

Государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

БОЛДОНОВА НАТАЛЬЯ АЛЕКСАНДРОВНА

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО
ЛЮТЕИНИЗИРУЮЩЕГО ГОРМОНА В ЦИКЛАХ
ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ**

14.01.01 – Акушерство и гинекология

Диссертация на соискание ученой
степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель
Дружинина Елена Борисовна
доктор медицинских наук

Иркутск – 2015

Оглавление

Список условных сокращений	4
Введение	6
Глава 1. Обзор литературы	14
1.1. Фолликуло- и оогенез: химические свойства и биологическое действие лютеинизирующего гормона	14
1.2. Нарушения фолликулогенеза, провоцируемые экзогенным лютеинизирующим гормоном при гонадотропиновой стимуляции яичников, и подходы к их профилактике	29
1.3. Место экзогенного лютеинизирующего гормона в протоколах овариальной стимуляции	35
Глава 2. Материалы и методы исследования	47
2.1. Материалы исследования	47
2.2. Методы исследования	49
2.2.1. Стимуляция овуляции	49
2.2.2. Трансвагинальная пункция. Эмбриологический этап	52
2.2.3. Статистический анализ полученных результатов	56
Глава 3. Результаты исследования	57
3.1. Клинико-anamnestическая характеристика пациенток	57
3.2. Оценка эффективности предыдущих циклов экстракорпорального оплодотворения	61
3.3. Сравнительная характеристика показателей индуцированного цикла при стимуляции яичников различными препаратами гонадотропинов	62
3.3.1. Анализ исходных клинико-anamnestических и клинико-лабораторных показателей у пациенток исследуемых групп	63
3.3.2. Анализ показателей эмбриологического этапа у пациенток исследуемых групп	65

3.3.3. Анализ показателей фолликуло- и стероидогенеза у пациенток исследуемых групп	68
3.3.4. Анализ биохимических показателей фолликулярной жидкости у пациенток исследуемых групп	74
3.3.5. Оценка эффективности применения двух протоколов стимуляции	78
3.4. Сравнительный анализ эффективности различных протоколов в зависимости от времени начала стимуляции ЧМГ или р-ЛГ	80
3.4.1. Анализ исходных клинико-anamнестических и клинико-лабораторных показателей у пациенток различных протоколов стимуляции	80
3.4.2. Анализ показателей эмбриологического этапа у пациенток различных протоколов стимуляции	82
3.4.3. Анализ показателей фолликуло- и стероидогенеза у пациенток различных протоколов стимуляции	86
3.4.4. Оценка эффективности применения четырех протоколов стимуляции	90
3.4.5. Корреляционный анализ биохимических показателей сыворотки крови и показателей фолликуло- и оогенеза у пациенток различных протоколах стимуляции	92
3.4.6. Анализ биохимических показателей фолликулярной жидкости у пациенток различных протоколах стимуляции	97
Глава 4. Обсуждение полученных результатов	100
Выводы	121
Практические рекомендации	123
Список литературы	124

Список условных сокращений

а-ГнРГ	агонист гонадотропин релизинг гормона
АМГ	антимюллеров гормон
ант-ГнРГ	антагонист гонадотропин релизинг гормона
ВРТ	вспомогательные репродуктивные технологии
Гн-РГ	гонадотропин релизинг гормоны
Е2	эстрадиол
ИКСИ	интраплазматическая инъекция сперматозоида
ИМТ	индекс массы тела
ИППП	инфекции, передающиеся половым путем
ЛГ	лютеинизирующий гормон
МЦ	менструальный цикл
ПЭ	перенос эмбриона
Р	прогестерон
РГ	релизинг-гормон
Р-ЛГ	рекомбинантный лютеинизирующий гормон
Р-ФСГ	рекомбинантный фолликулостимулирующий гормон
СГЯ	синдром гиперстимуляции яичников
СО	стимуляция овуляции
СПКЯ	синдром поликистозных яичников
Т	тестостерон
ТВП	трансвагинальная пункция яичников
ТТГ	тиреотропный гормон
УЗИ	ультразвуковое исследование
ФЖ	фолликулярная жидкость
ФСГ	фолликулостимулирующий гормон
ХГ	хорионический гонадотропин
ХГЧ	хорионический гонадотропин человека

ЧМГ	человеческий менопаузальный гормон
ЧНБ	частота наступления беременности
ЭКО	экстракорпоральное оплодотворение

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Проблемы сохранения и восстановления репродуктивного здоровья населения далеки от окончательного решения и выступают важнейшей медицинской задачей государственного значения [16, 18, 21, 41]. В настоящее время в Европе бесплодными являются около 10 % супружеских пар, в США – 8–15 %, в Канаде – около 17 % [122, 164]. Частота бесплодных браков на территории России колеблется от 8 до 17,8 %, в отдельных регионах превышая определенный ВОЗ критический уровень 15 %, при котором бесплодие может рассматриваться как фактор, значительно влияющий на демографические показатели и представляющий собой государственную проблему [31]. Поэтому лечение бесплодия следует рассматривать как резерв рождения желанных детей и перспективного увеличения репродуктивного потенциала населения.

Важнейший и принципиальный этап в лечении бесплодия – разработка и внедрение в клиническую практику методов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Эти методы дают возможность реализовать функцию деторождения при таких формах бесплодия, которые ранее считались абсолютно бесперспективными для лечения: отсутствие или полная непроходимость маточных труб, отсутствие или преждевременное истощение яичников [16]. На сегодняшний день термин ВРТ охватывает все виды лечения бесплодия, основанные на экстракорпоральном оплодотворении (ЭКО), а также применение гамет и эмбрионов донора, суррогатной матери, замораживания зародышевых клеток и эмбрионов, микроманипуляций (ИКСИ, преимплантационная генетическая диагностика, вспомогательный хетчинг) и т.д.

Впервые в мире ребенок, зачатый в пробирке, появился на свет в Англии в 1978 году благодаря трудам эмбриолога Р. Эдвардса и акушера-гинеколога П. Стептоу [57]. Метод стал быстро развиваться в других странах. В настоящее

время при помощи этого метода в мире зачато более 4 млн. детей. В России первый ребенок в рамках программы ЭКО родился в 1986 году [20].

Эффективность лечения бесплодного брака имеет выраженные колебания в зависимости от причин нарушения репродуктивной функции, возраста женщин и других факторов. Так, частота восстановления репродуктивной функции при трубно-перитонеальном бесплодии не превышает 30 %, в то время как после лечения эндокринного бесплодия беременность наступает у 80 % женщин [44]. Успех репродуктивных технологий приближается к 50 % у женщин в возрасте до 25 лет при длительности лечения около 3 лет и снижается до 15–20 % у женщин старше 35 лет, в анамнезе которых длительное лечение по поводу бесплодия. Частота наступления беременности в циклах ЭКО у женщин с различными формами бесплодия в среднем составляет 30–40 % [17].

В 2013 году в России по данным Российской ассоциации репродукции человека (РАРЧ) в программах ЭКО частота наступления беременности составила в расчете на цикл – 33,1 %, на пункцию – 34,2 %, на перенос эмбрионов – 38,5 %. В программах ИКСИ эти показатели составили соответственно 29,7; 30,8; 36,9 % [43].

Для проведения метода ЭКО женщине проводят стимуляцию овуляции при помощи гонадотропинов, что дает возможность получить у нее значительно больше яйцеклеток, чем в естественном цикле. После оплодотворения яйцеклеток *in vitro* и двух–пяти дней культивирования эмбрионов в специальной питательной среде отбирают эмбрионы для переноса в полость матки, для чего используют специальный катетер. Если наступает имплантация, то дальнейшее развитие беременности и родов проходит по обычным естественным механизмам [20].

Стимуляция функции яичников является основой программ вспомогательной репродукции, так как определяет характер ответа яичников на введение индукторов овуляции: число растущих фолликулов, количество и качество получаемых яйцеклеток и культивируемых эмбрионов [29]. Начиная с

60-х годов прошлого столетия, методики стимуляции претерпели значительные изменения.

В настоящее время отмечается тенденция применения «мягких» схем (небольшими дозами гонадотропинов) с целью снижения гиперстимуляции и ее негативного воздействия на организм женщины и на течение ранних сроков наступившей беременности [72]. Также в мире отказались от переноса двух и более эмбрионов с целью профилактики многоплодия. При большом количестве полученных эмбрионов осуществляют перенос 1–2 лучшего качества, лишние эмбрионы хорошего качества подвергают криоконсервации для переноса в нестимулируемом цикле.

Стимуляцию овуляции считают оптимальной, если удастся получить не менее 7 преовуляторных фолликулов. Созревание 5–6 или менее 5 фолликулов расценивается как субоптимальный или «бедный» ответ и встречается почти у трети пациенток позднего репродуктивного возраста (старше 35 лет) [11, 107]. Неадекватный ответ яичников приводит к снижению эффективности ЭКО.

На современном этапе нет единого мнения о выборе метода стимуляции, чтобы с одной стороны снизить риск осложнений, а с другой – обеспечить адекватный фолликуло- и оогенез и получить достаточное количество яйцеклеток хорошего качества [101, 170].

В нормальном менструальном цикле в первую половину фолликулярной фазы развитие фолликула подразумевает ФСГ-зависимый рост, во вторую половину начинается ЛГ-зависимый рост, когда происходит селекция доминантного фолликула [75, 185]. В современных циклах стимуляции овуляции преимущественно используются схемы с агонистами и антагонистами гонадотропин релизинг гормона (а-ГнРГ и ант-ГнРГ), что успешно решает проблему раннего пика ЛГ, а также с рекомбинантным фолликулостимулирующим гормоном (р-ФСГ), лишённого ЛГ-активности, что приводит к значительному снижению концентрации эндогенного ЛГ [66, 137]. С другой стороны, у пациенток старшего репродуктивного возраста отмечается

уменьшение числа функциональных ЛГ-рецепторов, что может приводить к снижению овариального ответа [107, 120, 147, 186]. Также существуют формы бесплодия, обусловленные гипоталамо-гипофизарными нарушениями, приводящими к тяжелой недостаточности ЛГ и ФСГ [46].

По данным литературы снижение концентрации ЛГ способствует нарушению адекватного стероидогенеза, ухудшает качество ооцит/эмбрионов, что приводит к уменьшению частоты имплантации, уменьшению пригодных для криоконсервации эмбрионов, увеличению частоты раннего прерывания беременности, увеличению частоты биохимической беременности [10, 22, 39, 100, 153]. Вышеуказанные причины абсолютной или функциональной недостаточности ЛГ для повышения эффективности ЭКО требуют дополнительного назначения в циклах стимуляции препаратов экзогенного ЛГ.

На рынке препараты, содержащие экзогенный ЛГ, представлены высокоочищенным человеческим менопаузальным гонадотропином (ЧМГ), а также рекомбинантным лютеинизирующим гормоном (р-ЛГ).

По данным литературы большинство мета-анализов проводят сравнение эффективности и безопасности применения р-ФСГ по сравнению с ЧМГ [129, 133], однако вопросы, посвященные сравнению особенностей фолликуло- и оогенеза при стимуляции овуляции ЧМГ по сравнению с р-ЛГ, изучены недостаточно [204].

В настоящее время остаются до конца не изучены вопросы клинической практики: какова роль ЛГ в фолликулогенезе индуцированного цикла, у каких групп пациенток добавление ЛГ повысит эффективность лечения бесплодия, какие дозы мочевого или рекомбинантного экзогенного ЛГ необходимы для осуществления адекватного фолликулогенеза, на каком этапе фолликулогенеза следует его добавлять, может ли добавление ЛГ в схему стимуляции преодолеть проблему «бедного ответа» и синдрома гиперстимуляции яичников (СГЯ).

Роль экзогенного ЛГ, выбор мочевых или рекомбинантных ЛГ-содержащих гонадотропинов в процессе стимулированного цикла являются

актуальными проблемами современной репродукции, что и послужило основанием для проведения нашей работы.

Цель исследования – оптимизировать протоколы стимуляции яичников в программах ВРТ с использованием р-ЛГ у пациенток с неудачными попытками ЭКО в анамнезе.

Задачи исследования:

1. Провести сравнительный анализ результатов программ ЭКО при использовании различных видов гонадотропинов (р-ФСГ+ЧМГ, р-ФСГ+р-ЛГ).
2. Провести сравнительный анализ результатов программ ЭКО в разных схемах стимуляции (добавление ЧМГ и ЛГ со 2–3-го или 6–7-го дня).
3. Определить взаимосвязь уровней ФСГ, Е2, ЛГ, Р и АМГ сыворотки крови в процессе индуцированного цикла с показателями фолликуло- и оогенеза при различных протоколах стимуляции яичников.
4. Определить взаимосвязь уровней ФСГ, Е2, ЛГ, Р и АМГ в фолликулярной жидкости с уровнями гормонов в сыворотке крови в день ТВП и с показателями фолликуло- и оогенеза.
5. Разработать рекомендации по выбору индивидуального протокола стимуляции яичников в программах ЭКО, способствующему повышению эффективности лечения.

Научная новизна. Впервые установлено, что добавление р-ЛГ с начала стимуляции у пациенток с низкими показателями овариального резерва, длительностью бесплодия более 8–9 лет, с предшествующими неудачными попытками ЭКО улучшает качество полученных ооцитов и эмбрионов, тем самым способствуя повышению частоты наступления беременности и срочных родов. Применение высоких доз гонадотропинов у данной категории пациенток не снижает частоту «бедного» ответа.

Установлено, что уровень ЛГ крови на 5–7-й день выше 3,0 mIU/ml ухудшает качество эмбрионов, а уровень АМГ в фолликулярной жидкости коррелирует с количеством пунктированных фолликулов и полученных яйцеклеток, что может служить дополнительным фактором для определения эффективности лечения методом ЭКО. Концентрации ФСГ, ЛГ и АМГ в периферической крови коррелируют с таковыми в фолликулярной жидкости. Концентрации E2 и P не коррелируют.

Теоретическая и практическая значимость. Теоретическое значение работы состоит в том, что изучены состояние репродуктивной системы, особенности фолликуло- и оогенеза, концентрации ФСГ, E2, ЛГ, P и АМГ в периферической крови в течение индуцированного цикла у пациенток в программах ЭКО при использовании различных протоколов стимуляции. Определена взаимосвязь гормонов в день ТВП и в фолликулярной жидкости, а также с показателями фолликуло- и оогенеза.

Практическая значимость работы состоит в том, что изученные процессы позволили оптимизировать методы лечения бесплодия у пациенток с низкими показателями овариального резерва и предшествующими неудачными попытками ЭКО путем добавления р-ЛГ с начала стимуляции.

Разработаны рекомендации по выбору индивидуального протокола стимуляции яичников, способствующему повышению эффективности лечения в циклах ЭКО.

Положения, выносимые на защиту:

1. Показатели фолликуло- и оогенеза в стимулируемом цикле определяются видом индуктора и днем его добавления в процессе стимуляции. Добавление р-ЛГ на начальных этапах фолликулогенеза в циклах ЭКО способствует оптимизации процессов оогенеза: уменьшению количества незрелых, а впоследствии неоплодотворенных яйцеклеток,

получению высокой доли эмбрионов хорошего качества – 78 %.

2. Применение протокола стимуляции р-ФСГ+р-ЛГ со 2–3-го дня у пациенток со сниженными показателями овариального резерва, длительным бесплодием более 8–9 лет и с предшествующими неудачными попытками ЭКО в анамнезе способствует повышению эффективности лечения бесплодия методом ЭКО в 1,5–2 раза – частота наступления беременности 30 %.

Личный вклад автора в проведенное исследование. Лично автором проведено клинико-анамнестическое обследование, статистическая обработка полученных результатов у 324 пациенток, получающих лечение по поводу бесплодия в циклах ВРТ. Изучена диагностическая значимость уровней гормонов в сыворотке крови и фолликулярной жидкости в процессе индуцированного цикла. Разработаны рекомендации по выбору индивидуального протокола стимуляции яичников, способствующему повышению эффективности лечения в циклах ЭКО.

Апробация работы. Работа обсуждена на заседании кафедры перинатальной и репродуктивной медицины ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования» Минздрава РФ 6 октября 2015 года.

Работа является победителем общероссийского научно-практического мероприятия «Эстафета вузовской науки–2014», научная платформа «Репродуктивное здоровье», состоявшегося на базе ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» 4–5 декабря 2014 года.

Результаты исследований были представлены на научно-практическом семинаре «Инновационные технологии в репродуктивной медицине» 23 июня 2015 года (Иркутск); IV-й международной научно - практической конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты репродуктологии» 11–12 сентября 2015 года (Иркутск).

Реализация и внедрение полученных результатов. Полученные результаты внедрены в практику работы отделения вспомогательных репродуктивных технологий Областного перинатального центра ГБУЗ «Иркутская областная клиническая больница».

Материалы исследования используются для практических занятий и лекций со слушателями семинаров кафедры перинатальной и репродуктивной медицины ГБОУ ДПО «Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования», аспирантами и клиническими ординаторами.

Публикации. По материалам выполненных исследований опубликовано в открытой печати 11 научных работ, 8 из которых в рецензируемых научных журналах, включенных ВАК Министерства образования и науки России в список изданий, рекомендуемых для публикации основных научных результатов диссертационных работ.

Структура и объем диссертации. Работа изложена на 149 страницах, состоит из введения и 4-х глав (обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследований и обсуждение полученных результатов), а также выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа иллюстрирована 25 таблицами и 16 рисунками. Использованная литература включает 57 источников на русском и 155 на английском языках.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Фолликуло- и оогенез: химические свойства и биологическое действие лютеинизирующего гормона

Основным научным достижением в области исследования репродуктивной функции явилась расшифровка механизмов эндокринного контроля менструального цикла. Изучены закономерности фолликулогенеза, процесса овуляции и формирования желтого тела, охарактеризованы механизмы гонадотропной регуляции этих процессов [17, 177].

Стадии фолликулогенеза от конца лютеиновой фазы предыдущего менструального цикла делят на следующие этапы [32]:

- набор когорты антральных фолликулов,
- селекция доминантного фолликула,
- овуляция с разрывом фолликула и выходом ооцита,
- формирование и функционирование желтого тела.

К менархе в яичниках девочки насчитывается 260 000–450 000 примордиальных фолликулов. Из них в течение жизни могут достигать овуляции только около 400–500, остальные подвергаются атрезии на различных стадиях развития [125].

А. Gougeon (2004) предложил следующую классификацию фолликулов:

1-й класс – преантральный фолликул (размер фолликула 0,11–0,22 мм, размер ооцита около 70 мкм, число клеток гранулезы 2100 ± 100);

2-й класс – ранний антральный фолликул (размер фолликула 0,2–0,4 мм, число клеток гранулезы 7600 ± 100);

3-й класс – малый антральный фолликул (размер фолликула 0,5–0,9 мм, число клеток гранулезы $33\ 000 \pm 1300$);

4-й класс – малый антральный фолликул (размер фолликула 0,9–2,0 мм, число клеток гранулезы $176\ 800 \pm 7\ 500$).

Размер ооцита в период роста с 1-го по 4-й класс увеличивается и составляет от 70 до 120 мкм.

5-й класс – антральный фолликул (размер фолликула 2–5 мм, число клеток гранулезы $933\ 500 \pm 44\ 900$);

6-й класс – большой антральный (графов) фолликул (размер от 5 до 10 мм, число клеток гранулезы $3\ 400\ 000 \pm 300\ 000$);

7-й класс – ранний доминантный фолликул (размер 10–14 мм, число клеток гранулезы $24\ 140\ 000 \pm 2\ 970\ 000$);

8-й класс – зрелый доминантный фолликул (размер 14–20 мм, число клеток гранулезы $54\ 760\ 000 \pm 4\ 610\ 000$). Размер ооцита становится также максимальным и достигает 120–150 мкм.

Рост фолликулов от стадии примордиального до стадии преантрального не зависит от ФСГ, и эта фаза роста называется гормонально-нечувствительной. При этом скорость роста крайне медленная, и фаза роста может продолжаться более 3 месяцев. Со стадии преантрального фолликула начинается так называемая гормонально-чувствительная фаза роста. Она характеризуется тем, что для роста фолликулов необходимо присутствие в крови хотя бы минимальных концентраций ФСГ. Начиная со стадии антрального фолликула, происходит выбор фолликулов, из которых в дальнейшем произойдет селекция доминантного фолликула. При этом рост фолликула становится абсолютно зависим от гипофизарных гонадотропинов – ФСГ и в меньшей степени ЛГ (гормонально-зависимая стадия роста) [1].

Лютеинизирующий гормон и ФСГ выделяются аденогипофизом, сходны по химической структуре, являются гетеродимерными гликопротеидами с молекулярной массой 28 и 35–45 кД соответственно и состоят из α - и β -субъединиц: α -субъединица – общая (в том числе для тиреотропного гормона (ТТГ) и хорионического гонадотропина (ХГ)), β -субъединица варьирует и этим определяется специфичность действия каждого гормона. Обе субъединицы синтезируются в одних и тех же клетках, но с участием разных генов.

Установлено, что у β -субъединицы ЛГ ген одинаков у человека, крысы и мыши [10, 46]. Длительность существования гликопротеидных гормонов в крови связана с содержанием в них сиаловой кислоты: чем больше ее в молекуле, тем продолжительнее время циркуляции гормона. В ЛГ содержится около 2 % сиаловой кислоты, значительно меньше, чем в ФСГ (5 %) и ХГ (10 %). Поэтому полупериод циркуляции молекулы ЛГ составляет лишь 1 час, тогда как молекулы ФСГ – 4 часа, а молекулы ХГ – 6 часов [40].

На протяжении менструального цикла у женщин репродуктивного возраста уровень ЛГ в крови постепенно повышается с предовуляторным пиком секреции и в последующем во время лютеиновой фазы снижается. Базальная концентрация ЛГ в крови не превышает 10 МЕ/л. В период предовуляторного пика уровень ЛГ может достигать 30–50 МЕ/л [54]. Средняя величина суточной продукции ЛГ у женщин с регулярным менструальным циклом составляет 100–500 МЕ с выраженным предовуляторным подъемом, в постменопаузе – 3 000–4 000 МЕ или в 2–7,5 раза выше, чем в репродуктивном периоде [111]. Скорость метаболического клиренса ЛГ составляет 30 мл/ч на 1 кг массы тела, что значительно превышает аналогичный показатель для ФСГ (8 мл/ч на 1 кг массы тела) [181].

Биологическое действие ФСГ направлено на фолликулогенез. Рецепторы ФСГ имеются в гранулезных клетках фолликулов, посредством которых ФСГ стимулирует рост и созревание фолликулов. Рецепторы к ЛГ имеются в тека-клетках, интерстициальных и лютеиновых клетках, а также в гранулезных в зависимости от стадии зрелости фолликула [46]. Действие ЛГ на фолликулогенез связано со способностью гормона модулировать овариальную продукцию половых стероидов [109].

Точный механизм выхода фолликулов из примордиального пула неизвестен, однако имеются предположения, что выходят из стадии примордиальных фолликулов те из них, которые теряют боковой контакт с другими примордиальными фолликулами. Рост фолликула начинается с

увеличением числа клеток гранулезы. Примечательно, что скорость выхода фолликулов из примордиального пула с возрастом увеличивается [85]. Полагают, что основным регулятором роста и атрезии первичных фолликулов являются местные аутокринно/паракринные пептиды [57], что процесс роста и атрезии фолликулов продолжается во всех возрастах, включая внутриутробный период и менопаузу, не прерывается беременностью, овуляцией или ановуляцией [46]. Доказано, что продукция антимюллера гормона (АМГ) растущими фолликулами тормозит выход в рост примордиальных фолликулов [152]. Также положительную роль в выходе примордиальных фолликулов из покоящегося пула могут играть инсулин и инсулиноподобный фактор роста -1 (ИПФР-1) [195].

В преантральном фолликуле происходит увеличение слоев гранулезы вокруг ооцита, что требует хотя бы минимального уровня ФСГ в сыворотке крови. Особую роль в этот период приобретает формирование блестящей оболочки ооцита (*zona pellucida*) [1]. В преантральных фолликулах на клетках гранулезы были обнаружены рецепторы к ФСГ, в тоже время на клетках формирующейся теки были выявлены рецепторы к ЛГ. Уже на стадии преантрального фолликула гранулезные клетки способны синтезировать три класса стероидов: преимущественно эстрогены, а также андрогены и прогестерон. Повышение уровня ФСГ индуцирует увеличение числа его рецепторов за счет роста числа гранулезных клеток. ФСГ индуцирует активность ароматазы – основного фермента, превращающего андрогены в эстрадиол. Полагают, что эстрадиол способен увеличивать число собственных рецепторов, оказывая прямой митогенный эффект на гранулезные клетки, не зависящий от ФСГ. Его рассматривают как паракринный фактор, усиливающий эффекты ФСГ, включая активацию процессов ароматизации [46]. Действие ФСГ осуществляется через аденилат-циклазную систему. Также обнаружено, что выработка андрогенов клетками теки под воздействием ЛГ стимулирует появление рецепторов к ФСГ на клетках гранулезы. Роль андрогенов в раннем

развитии фолликула сложна. Они являются не только субстратом для ФСГ-вызванной ароматизации в эстрогены, но могут в низких концентрациях усиливать процесс ароматизации. Когда уровень андрогенов увеличивается, преантральные гранулезные клетки преимущественно выбирают не путь ароматизации андрогенов в эстрогены, а более простой путь превращения в андрогены через 5α -редуктазу, образуется андроген, который не может быть конвертирован в эстроген, и таким путем ингибируется ароматазная активность. Этот процесс также ингибирует ФСГ и образование рецепторов к ЛГ, останавливая развитие фолликула. Таким образом, низкая концентрация андрогенов усиливает их ароматизацию и превращение в эстрогены. Высокая концентрация ограничивает процесс ароматизации, фолликул с высоким уровнем андрогенов подвергается процессам атрезии. Рост и развитие фолликула зависят от его способности превращать андрогены в эстрогены [114]. Важную роль в развитии фолликулов на преантральной стадии играют АМГ, эпидермальный фактор роста (ЭФР), трансформирующий фактор роста – β (ТФР – β), ИПФР – I и II, факторы роста фибробластов 2-го и 7-го типов, активин, SF-1 (фактор стероидогенеза 1-го типа) [207].

Под синергичным действием ФСГ и эстрогенов увеличивается продукция фолликулярной жидкости, в межклеточном пространстве гранулезных клеток образуется полость. Формирование полости в преантральном фолликуле имеет большое значение. Эта полость служит основным ресурсом для модуляции и накопления важнейших факторов, таких как гипофизарные гонадотропины, половые стероиды, факторы роста, ферменты, протеогликаны и другие биологически активные вещества, синтезирующиеся как местно в клетках гранулезы, теки и в самом ооците, так и поступающие из кровотока. Образование полости у фолликула также связано с тем, что только у полостных фолликулов ооцит может продолжить мейотическое деление, что используется в программе созревания в пробирке (IVM). Объем полости фолликула быстро увеличивается, и это требует васкуляризации, то есть присоединение к

сосудистому руслу яичника, что осуществляется через систему капилляров и артериол [1].

Начальные этапы роста антральных фолликулов могут происходить в присутствии крайне низких концентраций ФСГ и ЛГ, однако при достижении 2 мм в диаметре (5-й класс) данные фолликулы приобретают способность расти только в присутствии высоких доз ФСГ. Этот момент является критическим для фолликулогенеза и последующей селекции доминантного фолликула. Сам рост фолликула, который был до этого достаточно автономным, становится во всем зависимым от колебания уровня гипофизарных гонадотропинов в течение менструального цикла. В межовуляторный период у женщины проходит несколько волн роста фолликулов. Овуляцией и селекцией доминантного фолликула заканчивается только последняя волна, которая должна приходиться на начало или середину фолликулярной фазы цикла. Та волна, которая приходится на лютеиновую фазу цикла, приводит к атрезии растущих фолликулов. Более того, при тщательном изучении волн фолликулогенеза было обнаружено, что имеются так называемые минорные волны, при которых размер максимального фолликула не достигает 10 мм в диаметре, и майорные волны, где максимальный размер фолликула достигает 10 мм и различия в размере между наибольшим фолликулом (аналог доминантного) и вторым по величине (аналог субдоминантного) достигает 2 мм. Вероятно, в яичнике женщины постоянно вырабатываются волны роста больших антральных фолликулов, и только та волна заканчивается селекцией доминантного фолликула, при которой создана благоприятные условия гормонального окружения, когда фолликул может полноценно овулировать. Число фолликулов в волне зависит от возраста пациентки и показателей овариального резерва. В молодом возрасте и при сохраненном овариальном резерве волна может состоять из нескольких десятков фолликулов. В любом из этих случаев овулирует один фолликул, и лишь в редких случаях у человека наблюдается спонтанная овуляция двумя фолликулами и более [75, 86].

Процесс формирования группы фолликулов, из которых в последующем будет выбран доминантный, носит название «рекрутский набор» (recruitment). Рост фолликулов, находящихся на этой стадии роста, происходит только в присутствии растущей концентрации в крови ФСГ. Антральные фолликулы, которые формируют эту группу, характеризуются следующими параметрами. Во-первых, гранулеза этих фолликулов становится более чувствительной к действию ФСГ. В настоящее время признается, что одним из ведущих механизмов повышения этой чувствительности является снижение уровня АМГ в полости фолликула, при достижении им в диаметре 2 мм и более. Во-вторых, в гранулезе фолликулов происходит постепенный переход от продукции активинов (А и В) к продукции ингибинов. Действие активинов в антральных фолликулах важно, так как оно препятствует преждевременной лютеинизации фолликулов, повышает число рецепторов к ФСГ и возможно способствует зрелости ооцита. В-третьих, постепенно в фолликуле усиливается продукция эстрадиола [174]. Для обеспечения этого процесса необходимы следующие условия. Если единственной мишенью для ФСГ являются гранулезные клетки, то у ЛГ имеется много мишеней – это тека-клетки, стромальные, лютеиновые и гранулезные клетки. Способностью к стероидогенезу обладают и гранулезные, и тека-клетки, но ароматазная активность преобладает в клетках гранулезы. В антральном фолликуле ЛГ-рецепторы присутствуют только в тека-клетках, а рецепторы ФСГ – только на гранулезных клетках. В ответ на ЛГ тека-клетки продуцируют андрогены, которые затем, через вызванную ФСГ ароматизацию, превращаются гранулезными клетками в эстрогены. По мере роста фолликула тека-клетки начинают экспрессировать гены для ЛГ-рецепторов, P450_{scc} и 3 β -гидроксистероид-дегидрогеназу [144]. Яичниковый стероидогенез всегда ЛГ-зависим. По мере роста фолликула тека-клетки экспрессируют P450_c 17-энзим, который образует из холестерина андроген. Гранулезные клетки не имеют этого энзима и зависимы от тека-клеток в продукции эстрогенов из андрогенов (рисунок 1).

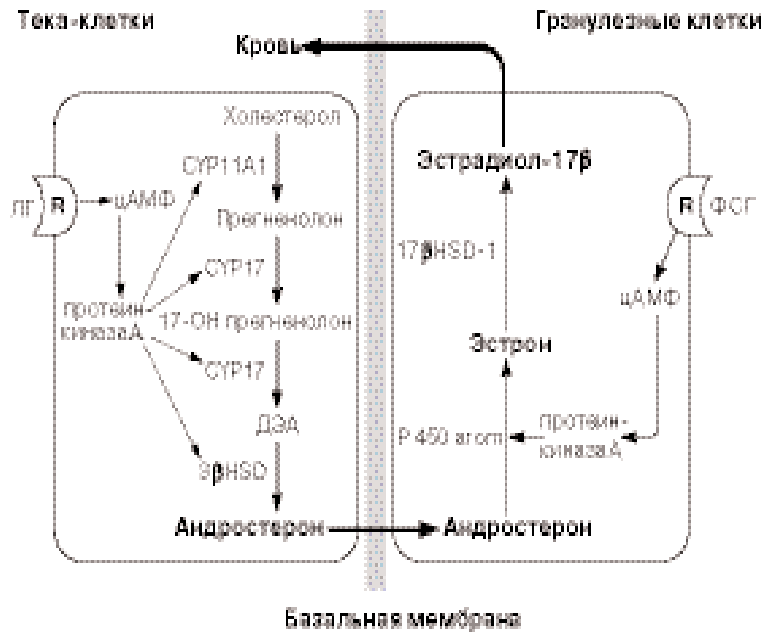


Рисунок 1 – Предполагаемый механизм регуляции синтеза эстрогенов (две клетки, два гонадотропина): цАМФ – циклический аденозинмонофосфат; R – рецепторы [46]

В отличие от стероидогенеза, фолликулогенез зависит от ФСГ. По мере роста фолликула и увеличения уровня эстрогенов приходит в действие механизм обратной связи – тормозится продукция ФСГ, что в свою очередь ведет к снижению ароматазной активности фолликула и, в конечном результате, к атрезии фолликула через апоптоз [46]. Этот механизм носит название «двухклеточная теория стероидогенеза» и характеризует синтез эстрадиола от «рекрутского набора» фолликулов 5-го класса до селекции доминантного фолликула. В-четвертых, в антральных фолликулах начинает действовать система инсулиноподобных факторов роста. Синтез ИПФР-1 происходит в клетках гранулезы под воздействием гормона роста. Однако для активации этого фактора роста необходимо заблокировать действие белков, связывающих ИПФР (ИПФРСБ). ИПФР-1 играет крайне важную роль как фактор, способствующий синтезу эстрадиола клетками гранулезы, и как

важнейший фактор роста этих клеток [1].

Рост фолликулов от 2 до 10 мм в диаметре занимает около 7 дней, и в середине фолликулярной фазы цикла (между 6-м и 8-м днём) происходит селекция доминантного фолликула. Самый ранний признак выбора доминантного фолликула – асимметричная секреция эстрогенов яичниками. Стимуляция ФСГ вызывает рост размера фолликулов, и к середине фолликулярной фазы цикла лидирующий фолликул достигает размера более 10 мм в диаметре. У фолликула, достигшего этого размера, наблюдается появление рецепторов к ЛГ в гранулезе. Стимуляция этих рецепторов к ЛГ вызывает активизацию ароматазы, и такой фолликул начинает продуцировать высокие концентрации эстрадиола в кровь, при этом наблюдается прямая корреляция между размером лидирующего фолликула и уровнем эстрадиола в крови женщины. Это вызывает по принципу обратной связи снижение уровня выработки ФСГ гипофизом и соответственно уменьшение концентрации этого гормона в крови. Асимметрия секреции эстрогенов яичниками сигнализирует об установлении в лидирующем фолликуле самоподдерживающегося эстрогенного микроокружения, подавляющего остальные фолликулы [8, 51]. Гранулеза лидирующего фолликула начинает вырабатывать гормон ингибин А, который также снижает уровень ФСГ. Снижение уровня ФСГ приводит к обратному развитию тех фолликулов, которые в своем росте полностью зависят от уровня ФСГ (2–10 мм в диаметре) и подвергаются атрезии, механизм которой связан с апоптозом [23]. В то же время лидирующий фолликул переходит с ФСГ-зависимого на ЛГ- и ФСГ-зависимый рост. В этом состоит механизм селекции доминантного фолликула. Высокий уровень эстрадиола в фолликулярной жидкости доминантного фолликула также обеспечивает и высокий уровень ИПФР-1, действие которого происходит при блокировании ИПФРСБ [134, 183]. Васкуляризация доминантного фолликула крайне важна, так как обеспечивает высокую концентрацию в фолликулярной жидкости гипофизарных гонадотропинов и других биологически активных веществ,

способных проникать из крови. Основным фактором, обеспечивающим васкуляризацию фолликулов, является васкулярный фактор роста эндотелия (ВФРЭ) [130, 136]. Также ВФРЭ играет важную роль как митоген для клеток гранулезы. В фолликулярной жидкости доминантного фолликула наблюдается выраженная корреляция между уровнем ВФРЭ и эстрадиола [155, 156].

Кульминацией нейрогуморальных процессов, обеспечивающих цикличность функции репродуктивной системы, является овуляция. Преовуляторный выброс ЛГ способствует овуляции фолликулов 8-го класса и вызывает вступление ооцита в фазу созревания, то есть возобновление и завершение I деления мейоза (заблокированного в профазе еще во внутриутробном периоде) от стадии герминативного пузырька до метафазы II, сопровождающееся цитоплазматическим созреванием, необходимым для оплодотворения и раннего эмбрионального развития [4]. Созревшая яйцеклетка выходит вместе с фолликулярной жидкостью и, благодаря специфическим анатомическим соотношениям между воронкой яйцевода и яичниками, попадает в яйцевод [45]. По многочисленным наблюдениям, у женщин овуляция происходит в среднем через 36 часов после выброса ЛГ. Основной физиологической реакцией в преовуляторный период является значительное увеличение секреции 17-β-эстрадиола. Когда эта секреция достигает критического уровня в течение 24-36 часов, происходит выброс ЛГ, в меньшей степени ФСГ, после чего уровень эстрогенов быстро снижается. Главные факторы, вызывающие преовуляторный выброс гонадотропинов, это повышенное выделение рилизинг-гормона (РГ), повышенная чувствительность гипофиза к ЛГ-РГ и самопотенцирующий эффект ЛГ-РГ на его собственное выделение. В преовуляторный период в фолликулах большого размера имеет место увеличение 17-β-эстрадиола и прогестерона и снижение пролактина, однако содержание в них ФСГ и ЛГ значительно меньше, чем в плазме. Содержание прогестерона в фолликулярной жидкости (ФЖ) доминантного фолликула может достигать непосредственно перед овуляцией 60 000-80 000 нмоль/л, что является одним из диагностических признаков

готовности фолликула к овуляции [95].

На основании морфологических исследований принято подразделять весь процесс овуляции на несколько стадий:

- в первой стадии (за 20–30 минут) фолликул уплощен, стенка его прозрачна, почти не возвышается над поверхностью яичника;

- вторая стадия – преовуляторная, на протяжении которой в течение 10–15 минут фолликул резко увеличивается в объеме, стенка его отчетливо выбухает над поверхностью яичника, а сосуды резко расширены. По мере образования стигмы в зоне ее локализации сосуды запустевают. Наряду с этим в других участках расширенные кровеносные сосуды как бы собирают в складку внутреннюю соединительную оболочку, обнажая в верхней части фолликула место разрыва;

- третья стадия – овуляторная, для нее характерно образование конуса и выход яйцеклетки. Сосуды на вершине фолликула исчезают, образуя стигму, наиболее истонченная часть бессосудистой зоны выпячивается в форме заостренного овуляционного конуса. Непосредственно за 2–3 секунды перед овуляцией конус фолликула еще больше заостряется и на его вершине выступает образование в виде сосочка. Формируется отверстие для выхода яйцеклетки [45]. После этого комплекс ооцит-яйценосный бугорок сравнительно медленно (в течение 2–5 минут) выделяется за пределы яичника. Из разорванной стенки фолликула на протяжении нескольких последующих суток может просачиваться ФЖ. В дальнейшем на месте овулировавшего фолликула формируется желтое тело, вырабатывающее прогестерон, который подготавливает эндометрий к имплантации эмбриона [3].

По мнению Д. Теппермена и соавт. (1989), процесс разрыва фолликулярной стенки при овуляции изучен весьма подробно. Вначале происходит набухание фолликула в результате накопления в нем жидкости. Возникают координированные изменения кровотока (гиперемия и повышение капиллярной проницаемости в текальном слое) и межклеточного матрикса в

фолликуле (общее разрыхление и распад межклеточных связей) [52]. Нарастание концентрации прогестерона сопровождается повышением синтеза простагландина F_{2a} и увеличением активности протеолитических ферментов в фолликулярной жидкости. Простагландин F_{2a} вызывает вазоконстрикцию и дальнейший распад тканей в апикальной части фолликула. В стенку преовуляторного фолликула мигрируют лейкоциты разных видов – нейтрофильные, базофильные и эозинофильные гранулоциты, Т- лимфоциты и моноциты, которые секретируют ряд биологически активных веществ (БАВ). Например, активированные макрофаги являются потенциальным источником таких медиаторов овуляции как протеазы, эйкозаноиды, цитокины и окись азота. В этой связи по характеру морфологических изменений и природе секретируемых клетками факторов описанные явления в ходе овуляции считают родственными воспалительной реакции («физиологическим» воспалением) [127]. Гуморальные воспалительные факторы стимулируют гранулезные клетки и клетки теки, повышая активность выработки ими факторов воспалительной реакции.

Растворение основного вещества и коллагеновых волокон в области стигмы обеспечивается активностью каскада ферментов, включающего металлопротеиназы матрикса, активатор плазминогена и калликреин. Источником ферментов служат собственные клетки стенки фолликула, а также мигрировавшие в нее лейкоциты. Коллагенолитическая активность усиливается под влиянием простагландинов E_2 и I_2 , которые опосредуют индуцированную ЛГ реакцию. Под действием ЛГ, ФСГ, простагландинов и стероидов яичников перед овуляцией в фолликуле повышается секреция активатора плазминогена – сериновых протеаз, которые расщепляют плазминоген с формированием плазмина. Плазмин активирует латентную коллагеназу (проколлагеназу) и запускает каскад протеолитических процессов, завершающихся растворением базальной мембраны и перифолликулярной стромы [25]. Мигрирующие в стенку фолликулов лейкоциты также продуцируют протеазы, которые

способствуют разрушению стенки фолликула.

Несмотря на гиперемию и отек стенки фолликула, давление в его полости непосредственно перед овуляцией не увеличивается, как полагали ранее, считая это причиной разрыва стенки фолликула. Роль сокращений миоидных клеток наружной теки как фактора, способствующего процессу овуляции, признается не всеми исследователями [3].

В то время как в доминирующей фолликуле происходит «физиологическое» воспаление, на организменном уровне наблюдается противоположная картина. Были получены данные о том, что в крови в овуляторный период происходит сдвиг баланса регуляторных факторов в сторону доминирования медиаторов с иммуносупрессорной и противовоспалительной активностью, отсутствующий в начале менструального цикла. Эти изменения в сочетании с увеличением регуляторных Т-лимфоцитов, снижением уровня спонтанной пролиферации мононуклеаров свидетельствует о супрессорной реакции иммунной системы. Причем у женщин со стимулированной овуляцией эти изменения были более выражены, чем при физиологическом менструальном цикле [6, 38, 98]. Однако К. Orvieto (2004) на основании установленного им значительного увеличения С-реактивного белка в ФЖ и в сыворотке крови делает вывод о том, что гиперстимуляция яичников потенцирует развитие системного воспаления [151].

В развитии овуляции проявляются взаимоналожение, взаимодействие и избыточность гормональных, паракринных и аутокринных механизмов клеточной регуляции, что, вероятно, увеличивает надежность процесса овуляции в случае нарушения отдельных регуляторных звеньев [3].

В течение 3 дней после овуляции гранулезные клетки увеличиваются, в них появляются характерные вакуоли, наполненные пигментом лютеином. Тека-лютеиновые клетки дифференцируются из теки и стромы и становятся частью желтого тела. Активность стероидогенеза и длительность жизни желтого тела определяется уровнем ЛГ. Пик прогестерона наблюдается на 8-й

день после пика ЛГ. Отмечено, что прогестерон и эстрадиол в лютеиновую фазу секретируются эпизодически в корреляции с пульсовым выходом ЛГ [108]. С образованием желтого тела контроль над продукцией ингибина переходит от ФСГ к ЛГ. Содержание ингибина повышается вместе с увеличением эстрадиола до пика ЛГ; этот процесс продолжается и после пика ЛГ, хотя уровень эстрогенов снижается [65]. Снижение ингибина в конце лютеиновой фазы вносит свой вклад в увеличение ФСГ для следующего цикла. Желтое тело очень быстро, на 9–11-й день после овуляции, уменьшается. Механизм дегенерации неясен, но он не связан с лютеолитической ролью эстрогенов или с рецепторно-связанным механизмом, как это наблюдается в эндометрии [162]. Полагают, что эстрогены, продуцируемые желтым телом, требуются для синтеза рецепторов прогестерона в эндометрии. Эстрогены лютеиновой фазы также необходимы для связанных с прогестероном изменений в эндометрии после овуляции. Неадекватное развитие рецепторов прогестерона, как следствие неадекватного содержания эстрогенов, является, возможно, дополнительным механизмом бесплодия и ранних потерь беременности, другой формой неполноценности лютеиновой фазы. Длительность желтого тела устанавливается в момент овуляции. Оно непременно подвергнется регрессии, если не будет поддержано хорионическим гонадотропином в связи с беременностью. Таким образом, регрессия желтого тела ведет к снижению уровня эстрадиола, прогестерона и ингибина. Снижение уровня ингибина снимает его подавляющее влияние на ФСГ; снижение эстрадиола и прогестерона позволяет очень быстро восстановить секрецию ГнРГ и снять механизм обратной связи с гипофиза. Снижение уровней ингибина и эстрадиола совместно с увеличением ГнРГ дает превалирование ФСГ над ЛГ (рисунок 2). Увеличение уровня ФСГ приводит к росту фолликулов с последующим выбором доминантного фолликула, и начинается новый цикл – и в том случае, если не наступила беременность [46].

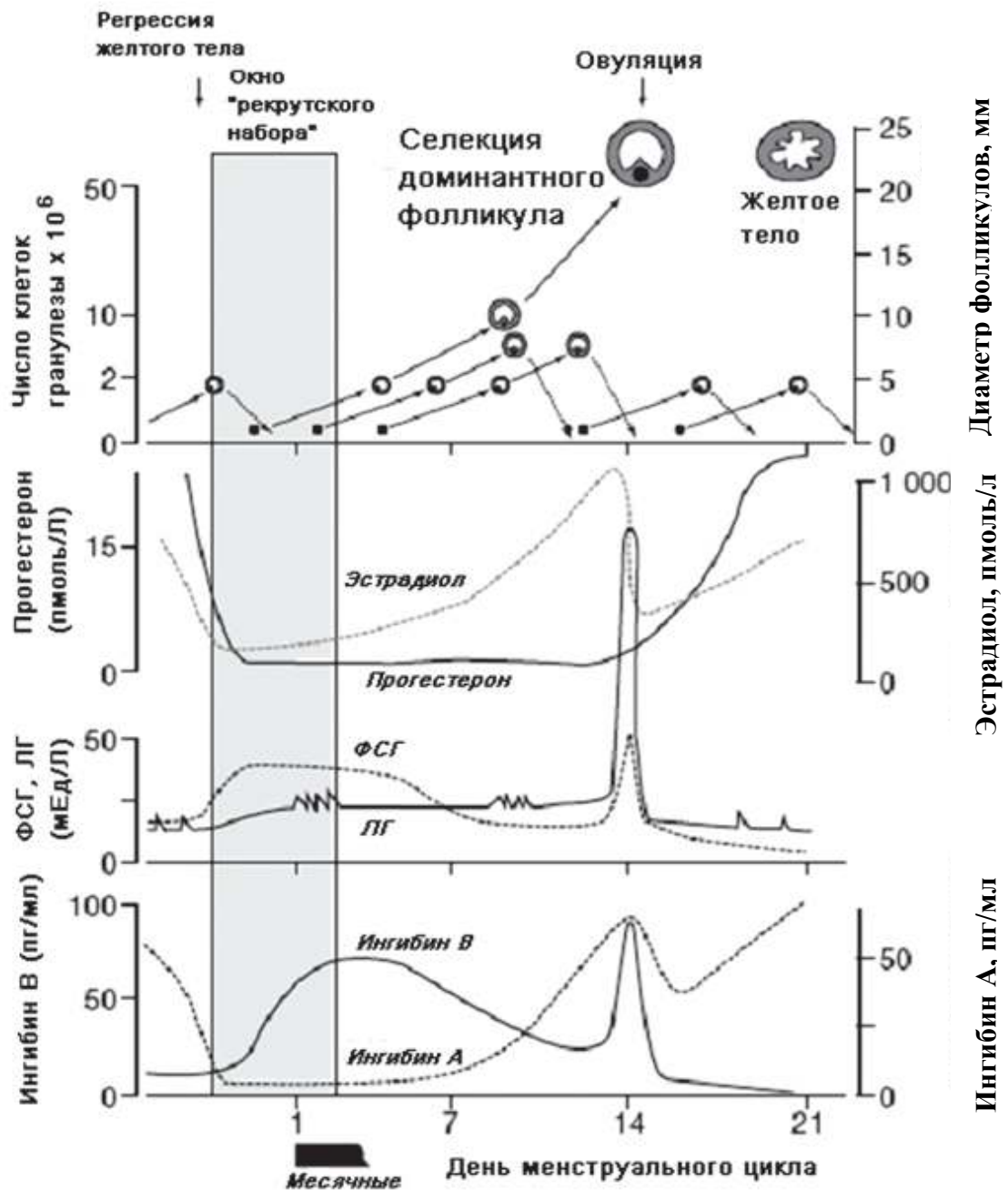


Рисунок 2 – Взаимоотношение гормонов в менструальном цикле женщины и волны фолликулогенеза [1]

Представленные выше сведения показывают, что изучение механизмов созревания фолликулов и овуляции находится в состоянии активной разработки, однако еще далеки от разрешения. Дальнейшее изучение механизмов процесса овуляции позволит создать правильное представление о

физиологии яичника человека. Понимание этих механизмов представляет существенный клинический интерес, поскольку нарушения фолликулогенеза и овуляции лежат в основе разнообразных расстройств женской репродуктивной системы. Более того, на процессе овуляции сфокусировано особое внимание клиницистов – гинекологов, репродуктологов и эндокринологов, осуществляющих ее стимуляцию для лечения бесплодия или блокирование с целью контрацепции. Детальное знание предовуляторных изменений насущно необходимо для проведения эффективной стимуляции функции яичников с получением ооцитов высокого качества и в необходимом количестве, которые в дальнейшем используются для вспомогательной репродукции.

1.2. Нарушения фолликулогенеза, провоцируемые экзогенным лютеинизирующим гормоном при гонадотропиновой стимуляции яичников, и подходы к их профилактике

Одним из наиболее, важных этапов программ ВРТ является получение достаточного количества зрелых предовуляторных ооцитов «хорошего качества». Поэтому контролируемая овариальная стимуляция является неотъемлемой частью программ ВРТ и заключается в использовании различных гормональных препаратов, оказывающих прямое или опосредованное воздействие на яичник и вызывающих рост одновременно нескольких фолликулов [2, 7]. Методики стимуляции, описанные в литературе, при сохранении общих принципов значительно различаются в деталях. В настоящее время нет единого мнения о выборе оптимального протокола стимуляции, который позволили бы, с одной стороны, обеспечить адекватный фолликулогенез и получение зрелых ооцитов, а с другой – характеризовался бы минимальной вероятностью осложнений [170].

В 1958 году Бруно Люненфельд впервые успешно стимулировал овуляцию с помощью гонадотропинов, экстрагированных из человеческого

гипофиза. Несколько позже, в 1960-х годах удалось выделить и очистить гонадотропины из мочи женщин в постменопаузе. Однако только с 1980 года индукция овуляции препаратами человеческого менопаузального гормона (ЧМГ) прочно вошла в клиническую практику [47, 48]. Препараты ЧМГ содержали в своем составе ФСГ и ЛГ. Ранее полагали, что ФСГ в препаратах ЧМГ играет решающую роль в формировании когорты развивающихся и отборе лидирующих фолликулов, а ЛГ не является необходимым в протоколах индуцируемого фолликулогенеза [10]. Более того, именно с содержащимся в ЧМГ экзогенным ЛГ (с его потенцирующим действием на синтез эстрогенов) связывалась вероятность провоцирования «паразитарных» пиков эндогенного ЛГ [10, 181]. Было установлено, что преждевременная высокая секреция ЛГ сопровождается ускоренным созреванием ооцитов и как следствие их лютеинизацией до наступления овуляции [181]. Последствием «паразитарных» выбросов ЛГ нередко становится отмена лечебного цикла либо из-за сниженной способности полученных ооцитов к оплодотворению *in vitro*, либо из-за отказа от переноса эмбрионов вследствие их морфологических дефектов. Такие нарушения приводят к заметному снижению эффективности ЭКО по показателю частоты наступления беременности, а также частоты рождений из-за возрастания ранних репродуктивных потерь. Последнее объясняется тем, что эмбрионы, полученные при оплодотворении ооцитов у женщин с «паразитарным» пиком ЛГ на фоне стимуляции овуляции, характеризуются худшей способностью как к имплантации, так и к дальнейшему развитию даже при отсутствии визуально определяемых дефектов на этапе их культивирования *in vitro* [10, 21, 181].

В настоящее время используются два подхода к предотвращению спонтанных пиков ЛГ:

1. Проведение овариальной стимуляции экзогенными гонадотропинами на фоне подавления продукции эндогенных гонадотропинов;

2. Совершенствование состава препаратов гонадотропинов путем использования чистого ФСГ вместо ЧМГ.

Первый подход преследует цель предотвратить саму возможность усиления продукции эндогенного ЛГ в процессе применения контролируемой дозы экзогенных гонадотропинов при индуцированной десенситизации гипофиза агонистами или антагонистами гонадотропин-рилизинг гормона (а-ГнРГ и ант-ГнРГ) [19]. Второй подход основан на предпосылке, что при стимуляции фолликулогенеза с применением только ФСГ вероятность «паразитарных» пиков эндогенного ЛГ снижается, поскольку препараты чистого ФСГ в меньшей степени стимулируют образование эстрогенов в отличие от ЧМГ, содержащего в своем составе экзогенный ЛГ [113].

В середине 1980-х был получен «чистый» ФСГ путем удаления ЛГ из ЧМГ с помощью полисомальных антител к ХГ, однако эти препараты все-таки содержали ЛГ 1 МЕ на каждые 75 МЕ ФСГ, а также большое количество примесей. В 1990-х годах была разработана генно-инженерная технология получения ФСГ *in vitro*. Были получены высокоочищенные рекомбинантные гонадотропины, имеющие высокую биохимическую чистоту и удельную биологическую активность. На молекулярном уровне аминокислотный состав и последовательность индивидуальных субъединиц рекомбинантного ФСГ соответствует природному ФСГ человека [48, 55, 56].

Для большей надежности предупреждения «паразитарных» пиков ЛГ эти два подхода сегодня достаточно часто используются одновременно. Следует отметить, что для реализации первого из указанных выше подходов к предотвращению спонтанных пиков ЛГ первоначально были разработаны схемы с а-ГнРГ.

А-ГнРГ были первоначально созданы для лечения бесплодия, обусловленного гипогонадотропным гипогонадизмом. Механизм действия а-ГнРГ состоит из двух фаз. В начале введения препарата по принципу прямой регуляции в аденогипофизе происходит значительное усиление секреции ФСГ

(более чем в 2 раза) и особенно ЛГ (более чем в 4 раза) – «flare up» эффект. Увеличение уровня гонадотропинов ведет к возрастанию секреции E_2 яичниками, которая достигает максимума через 24 часа. Это так называемая фаза активации. При продолжающемся введении препарата происходит потеря функциональной активности связанных а-ГнРГ рецепторов на поверхности клеток аденогипофиза, и рецепторы теряют способность отвечать на секреторные сигналы. Вследствие падения уровня гонадотропинов в крови возникает блокада функциональной активности яичников, сопровождающаяся резким падением уровня эстрадиола в крови – фаза «десенситизации» [48, 97, 106]. После прекращения введения и окончания действия а-ГнРГ спонтанная гипофизарная и яичниковая секреторная активности быстро восстанавливаются.

Ант-ГнРГ не способны стимулировать секрецию ЛГ и ФСГ и не влияют на синтез гонадотропинов. Механизм действия ант-ГнРГ противоположен действию а-ГнРГ. После введения препараты ант-ГнРГ конкурентно блокируют рецепторы в гипофизе. Истощения резервных запасов ЛГ и ФСГ в гонадотрофах гипофиза не происходит. Продолжительность действия препарата также зависит от вводимой дозы. Активации рецепторов при этом не происходит, а, следовательно, не возникает нежелательный эффект, проявляющийся в виде фазы активации, обычно наблюдаемый при использовании а-ГнРГ. Кроме того, не происходит десенситизации гипофиза, т.е. количество рецепторов ГнРГ не снижается. Благодаря такому механизму действия препараты ант-ГнРГ контролируют секрецию гонадотропинов. После введения ант-ГнРГ концентрация ЛГ и ФСГ в плазме крови снижается в течение нескольких часов, причем секреция ФСГ снижается в меньшей степени, чем секреция ЛГ. В условиях отсутствия предварительной стимуляции угнетение секреторной функции гипофиза происходит в течение нескольких часов после введения препарата и поддерживается благодаря продолжению такого лечения. После прекращения введения ант-ГнРГ функция гипофиза восстанавливается в течение нескольких дней [91, 188]. Препараты ант-ГнРГ

были специально созданы для применения в циклах стимуляции яичников, особенно при использовании вспомогательных репродуктивных технологий. Они появились значительно позже а-ГнРГ. В европейских странах клинические испытания антагонистов завершились в 2000 году. Российские специалисты получили опыт применения ант-ГнРГ в 2002 году.

На сегодняшний день появилось большое количество различных модификаций протоколов индукции овуляции, как при использовании агонистов (стандартный «длинный» протокол, «короткий» протокол, «супердлинный» протокол), так и антагонистов ГнРГ (фиксированный, «гибкий» протокол). Однако выбор наиболее оптимального протокола при той или иной гинекологической патологии остается предметом дискуссии в виду множества составляющих клинического успеха. В литературе нет четко прописанных показаний для применения того или иного протокола [27]. Предполагалось, что препараты ант-ГнРГ вытеснят из циклов ВРТ, ранее длительно использовавшиеся а-ГнРГ. Но этого не случилось: в протоколах ВРТ нашлось место, как антагонистам, так и агонистам ГнРГ.

В настоящее время многие клиницисты отдают предпочтение протоколам с а-ГнРГ. По мнению некоторых авторов [49], при использовании а-ГнРГ в «длинных» и «супердлинных» протоколах стимуляции развивается когорта лучше синхронизированных фолликулов. Предварительное использование а-ГнРГ до начала стимуляции приводит к подавлению биосинтеза эндогенных гонадотропинов, вследствие чего в когорте развивающихся фолликулов уменьшается количество фолликулов малых размеров (диаметр менее 14 мм) и увеличивается количество средних (диаметр 15–19 мм) и больших фолликулов (диаметр более 20 мм). Применение а-ГнРГ блокирует пополнение пула за счет новых преантральных фолликулов и вместе с гонадотропинами способствует развитию антральных фолликулов средних и больших размеров, что является предпосылкой для получения большего количества «зрелых» ооцитов и, как следствие, эмбрионов более высокого качества [12, 15, 27, 48].

Огромный резонанс произвел анализ Н. Al-Inany, М. Adoulgar опубликованный в Cochrane Database в 2001 году, в котором было показано, что антагонисты достоверно укорачивают время стимуляции и снижают расход гонадотропинов, а, следовательно, стоимость лечения (примерно на 40 % по сравнению с «длинным» протоколом с а-ГнРГ). Вопрос об оптимальном режиме назначения ант-ГнРГ остается открытым. По мнению некоторых исследователей [10, 152], преимущество «гибкого» режима введения ант-ГнРГ перед фиксированным состоит в том, что в первом случае обеспечивается более полноценное созревание фолликулов, что улучшает показатели эффективности ЭКО по критерию частоты наступления беременности на перенос эмбриона. Однако другие авторы (Mochtar M., Van Krevel H., Hamilton C. et al., 2003) не смогли подтвердить эти данные и отметили, что на фоне использования ант-ГнРГ в «гибком» режиме спонтанные пики ЛГ могут происходить до момента достижения фолликулами размеров, которые являются показанием к началу использования ант-ГнРГ. По мнению Т.А. Назаренко (2013) ант-ГнРГ приводят к выраженному подавлению ЛГ именно в тот период, когда фолликулы для своего развития и дозревания ооцитов нуждаются в этом гормоне в циклах, где используются рекомбинантные гонадотропины. Супрессия ЛГ и снижение E2 могут влиять на имплантацию и рецепторный аппарат эндометрия. Из этого следует, что добавление ЛГ одновременно с назначением ант-ГнРГ могло бы решить эти проблемы, однако сравнительные исследования не смогли подтвердить это предположение [132, 133]. Несмотря на неоднозначное к ним отношение ант-ГнРГ прочно вошли в клиническую практику и широко используются в программах ЭКО.

Известно, что негативное влияние на результаты программ ВРТ оказывает «бедный» ответ яичников на гонадотропиновую стимуляцию, который затрудняет или делает невозможным выбор эмбрионов лучшего качества для переноса их в полость матки из-за малого числа созревающих фолликулов, малого количества получаемых из них ооцитов, и в особенности, еще меньшее количество получаемых эмбрионов после инсеминации

яйцеклеток. Некоторые авторы [26, 90] рекомендуют при сниженном овариальном резерве применять протоколы с ант-ГнРГ, так как ожидается «бедный» ответ на СО, а выраженная десенситизация гипоталамо-гипофизарной системы препаратами а-ГнРГ может повлечь либо отсутствие ответа на стимуляцию, либо тот же «бедный» ответ, но доза гонадотропинов значительно увеличивается при использовании а-ГнРГ. Однако ант-ГнРГ применяются и у молодых пациенток с хорошим овариальным резервом, что позволяет избежать таких осложнений стимуляции, как синдром гиперстимуляции яичников (СГЯ).

Проведено достаточно много широкомасштабных рандомизированных исследований по сравнению протоколов стимуляции с агонистами и антагонистами ГнРГ. Согласно популяционно-статистическому исследованию FIVNAT (French In Vitro National) [158], применение в селективной популяции во Франции «длинного» протокола с а-ГнРГ обеспечивало несколько большую (на 5,4 %; $p < 0,05$) эффективность лечения по показателю частоты наступления беременности (ЧНБ) на перенос эмбриона в сравнении с ант-ГнРГ. Н. Al-Inany, М. Adoulghar (2002) в своей работе показали достоверно меньшее число наступления беременностей при использовании ант-ГнРГ. В исследовании N. Prapas (2005) при проведении стимуляции овуляции (СО) в группе здоровых пациентов–доноров ооцитов не получено было достоверной разницы по показателю ЧНБ. В других исследованиях [117, 124] была зарегистрирована практически одинаковая эффективность программ ВРТ при использовании агонистов и антагонистов ГнРГ. Большинство проведенных исследований показало, что достоверной разницы в результатах лечения не обнаружено.

1.3. Место экзогенного лютеинизирующего гормона в протоколах овариальной стимуляции

На протяжении последних лет вопрос о роли ЛГ в циклах контролируемой овариальной стимуляции в ВРТ привлекает повышенное

внимание [39]. В литературе на этот счет имеется три мнения. Согласно первому, ЛГ не улучшает результатов лечения [94, 131] и даже может их ухудшать [194]. Это мнение в 90-е годы имело много сторонников, однако в последнее время в клинической практике оно пересматривается: стало ясно, что у некоторых пациенток в циклах с супрессией гипофиза одного ФСГ для хорошего ответа яичников может быть недостаточно [87, 182]. Кроме того, было четко показано, что назначение при необходимости 75–150 МЕ ЛГ не вызывает нежелательных последствий, таких как ранняя лютеинизация [148, 201]. Последняя, как и ее влияние на исходы лечения, была хорошо известна до начала применения аналогов ГнРГ [160], когда раннюю лютеинизацию рассматривали как следствие преждевременного повышения уровня эндогенного ЛГ [139]. Второе мнение заключается в том, что ЛГ показан всем женщинам, так как он усиливает ответ яичников на ФСГ, позволяя сократить длительность стимуляции и таким образом снизить расходы на лечение при равной или даже более высокой эффективности, чем при применении только ФСГ [64, 165, 203]. Согласно третьей точке зрения, у которой сегодня наибольшее число сторонников, ЛГ может быть полезным в определенных клинических ситуациях [201, 209]. Предметом споров остаются несколько нерешенных вопросов: в каких именно клинических ситуациях назначение ЛГ будет полезным (у всех пациенток, у пациенток с недостаточным ответом на стимуляцию или у пациенток с нормальным ответом и низким базальным уровнем ЛГ, у пациенток позднего репродуктивного периода); каким должен быть протокол стимуляции (тип и схемы применения а- или ант-ГнРГ); какой препарат с ЛГ-активностью выбрать (рекомбинантный ЛГ (р-ЛГ) или человеческий менопаузальный гонадотропин); и наконец, в какой дозе и режиме следует назначать экзогенный ЛГ [88, 138, 140, 201, 203].

Известно, что согласно двухклеточной теории фолликулогенеза, для нормального роста фолликула в спонтанном менструальном цикле необходимо участие обоих гонадотропинов – ФСГ и ЛГ. Если на первых этапах, в раннюю и

среднюю фолликулярную фазу, ключевое значение имеет ФСГ, то в позднюю фолликулярную фазу и в преовуляторный период гонадотропины меняются ролями. Теперь уже ведущим является ЛГ, без которого не происходит окончательного созревания ооцита, подготовки к овуляции и сам процесс овуляции. Работами ряда авторов показано, что на определенном этапе фолликулогенеза, а именно, когда фолликул достигает размера 14–15 мм, он может расти самостоятельно, без продолжающейся ФСГ-стимуляции, в то время как ЛГ в этот и последующие периоды необходим [154, 185]. Казалось бы, принципиальные позиции изучены и понятны, но не ясны детали: каким должен быть уровень ЛГ в раннюю, среднюю фолликулярные фазы и преовуляторный период; какова динамика концентрации ЛГ в течение менструального цикла и имеет ли значение уровень ЛГ для выбора доминантного фолликула и атрезии остальных [22]. Отсутствует четкое определение понятия «ЛГ-недостаточность».

Показано, что базальная концентрация ЛГ в овуляторном менструальном цикле, как правило, не превышает 10 МЕ/л, а в период преовуляторного пика она может достигать 30–50 МЕ/л. Более того, работами J. Chappel, C. Howles (1991) определена пороговая концентрация ЛГ в плазме крови, достаточная для стимуляции тека-клеток, – от 1 до 10 МЕ/л. По мнению других исследователей [154], величина ЛГ, равная 2,5 МЕ/л, является оптимальной для обеспечения адекватного фолликулогенеза. L. Sommer et al. (1994) установили, что для адекватного стероидогенеза в яичниках достаточно стимуляции всего 1 % рецепторов ЛГ. Однако G. Caglar et al. (2005) считают определение концентрации ЛГ в крови бессмысленным, так как ЛГ высвобождается в пульсирующем режиме и однократное его определение ничего не даст. Кроме того, есть мнение, что сывороточные концентрации ЛГ изначально являются довольно приблизительным показателем его биоактивности [200] и не зависят от введения экзогенно ЛГ [79, 168]. Точность определения концентрации ЛГ в плазме зависит как от специфичности, так и от чувствительности

используемых радиоиммунных методов [37]. Изобилие радиоиммунных наборов с различными пороговыми значениями, которые используются для оценки степени супрессии ЛГ, приводят к значительной гетерогенности публикуемых результатов о распространении и степени подавления уровня ЛГ у пациентов после десенситизации или супрессии гипофиза, варьирующей от 12 до 70 % [153, 178, 191, 210].

В 1994 году S. Hillier сформулировал концепцию потолочных значений ЛГ. Согласно этой концепции, для синтеза эстрадиола и адекватного развития фолликулов необходимо определенное количество ЛГ. При концентрации ниже пороговых значений нарушаются паракринные механизмы регулирования гранулезных клеток, прекращается нормальное развитие фолликулов, нарушается пролиферация эндометрия, что приводит к неполноценной лютеиновой фазе [76, 169, 202]. Высокие концентрации ЛГ в крови подавляют ароматазную активность гранулезы, вызывая атрезию фолликулов или же их преждевременную лютеинизацию, что сопровождается нарушением оплодотворения, снижением частоты наступления беременности и повышением частоты невынашивания беременности [120]. Таким образом, существует так называемое «терапевтическое окно» ЛГ, то есть пороговая концентрация (1–10 МЕ/л) наиболее оптимальная для адекватного фолликулогенеза [123].

Лютеинизирующий гормон – это гетеродимер, состоящий из двух нековалентно связанных субъединиц α и β , которые образуются в аденогипофизе. Наиболее частым полиморфизмом служит вариант v - β ЛГ с частотой носительства от 0 до 52 % в различных этнических группах [78]. На основании клинических данных было установлено, что короткодействующий вариант v - β ЛГ обладает меньшей биоактивностью, чем немутантный тип ЛГ, несмотря на его сильную активность *in vitro* [67]. C. Alviggi et al. (2009) показали, что v - β ЛГ чаще выявляют у женщин с повышенным общим потреблением экзогенного рекомбинантного ФСГ (p-ФСГ) во время стимуляции яичников и малым числом полученных яйцеклеток по сравнению с

женщинами с нормальным потреблением и ответом на р-ФСГ [190]. Авторы заключили, что субоптимальный ответ яичников на р-ФСГ можно объяснить меньшей биоактивностью ЛГ. Более того, в свете последних исследований полиморфизма рецепторов гонадотропинов можно предположить, что существуют индивидуальные, генетически обусловленные различия ответа на экзогенный ФСГ и резидуальный эндогенный ЛГ [104].

В настоящее время на рынке препараты гонадотропинов с ЛГ-активностью представлены в виде менотропинов и р-ЛГ.

Менотропин, известный также как человеческий менопаузальный гонадотропин (ЧМГ), является родоначальником препаратов гонадотропинов. Менотропин представляет собой экстракт мочи постменопаузальных женщин с фиксированным соотношением ФСГ- и ЛГ-активности. Однако лютеинизирующая активность ЧМГ обусловлена комбинацией ЛГ и хорионического гонадотропина человека (ХГЧ) в различных соотношениях [189], что объясняет ее вариабельность от серии к серии. Заявленную активность (например, 75 МЕ) мочевых препаратов, включая ЧМГ, проверяют путем биопроб на животных. Этот метод допускает существенную вариабельность, поэтому с уверенностью судить о точном содержании представленных гормонов невозможно. Термин «менотропин» отражает источник гормональной активности, а не чистоту лиофилизированного экстракта мочевых белков. Препараты ЧМГ могут содержать всего лишь менее 5 % активных гонадотропинов, остальные белки в них представлены негонадотропными примесями [83]. Ранее сообщалось о присутствии эпидермального фактора роста, которое удалось устранить благодаря повышению степени очистки препаратов ЧМГ [102]. В недавно проведенном исследовании комплексный протеомный анализ показал наличие в ЧМГ 23 белков, не связанных с гонадотропинами, причем о присутствии 16 из них ранее не сообщалось. Оказалось, что ЧМГ содержат ингибитор протеина С, ингибитор эластазы лейкоцитов, цинк-2-гликопротеин, белок I, связывающий фактор некроза опухоли, иммуноглобулины, урокиназу, которые могут

подавлять пенетрацию сперматозоида в ооцит, нарушать развитие бластоцист и останавливать рост эмбрионов, подавлять дифференцировку гранулезных клеток и снижать продукцию эстрогенов [96, 126, 179]. Все это может негативно отражаться на результатах лечения методом ЭКО, хотя убедительные клинические доказательства этого влияния пока не получены. Наличие белковых примесей в ЧМГ может повышать риск аллергических реакций, однако следует признать, что в клинической практике они встречаются не так часто. В 2010 году на конгрессе Международной федерации обществ фертильности (IFFS) были представлены данные по обнаружению прионных белков в ЧМГ, в то время как в рекомбинантных аналогах никаких примесей выявлено не было. Однако это требует дальнейших исследований. Несмотря на недостатки, препараты менотропина в течение длительного периода оставались единственными доступными гонадотропинами. Дальнейшее усовершенствования методов преодоления бесплодия способствовало увеличению мировых потребностей в более надежных и постоянных препаратах гонадотропинов. Рекомбинантная эволюция обеспечила надежное производство гонадотропинов высокой степени очистки и постоянства состава для технологически интенсивных ВРТ. С конца 1980-х годов центр биотехнологических исследований компании Merck Serono в США занимался проблемой производства рекомбинантных гонадотропинов. В течение десятилетия был разработан первый препарат рекомбинантного человеческого лютеинизирующего гормона (лютропин альфа). Р-ЛГ обладает значительными преимуществами перед препаратами ЧМГ:

- единственный изолированный ЛГ, что позволяет индивидуально дозировать ЛГ и ФСГ;
- оптимальная степень очистки, что сопровождается хорошей переносимостью;
- высокое постоянство от серии к серии, что обеспечивает наилучший контроль дозирования;
- период полувыведения идентичен человеческому ЛГ.

Гипогонадотропный гипогонадизм является хорошим примером для изучения влияния гонадотропинов на функцию яичников. Показано, что при данной патологии введение лишь ФСГ может приводить к росту фолликулов, но при этом не происходит созревания ооцитов, такая стимуляция оказывается безуспешной [176, 187]. Другие многочисленные исследования доказали эффективность стимуляции при гипогонадотропном гипогонадизме менопаузальными гонадотропинами (содержащими оба гонадотропина), однако подчеркнута необходимость больших доз гонадотропинов и длительной стимуляции [176]. Первые рандомизированные исследования по применению р-ЛГ были проведены именно на этой группе пациенток [79, 168]. В ходе исследования установлен пороговый параметр для определения тяжелой недостаточности ЛГ и диагностики первого типа ановуляторного бесплодия (ВОЗ, 1973): 1,2 МЕ/л. Доказано, что у большинства женщин с гипоталамо-гипофизарной недостаточностью комбинация 75 МЕ р-ЛГ и 150 МЕ р-ФСГ является эффективной для оптимального фолликуло-, стероидо- и оогенеза, адекватной трансформации эндометрия [79, 168].

Парадоксальной является стимуляция яичников при синдроме поликистозных яичников (СПКЯ). Рядом исследователей было показано, что назначение ЧМГ пациенткам с СПКЯ, имеющих собственную эндогенную гиперсекрецию ЛГ, не повышает концентрацию ЛГ в фолликулярную фазу и даже снижает соотношение ЛГ/ФСГ [61, 109]. Более того, в исследовании по сравнению р-ФСГ и ЧМГ не показано клинических преимуществ р-ФСГ у пациенток с СПКЯ в отношении числа полученных зрелых яйцеклеток и частоты оплодотворения [166].

Появление на рынке аналогов ГнРГ (как агонистов, так и антагонистов) успешно решило проблему «паразитарных» пиков ЛГ, вызывающих преждевременную лютеинизацию неовулировавших фолликулов. Однако на фоне применения этих препаратов в современных протоколах стимуляции овуляции определяемая концентрация эндогенного ЛГ ниже наблюдаемой при

естественно протекающем менструальном цикле. У некоторых пациенток содержание эндогенного ЛГ временно становится ниже уровня, фиксируемого у женщин с гипогонадотропным гонадизмом [153, 210]. Механизмы действия агонистов и антагонистов ГнРГ принципиально различаются. В протоколах с а-ГнРГ происходит десенситизация гипоталамо-гипофизарной системы, которая поддерживается в течение индуцированного цикла. В протоколах с ант-ГнРГ «защита» начинается, когда фолликул достигает диаметра 14 мм, то есть в тот период, когда он с ФСГ-зависимого роста переходит на ЛГ-зависимый. Аналоги гонадолиберина в большей степени подавляют ЛГ, чем ФСГ [22]. Поэтому, логичным кажется необходимость экзогенного введения как ФСГ, так и ЛГ-содержащих препаратов, особенно на финальных стадиях фолликулогенеза для созревания фолликула и подготовки эндометрия к имплантации. Однако точки зрения специалистов относительно назначения экзогенного ЛГ у пациенток с нормогонадотропным бесплодием на фоне супрессии гипофиза аналогами ГнРГ в протоколах ВРТ различаются. Данные одних исследований отражают тот факт, что угнетение секреции эндогенного ЛГ на фоне супрессии гипофиза не влияет на исходы лечения большинства пациенток, стимулировавшихся чистым ФСГ, вследствие наличия так называемого остаточного ЛГ, концентрации которого вполне достаточно для поддержания адекватного фолликуло- и стероидогенеза [107, 113]. Результаты других исследований, наоборот, показали, что у вышеуказанной когорты пациенток могут быть настолько низкие концентрации ЛГ, что это негативно влияет на параметры лечения. Происходит снижение биосинтеза и секреции эстрадиола [163], ухудшение качества ооцит/эмбрионов, что приводит к уменьшению пригодных для криоконсервации криоэмбрионов [80, 99], увеличению частоты раннего прерывания беременности [210], снижению показателя фертильности и увеличению частоты биохимической беременности [178]. Более того, несколькими авторами обнаружена корреляция между концентрациями эндогенного ЛГ в среднефолликулярной фазе и секрецией

эстрадиола, между соотношением уровнем эстрадиола на полученный ооцит и результатом лечения [99, 153, 191, 210]. Вместе с тем, по данным многих исследований не выявлено связи между сывороточным уровнем ЛГ, измеренным в фолликулярной фазе во время стимуляции, и вероятностью рождения живого ребенка [73]. Тем не менее, результаты других исследований ставят под сомнение правомерность использования сывороточного уровня ЛГ в качестве надежного маркера его недостаточности [73, 104].

Добавление р-ЛГ к протоколам стимуляции в общей популяции пациенток ВРТ оценивалось в нескольких рандомизированных исследованиях. Независимые метаанализы, включавшие 12 таких исследований, не подтвердили преимуществ такого лечения по сравнению с применением одного только р-ФСГ у таких пациенток [68, 110]. Однако для женщин старшего репродуктивного возраста, составляющих большую долю пациенток с неудачными попытками ВРТ, дополнительное назначение ЛГ может быть полезным. За последнее время были накоплены доказательства, подтверждающие важность применения р-ЛГ у женщин старшего репродуктивного возраста, под которым понимают возраст от 35 лет и старше. Женщины старшей возрастной группы имеют сниженный овариальный резерв, что часто сопровождается «бедным» ответом в процессе контролируемой овариальной стимуляции в программах ЭКО. Под «бедным» ответом подразумевается ситуация, при которой в результате стимуляции к моменту введения ХГ получено менее 5 фолликулов [11, 12]. При общем же числе полученных эмбрионов от 1 до 3 (редко 4) проблема отбора наиболее качественных эмбрионов становится практически неразрешимой. На практике это приводит к тому, что приходится использовать для переноса эмбрионы, не лучшие из числа имеющихся, или вообще прерывать лечебный цикл при наличии в полученных эмбрионах очевидных дефектов развития (отсутствие дробления, морфологические дегенеративные изменения) [11]. По этой причине отмечается снижение эффективности ЭКО как по показателю частоты наступления беременности на

перенос эмбриона, так и на стимулируемый цикл. Вероятно поэтому в неселективной популяции женщин ВРТ, в которой преобладают пациентки с сохраненным овариальным резервом (моложе 35 лет), результаты ЭКО при применении чистого р-ФСГ и с добавлением ЛГ достоверно не различаются [33, 50].

Одни сторонники использования экзогенного ЛГ в процессе контролируемого фолликулогенеза у пациенток с риском «бедного» ответа рекомендуют его применение с 6-го дня стимуляции р-ФСГ. Выбор этой схемы обосновывается тем, что ЛГ начинает оказывать стимулирующее влияние лишь на фолликулы, достигшие в диаметре не менее 10 мм [34, 167]. Другие исследователи, основываясь на физиологии фолликулогенеза, назначают препараты ЛГ на этапе финального созревания фолликулов при достижении ими размеров 14 мм в диаметре. Причем препараты с ЛГ-активностью назначаются как после отмены ФСГ, так и на фоне его введения, вплоть до назначения овуляторной дозы ХГЧ [34, 137]. Исследование A. Ferraretti et al. (2004) показало, что экзогенный ЛГ можно использовать для экстренного лечения женщин с недостаточным ответом яичников на стимуляцию, когда требуются повышенные дозы ФСГ для завершения созревания фолликулов. Потребность в повышенных дозах ФСГ служит индивидуальным биологическим маркером (косвенным, но высокоспецифичным) дефицита ЛГ, который нельзя заранее определить по сывороточной концентрации ЛГ [104]. Для «удешевления» циклов стимуляции ряд исследователей, в основном это итальянский ученый M. Fillicori (2002) и его последователи, предложили заменить дорогостоящий р-ЛГ на малые дозы ХГЧ (200 МЕ), используя при этом имеющийся у ХГЧ эффект ЛГ [185]. Тем не менее, существуют лишь единичные исследования, указывающие на эффективность данной методики.

S.I. Durnerin et al. (2008) предлагают использовать ЛГ не для стимуляции имеющихся антральных фолликулов, а для формирования более полноценного пула фолликулов, способного вступить в дальнейшем в ФСГ-зависимую фазу фолликулогенеза. С этой целью ЛГ назначают в лютеиновую фазу

предыдущего цикла [100]. E. Lourtaye et al. (2003) предлагали назначать довольно большие дозы ЛГ (не менее 225 МЕ) на этапе финального созревания фолликулов при стимуляции поликистозных яичников с целью атрезировать мелкие фолликулы и обеспечить развитие и дозревание более крупных [84]. Обе эти теории не имели широкого распространения.

Актуальной темой является возможность прогнозирования ответа яичников на стимуляцию. Одни данные указывают, что недостаточный ответ в индуцированных циклах ожидается при базальном уровне ЛГ менее 3 МЕ/л, другие – указывают на прогностическую значимость соотношения базальных концентраций ЛГ/ФСГ > 3 [118, 119].

Влияние различных препаратов гонадотропинов на качество ооцитов и эмбрионов активно изучается. Проведенный метанализ циклов у пациенток старшего репродуктивного возраста, получавших р-ЛГ и р-ФСГ, показал, что применение р-ЛГ увеличивает частоту имплантаций и показателя клинически подтвержденных беременностей. Причем количество полученных яйцеклеток было сходным как при использовании р-ЛГ, так и при моностимуляции р-ФСГ. Возможный механизм улучшения частоты имплантаций и показателя клинически подтвержденных беременностей связан с более высокой зрелостью яйцеклеток или большей готовностью эндометрия к имплантации [204]. Циклы с р-ЛГ показали меньшие уровни апоптоза клеток кумулюса по сравнению с циклами только с ФСГ, что, вероятно, является показателем более высокого качества яйцеклеток. С возрастом в ранней фолликулярной фазе отмечается повышение уровня ФСГ, но не ЛГ. Возможно, что введение ЛГ восстанавливает микросреду развивающихся фолликулов у пациенток старшего репродуктивного возраста [147]. Данные свидетельствуют, что преждевременное повышение прогестерона с большей вероятностью коррелирует с дозой экзогенного ФСГ, а не с дозой ЛГ. Также установлено, что преждевременное повышение уровня прогестерона отрицательно сказывается на имплантации эмбрионов. Раннее повышение уровня прогестерона может

ускорить созревание эндометрия, что приведет к асинхронному развитию эмбриона и эндометрия и снижению частоты имплантации [161]. ФСГ стимулирует продукцию прогестерона за счет синтеза стероидов из холестерина. Лютеинизирующий гормон стимулирует СYP17 к превращению прогестерона в андрогены, которые преобразуются в эстрогены [120]. Добавление ЛГ может оказывать благоприятное воздействие на эндометрий за счет снижения риска преждевременного повышения прогестерона, повышения готовности эндометрия к имплантации [147].

В еще одном рандомизированном слепом исследовании было показано, что применение ЧМГ улучшает некоторые морфологические характеристики (число blastomeres на 2–3-и сутки, степень фрагментации) и способность эмбрионов к развитию, которая проявляется изменением скорости дробления. В протоколе стимуляции р-ФСГ количество полученных ооцитов было больше, однако количество высококачественных эмбрионов в обеих группах было одинаково. Причем эмбрионы высокого качества, полученные при стимуляции ЧМГ, обладают более высоким потенциалом к имплантации, чаще приводят к беременности и рождению здорового ребенка [129].

Во всех представленных исследованиях авторы пытаются выяснить механизмы влияния ЛГ на фолликуло- и оогенез, и их мнения не однозначны. При анализе результатов определяется большая доля субъективности исследователей, а некоторые высказывания, вообще, носят гипотетический характер. Поэтому дискуссии о выборе индивидуальных схем стимуляции яичников продолжаются и требуют дальнейших исследований. Наша работа и посвящена этой теме.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы исследования

Для достижения цели исследования и решения поставленных задач было обследовано 324 женщины, получающих лечение по поводу трубно-перитонеального бесплодия (N97.1) в программах ЭКО в отделении вспомогательных репродуктивных технологий (заведующая – д-р мед. наук Е.Б. Дружинина) Областного перинатального центра ГБУЗ «Иркутская областная клиническая больница» в период с мая 2012 г. по май 2014 г.

Критериями включения в исследование служили:

- репродуктивный возраст ≥ 30 и ≤ 45 лет на момент включения в исследование;
- отсутствие тяжелой соматической патологии;
- неэффективность ранее проводимой терапии бесплодия: вспомогательные репродуктивные технологии, реконструктивно-пластические операции на яичниках и маточных трубах, гормональная терапия;
- концентрация функциональных сперматозоидов (КФС) – более 30 %.

Все пациентки были сопоставимы по возрасту и диагнозу; у всех отсутствовали противопоказания для стимуляции овуляции в программах ЭКО и для вынашивания беременности. Все пациентки дали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Оценка клинико-anamnestических данных, клинико-лабораторных показателей, показателей эмбриологического этапа, результатов инструментальных методов исследования проводилась в сравниваемых группах. Формирование групп проводилось в 2 этапа. На первом этапе – в зависимости от применяемого индуктора в процессе стимуляции, на втором этапе – в зависимости от того вначале или на 6-7 день проводилось добавление ЛГ-содержащих индукторов в процессе стимуляции. Исследования проводились в следующих группах (рисунок 3).

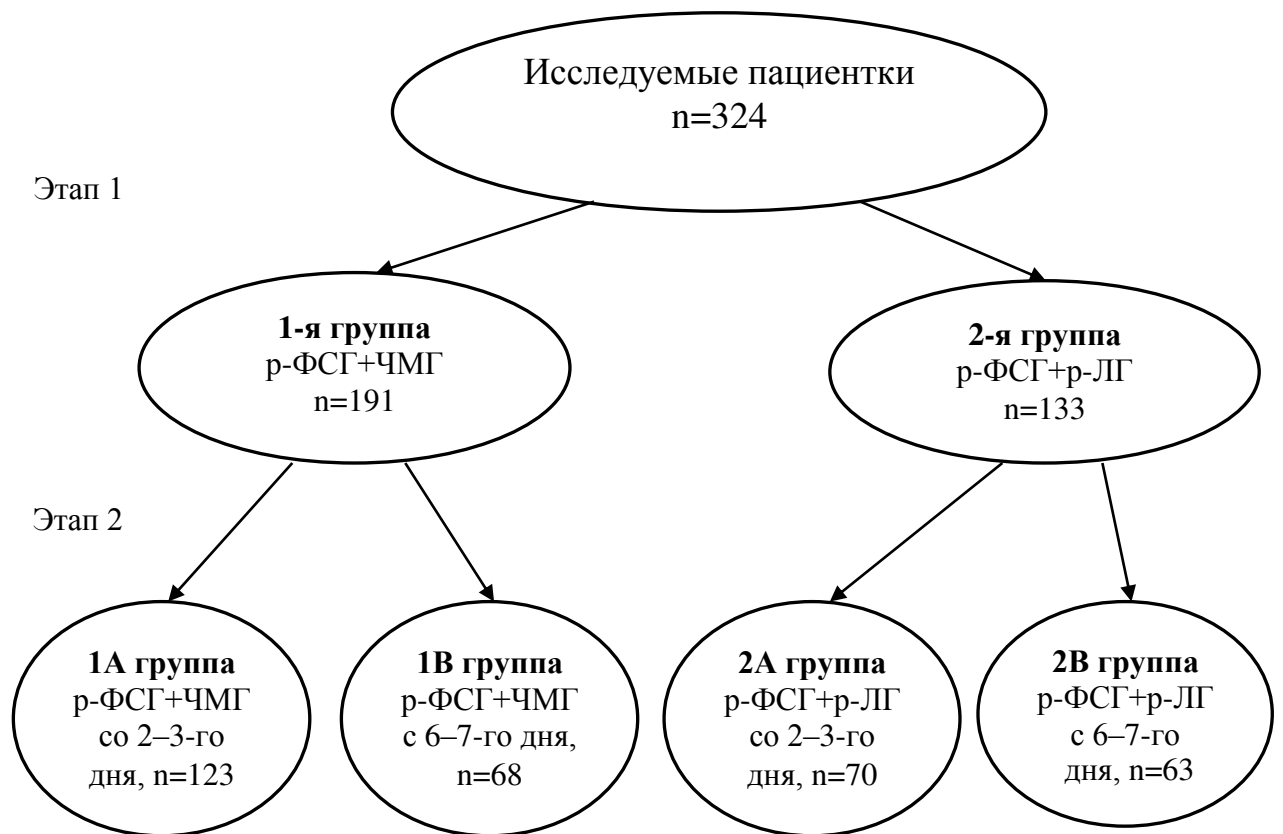


Рисунок 3 – Группы исследуемых пациенток в зависимости от применяемого протокола стимуляции

Обследование пациенток всех групп проводилось в несколько этапов. На первом этапе формировались сравниваемые группы в зависимости от применяемого протокола стимуляции овуляции для оценки исходных клинико-анамнестических, клинико-лабораторных данных, исходов предыдущих методов лечения бесплодия. На втором этапе проводился сравнительный анализ показателей индуцированного цикла и его эффективности в зависимости от применяемого протокола стимуляции. На третьем этапе проводился анализ гормонального профиля фолликулярной жидкости и периферической крови, корреляционная зависимость между ними и с показателями фолликуло- и оогенеза. На четвертом этапе разработаны рекомендации по выбору индивидуального протокола стимуляции овуляции, способствующему повышению эффективности ЭКО.

2.2. Методы исследования

В протоколах исследования тщательно оценивался акушерско-гинекологический и андрологический анамнез, данные объективного обследования (общесоматического и гинекологического), показатели лабораторных и инструментальных (УЗИ) методов исследования. У всех обследованных пациенток был исключен эндометриоз, миома матки с величиной узла более 2 см в диаметре, новообразования органов репродуктивной системы, гипопфиза, кисты яичников больших размеров, пороки развития матки, мужской фактор.

Классификация гинекологических заболеваний и форм бесплодия проводилась согласно руководству по "Международной статистической классификации болезней, травм и причин смерти X пересмотра".

2.2.1. Стимуляция овуляции

В течение индуцированного цикла учитывались схемы стимуляции, средние начальные и курсовые дозы гонадотропинов, длительность стимуляции, проводилось гормональное и ультразвуковое динамическое мониторирование за ростом фолликулов и эндометрия.

Гормональные методы исследования проводили в лаборатории Областного перинатального центра ГБУЗ «Иркутская областная клиническая больница» (заведующая лабораторией – А.А. Денисова). Концентрацию гормонов в сыворотке крови определяли с использованием иммунохемилюминесцентных тест-систем фирмы Siemens Healthcare Diagnostics Inc. (США) на автоматическом анализаторе «Immulite 2000» этой же фирмы. Анализ АМГ проводили с использованием иммуноферментного твердофазного анализа (Beckman Coulter MIS/AMH ELISA, USA) по принципу ферментно-усиленного "двухступенчатого" сэндвич-иммуноанализа.

Нормативные значения гормонов в плазме крови у здоровых женщин репродуктивного возраста представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Нормативные показатели концентрации гормонов

Гормон крови	Нормативный показатель
ЛГ, mIU/ml	Фолликулиновая фаза: 1,1–11,6 Середина цикла: 17–77 Лютеиновая фаза: 1,1–14,7
ФСГ, mIU/ml	Фолликулиновая фаза: 2,8–11,3 Середина цикла: 5,8–21 Лютеиновая фаза: 1,2–9,0
Прл, ng/ml	1,9–25
E2, pg/ml	Фолликулиновая фаза: 9–160 Лютеиновая фаза: 27–246
P, ng/ml	Фолликулиновая фаза: 0,1–1,13 Лютеиновая фаза: 0,95–21
T, ng/dl	10–118
ДГЭА-С, mg/dl	35–430
T4 свободный, ng/dl	0,8–1,9
T3 свободный, pg/ml	1,8–4,2
ТТГ, mIU/ml	0,4–4,0
Anti-ТПО, IU/ml	До 50 лет: < 35 После 50 лет: < 100
17-ОН прогестерон, ng/ml	0,1–0,8
АМГ, ng/ml	1–2,5

Базальная сывороточная концентрация ФСГ, ЛГ, E2 и АМГ у всех исследуемых пациенток определялась путем забора крови из локтевой вены на 2–3-й день менструального цикла. Базальные значения прогестерона крови оценивались во вторую фазу предыдущего естественного цикла.

С целью динамического гормонального мониторинга индуцированного цикла определяли сывороточную концентрацию ФСГ, ЛГ, E2, P и АМГ у 55 пациенток в 1-й и 2-й группах путем забора крови на 5–7-й день стимуляции при достижении лидирующим фолликулом 14 мм (в день старта антагониста ГнРГ) и в день трансвагинальной пункции. У этих же пациенток определяли концентрации ФСГ, ЛГ, E2, P и АМГ в фолликулярной жидкости в день забора ооцитов.

Ультразвуковое исследование органов малого таза проводили на 2–3-й день спонтанной менструации или менструально-подобной реакции (в первый день стимуляции овуляции) на аппарате «Sonoline Sienna» (Siemens, Германия) с использованием трансвагинального датчика с частотой 6,5 МГц. УЗИ включало в себя определение следующих параметров:

1. Объем яичника. Средний объем яичника вычисляли по формуле

$$V = 0,5 \times (A \times B \times C) \text{ см}^3,$$

где А – длина яичника (см); В – ширина яичника (см); С – толщина яичника (см).

2. Количество антральных фолликулов диаметром 2–10 мм.
3. Средний диаметр фолликула как половину суммы его двух перпендикулярных размеров.
4. Размеры матки.

Мониторинг за индивидуальным развитием фолликулов и эндометрия осуществлялся на 5–7-й день стимуляции овуляции и затем раз в 2 дня до момента введения овуляторной дозы ХГЧ. Адекватным ростом фолликула являлось увеличение его диаметра на 2 мм/сут, эндометрия – на 1 мм/сут. Фолликул расценивался как функционально зрелый, когда его размер достигал 17–18 мм.

Ответ яичников в процессе стимуляции считался:

- нормальным – при котором наблюдался равномерный рост 5–10 фолликулов в обоих яичниках;
- «бедным» – при росте менее 5–7 фолликулов в обоих яичниках;
- избыточным – при росте более 10 фолликулов в обоих яичниках.

Дозы гонадотропинов и длительность стимуляции подбирались индивидуально с учетом возраста, диагноза и данных динамического ультразвукового исследования.

Введение антагониста ГнРГ осуществлялось по достижении одним фолликулом диаметра 14–15 мм или на 5–7-й день стимуляции. Препарат в дозе 0,25 мг подкожно вводился в одно и тоже время суток до дня введения

триггера овуляции включительно.

2.2.2. Трансвагинальная пункция. Эмбриологический этап

При достижении 3 и более фолликулов диаметра > 17 мм вводился триггер овуляции хорионический гонадотропин, доза которого составила 5 000–10 000 ЕД. Через 35–36 часов в асептических условиях под внутривенным наркозом под контролем УЗИ проводилась трансвагинальная пункция фолликулов с последующим эмбриологическим этапом.

Проводился забор фолликулярной жидкости, после определения наличия или отсутствия в ней ооцита её центрифугировали в течение 10 минут на 1 000 оборотах с целью очистки от элементов крови. Впоследствии в ФЖ определялись концентрации ФСГ, ЛГ, Е2, Р и АМГ. В ряде случаев проводилось промывание фолликулов с применением двухпросветных игл фирмы Cook Medical (США) буферным раствором Flushing Medium фирмы ORIGIO (Дания) в объёме, не превышающем объём отобранной фолликулярной жидкости. Показаниями к промыванию фолликулов служили: менее 5–6 фолликулов диаметром 17 мм к моменту введения овуляторной дозы ХГЧ, синдром «пустых» фолликулов и «бедный» овариальный ответ в предыдущих попытках ЭКО.

Преинкубация, оплодотворение ооцитов, культивирование эмбрионов, криоконсервация осуществлялось на линейке сред фирмы ORIGIO (Дания) в четырехлуночных планшетах «Nunc», в CO_2 – инкубаторе «ThermoForma».

По морфологическим признакам полученные ооциты делили на зрелые (MII), незрелые (MI) и дегенеративные (ATR). Обращали внимание на наличие морфологических дефектов цитоплазмы, таких, как грануляция, вакуолизация, характер расположения ядра. Показаниями к ИКСИ служили: менее 4 полученных ооцитов, отсутствие оплодотворения или низкий индекс оплодотворения ($< 70\%$) в предшествующем индуцированном цикле, наличие антиспермальных антител (50 % и более).

На 1-й день культивации оценивалось наличие признаков оплодотворения и качество зигот. Наибольшее внимание уделялось количеству, размеру и симметричности пронуклеусов (PN); количеству и распределению нуклеолей; включениям цитоплазмы (рисунок 4). Оплодотворение расценивалось как нормальное в случае наличия двух пронуклеусов и 2 полярных тел (PB) через 14–16 часов после инсеминации или ИКСИ [198].



Рисунок 4 – Первый день культивации. Зигота

На 2-е и 3-и сутки оценивалось качество эмбрионов по совокупности следующих параметров: скорость дробления эмбрионов, симметричность и мультинуклеарность бластомеров, степень цитоплазматической фрагментации (рисунок 5). К эмбрионам 1–2-й степени качества относились эмбрионы, находящиеся на стадии развития двух бластомеров в конце первых суток культивирования, 4–6 бластомеров – на 2-е сутки, 7–9 бластомеров (или имеющие признаки компактизации) – на 3-и сутки культивирования. Степень фрагментации эмбрионов оценивалась как тип А – эмбрионы отличного качества без ануклеарных (безъядерных) фрагментов (4А), тип В – эмбрионы хорошего качества с содержанием ануклеарных фрагментов до 20 % (4В), тип С – эмбрионы удовлетворительного качества с содержанием ануклеарных фрагментов от 21 до 50 % (4С) и тип D – эмбрионы неудовлетворительного качества с содержанием ануклеарных фрагментов более 50 % (4D) (van Steiterghem A. et al., 1995).

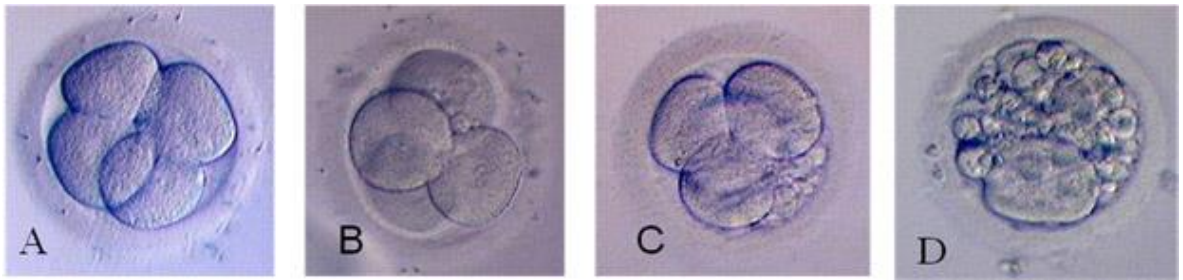


Рисунок 5 – Оценка качества эмбрионов по степени фрагментации

На 4-е сутки развития оценивалась компактизация эмбриона – морулы (рисунок 6):

(A) Grade 4: эмбрион полностью компактизован. Клеточные мембраны видны нечетко, но ядра различимы;

(B) Grade 3: компактизовано более 75 % бластомеров. Эмбрион сохраняет сферичную форму и гладкую поверхность;

(C) Grade 2: частичная компактизация (около 50 % бластомеров), аномальная морфология эмбриона;

(D) Grade 1: компактизация менее 50 % бластомеров. Различимы фрагменты и некомпактизовавшиеся бластомеры [199].

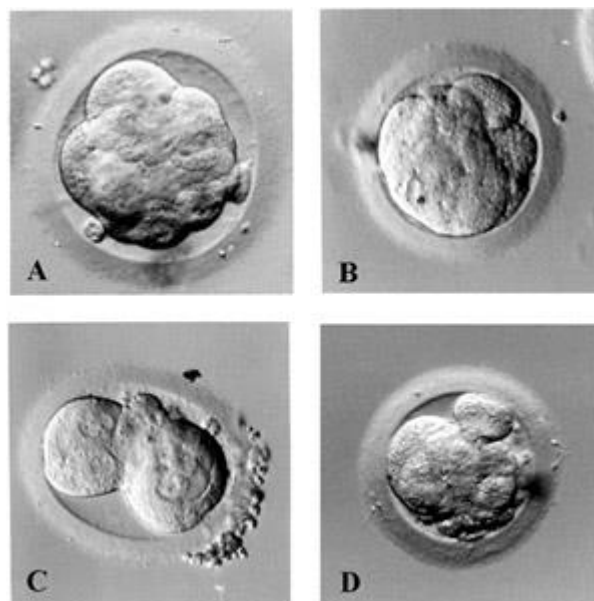


Рисунок 6 – Стадии компактизации эмбриона

На 5-е сутки культивирования оценивались степень зрелости, внутриклеточная масса, трофэктодермальный слой бластоцисты (Gardner D. et al., 1999).

Степень зрелости бластоцисты:

1-я степень – ранняя бластоциста, полость бластоцисты меньше половины объема эмбриона;

2-я степень – полость бластоцисты больше половины объема эмбриона;

3-я степень – полная бластоциста. Полость полностью занимает объем эмбриона;

4-я степень – расширенная бластоциста. Полость бластоцисты становится больше и начинает истончаться блестящая оболочка (ZP);

5-я степень – трофэктодерма начинает проникать через ZP;

6-я степень – вылупившаяся бластоциста.

Внутриклеточная масса:

A – плотно упакованная с большим количеством клеток;

B – более свободная группировка среднего количества клеток;

C – незначительное количество клеток.

Трофэктодермальный слой:

A – много клеток, формирующих трофэктодерму;

B – немного клеток, формирующих трофэктодерму;

C – незначительное количество больших клеток.

Число переносимых эмбрионов выбиралось индивидуально, применительно к каждой конкретной ситуации, однако не превышало 2. Перенос эмбрионов проводился катетерами Frydman (Laboratoire CCD, Франция) и Wallace (Smiths Medical International Ltd., Англия) по стандартной методике. Селекция эмбрионов для криоконсервации проводилась на 3–5-е сутки культивирования по стандартным критериям «хорошего качества». Используемый метод заморозки – витрификация. Для заморозки использовались открытые системы Cryoleaf (ORIGIO), в одну соломинку

помещалось 2–3 эмбриона с последующим переносом в криохранилище (Taylor–Wharton).

Первичная биохимическая диагностика беременности осуществлялась на 14-й день после овуляции или переноса эмбрионов путем определения концентрации β -субъединицы ХГ в сыворотке крови.

Клиническую диагностику беременности проводили на 21-й день после переноса эмбрионов. Ультразвуковое определение сердцебиения плода, осуществлялось при сроке беременности 5–6 недель.

Поддержка посттранферного периода препаратами прогестерона осуществлялась по стандартной схеме.

2.2.3. Статистический анализ полученных результатов

Статистическая обработка данных выполнена на индивидуальном компьютере с помощью электронных таблиц «Microsoft Excel», и пакета прикладных программ «Statistica for Windows» v.6.1, StatSoft Inc. (США).

Использовались программы:

- дескриптивной статистики;
- для сравнения параметрических данных (после проверки количественных данных на нормальное распределение) t-критерий Стьюдента для 2 независимых выборок;
- z-критерий для сравнения долей;
- для непараметрических данных критерий Манна-Уитни для 2 несвязанных групп, критерий Уилкоксона для 2 связанных групп;
- вычисления корреляционных взаимосвязей между показателями, корреляции Спирмена и Пирсона;
- многомерный регрессионный анализ.

Критический уровень значимости (p) для оценки данных принимался равным 0,05.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Клинико-anamнестическая характеристика пациенток

В соответствии с поставленной целью и задачами было обследовано 324 пациентки с трубно-перитонеальным бесплодием, проходящих лечение в программах ЭКО, из которых у 102 (31,5 %) отмечалось первичное бесплодие, у 222 (68,5 %) – вторичное. Средняя продолжительность бесплодия составила $8,4 \pm 4,7$ лет. Всем пациенткам было показано проведение программы ЭКО.

Клинико-anamнестические характеристики исследуемых пациенток представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Клинико-anamнестические показатели

Показатель	Исследуемая группа (n=324)
Возраст, лет	$35,7 \pm 3,8$ [30; 45]
Возраст менархе, годы	$13,3 \pm 1,3$ [10; 17]
Длина менструального цикла, дни	$28,6 \pm 5,5$ [21; 90]
Бесплодие:	
первичное	102 (31,5 %)
вторичное	222 (68,5 %)
Продолжительность бесплодия, годы:	
первичное	$8,9 \pm 4,7$ [3; 20]
вторичное	$8,1 \pm 4,7$ [3; 20]
Среднее количество попыток ЭКО	$2,9 \pm 0,9$ [2; 5]
Индекс массы тела, кг/м ²	$24,9 \pm 3,9$ [16,6; 38,2]

Возраст пациенток варьировал от 30 до 45 лет, что в среднем составило $35,7 \pm 3,8$ лет и соответствовало позднему репродуктивному возрасту (35 лет и старше).

Средний возраст менархе составил $13,3 \pm 1,3$ лет (от 10 до 17 лет), средняя продолжительность менструального цикла – $28,6 \pm 5,5$ дней (от 21 до 45 дней), что соответствовало данным показателям в общей популяции.

Нарушения менструального цикла (НМЦ) у исследуемых пациенток представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Нарушения менструального цикла

Показатель	Исследуемая группа (n=324)
Олигоменорея	4 (1,2 %)
Гипоменорея	2 (0,6 %)
Меноррагия	56 (17,3 %)
Альгоменорея	81 (25,0 %)

Таким образом, наиболее частыми НМЦ у исследуемых пациенток являлись меноррагия и альгоменорея (17,3 и 25,0 % соответственно), которые характеризуют клиническую картину воспалительных заболеваний органов малого таза.

На момент вступления в программу ЭКО физическое здоровье пациенток было расценено как нормальное. При наличии хронической экстрагенитальной патологии отмечалась стойкая ремиссия или компенсированное состояние, показатели гемостазиограммы, клинического и биохимического анализов крови были в пределах нормы. Структура экстрагенитальной патологии исследуемых пациенток представлена в таблице 4.

Таблица 4 – Экстрагенитальная патология

Заболевания	Исследуемая группа (n=324)
Щитовидная железа	50 (15,4 %)
Желудочно-кишечный тракт	45 (13,9 %)
Мочевыделительная система	27 (8,3 %)
Сердечно-сосудистая патология	26 (8,0 %)
Варикозная болезнь	8 (2,5 %)

У каждой 6-й из исследуемых пациенток отмечалась патология щитовидной железы – 15,4 %. Основной диагноз – эндемический зоб (90 %), что объяснялось йододефицитом в Иркутской области.

Гинекологические заболевания в исследуемой группе пациенток были излечены, не нарушали состояния здоровья женщин или требовали лишь диспансерного наблюдения. Структура гинекологических заболеваний

представлена в таблице 5.

Таблица 5 – Гинекологические заболевания

Гинекологические заболевания	Исследуемая группа (n=324)
Хронический сальпингоофорит	243 (75,0 %)
Хронический эндометрит	141 (43,5 %)
Гиперплазия эндометрия	32 (9,9 %)
Гипоплазия эндометрия	14 (4,3 %)
Патология шейки матки	169 (52,2 %)
Миома матки	88 (27,2 %)
ИППП	143 (44,1 %)

Как видно из таблицы наиболее часто у исследуемых пациенток отмечался хронический сальпингоофорит (75,0 %). Хронический эндометрит регистрировался в 43,5 %. Надо отметить, что у пациенток с хроническим эндометритом на момент вступления в программу ЭКО было проведено комплексное лечение, при котором его эффективность подтверждалась гистологическим исследованием пайпель-биоптата эндометрия. Отмечалась достаточно высокая частота ранее перенесенных ИППП, у каждой 2-й пациентки (44,1 %). Патология шейки матки в анамнезе отмечалась у 169 (52,2 %) пациенток. Миомы матки малых размеров (менее 2 см) ранее диагностированы у каждой 4-й женщины (27,2 %).

Таким образом, в структуре гинекологических заболеваний преобладали воспалительные заболевания органов малого таза, что и определяло наличие трубно-перитонеального бесплодия у исследуемых пациенток.

Оперативные вмешательства на яичниках проводились у 48 пациенток (14,8 %), из них по поводу кист в 34 (70,8 %), по поводу апоплексии в 14 (29,2 %) случаях. Реконструктивно-пластические операции на трубах проводились у 156 пациенток (48,1 %), из них по поводу внематочной беременности у 118 (75,6 %), по поводу пио-, сакто-, гидросальпинксов у 38 пациенток (24,4 %). Спаечный процесс малого таза при оперативных вмешательствах зарегистрирован у 155 пациенток (47,8 %). Надо отметить, что спонтанное наступление беременности после проведения реконструктивно-

пластических операций наблюдалось только у 5 пациенток (1,5 %).

На основании представленных данных можно сделать вывод, что предшествующие реконструктивно-пластические операции на органах малого таза малоперспективны для спонтанной реализации репродуктивной функции.

Анализ репродуктивной функции пациенток, входящих в группу исследования показал, что самостоятельные беременности в анамнезе имели 220 женщин (67,9 %), после ЭКО – 16 пациенток (4,9 %). Срочными родами завершилась беременность у 85 пациенток (26,2 %), преждевременными – у 12 (3,7 %). Ранний самопроизвольный выкидыш (до 12 недель) произошел у 54 женщин (16,7 %). Искусственные аборты были в анамнезе у 110 пациенток (34,0 %). Эктопическая беременность была диагностирована в 118 случаях (36,4 %).

Средний базальный уровень гормонов крови у исследуемых пациенток (n=324) находился в пределах нормативных значений. Данные гормонального исследования представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Исходный гормональный профиль сыворотки крови

Показатель	Исследуемая группа (n=324)
	M±St.d
ЛГ, mIU/ml	6,4±2,3 [0,9; 20,3]
ФСГ, mIU/ml	8,0±4,2 [1,8; 23,9]
Прл, ng/ml	13,4±6,5 [1,9; 25,3]
E2, pg/ml	53,8±55,3 [5,9; 197,5]
P, ng/ml	11,3±12,4 [0,5; 31,7]
T, ng/dl	36,2±21,4 [8,6; 123,0]
ТТГ, mIU/ml	1,7±0,8 [0,4; 4,8]
17-ОН прогестерон, ng/ml	0,9±0,7 [0,1; 2,3]
АМГ, ng/ml	2,1±1,9 [0,1; 9,5]

У 96 пациенток (29,6 %) отмечался уровень АМГ ниже нижней границы нормы (1 ng/ml), что соответствовало позднему репродуктивному возрасту и низкому овариальному резерву. Однако среди них только у 34 (35,4 %) пациенток уровень ФСГ был выше верхней границы нормативного значения (11,3 mIU/ml). Общее количество пациенток, у которых уровень ФСГ

отмечался выше нормы, составило 58 (17,9 %).

Данные ультразвукового исследования органов малого таза представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Ультразвуковые показатели на 2–3-й день менструального цикла

Показатель	Исследуемая группа (n=324)
	M±St.d
М-эхо, мм	3,2±0,2 [2,8; 3,8]
Объем левого яичника, см ³	7,7±5,9 [1,0; 43,9]
Объем правого яичника, см ³	7,8±7,3 [1,2; 66,0]
Число антральных фолликулов в обоих яичниках	6,3±3,3 [1; 17]

Таким образом, несмотря на то, что средние значения ФСГ и АМГ были в пределах нормы и укладывались в параметры фертильных женщин, среднее количество антральных фолликулов соответствовало низкому овариальному резерву (6,3±3,3), менее 5–7 фолликулов в обоих яичниках.

Проведенный анализ клинико-anamнестических данных, гормонального и ультразвукового обследований показал, что пациентки исследуемой группы (n=324) были чаще позднего репродуктивного возраста, с трубно-перитонеальным фактором бесплодия, низким овариальным резервом, с преобладанием воспалительных заболеваний органов малого таза и неудачными попытками ЭКО в анамнезе.

3.2. Оценка эффективности предыдущих циклов экстракорпорального оплодотворения

Для поиска новых подходов к лечению бесплодия у исследуемой группы пациенток проведен анализ предшествующих циклов ЭКО. У всех исследуемых пациенток проводились повторные попытки ЭКО. Частота наступления беременности составила 16 случаев (4,9 %), из которых только у 5 пациенток беременность закончилась срочными родами. Параметры предыдущих циклов ЭКО представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Характеристика предыдущих циклов стимуляции

Показатель	Исследуемая группа (n=324)
Стимуляция р-ФСГ	38,7 %
Стимуляция р-ФСГ + ЧМГ	44,3 %
Стимуляция р-ФСГ + р-ЛГ	17,0 %
Стартовая доза гонадотропина, МЕ	107,2±125,2 [75; 450]
Курсовая доза гонадотропина, МЕ	1215,5±1454,8 [1012,5; 9600]
Количество пунктируемых фолликулов	2,9±3,8 [1; 16]
Количество полученных яйцеклеток всего:	2,3±3,5 [0; 20]
зрелых	1,7±2,7 [0; 16]
незрелых	0,3±0,7 [0; 4]
дегенеративных	0,1±0,3 [0; 2]
Количество полученных эмбрионов	1,6±2,4 [0; 15]
Продолжительность стимуляции	5,0±5,1 [5; 17]
ЧНБ	16 (4,9 %)

В предшествующих циклах ЭКО в 100 % случаев применялись протоколы с антагонистами Гн-РГ, в 38,7 % стимуляция овуляции осуществлялась р-ФСГ, в 44,3 % – сочетание р-ФСГ и ЧМГ и в 17,0 % – сочетание р-ФСГ и р-ЛГ. Средняя начальная доза гонадотропина составила 107,2±125,2 МЕ, курсовая – 1215,5±1454,8 МЕ. Среднее количество полученных яйцеклеток составило 2,3±3,5, среднее количество полученных эмбрионов – 1,6±2,4.

Таким образом, проведенный ретроспективный анализ предшествующих циклов ЭКО показал, что в предыдущих циклах индукции были затрачены небольшие курсовые дозы гонадотропинов, получено малое количество яйцеклеток и эмбрионов, то есть отмечался «бедный» ответ, и регистрировалась низкая частота наступления беременности.

3.3. Сравнительная характеристика показателей индуцированного цикла при стимуляции яичников различными препаратами гонадотропинов

В соответствии с поставленной целью и задачами проведен сравнительный анализ индуцированного цикла у пациенток 2-х групп. Первую

группу составили 191 пациентка, стимуляция овуляции у которых проводилась р-ФСГ в сочетании с ЧМГ, вторую группу – 133 пациентки, где в протокол стимуляции входили р-ФСГ и р-ЛГ.

3.3.1. Анализ исходных клинико-anamнестических и клинико-лабораторных показателей у пациенток исследуемых групп

Ведущими медико-биологическими факторами, влияющими на эффективность восстановления репродуктивной функции в программах ВРТ, являются возраст женщины, состояние овариального резерва, причины и продолжительность бесплодия, а также особенности и продолжительность предшествующего лечения [27, 53].

Мы проанализировали исходные клинико-anamнестические показатели у пациенток 2-х групп, полученные данные представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Характеристика клинико-anamнестических показателей у пациенток исследуемых групп

Показатель	Исследуемая группа (n=324)		Значение p
	1-я группа р-ФСГ+ЧМГ n=191	2-я группа р-ФСГ+р-ЛГ n=133	
Возраст, лет	35,5±3,9 [30; 45]	35,9±4,7 [30; 45]	p ₁₋₂ >0,05
Возраст менархе, годы	13,2±1,3 [10; 17]	13,3±1,3 [10; 17]	p ₁₋₂ >0,05
Длина менструального цикла, дни	28,7±5,1 [22; 90]	28,5±4,4 [21; 60]	p ₁₋₂ >0,05
Индекс массы тела, кг/м ²	24,8±4,4 [16,7; 38,2]	25,2±4,7 [16,6; 38,2]	p ₁₋₂ >0,05
Продолжительность бесплодия, годы	8,8±4,2 [3; 20]	9,2±5,2 [3; 20]	p ₁₋₂ >0,05
Первичное бесплодие	58 (30,4 %)	44 (33,1 %)	p ₁₋₂ >0,05
Вторичное бесплодие	133 (69,6 %)	89 (66,9 %)	p ₁₋₂ >0,05

Примечание – Статистически значимые различия при p<0,05.

Из представленной таблицы видно, что пациентки двух групп были полностью сопоставимы по клинико-anamнестическим параметрам. Средний возраст пациенток первой группы составил 35,5±3,9, второй – 35,9±4,7 лет, что

соответствует позднему репродуктивному периоду. Каждая 3-я пациентка в обеих группах не имела в анамнезе беременности.

Были проанализированы исходные клинико-лабораторные и ультразвуковые показатели у пациенток исследуемых групп (таблица 10).

Таблица 10 – Характеристика клинико-лабораторных и ультразвуковых показателей у пациенток исследуемых групп

Показатель	Исследуемая группа (n=324)		Значение p
	<i>1-я группа p-ФСГ+ЧМГ n=191</i>	<i>2-я группа p-ФСГ+p-ЛГ n=133</i>	
	M±St.d	M±St.d	
Базальный ЛГ, mIU/ml	5,1±3,1 [0,9; 20,3]	5,2±6,7 [1,3; 16,6]	p ₁₋₂ >0,05
Базальный ФСГ, mIU/ml	8,1±3,5 [1,8; 23,9]	8,2±4,1 [3,3; 18,6]	p ₁₋₂ >0,05
Базальный E2, pg/ml	49,4±51,9 [8,0; 197,5]	57,5±61,2 [5,9; 185,0]	p ₁₋₂ >0,05
Базальный P, ng/ml	10,8±7,4 [0,5; 31,7]	10,4±8,4 [0,5; 29,8]	p ₁₋₂ >0,05
Базальный АМГ, ng/ml	2,0±1,8 [0,1; 9,2]	1,8±1,6 [0,1; 9,5]	p ₁₋₂ >0,05
Объем левого яичника, см ³	7,9±6,5 [1,0; 41,7]	7,5±6,2 [1,1; 43,9]	p ₁₋₂ >0,05
Объем правого яичника, см ³	7,2±6,6 [1,2; 63,7]	7,9±8,1 [1,7; 66,0]	p ₁₋₂ >0,05
Число антральных фолликулов в обоих яичниках	6,0±3,0 [1; 17]	5,7±3,1 [1; 17]	p ₁₋₂ >0,05

Примечание – Статистически значимые различия при p<0,05.

Анализ показал, что исходные гормональные и ультразвуковые показатели яичников у пациенток двух групп статистически не отличались. Средний базальный уровень ФСГ, АМГ и объем яичников соответствовали показателям нормального овариального резерва. Однако число антральных фолликулов как в 1-й группе (протокол p-ФСГ + ЧМГ) – 6,0±3,0, так и во 2-й группе (p-ФСГ + p-ЛГ) – 5,7±3,1 соответствовало показателям низкого овариального резерва (менее 5–7 фолликулов в обоих яичниках).

Таким образом, проведенный сравнительный анализ показал, что

пациентки двух групп были полностью сопоставимы по клинико-анамнестическим, лабораторным и ультразвуковым показателям, преимущественно относились к позднему репродуктивному возрасту и имели сниженный овариальный резерв, что являлось предрасполагающим фактором к ослабленной реакции яичников в процессе стимуляции.

3.3.2. Анализ показателей эмбриологического этапа у пациенток исследуемых групп

Эффективность методов ВРТ во многом определяется характером ответа яичников на введение различных индукторов овуляции: количеством растущих фолликулов, количеством и качеством получаемых ооцитов и культивируемых эмбрионов [26]. На основании этого нами был проведен анализ показателей индуцированного цикла и эмбриологического этапа при использовании двух протоколов стимуляции овуляции. Данные представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Дозы гонадотропинов у пациенток исследуемых групп

Показатель	Исследуемая группа (n=324)		Значение p
	<i>1-я группа p-ФСГ+ЧМГ n=191</i>	<i>2-я группа p-ФСГ+p-ЛГ n=133</i>	
	M±St.d	M±St.d	
Стартовая доза ФСГ, МЕ	161,2±57,4 [37,5; 315,0]	229,6±79,1 [75,0; 375,0]	p ₁₋₂ <0,001
Стартовая доза ЛГ, МЕ	71,1±39,2 [37,5; 187,5]	80,8±23,2 [37,5; 225,0]	p ₁₋₂ <0,001
Курсовая доза ФСГ, МЕ	1627,9±617,2 [337,5; 3900,0]	2148,4±886,8 [675,0; 5850,0]	p ₁₋₂ <0,001
Курсовая доза ЛГ, МЕ	839,3±614,5 [112,5; 2962,5]	717,5±442,6 [75,0; 2925,0]	p ₁₋₂ >0,05
Курсовая доза гонадотропина, МЕ	2473,9±1016,6 [675,0; 5925,0]	2865,8±1163,3 [1350,0; 8775,0]	p ₁₋₂ <0,001
Продолжительность стимуляции, дней	9,9±2,1 [6; 17]	9,7±2,4 [6; 19]	p ₁₋₂ >0,05

Примечание – Статистически значимые различия при p<0,05.

Как видно из таблицы, начальная и курсовая дозы ФСГ у пациенток 2-й

группы составили $229,6 \pm 79,1$ и $2148,4 \pm 886,8$ МЕ соответственно, что достоверно выше, чем у пациенток 1-й группы – $161,2 \pm 57,4$ и $1627,9 \pm 617,2$ МЕ. Стартовая доза ЛГ во 2-й группе также была статистически выше, чем в 1-й ($80,8 \pm 23,2$ и $71,1 \pm 39,2$ МЕ соответственно), однако курсовые дозы ЛГ в обеих группах статистически не отличались. Курсовая доза гонадотропинов во 2-й группе ($2865,8 \pm 1163,3$ МЕ) была достоверно выше, чем в 1-й ($2473,9 \pm 1016,6$ МЕ). Продолжительность стимуляции в двух протоколах статистически не отличалась.

На основании этого можно сделать вывод, что в группе с добавлением в процессе стимуляции р-ЛГ отмечался более медленный рост фолликулов, что потребовало более высокой курсовой дозы гонадотропинов.

Сравнительная характеристика показателей эмбриологического этапа при использовании двух протоколов стимуляции овуляции представлены в таблице 12.

Среднее количество пунктированных фолликулов в 1-й группе составило $4,9 \pm 2,9$, во 2-й – $4,7 \pm 3,3$, что соответствовало «бедному» овариальному ответу и достоверно не отличалось. Такие параметры как количество полученных яйцеклеток, количество зрелых, незрелых и дегенеративных яйцеклеток, количество полученных эмбрионов, а также количество эмбрионов хорошего качества у пациенток 2 групп не имели статистических отличий. Индекс оплодотворения в обеих группах составил 73,0 и 71,3 % ($p_{1-2} > 0,05$). Однако доля эмбрионов хорошего качества (степень фрагментации ≤ 20 % и соответствие стадии развития эмбриона суткам культивации) от общего числа полученных у пациенток 2-й группы (протокол р-ФСГ + р-ЛГ) составила 75 %, что достоверно выше, чем в 1-й группе (р-ФСГ + ЧМГ) – 67,6 % ($p_{1-2} = 0,024$).

Криоконсервация лишних эмбрионов хорошего качества в 1-й группе проводилась в 17,3 % случаев, во 2-й группе – в 15,0 % ($p_{1-2} > 0,05$). Среднее количество криоэмбрионов в 1-й и 2-й группах составило $0,4 \pm 1,1$ и $0,4 \pm 1,3$ ($p_{1-2} > 0,05$).

Таблица 12 – Характеристика основных эмбриологических показателей у пациенток исследуемых групп

Показатель	Исследуемая группа (n=324)		Значение p
	1-я группа p-ФСГ+ЧМГ n=191	2-я группа p-ФСГ+p-ЛГ n=133	
Количество пунктированных фолликулов	4,9±2,9 [1; 15]	4,7±3,3 [1; 15]	p ₁₋₂ >0,05
Количество яйцеклеток	3,6±2,9 [0; 15]	3,4±2,9 [0; 15]	p ₁₋₂ >0,05
Количество зрелых яйцеклеток	2,9±2,6 [0; 13]	2,7±2,4 [0; 13]	p ₁₋₂ >0,05
Количество незрелых яйцеклеток	0,5±0,7 [0; 3]	0,6±0,9 [0; 5]	p ₁₋₂ >0,05
Количество дегенеративных яйцеклеток	0,1±0,4 [0; 2]	0,1±0,3 [0; 2]	p ₁₋₂ >0,05
Доля дегенеративных яйцеклеток	3,2 %	2,0 %	p ₁₋₂ >0,05
Количество неоплодотворенных яйцеклеток	0,8±0,9 [0; 4]	0,8±1,1 [0; 7]	p ₁₋₂ >0,05
Доля неоплодотворенных яйцеклеток	22,2 %	22,9 %	p ₁₋₂ >0,05
Количество эмбрионов	2,8±2,3 [0; 12]	2,6±2,2 [0; 11]	p ₁₋₂ >0,05
Индекс оплодотворения	73,0 %	71,3 %	p ₁₋₂ >0,05
Количество эмбрионов хорошего качества	1,9±1,8 [0; 10]	2,0±1,5 [0; 11]	p ₁₋₂ >0,05
Доля эмбрионов хорошего качества	67,6 %	75,0 %	p ₁₋₂ =0,024
Криоконсервация эмбрионов	33(17,3 %)	20(15,0 %)	p ₁₋₂ >0,05
Количество криоэмбрионов	0,4±1,1 [0; 6]	0,4±1,3 [0; 9]	p ₁₋₂ >0,05

Примечание – Статистически значимые различия при p<0,05.

Перенос эмбрионов на 3-й день культивирования был произведен у 98 (51,3 %) пациенток в 1-й группе и у 77 (57,9 %) пациенток во 2-й группе (p₁₋₂>0,05). Доля эмбрионов, достигших стадии бластоцисты, в этих группах статистически не различалась (9,9 и 5,3 % соответственно). Среднее количество перенесенных эмбрионов у пациенток в двух группах достоверно также не различалось (1,3±0,7 и 1,4±0,7 соответственно).

Проведенный сравнительный анализ показателей эмбриологического этапа программ ЭКО у пациенток 2-х исследуемых групп показал, что протокол стимуляции с добавлением p-ЛГ отличался статистически более высокими стартовыми дозами p-ФСГ и ЛГ, курсовой дозой p-ФСГ и дозой суммарного

гонадотропина, однако длительность стимуляции и количество пунктированных фолликулов, полученных яйцеклеток и эмбрионов в этой группе статистически не отличалось от протокола с добавлением ЧМГ. Более того, доля эмбрионов хорошего качества во 2-й группе была наибольшей – 75 %. Можно сказать, что применение протокола с р-ЛГ не увеличило количество полученных эмбрионов, а улучшило их качество.

Таким образом, лучшее качество яйцеклеток и эмбрионов в протоколах стимуляции овуляции, где в качестве индуктора применяется р-ФСГ в сочетании с р-ЛГ, дает нам возможность сделать вывод, что добавление р-ЛГ может быть полезным для оптимизации исходов лечения.

3.3.3. Анализ показателей фолликуло- и стероидогенеза у пациенток исследуемых групп

В настоящее время процессы яичникового стероидогенеза изучены достаточно широко, однако механизмы влияния различных гонадотропинов на процессы фолликуло- и стероидогенеза весьма гипотетичны [22]. Для дальнейшей оценки эффективности применения того или иного протокола стимуляции мы исследовали показатели фолликуло- и стероидогенеза у 55 пациенток в каждой из исследуемых групп.

Сравнительная характеристика показателей фолликуло- и стероидогенеза двух протоколов представлена в таблице 13.

Как видно из таблицы, количество растущих фолликулов диаметром более 10 мм на 5-й день стимуляции овуляции (начало активного фолликулогенеза) в 1-й и во 2-й группе достоверно не отличались ($6,4 \pm 2,8$ и $6,5 \pm 3,6$ соответственно) и соответствовали количеству антральных фолликулов. Количество пунктируемых фолликулов в обеих группах также не отличалось и соответствовало количеству растущих фолликулов на 5-й день стимуляции.

Таблица 13 – Характеристика показателей фолликуло- и стероидогенеза у пациенток исследуемых групп

Показатель	Исследуемая группа (n=110)		Значение p
	<i>1-я группа</i> <i>p-ФСГ + ЧМГ</i> <i>n=55</i>	<i>2-я группа</i> <i>p-ФСГ + p-ЛГ</i> <i>n=55</i>	
	M±St.d	M±St.d	
Число антральных фолликулов в обоих яичниках	6,4±2,9 [1; 17]	6,6±3,5 [1; 17]	p ₁₋₂ >0,05
Число фолликулов на 5-й день СО, Ø > 10 мм	6,4±2,8 [1; 16]	6,5±3,6 [1; 16]	p ₁₋₂ >0,05
Количество пунктируемых фолликулов	5,4±3,1 [1; 15]	5,7±3,7 [1; 15]	p ₁₋₂ >0,05
Толщина эндометрия на 5-й день СО, мм	6,5±1,3 [4,0; 10,0]	6,2±1,2 [4,0; 9,0]	p ₁₋₂ >0,05
Толщина эндометрия в день введения ХГ, мм	10,0±1,9 [5,5; 14,0]	9,9±1,6 [6,0; 14,0]	p ₁₋₂ >0,05
Базальный ФСГ, mIU/ml	7,8±3,8 [1,8; 23,9]	7,3±3,4 [3,3; 18,6]	p ₁₋₂ >0,05
Уровень ФСГ на 5–7-й день СО, mIU/ml	12,2±7,2 [4,9; 51,9]	11,8±5,6 [5,3; 38,5]	p ₁₋₂ >0,05
Уровень ФСГ в день ТВП, mIU/ml	8,8±3,9 [3,8; 21,9]	7,7±4,2 [3,0; 24,0]	p ₁₋₂ >0,05
Базальный E2, pg/ml	65,4±56,3 [8,0; 197,5]	81,1±58,2 [6,8; 185,0]	p ₁₋₂ >0,05
Уровень E2 на 5–7-й день СО, pg/ml	370,0±432,7 [36,9; 1952,0]	340,9±396,4 [39,2; 1309,0]	p ₁₋₂ >0,05
Уровень E2 в день ТВП, pg/ml	1473,7±1560,6 [320,0; 4435,0]	1141,1±707,9 [180,0; 3110,0]	p ₁₋₂ >0,05
Базальный ЛГ, mIU/ml	4,7±4,1 [0,9; 20,3]	4,6±2,1 [1,3; 16,6]	p ₁₋₂ >0,05
Уровень ЛГ на 5–7-й день СО, mIU/ml	3,9±3,2 [0,4; 13,6]	3,4±3,0 [0,9; 15,2]	p ₁₋₂ >0,05
Уровень ЛГ в день ТВП, mIU/ml	1,6±2,4 [0,1; 6,5]	3,1±4,2 [0,2; 25,1]	p ₁₋₂ =0,003
Базальный P, ng/ml	13,1±8,9 [0,5; 31,7]	13,1±10,3 [0,5; 29,8]	p ₁₋₂ >0,05
Уровень P на 5–7-й день СО, ng/ml	1,5±2,5 [0,1; 14,8]	1,7±5,1 [0,2; 11,2]	p ₁₋₂ >0,05
Уровень P в день ТВП, ng/ml	6,4±4,9 [1,0; 29,1]	5,7±3,6 [1,4; 16,8]	p ₁₋₂ >0,05
Базальный АМГ, ng/ml	1,9±1,5 [0,1; 9,2]	1,4±1,2 [0,1; 9,5]	p ₁₋₂ >0,05
Уровень АМГ на 5–7-й день СО, ng/ml	1,8±2,2 [0,1; 19,5]	2,1±2,5 [0,1; 10,8]	p ₁₋₂ >0,05
Уровень АМГ в день ТВП, ng/ml	0,9±1,0 [0,03; 5,7]	1,2±1,4 [0,01; 5,5]	p ₁₋₂ >0,05

Примечание – Статистически значимые различия при p<0,05.

У пациенток обеих групп толщина эндометрия на 5-й день стимуляции ($6,5 \pm 1,3$ и $6,2 \pm 1,2$ мм) и в день введения ХГ ($10,0 \pm 1,9$ и $9,9 \pm 1,6$ мм соответственно) достоверно не отличалась. Эстрадиол действует как гормон роста в развитии эндометрия [26]. Надо отметить, что уровень эстрадиола сыворотки крови на 5–7-й день стимуляции ($370,0 \pm 432,7$ и $340,9 \pm 396,4$ pg/ml) и в день ТВП ($1473,7 \pm 1560,6$ и $1141,1 \pm 707,9$ pg/ml соответственно) в исследуемых группах не отличался.

Уровень ФСГ сыворотки крови повышался одновременно с процессом стимуляции овуляции и на 5–7-й день его уровень у пациенток 2-х групп достоверно не отличался ($12,2 \pm 7,2$ и $11,8 \pm 5,6$ mIU/ml). В день ТВП отмечалось достоверное снижение уровня ФСГ по сравнению с 5–7-м днем стимуляции, однако его уровень в обеих группах также не отличался ($8,8 \pm 3,9$ и $7,7 \pm 4,2$ mIU/ml соответственно), несмотря на то, что стартовая и курсовая дозы р-ФСГ были достоверно выше в протоколе стимуляции с добавлением р-ЛГ, чем в протоколе с ЧМГ (рисунок 7).

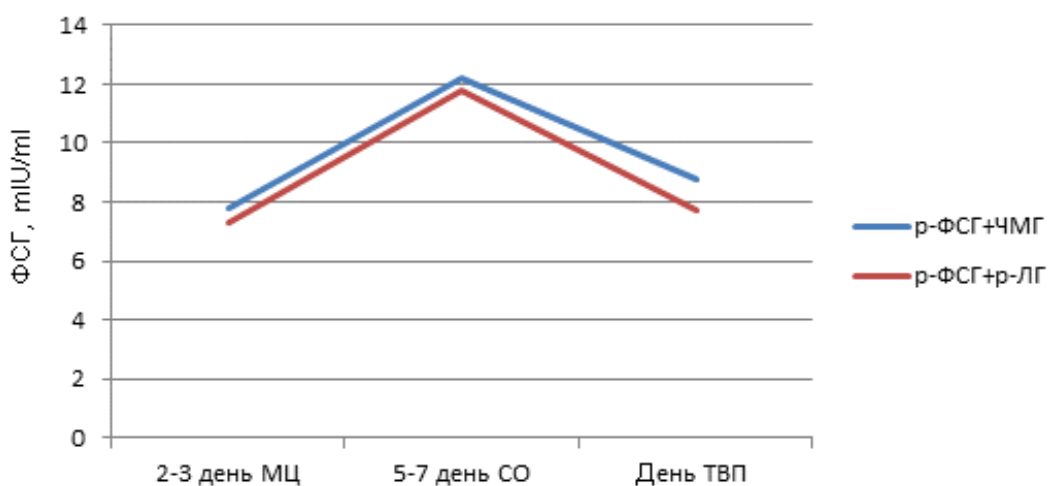


Рисунок 7 – Динамика ФСГ в течение индуцированного цикла в двух протоколах стимуляции

Уровень E2 сыворотки крови повышался одновременно с ростом фолликулов и статистически у пациенток исследуемых групп не отличался. Уровень E2 в день ТВП в обеих группах соответствовал количеству

пунктируемых фолликулов ($1473,7 \pm 1560,6$ pg/ml – $5,4 \pm 3,1$ и $1141,1 \pm 707,9$ pg/ml – $5,7 \pm 3,7$ соответственно) ($p_{1-2} > 0,05$) (рисунок 8).

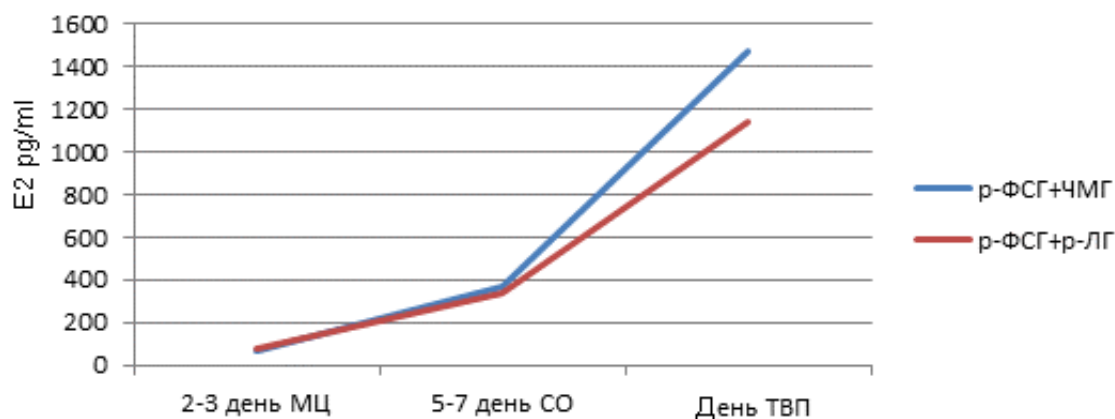


Рисунок 8 – Динамика E2 в течение индуцированного цикла в двух протоколах стимуляции

Таким образом, повышение уровня ФСГ в среднюю фолликулярную фазу цикла стимулировало рост антральных фолликулов, пролиферацию и дифференцировку гранулезных клеток, что в свою очередь вело к повышению уровня эстрогенов. В позднюю фолликулярную фазу включился механизм отрицательной обратной связи, высокий уровень эстрогенов привел к снижению концентрации ФСГ [26, 29]. Уровень эстрадиола на всех этапах фолликулогенеза отражал число растущих в яичниках фолликулов, причем это суммарный показатель, который отражал рост всех фолликулов. Однако по уровню эстрадиола судить о зрелости фолликула и качестве получаемого ооцита не представлялось возможным.

Уровень ЛГ сыворотки крови на 5–7-й день стимуляции составил в 1-й группе – $3,9 \pm 3,2$ mIU/ml и во 2-й группе – $3,4 \pm 3,0$ mIU/ml, что статистически не различалось, более того, в обеих группах отмечалось снижение уровня гормона по сравнению с исходными значениями ($p < 0,05$). Уровень ЛГ в день ТВП составил в 1-й группе – $1,6 \pm 2,4$ mIU/ml и во 2-й группе – $3,1 \pm 4,2$ mIU/ml ($p_{1-2} = 0,003$). Отмечалось достоверное снижение (в 2 раза) уровня гормона в 1-й группе по сравнению с 5–7-м днем стимуляции ($p < 0,05$). Во 2-й группе

(стимуляция р-ФСГ и р-ЛГ) уровень ЛГ в день ТВП оставался на уровне 5–7-го дня стимуляции (рисунок 9).

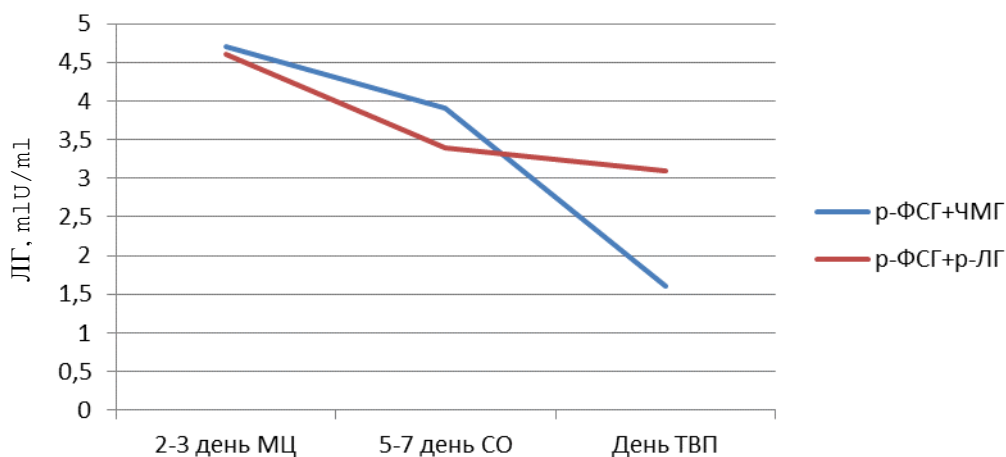


Рисунок 9 – Динамика ЛГ в течение индуцированного цикла в двух протоколах стимуляции

Уровень прогестерона на 5–7-й день у пациенток 2-х групп не отличался, однако отмечалось его снижение по сравнению с исходным в 8–9 раз ($1,5 \pm 2,5$ и $1,7 \pm 5,1$ ng/ml). В день ТВП отмечался рост уровня прогестерона в 4–5 раз по сравнению с уровнем 5–7-го дня стимуляции ($6,4 \pm 4,9$ и $5,7 \pm 3,6$ ng/ml соответственно) (рисунок 10).

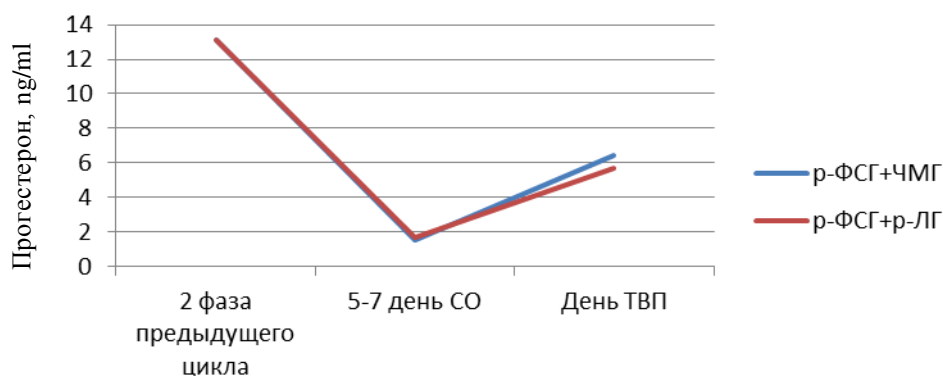


Рисунок 10 – Динамика прогестерона в течение индуцированного цикла в двух протоколах стимуляции

Таким образом, на 5–7-й день стимуляции яичников происходило снижение уровня ЛГ по сравнению с базальными значениями, причем это снижение имело место у пациенток обеих групп и не зависело от типа

применяемого ЛГ-содержащего индуктора. Значительное снижение уровня прогестерона на 5–7-й день объяснялось активным синтезом клетками гранулезы эстрогенов. В день ТВП, спустя 35–36 часов после введения овуляторной дозы ХГ, в протоколе с добавлением р-ЛГ уровень ЛГ оставался на относительно высоком уровне ($3,1 \pm 4,2$ mIU/ml) по сравнению с протоколом с добавлением ЧМГ ($1,6 \pm 2,4$ mIU/ml), что соответствовало более низкой концентрации прогестерона в данном протоколе ($5,7 \pm 3,6$ ng/ml), чем в протоколе с ЧМГ ($6,4 \pm 4,9$ ng/ml). И напротив, низкий уровень ЛГ в день ТВП в протоколе р-ФСГ в сочетании с ЧМГ соответствовал более высокому уровню прогестерона в этот день. Рост уровня прогестерона в позднюю фолликулярную фазу был связан с началом лютеинизации клеток гранулезы [26, 29].

Уровень АМГ сыворотки крови на 5–7-й день стимуляции в 1-й группе ($1,8 \pm 2,2$ ng/ml) достоверно не отличался от данного показателя во 2-й группе ($2,1 \pm 2,5$ ng/ml). Надо отметить, что уровень АМГ на 5–7-й день во 2-й группе был в 1,5 раза выше, чем базальный. Уровень АМГ в день ТВП в обеих группах был достоверно ниже, чем на 5–7-й день стимуляции. В 1-й группе (стимуляция р-ФСГ и ЧМГ) средний уровень АМГ был ниже 1 ng/ml ($0,9 \pm 1,0$), однако количество пунктируемых фолликулов в этой группе статистически не отличалось от данного показателя 2-й группы (стимуляция р-ФСГ и р-ЛГ) (рисунок 11).

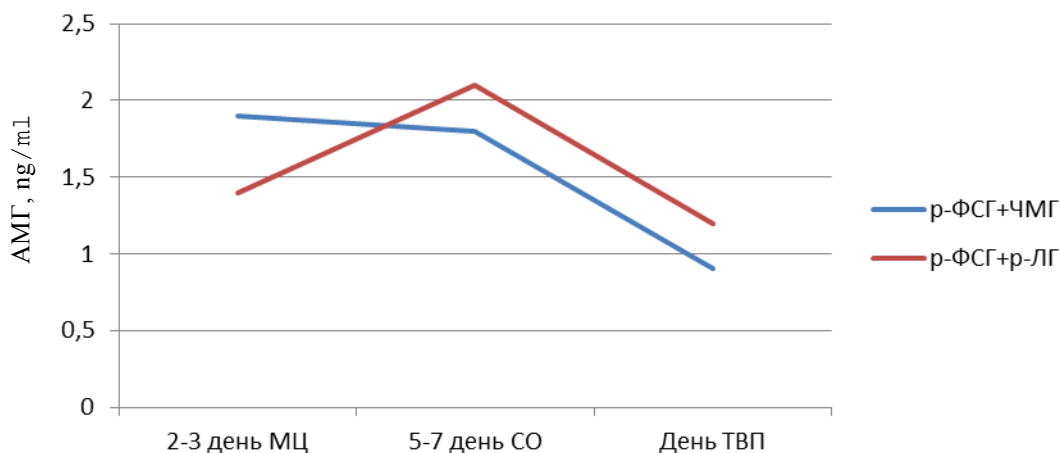


Рисунок 11 – Динамика АМГ в течение индуцированного цикла в двух протоколах стимуляции

Антимюллеров гормон синтезируется гранулезными клетками преантральных и малых антральных фолликулов (менее 4 мм). В фолликулах большего размера продукция гормонов резко снижается и почти не определяется при достижении фолликулом размера 8 мм и более [145]. Тем не менее, в нашем исследовании отмечался рост уровня АМГ на 5–7-й день стимуляции в группе с добавлением р-ЛГ, что, возможно, объяснялось запуском пула малых антральных фолликулов. Резкое снижение уровня АМГ в день ТВП во всех протоколах соответствовало большому размеру преовуляторных фолликулов.

3.3.4. Анализ биохимических показателей фолликулярной жидкости у пациенток исследуемых групп

Развитие ооцитов в растущем пуле фолликулов во многом определяется составом ФЖ, куда адсорбируются из крови или секретируются клетками гранулезы гормоны и факторы роста. БАВ, содержащиеся в антральной полости фолликула, составляют микроокружение, в котором развивается ооцит. Как избыток, так и недостаток этих соединений в ФЖ может оказывать выраженное негативное воздействие на развитие ооцита [35, 36, 69, 105, 180]. Состав ФЖ циклически меняется в зависимости от стадии развития фолликула [38]. В связи с этим был проведен сравнительный анализ уровней ФСГ, ЛГ, Е2, Р и АМГ в фолликулярной жидкости в двух протоколах стимуляции. Данные представлены в таблице 14.

Из таблицы видно, что уровень ФСГ в ФЖ в протоколе р-ФСГ с добавлением ЧМГ ($6,3 \pm 3,4$ mIU/ml) был достоверно выше, чем в протоколе с р-ФСГ с добавлением р-ЛГ ($4,9 \pm 3,9$ mIU/ml), несмотря на то, что курсовая доза р-ФСГ в последнем протоколе была достоверно выше. Уровень ЛГ в ФЖ в протоколе с добавлением р-ЛГ ($3,3 \pm 3,7$ mIU/ml) был выше, чем в протоколе с добавлением ЧМГ ($1,9 \pm 1,3$ mIU/ml) ($p_{1-2}=0,003$). Уровни Е2, Р и АМГ в ФЖ в 2 группах статистически не отличались.

Таблица 14 – Характеристика гормонального профиля фолликулярной жидкости у пациенток исследуемых групп

Показатель	Исследуемая группа (n=110)		Значение p
	<i>1-я группа</i> <i>p-ФСГ + ЧМГ</i> <i>n=55</i>	<i>2-я группа</i> <i>p-ФСГ + p-ЛГ</i> <i>n=55</i>	
	M±St.d	M±St.d	
Уровень ФСГ в день ТВП, mIU/ml	8,8±3,9 [3,8; 21,9]	7,7±4,2 [3,0; 24,0]	p>0,05
Уровень ФСГ в ФЖ, mIU/ml	6,3±3,4 [2,2; 18,8]	4,9±3,9 [1,1; 19,6]	p ₁₋₂ =0,003
Уровень ЛГ в день ТВП, mIU/ml	1,6±2,4 [0,1; 6,5]	3,1±4,2 [0,2; 25,1]	p ₁₋₂ =0,003
Уровень ЛГ в ФЖ, mIU/ml	1,9±1,3 [0,2; 8,9]	3,3±3,7 [0,1; 18,8]	p ₁₋₂ =0,003
Уровень E2 в день ТВП, pg/ml	1473,7±1560,6 [320,0; 4435,0]	1141,1±707,9 [180,0; 3110,0]	p>0,05
Уровень E2 в ФЖ, pg/ml	8251,4±418,8 [7876,2; 8417,7]	8116,2±431,9 [5546,3; 8502,2]	p>0,05
Уровень P в день ТВП, ng/ml	6,4±4,9 [1,0; 29,1]	5,7±3,6 [1,4; 16,8]	p>0,05
Уровень P в ФЖ, ng/ml	38,6±0,4 [35,5; 39,3]	38,7±0,4 [37,5; 39,3]	p>0,05
Уровень АМГ в день ТВП, ng/ml	0,9±1,0 [0,03; 5,7]	1,2±1,4 [0,01; 5,5]	p>0,05
Уровень АМГ в ФЖ, ng/ml	2,9±1,9 [0,3; 10,2]	3,1±2,8 [0,7; 16,2]	p>0,05

Примечание – Статистически значимые различия при p<0,05.

С целью выяснения возможных закономерностей между уровнями гормонов ФСГ, ЛГ, E2, P и АМГ в периферической крови и фолликулярной жидкости нами был проведен корреляционный анализ. В качестве меры зависимости между двумя переменными использовали коэффициент корреляции Спирмена (r). Выявленные взаимоотношения обозначали как имеющие «сильную» связь при $|r| = 0,75-1$, «умеренную» связь при $|r| = 0,25-0,7$ и «слабую» связь при $|r| < 0,25$ (Петри А., Сэбин К., 2003; Халафян А.А., 2008). Результаты корреляционного анализа представлены в таблице 15.

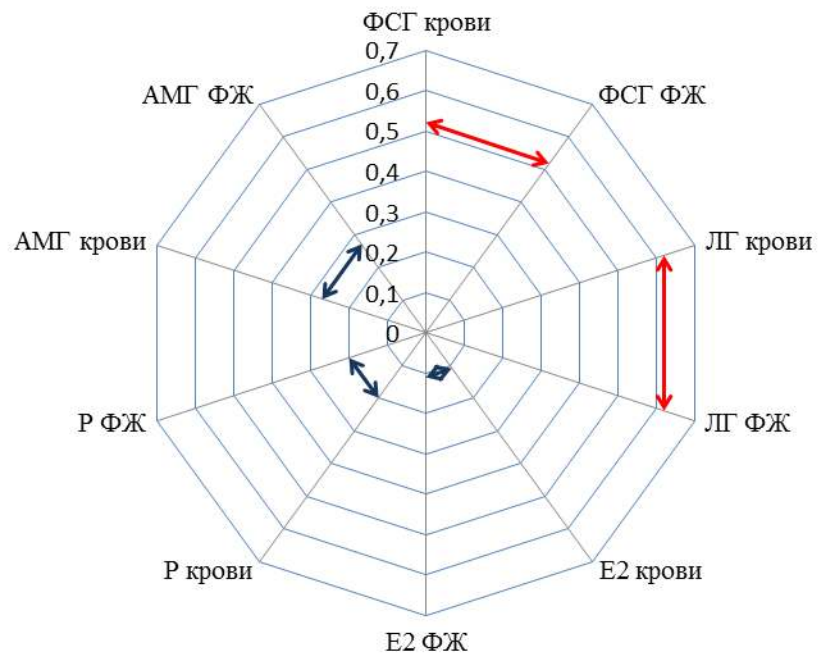
Таблица 15 – Корреляционная зависимость между уровнями гормонов периферической крови и фолликулярной жидкости

Показатель	1-я группа p-ФСГ + ЧМГ n=55	2-я группа p-ФСГ + p-ЛГ n=55
	r	r
ФСГ	0,52*	0,4*
ЛГ	0,62*	0,59*
E2	0,11	0,03
P	0,2	-0,01
АМГ	0,27	0,55*

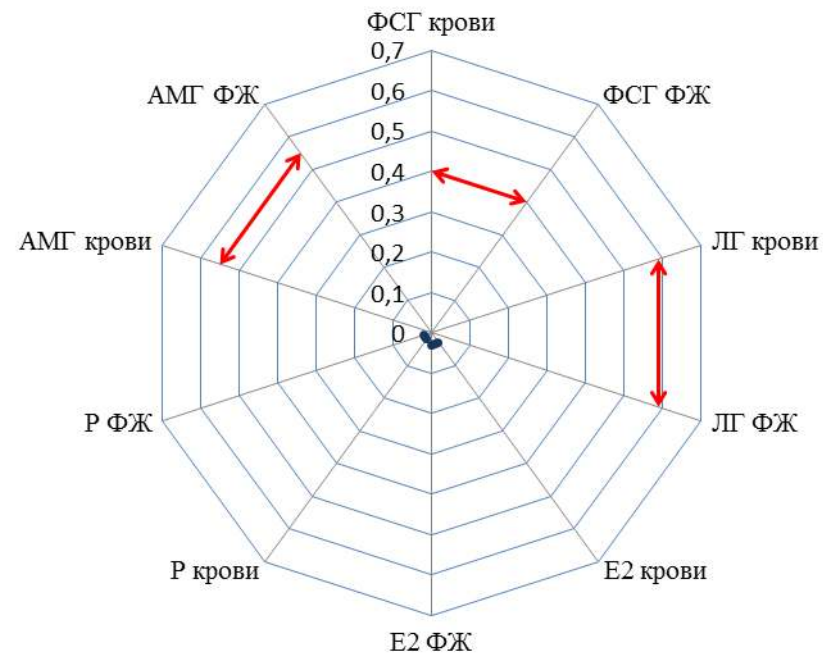
Примечание – * $p < 0,05$ статистически значимая корреляция.

Из таблицы видно, что уровни ФСГ и ЛГ в периферической крови и ФЖ в обоих протоколах стимуляции имели прямую корреляционную зависимость. Уровни АМГ также имели умеренную прямую связь, но только во 2-й группе – $r=0,55$, в 1-й группе $r=0,27$. Концентрации гормонов E2 и P в 2 группах не коррелировали (рисунок 12).

Таким образом, уровни E2 и P в ФЖ были значительно выше, чем в периферической крови, что обусловлено автономным синтезом данных гормонов гранулезными клетками непосредственно в фолликуле, и не имели между собой никакой корреляционной связи. Уровни ФСГ, ЛГ и АМГ (2-я группа) коррелировали с таковыми в периферической крови.



1-я группа



2-я группа

Рисунок 12 – Корреляционная зависимость между уровнями гормонов периферической крови и фолликулярной жидкости:

↔ (красный) – статистически значимая корреляция; ↔ (синий) – статистически не значимая корреляция

3.3.5. Оценка эффективности применения двух протоколов стимуляции

Эффективность применения двух протоколов стимуляции оценивалась по частоте синдрома пустого фолликула, «бедного ответа», СГЯ и частоте наступления беременности. Данные представлены в таблице 16.

Таблица 16 – Эффективность применения двух протоколов стимуляции

Показатель	Исследуемая группа (n=324)		Значение p
	1-я группа p-ФСГ + ЧМГ n=191	2-я группа p-ФСГ + p-ЛГ n=133	
Синдром пустого фолликула	15(7,9 %)	12(9,0 %)	p>0,05
«Бедный ответ»	116(60,7 %)	81(60,9 %)	p>0,05
СГЯ	8(4,2 %)	6(4,5 %)	p>0,05
Отмена переноса эмбрионов	26(13,6 %)	21(15,8 %)	p>0,05
Частота наступления беременности на стимулируемый цикл	29(15,2 %)	33(24,8 %)	p ₁₋₂ =0,044
Частота наступления беременности на перенос эмбриона	29(17,6 %)	33(29,5 %)	p ₁₋₂ =0,029
Биохимическая беременность	7(3,7 %)	3(2,3 %)	p>0,05
Прерывание беременности до 12 недель	8(6,5 %)	6(4,5 %)	p>0,05
Индукцированный выкидыш после 12 недель	-	1(0,8 %)	p>0,05
Внематочная беременность	1(0,5 %)	-	p>0,05
Срочные роды	20(10,5 %)	26(19,5 %)	p ₁₋₂ =0,034

Примечание – Статистически значимые различия при p<0,05.

Как видно из таблицы, использование обоих протоколов стимуляции сопровождалось высокой частотой развития «бедного ответа» (60,7 и 60,9 %), что было обусловлено низким овариальным резервом пациенток исследуемых групп (количество антральных фолликулов 6,0±3,0 и 5,7±3,1 соответственно).

С другой стороны, частота СГЯ у исследуемых пациенток регистрировалась на низком уровне: 4,2 % в 1-й группе и 4,5 % во 2-й, что также объясняется низкими показателями овариального резерва (p₁₋₂>0,05).

Надо отметить, что у всех пациенток с СГЯ регистрировалась только легкая степень тяжести данного осложнения, средняя и тяжелая степени не регистрировались.

Частота отмены переноса эмбрионов у пациенток двух групп статистически не отличалась – 13,6 и 15,8 % соответственно. Основными причинами отмены переноса эмбрионов был синдром пустого фолликула (7,9 и 9,0 %), когда во время пункции фолликулов не было получено ни одной яйцеклетки, и синдром гиперстимуляции яичников, который сопровождался криоконсервацией всех эмбрионов хорошего качества и последующим переносом криоэмбрионов в следующем нестимулируемом цикле.

Частота наступления беременности на стимулируемый цикл и на перенос эмбрионов у пациенток с протоколом стимуляции р-ФСГ + р-ЛГ отмечалась статистически выше, чем у пациенток с применением р-ФСГ + ЧМГ (24,8; 29,5–15,2; 17,6 % соответственно) ($p_{1-2}=0,044$; $p_{1-2}=0,029$). Последнее объясняется получением в процессе стимуляции р-ФСГ с добавлением р-ЛГ более высокой доли эмбрионов хорошего качества, что привело к более высокой частоте имплантаций. Однако количество прервавшихся беременностей в сроке до 12 недель в обеих группах было на одинаковом уровне (6,5 и 4,5 %). Количество срочных родов во 2-й группе (19,5 %) также отмечалось статистически выше, чем во 1-й группе (10,5 %), что может напрямую судить об эффективности применения протокола стимуляции р-ФСГ в сочетании с р-ЛГ ($p_{1-2}=0,034$). Преждевременные роды в обоих протоколах не зарегистрированы.

Представленный анализ протоколов стимуляции овуляции вряд ли можно назвать полным, учитывая то, что в состав исследуемых групп входили пациентки, получающие ЧМГ и р-ЛГ как сначала стимуляции, так и с 6–7-го дня. Поэтому дифференцированная оценка эффективности стимуляции пациенток, получающих ЧМГ или р-ЛГ сначала стимуляции или с 6–7-го дня, не представленная в доступной литературе, послужила основанием для следующего этапа нашей работы.

3.4. Сравнительный анализ эффективности различных протоколов в зависимости от времени начала стимуляции ЧМГ или р-ЛГ

В соответствии с поставленной целью и задачами для проведения сравнительного анализа индуцированного цикла исследуемые пациентки были разделены на 4 группы. 1А группу составили 123 пациентки, стимуляция у которых проводилась р-ФСГ с добавлением ЧМГ с начала стимуляции (2–3-й день менструального цикла), в 1В группу вошли 68 пациенток, когда добавление ЧМГ к р-ФСГ начиналось с 6–7-го дня стимуляции, 2А группа включила 70 пациенток, стимуляция у которых проводилась р-ФСГ с добавлением р-ЛГ со 2–3-го дня и 2В группа состояла из 63 пациенток, добавление р-ЛГ к р-ФСГ у которых начиналось с 6–7-го дня стимуляции овуляции.

3.4.1. Анализ исходных клиничко-анамнестических и клиничко-лабораторных показателей у пациенток различных протоколов стимуляции

Был проведен сравнительный анализ клиничко-анамнестических данных пациенток 4-х исследуемых групп (таблица 17).

Из представленной таблицы видно, что пациентки всех исследуемых групп были сопоставимы по клиничко-анамнестическим параметрам. Стоит отметить, что пациентки 1А группы имели более старший средний возраст ($36,1 \pm 3,9$ лет), а пациентки 2А группы чаще имели первичное (35,7 %) и более длительное ($9,3 \pm 5,3$ лет) бесплодие, чем пациентки других групп, однако отличия статистически не значимые.

Таблица 17 – Характеристика клинико-анамнестических показателей у пациенток различных протоколов стимуляции

Показатель	1А группа p-ФСГ+ +ЧМГ со 2–3-го дня n=123	1В группа p-ФСГ+ +ЧМГ с 6–7-го дня n=68	2А группа p-ФСГ+ +p-ЛГ со 2–3-го дня n=70	2В группа p-ФСГ+ +p-ЛГ с 6–7-го дня n=63	Значение p
Возраст, лет	36,1±3,9 [30; 45]	35,5±3,6 [30; 44]	35,5±5,5 [30; 45]	35,6±3,7 [30; 43]	p>0,05
Возраст менархе, годы	13,2±1,3 [10; 17]	13,3±1,4 [11; 17]	13,3±1,4 [10; 16]	13,3±1,3 [11; 17]	p>0,05
Длина менструального цикла, дни	28,9±6,1 [24; 90]	28,4±2,1 [22; 37]	28,6±4,3 [24; 60]	28,4±4,5 [21; 60]	p>0,05
Индекс массы тела, кг/м ²	24,8±4,1 [16,7; 35,9]	24,8±4,9 [18,5;38,2]	24,7±4,5 [16,6; 34,1]	25,6±4,9 [17,1; 38,2]	p>0,05
Продолжительность бесплодия, годы	7,6±4,2 [3; 19]	8,1±4,2 [3; 20]	9,3±5,3 [3; 20]	9,2±5,2 [3; 20]	p>0,05
Первичное бесплодие	37(30,1 %)	21(30,9 %)	25(35,7 %)	19(30,2 %)	p>0,05
Вторичное бесплодие	86(69,9 %)	47(69,1 %)	45(64,3 %)	44(69,8 %)	p>0,05

Примечание – Статистически значимые различия при p<0,05.

Были проанализированы исходные клинико-лабораторные и ультразвуковые показатели пациенток 4-х групп (таблица 18).

Анализ показал, что исследуемые пациентки имели сопоставимые данные исходного овариального резерва, на что показывали базальные уровни ФСГ, АМГ, размеры яичников и количество антральных фолликулов. Однако количество антральных фолликулов во всех 4-х группах соответствовало низкому овариальному резерву. Средние базальные уровни гормонов крови находились в пределах номинативных значений. Надо отметить, что уровень эстрадиола в 2В группе (66,4±68,1 pg/ml) был достоверно выше, чем в 1А (49,5±58,9 pg/ml) и 2А (49,5±53,5 pg/ml) группах ($p_{1A-2B}=0,006$; $p_{2A-2B}=0,034$). Данный факт может быть объяснен тем, что пациентки 2В группы имели несколько большее количество антральных фолликулов (6,1±3,1) ($p>0,05$), чем пациентки других групп, что и способствовало более высокому уровню базального эстрадиола.

Таблица 18 – Характеристика клинико-лабораторных и ультразвуковых показателей у пациенток различных протоколов стимуляции

Показатель	1А группа р-ФСГ+ +ЧМГ со 2–3-го дня n=123	1В группа р-ФСГ + +ЧМГ с 6–7-го дня n=68	2А группа р-ФСГ+ +р-ЛГ со 2–3-го дня n=70	2В группа р-ФСГ+ +р-ЛГ с 6–7-го дня n=63	Значение p
	M±St.d	M±St.d	M±St.d	M±St.d	
Базальный ЛГ, mIU/ml	5,0±3,3 [0,9; 20,3]	5,2±2,8 [1,0; 12,7]	5,1±3,0 [1,3; 16,6]	5,3±3,2 [2,0; 14,4]	p>0,05
Базальный ФСГ, mIU/ml	8,2±3,8 [1,8; 23,9]	7,8±2,8 [1,8; 13,9]	8,4±4,1 [4,1; 15,1]	7,9±4,2 [3,3; 18,6]	p>0,05
Базальный E2, pg/ml	49,5±58,9 [8,0; 197,5]	49,1±36,6 [8,7; 155,8]	49,5±53,5 [6,8; 180,2]	66,4±68,1 [5,9; 185,0]	p _{1А-2В} =0,006 p _{2А-2В} =0,034
Базальный Р, ng/ml	11,2±7,4 [0,5; 31,7]	10,0±7,3 [0,5; 26,6]	10,2±6,6 [0,5; 29,8]	10,6±10,3 [0,5; 26,5]	p>0,05
Базальный АМГ, ng/ml	1,9±1,7 [0,1; 9,2]	2,0±1,9 [0,1; 9,1]	1,7±1,6 [0,1; 9,4]	1,9±1,6 [0,1; 9,5]	p>0,05
Объем левого яичника, см ³	8,0±6,7 [1,0; 41,7]	8,0±6,1 [1,9; 35,6]	7,7±5,0 [1,1; 30,7]	8,5±7,3 [1,9; 43,9]	p>0,05
Объем правого яичника, см ³	7,4±7,8 [1,2; 63,7]	6,9±3,5 [1,2; 15,3]	7,3±8,5 [1,7; 66,0]	8,6±7,8 [2,2; 49,0]	p>0,05
Число антральных фолликулов в обоих яичниках	6,0±2,9 [1; 16]	6,0±3,2 [2; 17]	5,8±3,1 [1; 16]	6,1±3,1 [2; 17]	p>0,05

Примечание – Статистически значимые различия при p<0,05.

3.4.2. Анализ показателей эмбриологического этапа у пациенток различных протоколов стимуляции

Сравнительный анализ показателей индуцированного цикла у пациенток 4-х групп представлен в таблице 19.

Из таблицы видно, что наименьшая стартовая (161,2±57,4 МЕ) и курсовая (1627,9±617,2 МЕ) дозы р-ФСГ в процессе стимуляции потребовались в 1А группе (добавление ЧМГ со 2–3-го дня), и наоборот, наибольшие дозы р-ФСГ (229,6±79,1 МЕ и 2148,4±886,8 МЕ) были затрачены в 2А группе (добавление р-ЛГ со 2–3-го дня). Также в 2А группе отмечалась наибольшая стартовая доза ЛГ (80,8±23,2 МЕ), однако наибольшая курсовая доза ЛГ (839,3±614,5 МЕ) потребовалась в 1А протоколе (p<0,05). В итоге суммарная доза

гонадотропина, затраченная в процессе индукции овуляции потребовалась в 2А группе ($2865,8 \pm 1163,3$ МЕ) ($p < 0,05$). Средняя продолжительность стимуляции овуляции в 4-х протоколах статистически не отличалась.

Таким образом, у пациенток в группе с добавлением р-ЛГ со 2–3-го дня отмечался более медленный рост фолликулов, потребовавший наибольшей курсовой дозы гонадотропинов в процессе стимуляции овуляции, что вероятно можно объяснить более длительным первичным бесплодием и низким уровнем базального эстрадиола в данной группе.

Таблица 19 – Дозы гонадотропинов у пациенток различных протоколов стимуляции

Показатель	<i>1А группа р-ФСГ + ЧМГ со 2–3-го дня n=123</i>	<i>1В группа р-ФСГ + +ЧМГ с 6–7-го дня n=68</i>	<i>2А группа р-ФСГ + +р-ЛГ со 2–3-го дня n=70</i>	<i>2В группа р-ФСГ + +р-ЛГ с 6–7-го дня n=63</i>	Значение p
	M±St.d	M±St.d	M±St.d	M±St.d	
Стартовая доза ФСГ, МЕ	161,2±57,4 [75,0; 337,5]	196,5±58,8 [37,5; 375,0]	229,6±79,1 [112,5; 375,0]	226,8±82,3 [75,0; 375,0]	$p_{1A-1B} < 0,05$ $p_{1A-2A} < 0,05$ $p_{1A-2B} < 0,05$ $p_{1B-2A} = 0,039$
Курсовая доза ФСГ, МЕ	1627,9±617,2 [412,5; 3787,5]	1787,2±636,2 [337,5; 3900]	2148,4±886,8 [1050,0; 5850]	2029,9±825,3 [675,0; 3825]	$p_{1A-1B} = 0,003$ $p_{1A-2A} < 0,05$ $p_{1A-2B} < 0,05$ $p_{1B-2A} = 0,001$
Стартовая доза ЛГ, МЕ	71,1±39,2 [37,5; 187,5]	58,5±36,3 [37,5; 187,5]	80,8±23,2 [37,5; 150,0]	78,6±20,9 [75,0; 275,0]	$p_{1A-1B} < 0,05$ $p_{1B-2A} < 0,05$ $p_{1B-2B} < 0,05$
Курсовая доза ЛГ, МЕ	839,3±614,5 [225,0; 2962,5]	544,3±412,9 [112,5; 217,5]	717,5±442,6 [75,0; 2925,0]	665,9±423,2 [150,0; 2925]	$p_{1A-1B} < 0,05$ $p_{1A-2A} = 0,038$ $p_{1A-2B} = 0,001$ $p_{1B-2A} < 0,05$ $p_{1B-2B} = 0,009$
Курсовая доза гонадотропин, МЕ	2473,9±1016,6 [825,0; 5925,0]	2346,1±916,7 [675,0; 5362,5]	2865,8±1163,3 [1575,5; 8775]	2695,8±995,1 [1350,0; 5400]	$p_{1A-2A} = 0,003$ $p_{1B-2A} < 0,05$ $p_{1B-2B} = 0,024$
Продолжитель- ность стимуляции, дней	9,8±2,0 [6; 16]	10,0±2,1 [6; 17]	9,6±2,3 [6; 15]	9,9±2,6 [7; 19]	$p > 0,05$

Примечание – Статистически значимые различия при $p < 0,05$.

Сравнительный анализ показателей эмбриологического этапа у пациенток 4-х исследуемых групп представлен в таблице 20.

Таблица 20 – Характеристика основных эмбриологических показателей у пациенток различных протоколов стимуляции

Показатель	1А группа p-ФСГ+ +ЧМГ со 2–3-го дня n=123	1В группа p-ФСГ+ +ЧМГ с 6–7-го дня n=68	2А группа p-ФСГ+ +p-ЛГ со 2–3-го дня n=70	2В группа p-ФСГ+ +p-ЛГ с 6–7-го дня n=63	Значение p
Количество пунктированных фолликулов	5,0±2,9 [1; 15]	4,8±2,9 [1; 15]	4,5±3,1 [1; 14]	5,0±3,4 [1; 15]	p>0,05
Количество полученных яйцеклеток	3,6±2,9 [0; 15]	3,6±2,9 [0; 13]	2,9±2,7 [0; 13]	4,0±3,1 [0; 15]	p _{2А-2В} =0,009
Количество зрелых яйцеклеток	3,0±2,6 [0; 13]	3,0±2,4 [0; 11]	2,3±2,1 [0; 11]	3,1±2,6 [0; 13]	p>0,05
Количество незрелых яйцеклеток	0,5±0,7 [0; 3]	0,6±0,8 [0; 3]	0,4±0,8 [0; 3]	0,8±1,1 [0; 5]	p _{1А-2В} =0,049 p _{2А-2В} =0,011 p _{1В-2А} =0,018
Доля незрелых яйцеклеток	13,3 %	16,2 %	14,5 %	20,8 %	p _{1А-2В} =0,014
Количество дегенеративных яйцеклеток	0,2±0,4 [0; 2]	0,1±0,3 [0; 1]	0,1±0,3 [0; 2]	0,1±0,3 [0; 2]	p>0,05
Доля дегенеративных яйцеклеток	3,9 %	2,0 %	2,5 %	1,6 %	p>0,05
Количество неоплодотворенных яйцеклеток	0,8±0,9 [0; 4]	0,8±1,0 [0; 4]	0,5±0,8 [0; 3]	1,0±1,4 [0; 2]	p _{1А-2А} =0,048 p _{2А-2В} =0,016 p _{1В-2А} =0,049
Доля неоплодотворенных яйцеклеток	22,7 %	21,5 %	18,0 %	27,0 %	p _{2А-2В} =0,032
Количество полученных эмбрионов	2,7±2,4 [0; 12]	2,8±2,3 [0; 12]	2,3±2,1 [0; 11]	2,9±2,3 [0; 10]	p>0,05
Количество эмбрионов хорошего качества	1,8±1,3 [0; 7]	2,0±2,5 [0; 10]	1,8±1,1 [0; 5]	2,0±1,8 [0; 11]	p>0,05
Доля эмбрионов хорошего качества	65,9 %	70,5 %	78,0 %	67,1 %	p _{2А-2В} =0,034 p _{1А-2А} =0,009
Индекс оплодотворения	73,0 %	73,1 %	73,0 %	69,5 %	p>0,05
Криоконсервация эмбрионов	16,3 %	19,1 %	14,3 %	15,9 %	p>0,05
Количество криоэмбрионов	0,4±1,1 [0; 6]	0,4±0,9 [0; 5]	0,3±0,9 [0; 4]	0,6±1,7 [0; 9]	p>0,05

Примечание – Статистически значимые различия при p<0,05.

Среднее количество пунктированных фолликулов во всех 4-х группах статистически не отличалось и соответствовало субоптимальному овариальному ответу. Наименьшее количество яйцеклеток было получено у пациенток 2А группы ($2,9 \pm 2,7$) ($p_{2A-2B}=0,009$). Однако наименьшее количество незрелых яйцеклеток отмечалось также в 2А группе ($0,4 \pm 0,8$) ($p_{1A-2B}=0,049$; $p_{2A-2B}=0,011$; $p_{1B-2A}=0,018$). Наибольшая доля незрелых яйцеклеток отмечалась в 2В группе (20,8 %) ($p_{1A-2B}=0,014$). Это объясняется тем, что пул преовуляторных фолликулов у пациенток 2А группы (добавление р-ЛГ со 2–3-го дня) был более однородным, чем у пациенток 1А, 1В и 2В групп, у которых при большем количестве полученных яйцеклеток, значительная часть из них были незрелыми. С этим же связана и меньшая доля неоплодотворенных яйцеклеток в 2А группе (18,0 %) ($p_{2A-2B}=0,032$). Общее количество полученных эмбрионов и количество эмбрионов хорошего качества у пациенток исследуемых групп статистически не отличалось. Однако доля эмбрионов хорошего качества была наибольшей в 2А группе (78,0 %) ($p_{2A-2B}=0,034$; $p_{1A-2A}=0,009$). Индекс оплодотворения (процент оплодотворившихся яйцеклеток от общего количества полученных) во всех 4-х группах статистически не отличался.

Криоконсервация лишних эмбрионов хорошего качества проводилась в 16,3 % случаев в 1А группе, в 19,1 % – в 1В группе, в 14,3 % – в 2А группе и в 15,9 % – в 2В группе ($p>0,05$). Среднее количество криоэмбрионов во всех 4-х группах статистически не отличалось.

Проведенный сравнительный анализ четырех ЛГ-содержащих протоколов стимуляции показал, что добавление ЧМГ или р-ЛГ в процессе стимуляции овуляции на разных этапах созревания фолликулов по-разному влияет на качество и количество полученных ооцитов и эмбрионов. Так, в 1А группе (добавление к р-ФСГ ЧМГ со 2–3-го дня) в процессе стимуляции было затрачено наименьшее количество р-ФСГ, наибольшее количество ЛГ-содержащих гонадотропинов, отмечалась относительно высокая доля

дегенеративных яйцеклеток и наименьшая доля эмбрионов хорошего качества. В 1В группе (добавление к р-ФСГ ЧМГ с 6–7-го дня) пациентки в процессе стимуляции получили средние дозы р-ФСГ и минимальные дозы ЛГ-содержащего индуктора, что привело к получению среднего количества эмбрионов. В 2В группе (добавление к р-ФСГ р-ЛГ с 6–7-го дня) стимуляция овуляции проводилась относительно высокими дозами гонадотропинов, было получено наибольшее количество яйцеклеток, однако и наибольшее количество незрелых и неоплодотворенных яйцеклеток. В 2А группе (добавление к р-ФСГ р-ЛГ со 2–3-го дня) были затрачены максимальные курсовые дозы р-ФСГ и общего гонадотропина, отмечался медленный рост фолликулов, что привело к получению наименьшего количества яйцеклеток, однако и к наименьшему количеству незрелых и неоплодотворенных яйцеклеток, а также к наибольшей доле эмбрионов хорошего качества.

3.4.3. Анализ показателей фолликуло- и стероидогенеза у пациенток различных протоколов стимуляции

Сравнительная характеристика показателей фолликуло- и стероидогенеза у пациенток 4-х исследуемых групп представлена в таблице 21.

Количество растущих фолликулов на 5-й день стимуляции и количество пунктированных фолликулов во всех группах статистически не отличалось и соответствовало количеству антральных фолликулов в своей группе.

Толщина эндометрия на 5-й день стимуляции и в день введения ХГ также во всех группах статистически не отличалась.

Уровень ФСГ на 5–7-й день стимуляции во всех группах статистически не отличался. Однако в день ТВП его уровень в 1А группе был наибольшим ($9,4 \pm 4,1$ mIU/ml). Надо отметить, что курсовая доза р-ФСГ в этой группе была наименьшей ($1627,9 \pm 617,2$ ME).

Таблица 21 – Характеристика показателей фолликуло- и стероидогенеза у пациенток различных протоколов стимуляции

Показатель	<i>1А группа p-ФСГ+ +ЧМГ со 2– 3-го дня n=37</i>	<i>1В группа p-ФСГ + +ЧМГ с 6–7-го дня n=18</i>	<i>2А группа p-ФСГ+ +p-ЛГ со 2–3-го дня n=25</i>	<i>2В группа p-ФСГ+ +p-ЛГ с 6–7-го дня n=30</i>	Значение p
	M±St.d	M±St.d	M±St.d	M±St.d	
Число антральных фолликулов в обоих яичниках	6,5±3,1 [1; 16]	6,3±2,4 [2; 17]	6,2±4,2 [1; 16]	6,9±2,8 [2; 17]	p>0,05
Число фолликулов, на 5-й день стимуляции Ø > 10 мм	6,5±3,0 [1; 16]	6,1±2,4 [2; 15]	6,1±4,3 [1; 16]	6,9±2,8 [2; 15]	p>0,05
Количество пунктируемых фолликулов	5,2±3,4 [1; 15]	5,8±2,7 [1; 15]	5,6±4,2 [1; 14]	5,9±3,3 [1; 15]	p>0,05
Толщина эндометрия на 5-й день, мм	6,3±1,1 [4,0; 9,0]	6,9±1,6 [4,0; 10,0]	6,1±1,3 [4,0; 9,0]	6,3±1,2 [4,0; 9,0]	p>0,05
Толщина эндометрия в день введения ХГ, мм	10,1±2,1 [5,5; 14,0]	9,9±1,6 [6,6; 14,0]	9,9±1,3 [6,0; 14,0]	9,9±1,2 [7,1; 13,0]	p>0,05
Базальный ФСГ, mIU/ml	8,1±4,3 [1,8; 23,9]	7,2±2,8 [1,8; 13,9]	7,6±3,9 [4,1; 15,1]	7,0±2,9 [3,3; 18,6]	p>0,05
Уровень ФСГ на 5–7-й день СО, mIU/ml	12,7±8,0 [4,9; 51,9]	11,1±5,0 [5,3; 24,9]	11,8±7,1 [5,3; 38,5]	11,8±4,1 [5,8; 20,7]	p>0,05
Уровень ФСГ в день ТВП, mIU/ml	9,4±4,1 [3,8; 21,9]	7,5±3,5 [3,8; 16,7]	8,1±5,4 [3,0; 24,0]	7,4±2,8 [3,0; 12,3]	p _{1А-1В} =0,046 p _{1А-2А} =0,03 p _{1А-2В} =0,048
Базальный Е2, pg/ml	71,9±66,4 [8,0; 197,5]	52,9±24,9 [8,7; 155,8]	79,3±59,3 [6,8; 180,2]	82,5±58,4 [5,9; 185,0]	p _{1В-2В} =0,04
Уровень Е2 на 5–7-й день СО, pg/ml	436,3±504,2 [47,6; 1952,0]	229,8±147,1 [36,9; 488,0]	199,9±125,1 [51,0; 508,0]	462,3±501,1 [39,2; 1309]	p _{2А-2В} =0,008
Уровень Е2 в день ТВП, pg/ml	1549,9±1725,9 [320,0; 4435,0]	1321,3±1192,9 [363,0; 4435,0]	920±529,3 [220,0; 2144,0]	1325,3±790,1 [180; 3110]	p _{2А-2В} =0,04
Базальный ЛГ, (mIU/ml)	5,1±4,7 [0,9; 20,3]	3,9±2,2 [1,0; 12,7]	4,7±2,1 [1,3; 16,6]	4,6±2,1 [2,0; 14,4]	p>0,05
Уровень ЛГ на 5–7-й день СО, mIU/ml	3,9±3,1 [0,4; 13,6]	4,0±3,5 [0,6; 10,7]	2,8±1,5 [0,9; 6,2]	3,9±3,8 [0,9; 15,2]	p>0,05
Уровень ЛГ в день ТВП, mIU/ml	1,5±2,6 [0,1; 5,8]	1,5±1,9 [0,2; 6,5]	3,9±5,6 [0,2; 25,1]	2,4±2,4 [0,2; 9,0]	p _{1А-2А} =0,004 p _{1В-2А} =0,013
Базальный Р, ng/ml	13,9±9,3 [0,5; 31,7]	11,8±8,4 [0,5; 26,6]	12,6±8,7 [0,5; 29,8]	13,5±11,7 [0,5; 26,5]	p>0,05
Уровень Р на 5–7-й день СО, ng/ml	1,2±1,6 [0,1; 6,6]	2,0±3,9 [0,2; 14,8]	2,6±7,3 [0,2; 11,2]	0,9±1,1 [0,2; 5,1]	p>0,05
Уровень Р в день ТВП, ng/ml	5,9±3,9 [1,0; 16,3]	7,3±6,4 [1,3; 29,1]	4,2±2,9 [1,4; 14,8]	6,9±3,7 [1,4; 16,8]	p _{1В-2А} =0,04 p _{2А-2В} =0,001
Базальный АМГ, ng/ml	1,8±1,5 [0,1; 9,2]	2,1±1,3 [0,1; 9,1]	1,4±1,4 [0,1; 9,4]	1,4±0,9 [0,1; 9,5]	p>0,05
Уровень АМГ на 5–7-й день СО, ng/ml	1,8±2,4 [0,1; 11,5]	1,6±1,3 [0,1; 3,9]	1,9±2,6 [0,1; 10,8]	2,4±2,3 [0,1; 10,0]	p _{2А-2В} =0,049
Уровень АМГ в день ТВП, ng/ml	1,0±1,1 [0,01; 5,7]	0,9±3,3 [0,01; 3,3]	1,0±1,3 [0,01; 5,3]	1,2±1,6 [0,1; 5,5]	p>0,05

Примечание – Статистически значимые различия при p<0,05.

Уровень E2 сыворотки крови повышался одновременно с ростом фолликулов, однако в 2А группе (добавление р-ЛГ со 2–3-го дня) уровень E2 на 5–7-й день стимуляции не соответствовал количеству растущих фолликулов в этой группе, отмечался на самом низком уровне ($199,9 \pm 125,1$ pg/ml) из четырех групп и статистически отличался от уровня E2 в 2В группе ($462,3 \pm 501,1$ pg/ml), несмотря на то, что количество растущих фолликулов было на одном уровне. В день ТВП уровень E2 сыворотки крови в 2А группе был также самым низким ($920 \pm 529,3$ pg/ml) из 4-х групп и статистически отличался от такового в 2В группе ($1325,3 \pm 790,1$ pg/ml), однако количество пунктируемых фолликулов в 4-х группах достоверно не отличалось. Надо отметить, что количество полученных яйцеклеток в 2А группе было наименьшим из 4 групп, что, вероятно, явилось следствием менее активного стероидогенеза в этой группе (см. таблицу 20).

Уровень ЛГ сыворотки крови на 5–7-й день стимуляции в 1А, 2А и 2В группах снизился в 1,5 раза, причем как в протоколах с ЧМГ, так и р-ЛГ. В 1В группе уровень ЛГ на 6–7-й день соответствовал базальному. Снижение уровня ЛГ наблюдалось даже в группах, где добавление ЛГ-содержащего препарата начиналось со 2–3-го дня менструального цикла. В день ТВП, спустя 35–36 часов после введения овуляторной дозы ХГ, в 1А и в 1В группах (протоколы с ЧМГ) уровень ЛГ в сыворотке был в 2,5 раза ниже, чем на 5–7-й день. В группе с добавлением р-ЛГ со 2–3-го дня уровень ЛГ в день ТВП был в 1,5 раза выше по сравнению с 5–7-м днем ($3,9 \pm 5,6$ mIU/ml), а в группе с добавлением р-ЛГ с 6–7-го дня стимуляции ЛГ крови в день ТВП был в 1,5 раза ниже, чем на 5–7-й день ($2,4 \pm 2,4$ mIU/ml) (рисунок 13).

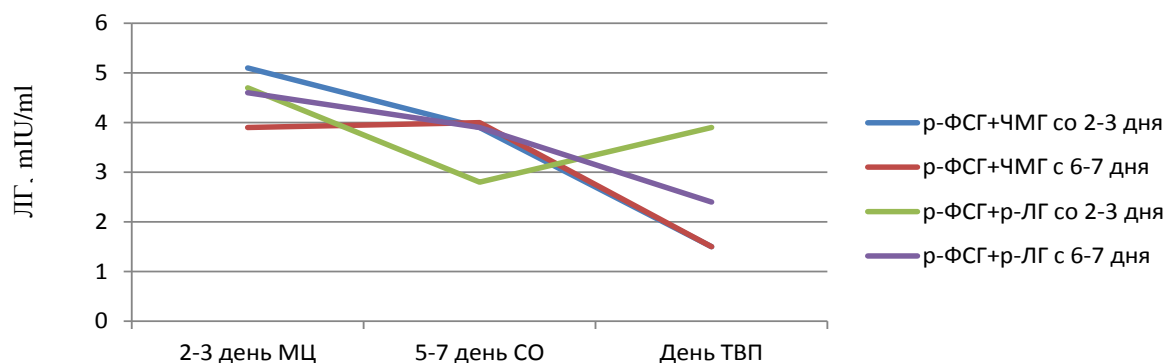


Рисунок 13 – Динамика ЛГ в течение индуцированного цикла у пациенток различных протоколов стимуляции

На 5–7-й день стимуляции у пациенток 4 групп отмечалось снижение уровней прогестерона крови по сравнению с исходным в 5–15 раз. В день ТВП отмечался рост уровня Р по сравнению с показателями 5–7-го дня в 2–7 раз. Уровень прогестерона в 2А группе был минимальным по сравнению с данным показателем других групп ($p_{1B-2A}=0,04$; $p_{2A-2B}=0,001$).

Таким образом, в 1А, в 1В и в 2В группах динамика ЛГ в течение индуцированного цикла имела общую тенденцию. Однако процессы стероидогенеза в 2А группе (добавление р-ЛГ со 2–3-го дня) имели особенности. Согласно концепции «потолочных» значений ЛГ (Hillier S., 1994) существуют пороговые концентрации ЛГ, ниже которых нарушается адекватная функция фолликулов и ооциты могут не достичь степени зрелости. Высокие концентрации ЛГ подавляют пролиферацию гранулезы, вызывая атрезию фолликулов. Впоследствии это приводит к получению эмбрионов низкого качества. В 2А группе на 5–7-й день отмечалось значительное снижение концентрации ЛГ до уровня $2,8 \pm 1,5$ mIU/ml, в других группах этот показатель был значительно выше. Также в 2А группе регистрировался низкий уровень продукции E2, сопровождающийся наименьшим количеством полученных яйцеклеток, однако отмечалась наибольшая доля эмбрионов хорошего качества. Уровень прогестерона в 2А группе в день ТВП был самым низким из 4-х групп, прогностически более благоприятным для имплантации и

соответствовал самой высокой концентрации ЛГ в этот день.

На 5–7-й день стимуляции уровень АМГ неоднозначно реагировал на протокол стимуляции. Так, в 1А группе его уровень оставался на уровне базального, в 1В группе отмечалось незначительное снижение, а в 2А и 2В – повышение. В день ТВП отмечалось стойкое снижение уровня АМГ, причем в 1В группе среднее значение было ниже 1,0 ng/ml ($0,9 \pm 3,3$ ng/ml) (рисунок 14).

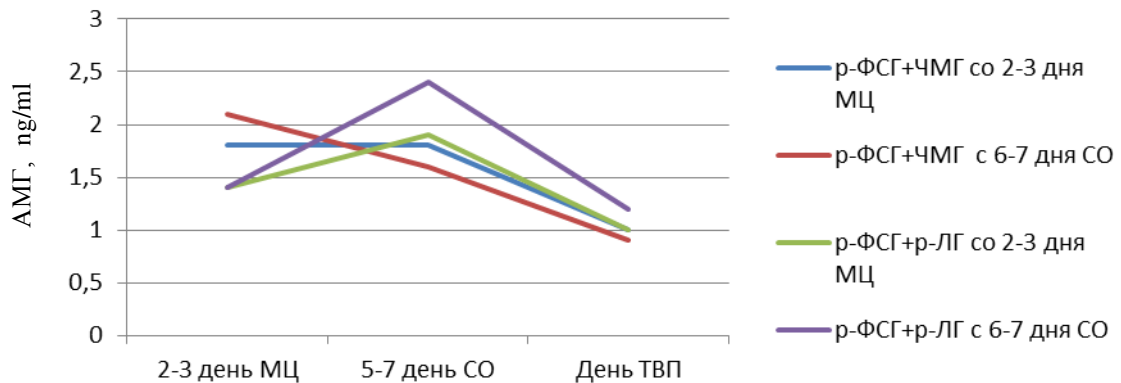


Рисунок 14 – Динамика АМГ в течение индуцированного цикла у пациенток различных протоколов стимуляции

Анализ динамики уровней АМГ в течение индуцированного цикла показал, что повышение концентрации АМГ на 5–7-й день стимуляции в протоколах с р-ЛГ, вероятно, свидетельствовало о запуске пула малых антральных фолликулов.

3.4.4. Оценка эффективности применения четырех протоколов стимуляции

Сравнительный анализ показателей эффективности применения 4-х протоколов стимуляции представлены в таблице 22.

Из таблицы видно, что частота синдрома пустого фолликула во всех четырех группах статистически не отличалась. Частота СГЯ также не отличалась и регистрировалась на низком уровне – 3,3; 5,9; 5,7 и 3,2 % соответственно ($p > 0,05$).

Таблица 22 – Эффективность применения четырех протоколов стимуляции

Показатель	1А группа p-ФСГ+ +ЧМГ со 2–3-го дня n=123	1В группа p-ФСГ+ +ЧМГ с 6–7-го дня n=68	2А группа p-ФСГ+ +p-ЛГ со 2–3-го дня, n=70	2В группа p-ФСГ+ +p-ЛГ с 6–7-го дня n=63	Значение p
Синдром пустого фолликула	8(6,5 %)	7(10,3 %)	7(10,0 %)	5(7,9 %)	p>0,05
«Бедный ответ»	78(63,4 %)	38(55,9 %)	51(72,9 %)	30(47,6 %)	p _{2А-2В} =0,005 p _{1В-2А} =0,056
СГЯ	4(3,3 %)	4(5,9 %)	4(5,7 %)	2(3,2 %)	p>0,05
Отмена переноса эмбрионов	14(11,4 %)	12(17,6 %)	13(18,6 %)	8(12,7 %)	p>0,05
Частота наступления беременности на стимулируемый цикл	19(15,4 %)	10(14,7 %)	21(30,0 %)	12(19,0 %)	p _{1А-2А} =0,026 p _{1В-2А} =0,051
Частота наступления беременности на перенос эмбриона	19(17,4 %)	10(17,9 %)	21(36,8 %)	12(21,8 %)	p _{1А-2А} =0,01 p _{1В-2А} =0,041
Биохимическая беременность	5(4,1 %)	2(2,9 %)	-	3(4,8 %)	p>0,05
Прерывание беременности до 12 недель	4(3,3 %)	4(5,9 %)	2(2,9 %)	4(6,3 %)	p>0,05
Индукцированный выкидыш после 12 недель	-	-	-	1(1,6 %)	p>0,05
Внематочная беременность	-	1(1,5 %)	-	-	p>0,05
Срочные роды	14(11,4 %)	6(8,8 %)	18(25,7 %)	8(12,7 %)	p _{1А-2А} =0,018 p _{1В-2А} =0,017

Примечание – Статистически значимые различия при p<0,05.

Добавление p-ЛГ со 2–3-го дня чаще всего сопровождалось развитием «бедного ответа» (72,9 %), что подтверждалось получением в данной группе пациенток наименьшего количества яйцеклеток. В группе с добавлением p-ЛГ с 6–7-го дня частота «бедного» ответа, наоборот, была наименьшей (47,6 %). Однако частота наступления беременности на стимулируемый цикл, на перенос эмбрионов и процент срочных родов в группе с добавлением p-ЛГ со

2–3-го дня были наибольшими (30; 36,8; 25,7 % соответственно), что является следствием получения в этой группе наибольшей доли эмбрионов хорошего качества (78 %). Надо отметить, что биохимические беременности в этой группе вообще не регистрировалась. Частота потери беременности на ранних этапах (до 12 недель) у пациенток 4-х исследуемых групп не отличалась.

Анализ эффективности применяемых 4-х ЛГ-содержащих протоколов показал, что протокол с добавлением р-ЛГ со 2–3-го дня у пациенток с низким овариальным резервом не способствует преодолению «бедного» ответа яичников и не увеличивает количество полученных яйцеклеток и эмбрионов, а способствует улучшению качества эмбрионов, что приводит к статистическому увеличению частоты имплантаций и впоследствии к частоте срочных родов.

3.4.5. Корреляционный анализ биохимических показателей сыворотки крови и показателей фолликуло- и оогенеза у пациенток различных протоколов стимуляции

С целью выяснения патогенетической роли ЛГ и ЛГ-содержащих препаратов (ЧМГ и р-ЛГ) в процессе фолликуло- и оогенеза индуцированного цикла нами был проведен корреляционный анализ уровней гормонов сыворотки крови ФСГ, E2, ЛГ, P и АМГ с количеством пунктируемых фолликулов, полученных яйцеклеток, зрелых яйцеклеток, количеством эмбрионов и количеством эмбрионов хорошего качества.

Уровень ФСГ на 5–7-й день имел умеренную обратную связь с показателями фолликуло- и оогенеза в 1А ($r = -0,43$; $r = -0,34$) и 2А группах ($r = -0,74$; $r = -0,55$; $r = -0,56$; $r = -0,56$; $r = -0,54$). Уровень ФСГ в день ТВП с данными показателями не коррелировал.

Уровень эстрадиола увеличивался с ростом фолликулов, однако на 5–7-й день только в 1А группе отмечена прямая корреляция его уровня с количеством пунктированных фолликулов, полученных яйцеклеток и эмбрионов (рисунок 15). В день ТВП корреляция эстрадиола с

вышеуказанными показателями фолликуло- и оогенеза отмечалась во всех группах.

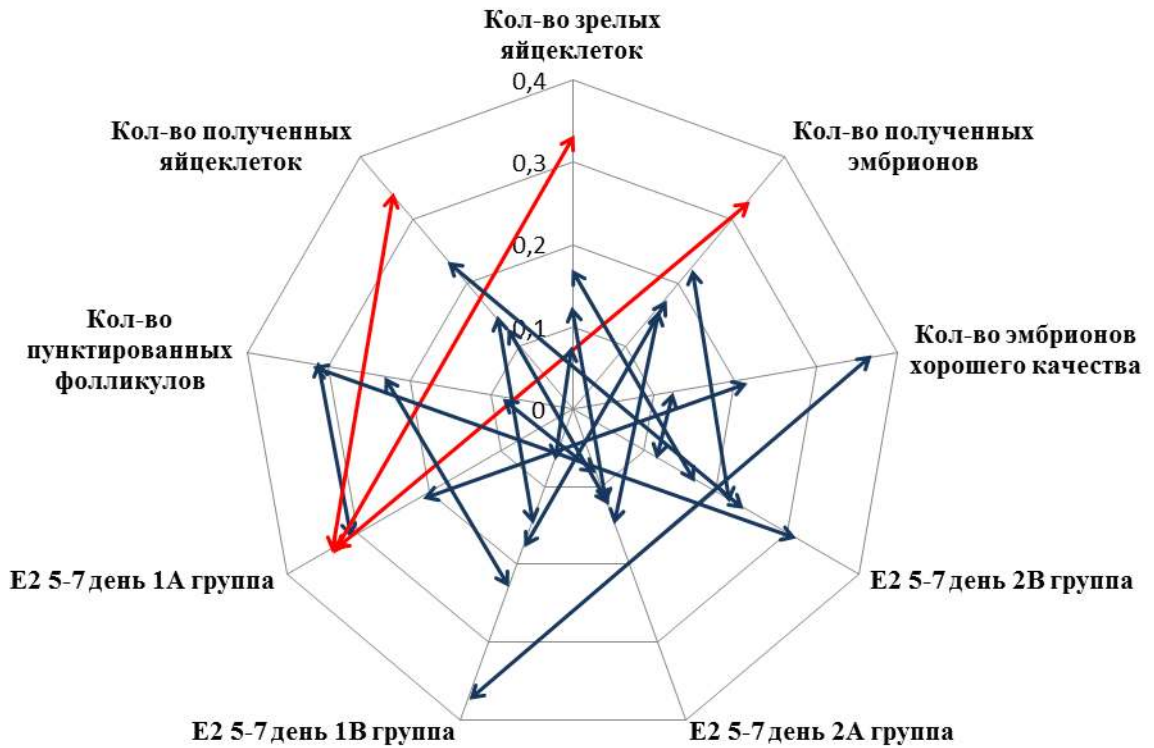


Рисунок 15 – Корреляционная зависимость между уровнем эстрадиола на 5–7-й день периферической крови и показателями фолликуло- и оогенеза:

- ↔ статистически значимая корреляция;
- ↔ статистически не значимая корреляция

Уровень ЛГ на 5–7-й день стимуляции овуляции ни в одной из 4-х групп с количеством пунктированных фолликулов, числом полученных яйцеклеток, их качеством, числом полученных эмбрионов не коррелировал. Однако, как было сказано выше, согласно концепции «потолочных» значений ЛГ (Hillier S., 1994) существует пороговая концентрация ЛГ, необходимая для синтеза эстрадиола и нормального развития фолликулов. Каковы же оптимальные

границы этого диапазона? На основании этого нами был проведен регрессионный анализ с целью прогнозирования количества эмбрионов хорошего качества при фиксированных значениях концентрации ЛГ. Анализ показал, что при уровне ЛГ от 1,0 до 2,0 mIU/ml прогнозируемое количество эмбрионов хорошего качества – 2,1 [95 % ДИ 1,3–2,9], при 2,1 – 3,0 mIU/ml – 1,8 [95 % ДИ 1,3–2,3], при 3,1 – 4,0 mIU/ml – 1,6 [95 % ДИ 0,7–2,5] и при 5,0–7,0 mIU/ml – 1,3 [95 % ДИ –0,21–2,8]. Таким образом, более высокому уровню ЛГ на 5–7-й день соответствует меньшее количество эмбрионов хорошего качества. В 2А группе уровень ЛГ на 5–7-й день был минимальный из четырех групп ($2,8 \pm 1,5$ mIU/ml), а доля эмбрионов хорошего качества наибольшей (78 %).

В день ТВП в 1А, 1В и 2А группах уровень ЛГ крови имел умеренную прямую связь с количеством пунктированных фолликулов, полученных яйцеклеток и эмбрионов.

Уровень прогестерона крови на 5–7-й день ни в одной группе не коррелировал с показателями оогенеза. В день ТВП в 1А, 1В и в 2А группах отмечалась обратная умеренная связь с количеством ооцитов, их качеством и количеством эмбрионов ($r = -0,62$; $r = -0,73$; $r = -0,61$).

Корреляционная связь уровня АМГ с процессами фолликуло- и оогенеза представлена в таблице 23.

Таблица 23 – Корреляционная зависимость между уровнем АМГ периферической крови и показателями фолликуло- и оогенеза

Показатель	1А группа р-ФСГ + ЧМГ со 2–3-го дня n=37		1В группа р-ФСГ + ЧМГ с 6–7-го дня n=18		2А группа р-ФСГ +р-ЛГ со 2–3-го дня n=25		2В группа р-ФСГ +р-ЛГ с 6–7-го дня n=30	
	5–7-й день	ТВП	5–7-й день	ТВП	5–7-й день	ТВП	5–7-й день	ТВП
Количество пунктированных фолликулов	0,66*	0,56*	0,31	0,08	0,8*	0,58*	0,64*	0,62*
Количество полученных яйцеклеток	0,61*	0,54*	0,31	-0,01	0,73*	0,62*	0,64*	0,61*
Количество зрелых яйцеклеток	0,54*	0,45*	0,37	0,04	0,72*	0,59*	0,56*	0,54*
Количество полученных эмбрионов	0,54*	0,44*	0,28	0,08	0,7*	0,56*	0,53*	0,58*
Количество эмбрионов хорошего качества	0,42*	0,34*	0,19	0,15	0,66*	0,54*	0,53*	0,59*

Примечание – * $p < 0,05$ статистически значимая корреляция.

Из таблицы видно, что уровень АМГ крови в 1А, 2А и 2В группах как на 5–7-й день стимуляции, так и в день ТВП имел прямую связь с количеством пунктированных фолликулов, полученных яйцеклеток, зрелых яйцеклеток, количеством эмбрионов и эмбрионов хорошего качества. Более того в 2А группе (р-ЛГ со 2-3 дня), где отмечалось статистически большее количество имплантаций и срочных родов, данная корреляционная связь расценивалась как сильная. В 1В группе (ЧМГ с 6-7 дня) какая-либо связь между АМГ и показателями оогенеза отсутствовала. Причем концентрация АМГ в этой группе на 5–7-й и в день ТВП была наименьшей из 4-х групп (рисунок 16).

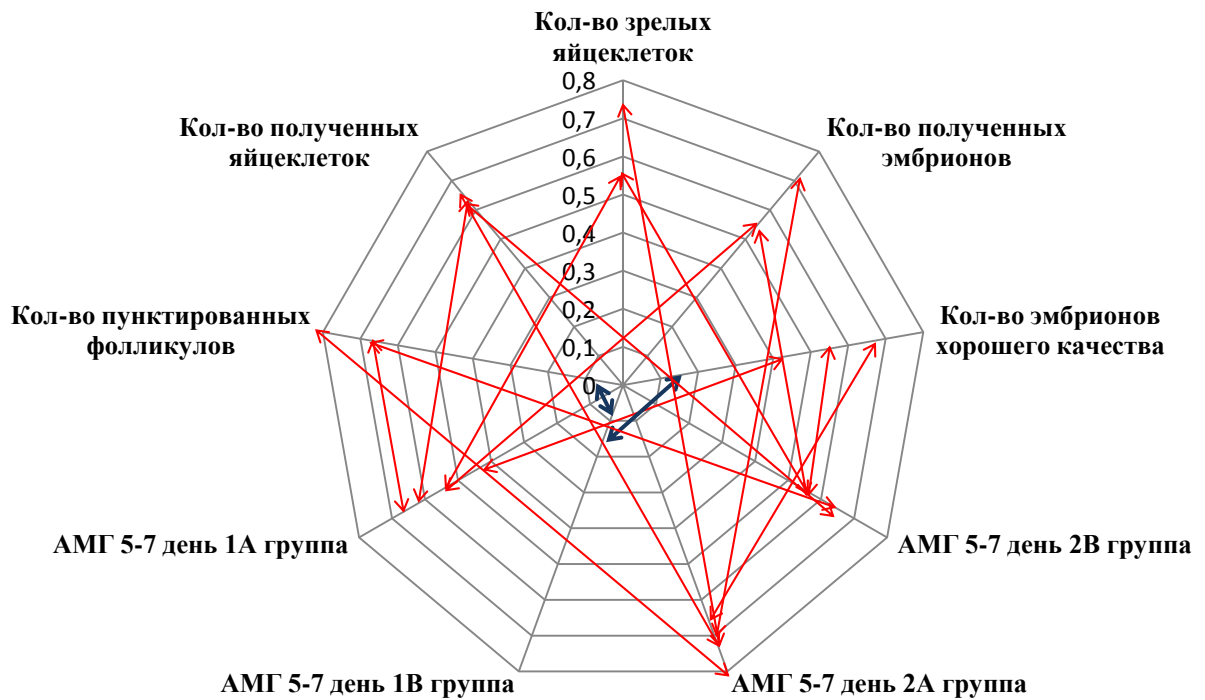


Рисунок 16 – Корреляционная зависимость между уровнем АМГ на 5–7-й день периферической крови и показателями фолликуло- и оогенеза:

- ↔ статистически значимая корреляция;
- ↔ статистически не значимая корреляция

Таким образом, проведенный анализ показал, что уровень ЛГ более 3,0 mIU/ml соответствует меньшему количеству эмбрионов хорошего качества. Уровень эстрадиола только в день ТВП отражал зависимость от показателей фолликуло- и оогенеза, в отличие от АМГ, уровень которого как на 5–7-й день, так и в день ТВП имел прямую корреляционную связь с данными показателями.

3.4.6. Анализ биохимических показателей фолликулярной жидкости у пациенток различных протоколов стимуляции

Был проведен сравнительный анализ уровней ФСГ, Е2, ЛГ, Р и АМГ в фолликулярной жидкости в 4-х протоколах стимуляции. Данные представлены в таблице 24.

Таблица 24 – Уровени гормонов сыворотки крови и фолликулярной жидкости в день трансвагинальной пункции

Показатель	<i>1А группа p-ФСГ+ +ЧМГ со 2–3-го дня n=37</i>	<i>1В группа p-ФСГ+ +ЧМГ с 6–7-го дня n=18</i>	<i>2А группа p-ФСГ+ +p-ЛГ со 2–3-го дня n=25</i>	<i>2В группа p-ФСГ+ +p-ЛГ с 6–7-го дня n=30</i>	Значение p
	M±St.d	M±St.d	M±St.d	M±St.d	
Уровень ФСГ в день ТВП, mIU/ml	9,4±4,1 [3,8; 21,9]	7,5±3,5 [3,8; 16,7]	8,1±5,4 [3,0; 24,0]	7,4±2,8 [3,0; 12,3]	p _{1А-1В} =0,046 p _{1А-2А} =0,03 p _{1А-2В} =0,048
Уровень ФСГ в ФЖ, mIU/ml	6,8±3,6 [2,2; 18,8]	5,5±2,8 [2,2; 12,8]	5,3±4,2 [1,8; 19,6]	4,8±3,7 [1,1; 19,4]	p _{1А-2А} =0,019 p _{1А-2В} =0,003
Уровень Е2 в день ТВП, pg/ml	1549,9±1725,9 [320,0; 4435]	1321,3±1192,9 [363,0; 4435]	920±529,3 [220,0; 2144]	1325,3±790,1 [180,0; 3110]	p _{2А-2В} =0,04
Уровень Е2 в ФЖ, pg/ml	8,257,6±127,7 [7876,2; 8417,7]	8240,4±130,9 [7960,9; 8389,6]	8142,2±578,5 [5546,3; 8502,1]	8188,7±299,3 [6930,4; 8459,9]	p>0,05
Уровень ЛГ в день ТВП, mIU/ml	1,5±2,6 [0,1; 5,8]	1,5±1,9 [0,2; 6,5]	3,9±5,6 [0,2; 25,1]	2,4±2,4 [0,2; 9,0]	p _{1А-2А} =0,004 p _{1В-2А} =0,013
Уровень ЛГ в ФЖ, mIU/ml	2,0±1,6 [0,2; 8,9]	1,7±0,8 [0,5; 3,9]	4,2±4,0 [0,1; 18,8]	2,6±3,4 [0,1; 17,8]	p _{1А-2А} =0,002 p _{1В-2А} =0,004 p _{2А-2В} =0,02
Уровень Р в день ТВП, ng/ml	5,9±3,9 [1,0; 16,3]	7,3±6,4 [1,3; 29,1]	4,2±2,9 [1,4; 14,8]	6,9±3,7 [1,4; 16,8]	p _{1В-2А} =0,04 p _{2А-2В} =0,001
Уровень Р в ФЖ, ng/ml	38,7±0,5 [36,6; 39,3]	38,5±0,8 [35,5; 39,2]	38,7±0,3 [38,1; 39,3]	38,7±0,4 [37,5; 39,3]	p>0,05
Уровень АМГ в день ТВП, ng/ml	1,0±1,1 [0,01; 5,7]	0,9±3,3 [0,01; 3,3]	1,0±1,3 [0,01; 5,3]	1,2±1,6 [0,1; 5,5]	p>0,05
Уровень АМГ в ФЖ, ng/ml	2,6±1,5 [0,9; 8,3]	3,3±2,6 [0,3; 10,2]	2,5±2,3 [0,7; 8,2]	3,5±3,1 [0,7; 16,2]	p _{1В-2А} =0,048 p _{2А-2В} =0,015

Примечание – Статистически значимые различия при p<0,05.

Из таблицы видно, что уровень ФСГ в ФЖ в 1А группе (6,8±3,6 mIU/ml) был статистически выше, чем в 2А и 2В группах (5,3±4,2 mIU/ml и 4,8±3,7 mIU/ml). Уровень ФСГ сыворотки крови в день ТВП был также

статистически выше в 1А группе. Уровень ЛГ в ФЖ статистически выше отмечался в 2А группе, такая же тенденция отмечена в периферической крови в день ТВП. Концентрация АМГ в ФЖ имела наименьшее значение в 2А группе, однако в сыворотке крови уровни АМГ в 4-х группах статистически не отличались. Уровни эстрадиола и прогестерона в ФЖ во всех группах статистически не отличались.

С целью выяснения возможных закономерностей между уровнями гормонов ФСГ, ЛГ, Е2, Р и АМГ в периферической крови и фолликулярной жидкости нами был проведен корреляционный анализ. Данные представлены в таблице 25.

Таблица 25 – Корреляционная зависимость между уровнями гормонов периферической крови и фолликулярной жидкости

Показатель	<i>1А группа p-ФСГ + ЧМГ со 2–3-го дня n=37</i>	<i>1В группа p-ФСГ + ЧМГ с 6–7-го дня n=18</i>	<i>2А группа p-ФСГ+p-ЛГ со 2–3-го дня n=25</i>	<i>2В группа p-ФСГ+p-ЛГ с 6–7-го дня n=30</i>
	г	г	г	г
ФСГ	0,75*	0,64*	0,77*	0,5*
ЛГ	0,85*	0,57*	0,76*	0,42*
Е2	0,13	0,25	-0,48	-0,07
Р	0,22	0,26	-0,07	0,08
АМГ	0,78*	-0,11	0,66*	0,44*

Примечание – * $p < 0,05$ статистически значимая корреляция.

Проведенный корреляционный анализ показал, что уровни ФСГ и ЛГ в периферической крови и ФЖ во всех 4-х группах имели прямую связь. Уровни АМГ также имели связь, но только в 1А, 2А и 2В группах. Концентрации гормонов Е2 и Р в 4-х группах не коррелировали.

С целью выяснения возможных закономерностей между уровнями гормонов ФСГ, ЛГ, Е2, Р и АМГ в фолликулярной жидкости с числом пунктированных фолликулов, полученных яйцеклеток, числом зрелых яйцеклеток, числом эмбрионов и эмбрионов хорошего качества нами был проведен корреляционный анализ.

Уровень ФСГ, ЛГ и прогестерона в фолликулярной жидкости ни в одной группе не имели какой-либо связи с количеством ооцитов, зрелых ооцитов и эмбрионов.

Уровень эстрадиола в ФЖ был значительно выше, чем в периферической крови и имел связь с показателями оогенеза только в 1А и в 2А группе, причем в 1А – слабую прямую, а в 2А – сильную обратную.

Уровень АМГ в ФЖ имел связь с количеством пунктированных фолликулов ($r = 0,57$) и полученных ооцитов только в 2А группе ($r = 0,57$). Надо отметить, что доля эмбрионов хорошего качества в этой группе была наибольшей из 4-х групп (78 %).

Таким образом, концентрации ФСГ, ЛГ, Е2, Р и АМГ в ФЖ ни в одной группе не отражали в полной мере связь с процессами фолликуло- и оогенеза. Однако выявленная прямая связь АМГ с количеством пунктированных фолликулов и полученных ооцитов в группе с добавлением р-ЛГ со 2–3-го дня позволяет судить о возможной прогностической значимости уровня АМГ фолликулярной жидкости для качества получаемых эмбрионов и их имплантационной способности.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

На сегодняшний день вспомогательные репродуктивные технологии широко вошли в медицинскую практику. В связи с этим на фармакологическом рынке существует большое количество различных гонадотропинов, а в медицинской практике множество различных схем стимуляции суперовуляции. Проведено множество сравнительных исследований по изучению эффективности применения того или иного гонадотропина у разных групп пациенток в циклах ЭКО, однако мнения специалистов весьма разноречивы [2, 7, 10, 24, 27, 50, 84, 100, 133, 153].

В процессе гонадотропной стимуляции особо важно правильно воспроизвести процессы фолликуло- и оогенеза, что способствует получению достаточного количества яйцеклеток и эмбрионов хорошего качества, адекватной трансформации эндометрия, что и определяет успех программ ЭКО [2, 3, 5, 6]. Необходимость переосмысления роли уже существующих индукторов овуляции и разработки модифицированных схем стимуляции овуляции, послужило основой нашего исследования.

В работе была изучена роль добавления экзогенного ЛГ, входящего в состав мочевых и рекомбинантных гонадотропинов, в фолликуло- и оогенезе при различных схемах индукции у бесплодных пациенток в циклах ЭКО. Также проведён анализ гормонального профиля периферической крови в течение индуцированного цикла и фолликулярной жидкости (ФСГ, ЛГ, Е2, Р и АМГ). Тем более что работы, оценивающие характер изменения уровней ЛГ и АМГ в течение индуцированного цикла, единичны. Пристальное внимание специалистов привлечено к изучению микроокружению ооцита для оценки его качества [32, 35, 37, 38, 57, 69]. На сегодняшний день не выяснена диагностическая значимость фолликулярной жидкости, не определены параметры этого биологического субстрата, которые могли бы отражать

качество полученного ооцита. Исследование посвящено изучению некоторых из перечисленных вопросов.

Был проведен анализ параметров индуцированного цикла у 324 бесплодных пациенток. В протоколах оценивались клиничко-анамнестические и клиничко-лабораторные данные, параметры индуцированного цикла ЭКО, эмбриологический этап, показатели гормонального профиля сыворотки крови и фолликулярной жидкости, частота наступления беременности.

Средний возраст исследуемых пациенток составил $35,7 \pm 3,8$ лет и варьировал от 30 до 45 лет, из которых 51,1 % приходился на поздний репродуктивный период (35 лет и более). По данным РАРЧ за 2013 год доля циклов ВРТ у пациенток старшего репродуктивного возраста составила 42,9 %, что согласуется с нашими данными о росте количества возрастных пациенток в программах ВРТ.

Все пациентки исследования имели изолированный трубно-перитонеальный фактор бесплодия. На сегодняшний день, по литературным данным, имеет место преобладание данного вида бесплодия в циклах ЭКО [17, 27], при этом частота наступления беременности при трубно-перитонеальном бесплодии достаточно высока и составляет 35–58 % [16, 20, 23, 30]. Однако у пациенток позднего репродуктивного возраста ЧНБ регистрируется значительно реже – в 15–22 % [20, 21, 30, 40].

В структуре сопутствующих гинекологических заболеваний отмечался высокий процент хронического сальпингоофорита (75,0 %) и перенесенных ИППП (44,1 %), что и определило трубно-перитонеальное бесплодие у исследуемых пациенток.

Интересно отметить, что реконструктивно-пластические операции на трубах проводились у 156 пациенток (48,1 %), однако спонтанное наступление беременности после проведения этих операций наблюдалось только у 5 пациенток (1,5 %). Полученные данные согласуются с результатами исследования И.В. Корнеевой (2003) в том, что повторные реконструктивно-

пластические операции на органах малого таза, особенно при трубно-перитонеальном бесплодии, малоперспективны для восстановления репродуктивной функции (9,8 %), а свидетельствуют только о прогрессировании патологического процесса в органах малого таза.

Овариальный резерв определяет функциональное состояние репродуктивной системы, полноценность которой обеспечивает рост, созревание фолликула, созревание ооцита в доминантном фолликуле, овуляцию и оплодотворение полноценной яйцеклетки [26]. Одними из показателей овариального резерва являются число антральных фолликулов на 2–3-й день менструального цикла и уровень АМГ. АМГ продуцируется гранулезными клетками, отражает величину пула примордиальных фолликулов, то есть репродуктивный потенциал пациентки [26, 27, 28, 71, 74, 135, 208].

Определение уровня базального АМГ у исследуемых пациенток показало, что в 29,6 % случаев отмечалось его снижение менее 1 ng/ml, что соответствует низкому овариальному резерву, причем в 70,8 % это были пациентки позднего репродуктивного возраста (35 лет и старше). Низкий уровень АМГ у более молодых пациенток (30–35 лет) был обусловлен наличием оперативных вмешательств на яичниках, что отмечалось в 53 %.

Данные литературы подтверждают, что сниженный овариальный резерв могут иметь не только пациентки позднего репродуктивного возраста, но и молодые женщины с резецированными яичниками и оперативными вмешательствами на маточных трубах [53]. Это приводит к нарушению архитектоники питающей сети сосудов яичников и неравномерному распределению циркулирующих гонадотропинов в разных участках ткани женских гонад, что сопровождается ослаблением гормональной стимуляции некоторых из растущих фолликулов и в конечном итоге ухудшает количественные показатели активности фолликулогенеза [11, 206].

При оценке овариального резерва исследуемых пациенток выявлено, что средний уровень базального АМГ соответствовал параметрам фертильных

женщин ($2,1 \pm 1,9$ ng/ml), однако количество антральных фолликулов было $6,3 \pm 3,3$, что определялось как сниженный овариальный резерв.

В настоящее время вопрос о влиянии повторных стимуляций на овариальный резерв активно обсуждается. По мнению некоторых авторов с каждой попыткой ЭКО снижается пул примордиальных фолликулов, что впоследствии приведет к снижению овариального ответа [5, 28, 180, 212]. У всех исследуемых пациенток были повторные попытки ЭКО, что повышало риск неадекватного ответа яичников в предстоящей стимуляции.

Исследование Х.Г. Алиевой и М.А. Гасановой (2011) показало, что при увеличении длительности бесплодия от 3 до 6 лет вероятность наступления беременности снижается в 2 раза, до 9–12 лет – в 2,3 раза, до 15 лет – в 3,5 раза. В нашем исследовании средняя продолжительность бесплодия у пациенток составила $8,4 \pm 4,7$ лет, что снижало вероятность наступления беременности в предстоящем цикле ЭКО в 2,3 раза.

Таким образом, сниженный овариальный резерв, длительное бесплодие, наличие повторных неудачных предшествующих попыток ЭКО у исследуемых пациенток усугубляло прогноз на эффективность ЭКО.

Следующим этапом исследования было разделение исследуемых пациенток ($n=324$) на 2 группы в зависимости от сочетания индукторов, применяемых в процессе стимуляции: р-ФСГ+ЧМГ или р-ФСГ+р-ЛГ.

Исследуемые группы пациенток были сопоставимы по возрасту, возраст менархе, ИМТ, базальным уровням ФСГ, ЛГ, Е2, Р и АМГ, количеству антральных фолликулов, продолжительности бесплодия, количеству повторных попыток ЭКО.

Стартовые дозы р-ФСГ и ЛГ ($229,6 \pm 79,1$ и $80,8 \pm 23,2$ МЕ), курсовая доза р-ФСГ и суммарная доза общего гонадотропина ($2148,4 \pm 886,8$ и $2865,8 \pm 1163,3$ МЕ), затраченные в процессе стимуляции, у пациенток во 2-й группе (добавление р-ЛГ) были статистически выше, чем у пациенток 1-й группы (добавление ЧМГ). По мнению ряда авторов, у пациенток с низкими

показателями овариального резерва применение повышенных стартовых доз гонадотропинов (от 225 до 450 МЕ/сут) способствует повышению овариального ответа [11, 26, 58, 107, 128]. Однако в нашем исследовании высокие дозы гонадотропинов не повысили количество пунктируемых фолликулов во 2-й группе, их количество статистически не отличалось от таковых в 1-й группе ($4,7 \pm 3,3$ и $4,9 \pm 2,9$ соответственно).

Оценка экономичности протоколов показала, что добавление р-ЛГ в протоколах стимуляции повышает стоимость лечения.

Сравнительный анализ аспектов эмбриологического этапа показал, что по числу пунктированных фолликулов, полученных яйцеклеток, в том числе зрелых, незрелых и дегенеративных, полученных эмбрионов, в том числе хорошего качества, пациентки двух исследуемых групп статистически не отличались. Известно, что в естественном менструальном цикле полостные фолликулы к середине фолликулярной фазы представлены несколькими классами. Первый класс – это 1, редко 2, будущих доминантных фолликула; второй – фолликулы, вступившие в различные стадии атрезии; третий – более мелкие растущие полостные фолликулы, окончательное созревание которых произойдет в следующем менструальном цикле [1, 2]. В процессе роста фолликулов происходит созревание некоторых ооцитов. Некоторые авторы полагают, что стимуляция овуляции нарушает процессы нормального фолликуло- и оогенеза, приводя к развитию фолликулов, уже затронутых процессом атрезии [30]. Последнее, возможно, является одним из факторов получения дегенеративных ооцитов. В нашем исследовании пациентки двух групп имели минимальное количество дегенеративных яйцеклеток ($0,1 \pm 0,4$ и $0,1 \pm 0,3$), что подтверждает литературные данные о росте более полноценного пула фолликулов при добавлении ЛГ-содержащих препаратов в процессе стимуляции (как мочевого, так и рекомбинантных).

Тем не менее, в группе с добавлением р-ЛГ отмечалось достоверно большая доля эмбрионов хорошего качества (75 % против 67,6 % в группе с

добавлением ЧМГ). Надо отметить, что, несмотря на статистически более высокие стартовые дозы р-ФСГ, ЛГ, курсовые дозы р-ФСГ и суммарную дозу гонадотропина, курсовая доза ЛГ во 2-й группе была статистически ниже, чем в 1-й группе, однако доля эмбрионов хорошего качества была выше во 2-й группе, чем в 1-й. Таким образом, на основании вышесказанного можно сделать вывод, что на качество полученных эмбрионов влияет не доза затраченного гонадотропина в процессе стимуляции, а его состав, в частности, мочевого или рекомбинантный ЛГ-содержащий индуктор. Полученные результаты подтверждаются мнением некоторых авторов об обратной зависимости между количеством получаемых ооцитов и их качеством [89, 157] и согласуются с мнением других исследователей, отмечающих улучшение качества ооцитов и эмбрионов при применении для стимуляции препаратов, содержащих рекомбинантный ЛГ [121, 141, 171, 184, 193, 196].

Важным фактором, определяющим имплантационный потенциал эмбрионов, является скорость их дробления. Эмбрионы с медленной скоростью дробления дают меньшую частоту наступления беременности. Перенос эмбрионов, находящихся на стадии развития 4-х бластомеров (2-е сутки), приводят к меньшей частоте наступления беременности по сравнению с переносом 6-и клеточных эмбрионов [42, 115, 198]. В нашем исследовании перенос на 3-й день культивирования был произведен у 119 (62,3 %) пациенток в 1-й группе и у 77 (57,9 %) пациенток во 2-й группе (различия статистически не значимые).

В последние годы отмечается тенденция селективного переноса в полость матки одного эмбриона хорошего качества, достигшего 5-го дня культивирования, то есть стадии бластоцисты, с целью снижения риска многоплодной беременности и повышения ЧНБ [9, 13, 14]. Однако это вряд ли можно отнести к пациенткам со сниженными показателями овариального резерва и имеющим риск «бедного» ответа. У женщин старшего репродуктивного возраста безопаснее переносить 3-дневные эмбрионы, так как

нет гарантии их дальнейшего развития [26]. В нашем исследовании число эмбрионов, достигших стадии бластоцисты, у пациенток 1-й группы составило 3,7 %, у пациенток 2-й группы – 4,7 % ($p>0,05$). Среднее количество перенесенных эмбрионов в двух группах было сопоставимо и не более 2.

Уровень E2 сыворотки крови повышался во всех группах одновременно с ростом фолликулов. На 5–7-й день стимуляции его уровень соответствовал количеству растущих фолликулов, в день трансвагинальной пункции – количеству пунктируемых фолликулов. Уровень эстрадиола на всех этапах фолликулогенеза отражает число растущих в яичниках фолликулов, причем это суммарный показатель, который отражает рост всех фолликулов разного диаметра. Однако по уровню эстрадиола судить о зрелости фолликула и качестве получаемого ооцита не представляется возможным.

На 5–7-й день стимуляции яичников происходило снижение уровня ЛГ по сравнению с базальными значениями, причем это снижение имело место у пациенток обеих групп и не зависело от типа индуктора. В исследовании Н.Р. Мамедовой (2012) также отмечалось снижение уровня ЛГ на 5-й день стимуляции при использовании в качестве индукторов как одного р-ФСГ, так и в сочетании с ЧМГ. В нашем же случае снижение ЛГ отмечалось и при стимуляции р-ФСГ в сочетании с р-ЛГ. Изучая доступную литературу, было найдено два объяснения этому факту. Первое из них заключается в том, что клетками гранулезы во время стимуляции р-ФСГ выделяется БАВ, ингибирующее выброс ЛГ, – ФОПГ (фактор отмены пика гонадотропинов, LH-RH Attenuating Factor). Именно его действие, возможно, приводит к падению уровней ЛГ на 5–7-й день стимуляции, когда фолликул с ФСГ стимулированного роста переходит на ЛГ-зависимый [175]. С другой стороны, сывороточный уровень ЛГ, определенный иммуноферментными методами, может не отражать реальную биоактивность циркулирующего ЛГ [153, 178, 191, 197, 210].

В день ТВП, спустя 35–36 часов после введения овулятоной дозы ХГ, отмечалось достоверное снижение уровня ЛГ в группе с добавлением ЧМГ

($1,6 \pm 2,4$ mIU/ml), в группе с добавлением р-ЛГ уровень ЛГ оставался на уровне 5-7 дня стимуляции ($3,1 \pm 4,2$ mIU/ml) ($p_{1-2}=0,003$). Данное различие в уровне ЛГ у пациенток двух исследуемых групп, возможно, объясняется составом ЛГ-содержащих препаратов. Так, ЧМГ является мочевым гонадотропином, лютеинизирующий эффект которого связан с комбинацией ЛГ и ХГЧ в различных соотношениях, период полувыведения составляет 4–12 часов. Р-ЛГ состоит из рекомбинантного «чистого» лутропина-альфа, период полувыведения которого идентичен человеческому и составляет 10–12 часов [83]. Однако вышесказанное противоречит мнению некоторых авторов о том, что концентрация ЛГ плазмы не отражает его биоактивность и не зависит от экзогенного введения ЛГ [79, 168].

Можно сделать вывод, фолликулогенез в поздней фолликулярной фазе у пациенток в протоколе стимуляции р-ФСГ с добавлением ЧМГ проходил в условиях более низких концентраций ЛГ, что, по мнению многих авторов неблагоприятно влияет на созревании фолликулов и впоследствии яйцеклеток. Более того, при супрессии гипофиза ант-ГнРГ уровень ЛГ на финальных этапах фолликулогенеза может оказаться недопустимо низким без его дополнительного экзогенного введения [125, 210, 211]. Таким образом, за счет ФСГ происходит рост фолликулов, но для дозревания фолликула и ооцита на завершающих этапах фолликулогенеза необходим ЛГ [121, 141, 184, 193, 209].

Мнения исследователей о влиянии ЛГ на трансформацию эндометрия неоднозначны. Одни авторы свидетельствует об отрицательном влиянии высоких концентраций ЛГ на эндометрий [181, 186], другие указывают на отсутствие этого влияния [150]. По данным N. Chabbert-Buffet и соавторов (2003) в циклах с антагонистами, по причине глубокого подавления функции гипофиза, недостаток ЛГ отрицательно влияет на толщину эндометрия, поэтому авторы предлагают вводить в подобные схемы препараты с ЛГ-активностью [81].

Под влиянием растущей концентрации эстрогенов крови в

пролиферативную стадию начинается быстрый рост примордиальных желез и стромы эндометрия за счет митотического деления клеток [4, 23]. В нашем исследовании толщина эндометрия на 5–7-й день стимуляции и в день введения ХГ у пациенток двух групп исследования статистически не отличалась, что подтверждалось отсутствием статистической разницы между уровнем эстрадиола на 5–7-й день и в день ТВП в обеих группах. С другой стороны, статистически меньший уровень ЛГ в день ТВП в 1-й группе ($1,6 \pm 2,4$ mIU/ml) не отразился на толщине эндометрия, что может быть объяснено тем, что уровень ЛГ в протоколе с ЧМГ в позднюю пролиферативную стадию достиг определенных пороговых значений, необходимых для адекватной трансформации эндометрия. Последние данные совпадают с результатами некоторых исследователей, не выявивших отличий в протоколах с ЧМГ и р-ЛГ по толщине эндометрия и количеству пациенток с наличием трехслойного эндометрия [77, 88, 150]. Кроме того, оценка функционального состояния эндометрия только на основании ультразвуковых данных многими специалистами подвергается сомнению.

В преовуляторный период увеличение продукции эстрогенов вызывает появление рецепторов ЛГ, что в свою очередь вызывает лютеинизацию гранулезных клеток и продукцию прогестерона [4, 19]. Уровень прогестерона на 5–7-й день у пациенток обеих групп снизился по сравнению с исходным (лютеиновая фаза предыдущего цикла) в 8–9 раз. В день ТВП отмечался рост уровня прогестерона в 4–5 раз по сравнению с уровнем 5–7-го дня стимуляции. Надо отметить, что уровни как эстрадиола, так и прогестерона на протяжении стимуляции в обеих группах статистически не отличались. Однако в день ТВП в протоколе с добавлением р-ЛГ более низкая концентрация прогестерона ($5,7 \pm 3,6$ ng/ml) соответствовала относительно высокому уровню ЛГ ($3,1 \pm 4,2$ mIU/ml), а в протоколе с добавлением ЧМГ низкий уровень ЛГ в день ТВП ($1,6 \pm 2,4$ mIU/ml) соответствовал более высокому уровню прогестерона в этот день ($6,4 \pm 4,9$ ng/ml). Раннее повышение уровня прогестерона может

ускорить созревание эндометрия, что приведет к асинхронному развитию эмбриона и эндометрия и снижению частоты имплантации [77, 146, 161]. Добавление ЛГ может оказывать благоприятное воздействие на эндометрий за счет снижения риска преждевременного повышения прогестерона, повышения готовности эндометрия к имплантации [147]. Таким образом, что более высокий уровень ЛГ в день ТВП во 2-й группе предотвратил преждевременный рост прогестерона, что привело, с одной стороны, к увеличению доли эмбрионов хорошего качества, а, с другой стороны, к увеличению имплантаций.

Антимюллеров гормон синтезируется гранулезными клетками преантральных и малых антральных фолликулов (менее 4 мм). В фолликулах большего размера продукция гормонов резко снижается и почти не определяется при достижении фолликулом размера 8 мм и более [145]. На 5–7-й стимуляции достоверная динамика уровня АМГ отмечалась только в группе с добавлением р-ЛГ, а именно рост что, возможно, объяснялось запуском пула малых антральных фолликулов. В день ТВП уровень АМГ снижался по сравнению с исходным и с 5–7-м днем. Полученные результаты сопоставимы с работами А. La Marca et al. и Д.О. Жорданидзе, которые зарегистрировали в преовуляторный период в цикле стимуляции ФСГ значительное снижение уровня АМГ, совпадающее с пиком концентрации E2 [5, 70]. Интерпретируя данный факт, в литературных источниках найдены три версии. Первая состоит в том, что резкое снижение уровня АМГ в день ТВП во всех протоколах соответствовало большому размеру преовуляторных фолликулов и уменьшению пула малых антральных фолликулов. По второй версии, высокие концентрации экзогенно вводимого ФСГ могут снижать продукцию как самого АМГ так и количество АМГ-рецепторов типа 2, по третьей версии, эти же эффекты могут быть обусловлены высокими концентрациями E2 [70]. Также считается, что истинный овариальный резерв отражает уровень АМГ в периферической крови, взятой в начале менструального цикла [28, 93].

Фолликулярная жидкость является своеобразной питательной средой для находящегося в ней ооцита. Считается, что изменения в соотношениях стероидных гормонов в фолликулярной жидкости могут оказывать неблагоприятный эффект на качество ооцита [69, 105]. В нашем исследовании уровень ФСГ в ФЖ в протоколе стимуляции р-ФСГ с добавлением ЧМГ, был достоверно выше, чем в протоколе с добавлением р-ЛГ. Уровень ЛГ в ФЖ в протоколе с добавлением р-ЛГ, также как и в день ТВП, был достоверно выше, чем в протоколе с ЧМГ. Уровни E2, P и АМГ в ФЖ в обеих группах статистически не отличались. Уровни E2 и P в ФЖ были значительно выше, чем в периферической крови. Можно предположить, что секреция этих гормонов в фолликуле является автономной и регулируется внутрифолликулярными факторами, которые, вероятно, вырабатываются клетками гранулезы, секреторная активность которых обеспечивает гормональный уровень внутрифолликулярного окружения [22]. В результате исследования уровни ФСГ, ЛГ и АМГ (2-я группа) коррелировали с таковыми в периферической крови. Однако не было выявлено корреляции между концентрациями E2 и P в сыворотке и концентрациями E2 и P в фолликулярной жидкости, что подтверждает результаты исследований некоторых авторов, отрицающих возможность пассивной диффузии стероидных гормонов через фолликулярную мембрану [92].

На сегодняшний день исследований по сравнению клинической эффективности мочевых и рекомбинантных ЛГ-содержащих препаратов немного. D. Carone et al. (2010) сравнили эффективность комбинации р-ФСГ и р-ЛГ в соотношении 2:1 с мочевым ЛГ-содержащим индуктором, где не было выявлено ни одного клинически значимого отличия ни по одному эмбриологическому показателю, однако кумулятивная ЧНБ была статистически выше в группе с р-ЛГ. K. Vuler et al. (2011) при сравнении подобных протоколов выявили, что курсовая доза р-ФСГ в группе с р-ЛГ оказалась значительно ниже, а ЧНБ на стимулируемый цикл, на перенос эмбрионов и

частота имплантаций были значительно выше, чем в группе с ЧМГ. В нашем исследовании частота наступления беременности на стимулируемый цикл (24,8 %) и на перенос эмбрионов (29,5 %) у пациенток с протоколом стимуляции р-ФСГ с добавлением р-ЛГ были статистически выше, чем у пациенток в протоколе с добавлением ЧМГ (15,2 и 17,6 % соответственно). Также во 2-й группе отмечалось статистически большее количество рожденных доношенных детей, чем в 1-й группе (26 и 20 соответственно). Считается, что клинически значимым улучшением является увеличение частоты наступления беременности на 5–8 % [60]. В нашем случае это увеличение ЧНБ на стимулируемый цикл в группе с добавлением р-ЛГ составило 9,6 %. Возможный механизм улучшения частоты имплантаций и показателя клинически подтвержденных беременностей связан с более высоким качеством яйцеклеток или большей готовностью эндометрия к имплантации. Циклы с р-ЛГ показали меньшие уровни апоптоза клеток кумулюса что, вероятно, является показателем более высокого качества яйцеклеток [103].

Использование комбинации индукторов стимуляции р-ФСГ с ЧМГ и р-ФСГ с р-ЛГ одинаково часто сопровождалось развитием «бедного ответа» (60,7 и 60,9 %), что являлось следствием низкого овариального резерва у пациенток двух групп. С другой стороны, частота синдрома гиперстимуляции у пациенток исследуемых групп регистрировалась на низком уровне и также статистически не отличалась (4,2 и 4,5 % соответственно).

На основании проведенного анализа двух протоколов стимуляции можно сделать вывод, что добавление р-ЛГ в процессе индуцированного цикла не увеличивает количество эмбрионов, а улучшает их качество и впоследствии их имплантационный потенциал, что приемлемо для пациенток с заведомо ожидаемым субоптимальным ответом яичников.

В следующем этапе был проведен дифференцированный анализ эффективности стимуляции пациенток, получающих ЧМГ или р-ЛГ с начала стимуляции или с 6–7-го дня.

День введения ЛГ-содержащего препарата (6–7-й день) был выбран нами на основании рекомендаций, приводимых во многих литературных данных. Известно, что ЛГ начинает оказывать стимулирующее влияние на растущие фолликулы, достигшие размера не менее 10 мм в диаметре, т.е. к 6-му дню стимуляции [33, 149].

По возрасту, возрасту менархе, ИМТ, показателям овариального резерва, продолжительности бесплодия, количеству повторных попыток ЭКО пациентки 4-х групп были также сопоставимы, как и пациентки предыдущего этапа исследования. Несмотря на нормальные показатели АМГ, ФСГ, размеры яичников, среднее количество антральных фолликулов у пациенток 4-х групп соответствовало низкому овариальному резерву ($6,0 \pm 2,9$, $6,0 \pm 3,2$, $5,8 \pm 3,1$, $6,1 \pm 3,1$ соответственно). Таким образом, сниженный овариальный резерв, длительное бесплодие, наличие повторных неудачных предшествующих попыток ЭКО у исследуемых пациенток 4-х групп также усугубляло прогноз на эффективность ЭКО.

Наибольшая стартовая доза р-ФСГ, ЛГ, курсовая доза р-ФСГ и а также общее количество индуктора, затраченного в процессе стимуляции, отмечались в 2А группе (добавление р-ЛГ со 2–3-го дня), что свидетельствует о более медленном росте фолликулов у пациенток в этой группе. Однако количество пунктированных фолликулов и продолжительность стимуляции овуляции во всех 4-х группах статистически не отличалось. Наибольшая курсовая доза ЛГ отмечалась в 1А группе (добавление ЧМГ со 2–3-го дня). Соотношение затраченных ЛГ к ФСГ у пациенток 4 групп распределились следующим образом 1:2, 1:3, 1:3 и 1:3 соответственно. Расчет экономичности применяемых протоколов показал, что наиболее затратным был 2А протокол (курсовая доза гонадотропина $2865,8 \pm 1163,3$ МЕ), а менее затратными оказались протоколы

1А и 1В ($2473,9 \pm 1016,6$ МЕ и $2346,1 \pm 916,7$ МЕ). Протокол 2В имел средние экономические затраты по сравнению с другими протоколами ($2695,8 \pm 995,1$ МЕ).

Сравнительный анализ эмбриологического этапа 4-х ЛГ-содержащих протоколов стимуляции показал, что добавление ЧМГ или р-ЛГ в процессе стимуляции овуляции на разных этапах созревания фолликулов по-разному влияет на фолликуло-, и оогенез. Среднее количество пунктированных фолликулов, полученных зрелых и дегенеративных яйцеклеток, количество полученных эмбрионов, в том числе хорошего качества, во всех 4-х группах статистически не отличалось. Однако наименьшее количество яйцеклеток ($2,9 \pm 2,7$), в том числе незрелых яйцеклеток ($0,4 \pm 0,8$), было получено в 2А группе. Это свидетельствует о том, что рост преовуляторных фолликулов на фоне стимуляции р-ФСГ с добавлением р-ЛГ со 2–3-го дня был более однородным, чем в других группах, в которых при большем количестве полученных яйцеклеток большая из них часть были незрелыми. Получение в 2А группе наименьшего количества неоплодотворенных яйцеклеток ($0,5 \pm 0,8$) можно связать с наименьшим количеством незрелых яйцеклеток в этой группе, а также, с лучшим качеством полученных ооцитов. Доля эмбрионов хорошего качества в 2А группе (78 %) была наибольшей из 4-х групп (65,9; 70,5 и 67,1 % соответственно). Частота наступления беременности на стимулируемый цикл, на перенос эмбрионов и частота срочных родов в 2А группе также были наибольшими (30; 36,8 и 25,7 % соответственно), а биохимические беременности, вообще не регистрировались. Последние данные еще раз говорят в пользу лучшего качества полученных ооцитов и эмбрионов, а также готовности эндометрия к имплантации в протоколе с добавлением р-ЛГ на начальных этапах стимуляции овуляции [103]. Высокая стоимость данного протокола (за счет р-ФСГ-, а не ЛГ-содержащих гонадотропинов) является клинически обоснованной, в виду очевидного повышения эффективности ЭКО.

По некоторым литературным источникам [168, 194] протокол с добавлением р-ЛГ с 6–7-го дня или на этапе финального созревания фолликула способствует более физиологичному течению индуцированного цикла. В нашем исследовании более физиологичным оказался протокол с добавлением р-ЛГ со 2–3-го дня, свидетельствующий о том, что в естественном менструальном цикле рост фолликулов с начальных этапов осуществляется в присутствии как эндогенного ФСГ, так и ЛГ [1, 3, 22, 27, 62, 75]. С другой стороны, с возрастом в ранней фолликулярной фазе отмечается повышение уровня ФСГ, но не ЛГ. Возможно, что введение ЛГ восстанавливает микросреду развивающихся фолликулов у пациенток старшего репродуктивного возраста [147], что явилось приемлемым для исследуемых пациенток.

Такой показатель эффективности ЭКО как «бедный» ответ в 2А группе отмечался на самом высоком уровне (72,9 %, статистические отличия с 1В и 2В группами), что в последующем сопровождалось получением наименьшего количества яйцеклеток в этой группе, но наибольшей доли эмбрионов хорошего качества. То есть 2А протокол не увеличил количество пунктируемых фолликулов, а улучшил качество полученных ооцитов и эмбрионов [89, 121, 141, 184, 193].

Синдром гиперстимуляции яичников в 4-х группах регистрировался на статистически одинаковом низком уровне (3,3; 5,9; 5,7; 3,2 % соответственно). Низкий показатель СГЯ может быть объяснен, во-первых, низким исходным овариальным резервом исследуемых пациенток (несмотря на высокие дозы гонадотропинов), а, во-вторых, применением в процессе стимуляции ЛГ-содержащих гонадотропинов. Полученные результаты согласуются данными Н.Р. Мамедовой (2012) в том, что применение ЛГ-содержащих гонадотропинов в процессе стимуляции способствует атрезии мелких фолликулов и предотвращению СГЯ.

Несмотря на одинаковое количество растущих и в последующем

пунктированных фолликулов во всех 4-х протоколах, рост эстрадиола периферической крови в процессе индукции не был одинаков. Так в группе при добавлении р-ЛГ с 6–7-го дня он был максимальный и на 5–7-й день и в день ТВП, а количество полученных ооцитов было наибольшим, в группе с добавлением р-ЛГ со 2–3-го дня уровень E2 был минимальный, а количество полученных ооцитов наименьшим. Надо отметить, что низкие уровни E2 в 2А группе не отразились на росте эндометрия, толщина которого не имела статистических отличий во всех 4-х группах в процессе стимуляции. Таким образом, по активности стероидогенеза можно судить о количестве полученных ооцитов. Данные корреляционного анализа показали связь уровня E2 на 5–7-й день с количеством полученных эмбрионов, их зрелостью и количеством полученных эмбрионов только в 1А группе, в день ТВП корреляция эстрадиола с вышеуказанными показателями фолликуло- и оогенеза отмечалась во всех группах. Последний факт согласуется с литературными данными [37] в том, что уровень E2 соответствует количеству растущих фолликулов.

На 5–7-й день стимуляции, также как при сравнении предыдущих групп, отмечалось снижение уровня ЛГ сыворотки крови в 1А, 2А и 2В группах, причем как в протоколах с ЧМГ, так и р-ЛГ. В 1В группе (добавление ЧМГ с 6–7-го дня) уровень ЛГ на 5–7-й день соответствовал базальному.

Корреляционный анализ показал отсутствие какой-либо связи уровня ЛГ на 5–7-й день с показателями фолликуло- и оогенеза. Как было сказано выше, согласно концепции «потолочных» значений ЛГ (Hillier S., 1994) существует пороговая концентрация ЛГ, необходимая для синтеза эстрадиола и нормального развития фолликулов. Каковы же оптимальные границы этого диапазона? В нашем исследовании в 2А группе средняя концентрация ЛГ на 5–7-й день составила $2,8 \pm 1,5$ mIU/ml, была минимальная из 4-х групп и соответствовала самой высокой доле эмбрионов хорошего качества и частоте наступления беременности. Проведенный нами регрессионный анализ

показал, что при уровне ЛГ от 1,0 до 2 mIU/ml прогнозируемое количество эмбрионов хорошего качества – 2,1 [95 % ДИ 1,3–2,9], при 2,1 – 3,0 mIU/ml – 1,8 [95 % ДИ 1,3–2,3], при 3,1 – 4,0 mIU/ml – 1,6 [95 % ДИ 0,7–2,5] и при 5 – 7,0 mIU/ml – 1,3 [95 % ДИ –0,21–2,8], то есть более высокому уровню ЛГ на 5–7-й день соответствует меньшее количество эмбрионов хорошего качества. Таким образом, уровень ЛГ на 5–7-й день, может отражать качество полученных эмбрионов, а его концентрация 1,0–3,0 mIU/ml является оптимальной для нормального фолликуло- и оогенеза.

В день ТВП в 2А и 2В группах (протоколы с р-ЛГ) уровень ЛГ в сыворотке крови был значительно выше, чем в 1А и 1В группах (протоколы с ЧМГ). Данная разница, возможно, объясняется составом ЛГ-содержащих препаратов (мочевые или рекомбинантные). Препараты ЧМГ могут содержать всего лишь менее 5 % активных гонадотропинов, остальные белки в них представлены негонадотропными примесями. К этим примесям относят ингибитор протеина С, ингибитор эластазы лейкоцитов, цинк-2-гликопротеин, иммуноглобулины, урокиназу, которые могут подавлять пенетрацию сперматозоида в ооцит, нарушать развитие бластоцист и останавливать рост эмбрионов, подавлять дифференцировку гранулезных клеток и снижать продукцию эстрогенов, что может негативно отражаться на результатах ЭКО [96, 126, 179].

В день ТВП в 1А, 1В и 2А группах уровень ЛГ крови имел умеренную прямую связь с количеством пунктированных фолликулов, полученных яйцеклеток и эмбрионов. Анализируя литературные данные, мы не встретили указаний, определяющих уровни ЛГ, достаточные для адекватного обеспечения конечных этапов фолликулогенеза. Надо отметить, что в группах 1А и 1В ЛГ в день ТВП был на минимальных уровнях ($1,5 \pm 2,6$ и $1,5 \pm 1,9$ mIU/ml соответственно), а доля эмбрионов хорошего качества была достоверно ниже, чем в 2А группе (р-ЛГ со 2–3-го дня) (65,9 и 70,5 % против 78 %), где уровень ЛГ в день ТВП был $3,9 \pm 5,6$ mIU/ml, а на 5–7-й день

соответствовал оптимальному диапазону ($2,8 \pm 1,5$ mIU/ml). Это еще раз подтверждает, что для адекватного оогенеза важен пороговый уровень ЛГ именно на этапе селекции доминантного фолликула (6–7-й день) [34, 149].

В день ТВП уровень прогестерона в группе с добавлением р-ЛГ со 2–3-го дня был самым низким из 4-х групп ($4,2 \pm 2,9$ ng/ml), однако уровень ЛГ в этой группе был наибольшим ($3,9 \pm 5,6$ mIU/ml). В группе с добавлением ЧМГ с 6–7-го дня в день ТВП уровень прогестерона был наибольшим ($7,3 \pm 6,4$ ng/ml), а ЛГ – наименьшим ($1,5 \pm 1,9$ mIU/ml). Исследование P. Devroey et al. (2012) показало, что при значениях прогестерона в преовуляторный период более 4 нмоль/л ($1,5$ ng/ml) частота наступления беременности значительно ниже. В нашем исследовании забор крови осуществлялся в день ТВП, то есть спустя 35–36 часов после введения овуляторной дозы ХГ, поэтому судить об уровне прогестерона в преовуляторный период можно только гипотетически. Однако в 2А группе в день ТВП уровень прогестерона был наименьшим и в большей степени приближался к показателю в $1,5$ ng/ml, а частота наступления беременности в этой группе была наибольшей. J.N. Hugues (2012) провел анализ существующих исследований, сравнивающих уровни прогестерона в преовуляторный период в зависимости от используемых индукторов. В циклах, где препараты с ЛГ-активностью вводили с начала стимуляции, отмечено предовуляторное снижение уровней прогестерона и, напротив, в циклах, где ЛГ-содержащие препараты применялись с середины фолликулярной фазы, – его повышение. Представленные данные согласуются с полученными нами результатами: в день ТВП уровень прогестерона в группе с добавлением р-ЛГ со 2–3-го дня был самым низким, а в группе с добавлением ЧМГ с 6–7-го дня – самым высоким. Таким образом, указанные факты требуют дополнительных исследований и являются весомой предпосылкой для их проведения.

Уровень прогестерона крови на 5–7-й день ни в одной группе не коррелировал с показателями оогенеза. В день ТВП в 1А, 1В и в 2А группах

отмечалась обратная уменьшенная связь с количеством ооцитов, их качеством и количеством эмбрионов.

На 5–7-й день стимуляции уровень АМГ неоднозначно реагировал на протокол стимуляции. Повышение концентрации АМГ на 5–7-й день стимуляции в протоколах с р-ЛГ, вероятно, свидетельствовало о запуске пула малых антральных фолликулов. В день ТВП отмечалось стойкое снижение уровня АМГ. Уровень АМГ имел прямую корреляционную связь с количеством пунктированных фолликулов, полученных яйцеклеток, зрелых яйцеклеток и количеством эмбрионов как на 5–7-й день, так и в день ТВП во всех группах, кроме 1А (ЧМГ с 6–7-го дня). Таким образом, можно сделать вывод, что в нашем исследовании при анализе протоколов с добавлением экзогенного ЛГ уровень АМГ на 5–7-й день стимуляции в большей степени отражал связь с показателями фолликуло- и оогенеза, чем уровень Е2. Надо отметить, что в доступной литературе достаточно мало информации о динамике уровня АМГ в течение индуцированного цикла и его зависимости от протокола стимуляции.

Исследование фолликулярной жидкости с целью поиска в ней прогностических факторов, имеющих связь с исходами лечения, начато с введения в практику метода ЭКО. Зарубежные специалисты определяли в фолликулярной жидкости уровень сахаров, С-реактивный белок, АМГ, ингибин В, ингибин А, активин А, эстрадиол, прогестерон, лептин, лактоферрин, мелотонин, гомоцистеин, факторы роста, цитокины и В- и Т-клетки [69, 105, 143, 155].

В нашем исследовании уровни ФСГ и ЛГ периферической крови в день ТВП коррелировали с таковыми в ФЖ. Не было обнаружено зависимости между уровнями ФСГ и ЛГ в ФЖ и показателями фолликуло- и оогенеза. В результате исследования не выявлено корреляции между концентрациями Е2 в сыворотке и концентрациями Е2 в фолликулярной жидкости. Уровень Е2 имел связь с показателями оогенеза только в 1А и в 2А группе, причем в 1А –

слабую прямую, а в 2А – сильную обратную. Полученные данные не согласуются с мнением некоторых авторов [5] о том, что уровень Е2 в фолликулярной жидкости не отражает ни количество, ни качество полученных ооцитов, однако диагностическая значимость данной связи в нашем исследовании сомнительна и требует дальнейших исследований. Уровень прогестерона в фолликулярной жидкости ни в одной группе не имел какой-либо связи с количеством пунктированных фолликулов, полученных ооцитов, зрелых ооцитов и эмбрионов. В связи с этим, целесообразность определения уровня этих гормонов в фолликулярной жидкости представляется сомнительной.

В нашем исследовании в группах 1А, 2А и 2В концентрация АМГ в фолликулярной жидкости коррелировала с таковой в периферической крови. Представляет особый интерес тот факт, что уровень АМГ в ФЖ имел связь с количеством пунктированных фолликулов ($r = 0,57$) и полученных ооцитов ($r = 0,57$) только в 2А группе. Надо отметить, что доля эмбрионов хорошего качества в этой группе была самой большой из 4-х групп. Литературные данные об уровне АМГ в фолликулярной жидкости весьма противоречивы. Ряд авторов [105] установили, что высокое содержание АМГ в фолликулярной жидкости является прогностическим маркером успешной имплантации эмбрионов. Другие исследователи, напротив, утверждают обратное и связывают высокую частоту имплантации с низкими концентрациями АМГ в фолликулярной жидкости [69]. Однако в доступной литературе мы не нашли пороговых концентраций уровня АМГ, при которых отмечалась бы высокая частота имплантации эмбрионов. Более того, на сегодняшний день не существует нормативных показателей уровня АМГ в ФЖ. В нашем исследовании уровень АМГ в ФЖ, который коррелировал с показателями оогенеза (в 2А группе), составил $2,5 \pm 2,3$ ng/ml, был самым низким из 4-х групп.

Обнаруженные изменения концентраций АМГ в процессе индуцированного цикла в периферической крови, их корреляция с

показателями фолликуло- и оогенеза, с уровнями в фолликулярной жидкости могут явиться поводом для дальнейших исследований роли АМГ в прогнозе исхода программ ВРТ.

Таким образом, широкое распространение методов ВРТ при лечении бесплодия требует индивидуального подбора оптимальных и безопасных схем стимуляции овуляции с целью повышения эффективности, а также дальнейших исследований качества получаемых эмбрионов на генетическом уровне. У пациенток старшего репродуктивного возраста, а также у молодых женщин, перенесших оперативные вмешательства на яичниках, и в связи с этим имеющих низкие параметры овариального резерва, у пациенток с длительным бесплодием, повторными попытками ЭКО, то есть у пациенток с исходно ожидаемым субоптимальным ответом, добавление р-ЛГ является наиболее эффективным для лечения бесплодия методом ЭКО при его назначении на начальных этапах стимуляции овуляции.

Добавление р-ЛГ на начальных этапах созревания фолликулов способствует более физиологичному течению индуцированного цикла и улучшается качество эмбрионов. Таким образом, индивидуальный подход к каждой пациентке в зависимости от состояния репродуктивной системы и клинической ситуации являются залогом успешного лечения.

ВЫВОДЫ

1. У пациенток позднего репродуктивного возраста, со сниженными показателями овариального резерва, длительным бесплодием и неудачными попытками ЭКО в анамнезе высокие курсовые дозы гонадотропинов ($2473,9 \pm 1016,6$ МЕ и $2865,8 \pm 1163,3$ МЕ) в протоколах стимуляции р-ФСГ + ЧМГ и р-ФСГ + р-ЛГ не увеличивают количество полученных ооцитов и эмбрионов, тем самым не влияют на частоту наступления беременности.

2. Добавление р-ЛГ на начальных этапах фолликулогенеза (2–3 день менструального цикла) способствует оптимизации процессов оогенеза: уменьшению количества незрелых и неоплодотворенных яйцеклеток, получению высокой доли эмбрионов хорошего качества – 78 % (в протоколах с ЧМГ – 65,9 и 70,5 %, в протоколе р-ЛГ с 6–7-го дня – 67,1 %) и впоследствии к увеличению частоты наступления беременности – 30 % (в протоколах с ЧМГ – 15,4 и 14,7 %, в протоколе р-ЛГ с 6–7-го дня – 19 %).

3. Уровень ФСГ на 5–7-й день имеет умеренную обратную корреляцию с показателями фолликуло- и оогенеза только в группах с добавлением ЧМГ и р-ЛГ со 2–3-го дня (1А и 2А). Уровень ФСГ в день ТВП с данными показателями не коррелирует.

Уровень ЛГ крови на 5–7-й день стимуляции выше 3,0 mIU/ml ассоциирован с меньшим количеством эмбрионов хорошего качества.

Высокий уровень ЛГ в день ТВП ($3,9 \pm 5,6$ mIU/ml) ($p_{1A-2A}=0,004$; $p_{1B-2A}=0,013$) предотвращает преждевременный рост прогестерона ($4,2 \pm 2,9$ ng/ml) ($p_{1B-2A}=0,04$; $p_{2A-2B}=0,001$), что способствует увеличению доли эмбрионов хорошего качества – 78 % ($p_{2A-2B}=0,034$; $p_{1A-2A}=0,009$), тем самым увеличению имплантаций – 30 % ($p_{1A-2A}=0,026$; $p_{1B-2A}=0,051$).

Уровень АМГ на 5–7-й день крови в большей степени коррелирует с показателями фолликуло- и оогенеза, чем уровень Е2.

4. Концентрации ФСГ, ЛГ и АМГ в периферической крови коррелируют с таковыми в фолликулярной жидкости. Концентрации Е2 и Р не коррелируют. Прямая корреляция уровня АМГ в фолликулярной жидкости с количеством пунктируемых фолликулов и полученных ооцитов ($r = 0,57$) в протоколе с добавлением р-ЛГ со 2–3-го дня показала, что уровень АМГ в фолликулярной жидкости $2,5 \pm 2,3$ ng/ml соответствует высокой доле эмбрионов хорошего качества (78 %) ($p_{2A-2B}=0,034$; $p_{1A-2A}=0,009$). Более высоким концентрациям АМГ в фолликулярной жидкости соответствует меньшая доля эмбрионов хорошего качества ($3,3 \pm 2,6$ ng/ml – 70,5 %; $3,5 \pm 3,1$ ng/ml – 67,1 %).

5. У пациенток с низкими показателями овариального резерва, длительностью бесплодия более 8–9 лет, предшествующими неудачными попытками ЭКО целесообразно применять протокол стимуляции р-ФСГ с добавлением р-ЛГ со 2–3-го дня в средней стартовой дозе 80 МЕ, в средней курсовой дозе 700 МЕ.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Перед проведением программы ЭКО у всех пациенток необходимо оценить состояние овариального резерва, продолжительность бесплодия, эффективность предыдущих попыток ЭКО, причину бесплодия с целью предварительного выбора протокола лечения и дозы вводимого индуктора.

2. У пациенток с низкими показателями овариального резерва, длительностью бесплодия более 8–9 лет, с предшествующими неудачными попытками ЭКО целесообразно применять протокол стимуляции р-ФСГ с добавлением р-ЛГ со 2–3-го дня в средней стартовой дозе 80 МЕ, в средней курсовой дозе 700 МЕ.

Список литературы

1. Боярский, К.Ю. Молекулярные основы фолликулогенеза: от стадии больших антральных фолликулов до овуляции / К.Ю. Боярский, С.Н. Гайдуков // Проблемы репродукции. – 2010. – Т. 16, № 5. – С. 13–23.
2. Боярский, К.Ю. Фолликулогенез и современная овариальная стимуляция (обзор литературы) // Проблемы репродукции. – 2002. – Т. 8, № 3. – С. 36–44.
3. Быков, В.Л. Функциональная морфология овуляции у человека / В.Л. Быков // Морфология. – 2001. – № 1. – С. 82–88.
4. Волкова, О.В. Морфогенетические основы развития и функции яичников / О.В. Волкова, Т. Г. Боровая. – М.: Изд-во РГМУ, 1999. – 188 с.
5. Жорданидзе, Д.О. Состояние овариального резерва при некоторых формах бесплодия: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Жорданидзе Диана Омаровна. – М., 2011. – 26 с.
6. Иммунологический мониторинг женщин в динамике физиологического и стимулированного овуляторного цикла / И.В. Айзикович, Б.И. Айзикович, О.Ю. Леплина [и др.] // Проблемы репродукции. – 2006. – № 1. – С. 39–45.
7. Калугина, А.С. Оптимизация контролируемой суперовуляции и криоконсервации в программах вспомогательных репродуктивных технологий: дис. ... д-ра мед. наук / Калугина Алла Станиславовна. – СПб., 2009. – 271 с.
8. Китаев, Э.М. Закономерности фолликулогенеза в яичниках млекопитающих животных и человека / Э.М. Китаев, А.И. Никитина // Проблемы репродукции. – 1995. – № 3. – С. 11–15.
9. Китаев, Э.М. Не количество, а качество: стратегия выбора / Э.М. Китаев // Проблемы репродукции. – 2014. – № 6. – С. 17–22.

10. Краснопольская, К.В. Значение лютеинизирующего гормона при контролируемой суперовуляции гонадотропинами в программах экстракорпорального оплодотворения / К.В. Краснопольская, А.С. Калугина // Акушерство и гинекология. – 2006. – № 1. – С. 3–8.

11. Краснопольская, К.В. Феномен «бедного» ответа на стимуляторы суперовуляции в программах ЭКО (обзор литературы) / К.В. Краснопольская, А.С. Калугина // Проблемы репродукции. – 2004. – Т. 10, № 1. – С. 51–58.

12. Краснопольская, К.В. Экстракорпоральное оплодотворение в комплексном лечении женского бесплодия: дис. ... д-ра мед. наук / Краснопольская Ксения Владиславовна. – М., 2003. – 304 с.

13. Краснощока, О.Е. Клинические и эмбриологические аспекты селективного переноса одного эмбриона / О.Е. Краснощока, В.Ю. Смольникова, Е.А. Калинина // Проблемы репродукции. – 2015. – № 2. – С. 51–57.

14. Краснощока, О.Е. Рациональный выбор стратегии селективного переноса одного эмбриона в программе ЭКО / О.Е. Краснощока, В.Ю. Смольникова, Е.А. Калинина // Проблемы репродукции. – 2014. – № 6. – С. 17–22.

15. Кузьмичев, Л.Н. Исследование эффективности и безопасности депо-форм а-ГнРГ бусерелина и трипторелина в программе ЭКО / Л.Н. Кузьмичев, К.А. Яворовская, С.А. Дьяконов // Проблемы репродукции. – 2005. – № 4. – С. 19–21.

16. Кулаков, В. И. Бесплодный брак: рук. для врачей / В.И. Кулаков. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. – С. 10–21.

17. Кулаков, В.И. Диагностика и лечение женского бесплодия / В.И. Кулаков, И.Е. Корнеева // Практическая гинекология / Под ред. В.И. Кулакова, В. Н. Прилепской. – М.: МЕДпресс-информ, 2001. – С. 298–317.

18. Лабыгина, А.В. Основные клинико-патогенетические варианты женского эндокринного бесплодия: автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Лабыгина Альбина Владимировна; Науч. центр проблем здоровья семьи и репродукции человека. – Иркутск, 2010. – 27 с.

19. Леонов, Б.В. Применение антагонистов гонадолиберина (ганиреликса) для профилактики спонтанных пиков ЛГ в процедурах ВРТ / Б.В. Леонов, О.М. Супряга // Экстракорпоральное оплодотворение и его новые направления в лечении женского и мужского бесплодия. – М.: МИА, 2000. – С. 717–732 .

20. Леонов, Б.В. Вопросы организации программы ЭКО и пересадки эмбриона / Б. В. Леонов // Практическая гинекология / под ред. В.И. Кулакова, В. Н. Прилепской. – М.: МЕДпресс-информ, 2001. – С. 298–317.

21. Лечение женского и мужского бесплодия: вспомогательные репродуктивные технологии / под ред. В. И. Кулакова. – М.: МИА, 2005. – 592 с.

22. Мамедова, Н.Р. Препараты, содержащие лютеинизирующий гормон, в программах ВРТ (обзор литературы) / Н.Р. Мамедова, Т.А. Назаренко, И.В. Монахова // Проблемы репродукции. – 2011. – № 3. – С. 50–55.

23. Манухин, И.Б. Клинические лекции по гинекологической эндокринологии / И.Б. Манухин, Л.Г. Тумилович, М.А. Геворкян. – М.: МИА, 2001. – 247 с.

24. Менопаузальные и рекомбинантные препараты (Перговерис и комбинация Бравелль+Менопур) в циклах ЭКО / К.В. Краснопольская, Т.А. Назаренко, А.Н. Бекетова [и др.] // Проблемы репродукции. – 2015. – № 2. – С. 45–50.

25. Нагорная, В.Ф. Овуляция и протеолитические ферменты / В.Ф. Нагорная // Акушерство и гинекология. – 1990. – № 4. – С. 13–17.

26. Назаренко, Т.А. «Бедный ответ»: тактика ведения пациенток со сниженной реакцией на стимуляцию гонадотропинами в программах ЭКО / Т.А. Назаренко, К.В. Краснопольская. – М.: МЕДпресс-информ, 2012. – 75 с.

27. Назаренко, Т.А. Женское бесплодие, обусловленное нарушениями процесса овуляции: клиника, диагностика, лечение: автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Назаренко Татьяна Алексеевна. – М., 1998. – 42 с.

28. Назаренко, Т.А. Роль антимюллера гормона в оценке овариального резерва / Т.А. Назаренко, Н.Г. Мишиева, Н.Д. Фанченко // Проблемы репродукции. – 2005. – № 6. – С. 26–30.

29. Назаренко, Т.А. Стимуляция функции яичников / Т.А. Назаренко. – 4-е изд. – М.: МЕДпресс-информ, 2013. – С. 139–142.

30. Никитин, А.И. Пренатальные потери в программах вспомогательной репродукции / А.И. Никитин // Проблемы репродукции. – 1996. – № 4. – С. 49–55.

31. Овсянникова, Т.В. Эпидемиология бесплодного брака // Практическая гинекология / Под ред. В. И. Кулакова, В. Н. Прилепской. – М.: МЕДпресс-информ, 2001. – С. 366–381.

32. Полов, К. Введение в репродуктивную эндокринологию. Биохимические и физиологические аспекты, основы диагностики / К. Полов. – М., 2000. – 72 с.

33. Применение рекомбинантного лютеинизирующего гормона (Люверис) при стимуляции яичников в программе ЭКО у пациенток с риском бедного ответа, связанным с возрастным фактором / К.В. Краснопольская, Е.С. Булычева, О.С. Горская [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2007. – № 6. – С. 67–72.

34. Применение рекомбинантного лютеинизирующего гормона (Люверис) при стимуляции яичников в программе ЭКО у пациенток с риском бедного ответа, связанным с возрастным фактором / К.В. Краснопольская [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2007. – № 6. – С. 67–72.

35. Прорубщикова, М.Ю. Показатели перекисидации липидов в сыворотке крови и фолликулярной жидкости пациенток с бесплодием и различными исходами экстракорпорального оплодотворения / М.Ю. Прорубщикова, Л.И. Колесникова, Л.В. Сутурина // Бюл. Вост.-Сиб. науч. центра СО РАМН. – 2012. – № 3-1. – С. 75–78.

36. Прорубщикова, М.Ю. Роль окислительного стресса в прогнозе исходов программ экстракорпорального оплодотворения и переноса эмбрионов: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.03.03 / Прорубщикова Мария Юрьевна; Науч. центр проблем здоровья семьи и репродукции человека. – Иркутск, 2013. – 22 с.

37. Различия эндокринных профилей сыворотки крови и фолликулярной жидкости у пациенток ЭКО после стимуляции овуляции с применением высокоочищенного ЧМГ или рекомбинантного ФСГ. – Пер. ст.: J. Smitz, A.N. Andersen, P. Devroey [et al.] // Hum. Reprod. – 2011. – Vol. 22, No. 4. – P. 14–27.

38. Регуляторные факторы и цитокины в сыворотке и фолликулярной жидкости у женщин при контролируемой овариальной гиперстимуляции / Н.А. Хонина, И. В. Айзикович, Е. Я. Шевела [и др.] // Цитокины и воспаление. – 2005. – № 2. – С. 22–28.

39. Результат использования рекомбинантного ЛГ у женщин в процедурах ВРТ на фоне даун-регуляции агонистами ГнРГ и стимуляции рекомбинантным ФСГ: открытое исследование. – Пер. ст.: P. Humaidan, M. Bungum, L. Bungum, C.Y. Andersen // Reprod. BioMed. Online. – 2004. – Vol. 8, No. 6. – P. 635–642.

40. Репродуктивная эндокринология: пер. с англ.: в 2 т. / Под ред. С. С. К. Йена, Р. Б. Джаффе. – М., 1998. – Т. 1. – С. 109–159.

41. Репродуктивное здоровье коренного и пришлого населения Восточной Сибири / А.В. Лабыгина, Л.В. Сутурина, Л.И. Колесникова [и др.] // Здравоохранение Российской Федерации. – 2013. – № 3. – С. 37–39.

42. Роль морфологической оценки ооцита и эмбриона при использовании ВРТ (обзор литературы) / О.Е. Краснощока, В.Ю. Смольникова, Е.А. Калинина, В.В. Елагин // Проблемы репродукции. – 2015. – № 1. – С. 54–58.

43. Российская ассоциация репродукции человека. Регистр ВРТ. Отчет за 2013 год [Электронный ресурс]. – СПб., 2013. – Режим доступа: http://www.rahr.ru/d_registr_otchet/registr_2015.pdf (дата обращения: 07.10.2015).

44. Светлаков, А.В. Молекулярно-биологические аспекты имплантации у человека и животных / А.В. Светлаков, М.В. Яманова, А.Б. Егорова // Проблемы репродукции. – 2002. – Т. 8, № 2. – С. 16–28.

45. Серов, В.Н. Клинико-физиологические основы гинекологической эндокринологии / В.Н. Серов, А.А. Кожин, В.Н. Прилепская. – Ростов н /Дону: Эверест, 1998. – 368 с.

46. Сидельникова, В. М. Эндокринология беременности в норме и при патологии / В. М. Сидельникова. – М.: МЕДпресс-информ, 2007. – С. 9–26.

47. Сметник, В. П. Агонисты ГнРГ и «возвратная» (Add back) терапия / В. П. Сметник, И. А. Долгова // Проблемы репродукции. – 1999. – Т. 5, № 6. – С. 22–24.

48. Сметник, В. П. Использование аналогов ГнРГ в репродуктологии и онкологии / В. П. Сметник, Г. Е. Чернуха, Т. Е. Самойлова // Проблемы репродукции. – 2003. – № 5. – С. 28–32.

49. Смольникова, В. Ю. Принципы и схемы стимуляции суперовуляции в программе ЭКО и ПЭ / В. Ю. Смольникова, Е. Я. Финогенова // Лечение женского и мужского бесплодия. – М.: МИА, 2005. – С. 347–367.

50. Сравнительная оценка терапевтического потенциала препаратов, содержащих и не содержащих лютеинизирующий гормон, при их использовании в длинном протоколе в программе ЭКО / К. В.

Краснопольская, Е.С. Булычева, О. С. Горская [и др.] // *Акушерство и гинекология*. – 2007. – № 5. – С. 85–88.

51. Структурные основы генеративной и эндокринной функции яичников в норме и патологии / Г.В. Ковальский, Э.М. Китаев, Б.Я. Рыжавский [и др.]. – СПб., 1996. – 202 с.

52. Теппермен, Д. Физиология обмена веществ в эндокринной системе / Д. Теппермен, Х. Теппермен. – М.: Мир, 1989. – 656 с.

53. Ускова, М. А. Эффективность вспомогательных репродуктивных технологий у женщин, перенесших оперативные вмешательства на маточных трубах: дис. ... канд. мед. наук / Ускова Мария Александровна. – М., 2010. – 136 с.

54. Фанченко, Н.Д. Нейрогуморальная регуляция и состояние репродуктивной системы в период ее активного функционирования / Н.Д. Фанченко, Р.Н. Щедрина // *Руководство по эндокринной гинекологии* / Под ред. Е. М. Вихляевой. – М.: МИА, 2002. – С. 150–174.

55. Финогенова, Е.Я. Принципы индивидуального подбора существующих схем стимуляции суперовуляции в программе ЭКО и ПЭ / Е. Я. Финогенова // *Практическая гинекология* / Под ред. В. И. Кулакова, В. Н. Прилепской. – М.: МЕДпресс-информ, 2001. – С. 401–409.

56. Хеффнер, Л. Половая система в норме и патологии: пер. с англ. / Л. Хеффнер. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2003. – С. 40–41.

57. Элдер, К. Экстракорпоральное оплодотворение: пер. с англ. / Кэй Элдер, Д. Брайан Дейл. – М.: МЕДпресс-информ, 2008. – 303 с.

58. 450 IU versus 600 IU gonadotropin for controlled ovarian stimulation in poor responders: a randomized controlled trial / J. Lefebvre, R. Antaki, I.J. Kadoch [et al.] // *Fertil Steril*. – 2015. – Vol. 104, No. 6. – P. 1419–1425.

59. 7-Day administration of the gonadotropin-releasing-hormone antagonists cetrorelix in normal cycling women / L. Sommer, K. Zanger, C. Dyong [et al.] // *Eur. J. Endocrinol*. – 1994. – Vol. 131. – P. 280–285.

60. A double-blind, non-inferiority randomized controlled trial comparing corifollitropin alfa and recombinant r-hFSH during the first seven days of ovarian stimulation using a GnRH antagonist protocol / P. Devroey, R. Boostanfar, N. P. Koper [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2009. – Vol. 24. – P. 3063–3072.

61. A pharmacodynamic comparison of human menopausal gonadotropin in normal women and polycystic ovary syndrome / R. Anderson, J. Gragun, R. Chang [et al.] // *Fertil. Steril.* – 1989. – Vol. 52. – P. 216–220.

62. A prospective 1, randomized comparison of ovulation induction using highly purified follicle-stimulation hormone alone and with recombinant human luteinizing hormone in in-vitro fertilization // E. A. Sills [et al.] // *Hum. Reprod.* – 1999. – Vol. 14. – P. 2230–2235.

63. A prospective randomized study of three ovulation induction protocols for IVF: GnRH agonist versus antagonist with and without low dose hCG / K. Kyono, K. Fuchinoue, Y. Nakajo [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2004. – Vol. 82. – P. S31.

64. A randomized prospective assessor-blind evaluation of luteinizing hormone dosage and in vitro fertilization outcome / U. Gordon, R. F. Harrison, M. Fawzy [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2001. – Vol. 75. – P. 324–331.

65. Age related changes in follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, oestradiol and immunoreactive inhibin in women of reproductive age / J. Mac Naughton, M. Banah, P. McCloud [et al.] // *Clin. Endocrinol.* – 1992. – Vol. 36. – P. 339–345.

66. Al-Inany, H. G. GnRG antagonist in assisted reproduction: a Cochrane review / H. G. Al-Inany, M. Aboulghar // *Hum. Reprod.* – 2002. – Vol. 17. – P. 874–885.

67. Altered kinetics of pituitary response to gonadotropin-releasing hormone in women with variant luteinizing hormone: Correlation with ovulatory disorders / K. Takahashi, K. Karino, H. Kanasaki, K. Miyazaki // *Horm. Res.* – 2004. – Vol. 61. – P. 27–32.

68. Among patients treated with FSH and GnRH analogues for in-vitro fertilization, is the addition of recombinant LH associated with the probability of live birth? A systematic review and meta-analysis / E.M. Kolibianakis, L. Kalogeropoulou, G. Griesinger [et al.] // *Hum. Reprod. Update.* – 2007. – Vol. 13. – P. 445–452.

69. Andersen, C. Y. Concentration of AMH and inhibin B in relation to steroids and age in follicular fluid from small antral human follicles / C. Y. Andersen, M. Rosendahl, A. G. Byskov // *J. Clin. Endocrin. Metab.* – 2008. – Vol. 93, No. 6. – P. 2344–2349.

70. Anti-Mullerian hormone plasma levels in spontaneous menstrual cycle and during treatment with FSH to induce ovulation / A. La Marca [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2004. – Vol. 19, No. 12. – P. 2738–2741.

71. Antimüllerian hormone: prediction of cumulative live birth in gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment for in vitro fertilization / O. Hamdine, M. J.C. Eijkemans, E. G.W. Lentjes [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2015. – Vol. 104, Issue 4. – P. 891–898.

72. Antoine, J. M. Minimal ovarian stimulation: certainly less dangerous but rarely as efficient / J. M. Antoine, L. Verstraete // *Gynecol. Obstet. Fertil.* – 2006. – Vol. 34, No. 4. – P. 356–357.

73. Are endogenous LH levels during ovarian stimulation for IVF using GnRH analogues associated with the probability of ongoing pregnancy? A systematic review / E. M. Kolibianakis, J. Collins, B. Tarlatzis [et al.] // *Hum. Reprod. Update.* – 2006. – Vol. 12. – P. 3–12.

74. Assessing ovarian response: antral follicle count versus anti-Müllerian hormone / R. Fleming, D. B. Seifer, J. L. Frattarelli, J. Ruman // *Reprod. Biomed. Online.* – 2015. – Vol. 31, Issue 4. – P. 486–496.

75. Baerwald, A. R. Characterization of ovarian follicular wave dynamics in women / A. R. Baerwald, G. P. Adams, R. A. Pierson // *Biol. Reprod.* – 2003. – Vol. 69. – P. 1023–1031.

76. Biological versus chronological ovarian age: implications for assisted reproductive technology / C. Alviggi, P. Humaidan, C. M. Howles [et al.] // *Reprod. Biol. Endocrinol.* – 2009. – Vol. 22. – P. 101–113.

77. Bourgain, C. The endometrium in stimulated cycles for IVF / C. Bourgain, P. Devroey // *Hum. Reprod.* – 2003. – Vol. 9. – P. 515–522.

78. Buhler, K.F. Recombinant human LH supplementation versus supplementation with urinary hCG-based LH activity during controlled ovarian stimulation in the long GnRH-agonist protocol: a matched case–control study / K. F. Buhler, R. Fischer // *Gynecol. Endocrinol.* – 2011. – Vol. 28. – P. 345–350.

79. Burgués, S. The effectiveness and safety of recombinant human LH to support follicular development induced by recombinant human FSH in WHO group I anovulation: evidence from a multicentre study in Spain / S. Burgués; Spanish Collaborative Group on Female Hypogonadotropic Hypogonadism // *Hum. Reprod.* – 2001. – Vol. 16, No. 12. – P. 2525–2532.

80. Can you ever collect too many oocytes? / R. Briggs, G. Kovacs, V. MacLachlan [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2015. – Vol. 30. – P. 81–87.

81. Chabbert-Buffet, N. GnRH antagonists / N. Chabbert-Buffet, F. Olivennes // *Clin. Obstet. Gynec.* – 2003. – Vol. 46, No. 2. – P. 254–264.

82. Chappel J. C. Re-evaluation of the roles of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in the ovulatory process / J. C. Chappel, C. M. Howles // *Hum. Reprod.* – 1991. – Vol. 6. – P. 1206–1212.

83. Characterisation of a partially purified human menopausal gonadotropin preparation / E. Guidice, C. Crisci, V. Altarocca [et al.] // *Journal of Clinical Research.* – 2001. – Vol. 4. – P. 27–34.

84. Clinical evidence for an LH ceiling effect induced by administration of recombinant LH during the late follicular phase of stimulated cycles in World Health Organization type 1 and type 2 anovulation / E. Lourmaye, P. Engrand, Z. Shoham [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2003. – Vol. 18. – P. 314–322.

85. Comparative analysis of follicle morphology and oocyte diameter in four mammalian species (mouse, hamster, pig, and human) / J. Griffin, B. Emery, I. Huang [et al.] // *J. Exp. Clin. Assist. Reprod.* – 2006. – Vol. 3. – P. 1–9.

86. Comparative study of the dynamics of follicular waves in mares and women / O. J. Ginther, E. L. Gastal, M. O. Gastal [et al.] // *Biol. Reprod.* – 2004. – Vol. 71. – P. 1195–1201.

87. Comparison between follicular stimulation and luteal stimulation protocols with clomiphene and HMG in women with poor ovarian response / Y. Li, W. Yang, X. Chen [et al.] // *Gynecol Endocrinol.* – 2015. – Vol. 15. – P. 1–4.

88. Controlled Ovarian Stimulation with recombinant-FSH plus recombinant-LH vs. human Menopausal Gonadotropin based on the number of retrieved oocytes: results from a routine clinical practice in a real-life population / A. Revelli, G. Pettinau, G. Basso [et al.] // *Reproductive Biology and Endocrinology.* – 2015. – Vol. 13, No. 77. – P. 2–8.

89. Cycle characteristics and outcome in relation to ovarian during in vitro fertilization / M. R. Fluker [et al.] // *Assist. Reprod. Genet.* – 1993. – Vol. 10, No. 8. – P. 504 – 512.

90. Daya, S. Gonadotropin releasing hormone agonist protocols for pituitary desensitization in in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer cycles (Cochrane review) // *The Cochrane library.* – 2000. – Issue 1.

91. Deborah, L. Assisted – reproductive technologies / L. Deborah, Manzi-Smith // *Reproductive endocrinology and infertility.* – Mosby Elsevier, 2007. – P. 263–276.

92. Diagnosis, therapy and endocrinologic parameters of persistent follicles in mares in comparison with preovulatory follicles / B. Kaiser [et al.] // *Tierarztl. Prax. Ausg. G. Grosstiere Nutztiere.* – 1999. – Bd. 27, № 3. – S. 180–186.

93. Dynamic antimüllerian hormone levels during controlled ovarian hyperstimulation predict in vitro fertilization response and pregnancy outcomes /

A.K. Styer, P. C. Brady, P. M. Sluss [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2015. – Vol. 104, Issue 5. – P. 1153–1161.

94. Economic evaluation of highly purified menotropin compared with recombinant follicle-stimulating hormone in assisted reproduction / A. Lloyd, M. Phil, R. Kennedy [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2003. – Vol. 80. – P. 1108–1113.

95. Edwards R.G. // *Scientific Foundations of Obstetrics and Gynaecology* / R. G. Edwards. – London, 1997. – P. 175–252.

96. Effect of insulin-like growth factor-binding protein 7 on steroidogenesis in granulosa cells derived from equine chorionic gonadotropin-primed immature rat ovaries / K. Tamura, M. Matsushita, A. Endo [et al.] // *Biol. Reprod.* – 2007. – Vol. 77. – P. 485–491.

97. Effect of myo-inositol on the ovarian response and oocyte quality in PCO patients undergoing ovulation induction for ICSI / E. Papaleo, V. Unfer [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2007. – Vol. 22, Suppl. 1. – P. 89.

98. Effect of ovarie hiperstimulation on blood lymphocyte subpopulations, cytokines, leptin and nitrite among patients with unexplained infertility / M.C. Fornari, A. Sarto, V. E. Berardi [et al.] // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2002. – Vol. 6. – P. 394–403.

99. Effects of profound suppression of luteinizing hormone during ovarian stimulation on follicular activity, oocyte and embryo function in cycles stimulated with purified follicle stimulating hormone / R. Fleming, F. Lloyd, M. Herbert [et al.] // *Hum. Reprod.* – 1998. – Vol. 13. – P. 1788–1792.

100. Effects of recombinant LH treatment on folliculogenesis and responsiveness to FSH / C. I. Durnerin, K. Erb, R. Fleming [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2008. – Vol. 23, N. 2. – P. 421–426.

101. Empeiraire, J. C. Minimal ovarian stimulation: certainly less dangerous and probably as efficient / J. C. Empeiraire // *Gynecol. Obstet. Fertil.* – 2006. – Vol. 34, No. 4. – P. 354–355.

102. Epidermal growth factor contamination and concentrations of intact human chorionic gonadotropin in commercial preparations / S.J. Yarram, J. Jenkins, L.A. Cole [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2004. – Vol. 82. – P. 232–233.

103. Exogenous luteinising hormone activity may influence the treatment outcome in vitro fertilization but not in intracytoplasmic sperm injection cycles / P. Platteau, J. Smitz, C. Albano [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2004. – Vol. 81. – P. 11401–1404.

104. Exogenous luteinizing hormone in controlled ovarian hyperstimulation for assisted reproduction techniques / A. P. Ferraretti, L. Gianaroli, M. C. Magli [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2004. – Vol. 82. – P. 1521–1526.

105. Fanchin, R. 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 vitro fertilization / R. Fanchin // *J. Clin. Endocrin. Metab.* – 2007. – Vol. 92, No. 5. – P. 1796–1802.

106. Ferraretti, A. Elective cryopreservation of all oocytes in women at risk of OHSS / A. Ferraretti, L. Gianaroli, M. C. Fasolino // *Hum. Reprod.* – 2007. – Vol. 22, Suppl. 1. – P. 100.

107. Ferraretti, A. P. Does recombinant FSH increase embryo viability in poor responder patients? / A. P. Ferraretti, L. Gianaroli, M. C. Magli // *Hum. Reprod.* – 1999. – Vol. 14. – P. 256–269.

108. Filicori, M. Neuroendocrine regulation of the corpus luteum in the human. Evidence for pulsatile progesterone secretion / M. Filicori, J.P. Butler, W.F. Crowley, Jr. // *J. Clin. Invest.* – 1984. – Vol. 73. – P. 1638 – 1647.

109. Filicori, M. The role of luteinizing hormone in folliculogenesis and ovulation / M. Filicori // *Fertil. Steril.* – 1999. – Vol. 71. – P. 405–414.

110. Filicori, M. Use of luteinizing hormone in the treatment of infertility: time for reassessment? / M. Filicori // *Fertil. Steril.* – 2003. – Vol. 79. – P. 253–255.

111. Fink, G. Gonadotropin secretion and its control / G. Fink // *The Physiology of Reproduction.* – New York, 1989. – Vol. 1. – P. 1349–1377.

112. Fixed or flexible? The effect of an individualized GnRH antagonist protocol on folliculogenesis in IVF/ICSI / M. Mochtar, H. Van Krevel, C. Hamilton [et al.] // Hum reprod. – 2003. – Vol. 18, Suppl. 1: Abstract Book of the 19th ESRE Annual Meeting (Madrid, Spain). – P.110.

113. Follicle-stimulating hormone versus human menopausal gonadotropin for in vitro fertilization cycles: a meta-analysis / S. Daya, J. Gunby, E. G. Hughes [et al.] // Fertil. Steril. – 1995. – Vol. 64, N. 2. – P. 347 – 354.

114. Follicular steroids in relation to oocyte development and human ovarian stimulation protocols / A. Chabab, B. Hedon, F. Arnal [et al.] // Hum. Reprod. – 1986. – Vol. 1. – P. 449–454.

115. Gardner, D.K. Assessment of embryo viability: the ability to select a single embryo for transfer-a review / D.K. Gardner, D. Sakkas // Placenta. – 2003. – Vol. 24. – P. 512.

116. Gougeon, A. Dynamics of human follicular growth, morphologic, dynamic and functional aspects / A. Gougeon // Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology / Ed. L. Barbieri, J. Strauss. – Elsevier, 2004. – P. 25–43.

117. Happel, L., Roij N. 19 ESHRE Annual Meeting (Madrid, Spain), Abstract Book, 2003, Vol. 18, Suppl. 1, p. 310, p. 107.

118. High basal LH levels in combination with low basal FSH levels are associated with high success rates at assisted reproduction / Thomas Brodin, Torbjorn Bergh, Lars Berglund [et al.] // Hum. Reprod. – 2009. – Vol. 24, No. 11. – P. 2755–2759.

119. High FSH: LH ratio and low LH levels in basal cycle day 3: impact on follicular development and IVF outcome / G. Barroso, S. Oehninger, A. Monzo [et al.] // J. Ass. Reprod. Genet. – 2001. – Vol. 18. – P. 499–505.

120. Hillier, S.G. Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis / S. G. Hillier // Hum. Reprod. – 1994. – Vol. 9. – P. 188–191.

121. HMG improves IVF outcome in patients with high basal FSH/LH ratio: a preliminary study / R. Orvieto [et al.] // *Reprod. Biomed. Online.* – 2009. – Vol. 18. – P. 205–208.

122. Honkanen, N. Reproductive Health in Eastern Europe: an overview and the challenges ahead / N. Honkanen, G. Benagiano // *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* – 1997. – Vol. 167. – P. 187–196.

123. Howles, C. M. Treatment strategies in assisted reproduction for women of advanced maternal age / C. M. Howles, C. H. Kim, K. Elder // *Int. Surg.* – 2006. – Vol. 91. – S. 37–54.

124. Huirne, J. A. Are GnRH antagonist comparable to agonists for use in IVF? / J. A. Huirne, R. Homburg, C. B. Lambalk // *Hum. Reprod.* – 2007. – Vol. 22, No. 11. – P. 2805–2813.

125. Human menopausal gonadotropin versus recombinant folliclestimulating hormone in normogonadotropic women down-regulated with a gonadotropinreleasing hormone agonist who were undergoing in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection: a prospective randomized study // L. G. Westergaard [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2001. – Vol. 76. – P. 543–549.

126. Human sperm-egg binding is inhibited by peptides corresponding to core region of an acrosomal serine protease inhibitor / A. Moore, L. M. Penfold, J. L. Johnson [et al.] // *Molecular. Reprod. Development.* – 1993. – Vol. 34. – P. 280–291.

127. IL-8 expression and modulation in human preovulatory follicles and ovarian cells / A. Arici, E. Oral, O. Bukulmez [et al.] // *Endocrinology.* – 1996. – Vol. 12. – P. 1233–1239.

128. Impact of recombinant FSH dose adjustments on the number of oocytes during a second treatment cycle with IVF or ICSI in “standard patients” treated with 150 IU/day during the first cycle / B. Popovic-Todorovic, S. Ziebe, K. T. Schmidt [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2001. – Vol. 16. – P. 90.

129. Influence of ovarian stimulation with HP-hMG or recombinant FSH on embryo quality parameters in patients undergoing IVF / S. Ziebe [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2007. – Vol. 22, No. 9. – P. 2404–2413.

130. Kaczmarek, M. M. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology – an overview / M. M. Kaczmarek, D. Schams, A. J. Ziecik // *Reprod. Biol.* – 2005. – Vol. 5. – P. 111–136.

131. Kelly, E. E. Recombinant FSH therapy alone versus combination therapy with recombinant LH therapy in patients down-regulated with a low dose luteal GnRH agonist protocol: preliminary results / E. E. Kelly, L. Nebiolo // Jansen R, Mortimer D, Coote K, eds. *Towards reproductive certainty: fertility and genetics beyond* / Eds. R. Jansen, D. Mortimer, K. Coote. – Carnforth: Parthenon Publishing Group, 1999. – P. 200–204.

132. Kolibianakis, E. M. Among patients treated for IVF with gonadotrophins and GnRH analogues, is the probability of live birth dependent on the type of analogue used? A systematic review and meta-analysis / E. M. Kolibianakis, J. Collins // *Hum. Reprod. Update.* – 2006. – Vol. 12, No.6. – P. 651–671.

133. Kolibianakis, E. M. Effect of ovarian stimulation with recombinant follicle-stimulating hormone, gonadotropin releasing hormone antagonist and human chorionic gonadotropin on endometrial maturation on the day of oocyte pick-up / E. M. Kolibianakis, C. Bourgain, C. Albano // *Fertil. Steril.* – 2002. – Vol. 78. – P. 1025–1029.

134. Kwintkiewicz, J. The interplay of insulin-like growth factors, gonadotropins, and endocrine disruptors in ovarian follicular development and function / J. Kwintkiewicz, L. C. Giudice // *Semin. Reprod. Med.* – 2009. – Vol. 27, No. 1. – P. 43–51.

135. La Marca A. The use of ovarian reserve markers in IVF clinical practice: a national consensus / A. La Marca, R. Palermo, F.M. Ubaldi // *Gynecol Endocrinol.* – 2015. – Vol. 4. – P. 1–5.

136. Lam, P. M. Vascular endothelial growth factor plays more than an angiogenic role in the female reproductive system / P. M. Lam, C. Haines // *Fertil. Steril.* – 2005. – Vol. 84. – P. 1775–1778.

137. Less miscarriage rate using LH (r-LH) in GnRH agonist long protocols / V. Abdelmassih, L. Salgueiro, R. Abdelmassih, C. Carizza // Abstracts book of the 22nd Annual Meeting of the ESHRE. Prague. – 2006. – Vol. 21, Suppl 1. – P. 0–017.

138. Loumaye, E. Recombinant human luteinizing hormone / E. Loumaye, L. O’Dea // Tarlatzis B, ed. *Ovulation induction, European practice in gynaecology and obstetrics* / B. Tarlatzis, ed. – Elsevier edition, 2002. – P. 197–208.

139. Loumaye, E. The control of endogenous secretion of LH by gonadotrophin-releasing hormone agonists during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization and embryo transfer / E. Loumaye // *Hum. Reprod.* – 1990. – Vol. 5. – P. 357–376.

140. Low-dose growth hormone supplementation increases clinical pregnancy rate in poor responders undergoing in vitro fertilisation / K. Lattes, M. Brassesco, M. Gomez, M. A. Checa // *Gynecol Endocrinol.* – 2015. – Vol. 31, No. 7. – P. 565-568.

141. Lower apoptosis rate in human cumulus cells after administration of recombinant luteinizing hormone to women undergoing ovarian stimulation for in vitro fertilization procedures / G. Ruvolo [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2007. – Vol. 87. – P. 542–546.

142. Lunenfeld, B. Induction of ovulation: historical aspects / B. Lunenfeld, V. Insler // *Baillieres Clin. Obstet. Gynaecol.* – 1990. – Vol. 4, No. 3. – P. 473–489.

143. Maggoffin, D. A. Preantral follicles stimulate luteinizing hormone independent differentiation of ovarian theca-interstitial cells by an intrafollicular paracrine mechanism / D. A. Maggoffin, P. C. Magarely // *Endocrine.* – 1995. – Vol. 3. – P. 107–112.

144. Magoffin, D. A. Regulation of differentiated functionis in ovarian theca cells / D. A. Magoffin // Seminar Reprod. Endocrin. – 1991. – Vol. 9. – P. 321.

145. Measurements of serum Mullerian inhibiting substance in the evaluation of children with nonpalpable gonads / M.M. Lee, P.K. Donahoe, B.L. Silverman et al. // The new Engl. J. Med. – 1997. – Vol. 336. – P. 1480–1486.

146. Medroxyprogesterone acetate is an effective oral alternative for preventing premature luteinizing hormone surges in women undergoing controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization / Y. Kuang, Q. Chen, Y. Fu [et al.] // Fertil. Steril. – 2015. – Vol. 104, Issue 1. – P. 62–70.

147. Mid-follicular LH supplementation in women aged 35–39 years undergoing ICSI cycles: a randomized controlled study / R. Matorras, B. Prieto, A. Exposito [et al.] // Reprod. BioMed. Online. – 2009. – Vol. 19, No. 6. – P. 879–887.

148. Modulation of folliculogenesis and steroidogenesis in women by graded menotrophin administration / M. Filicori, G. E. Cognigni, P. Pocognoli [et al.] // Hum. Reprod. – 2002. – Vol. 17. – P. 2009–2015.

149. Nyboe Andersen A. Addition of rLH (Luveris) to rFSH during the final days of follicular maturation in IVF/ICSI treated patients: A Nordic randomized multicenter trial / Andersen A. Nyboe, P. Humaidan, G. Fried // Abstracts of the 22nd Annual Meeting of the ESHRE. – Prague, 2006. – P. 54.

150. Nyboe, Andersen A. Randomised trial (MERIT) comparing highly purified menotrophin and recombinant FSH in IVF / Andersen A. Nyboe, P. Devroey, J.-C. Arce // Abstracts of the 21st Annual Meeting of the ESHRE. – Copenhagen, Denmark, 2005. – P. 19.

151. Orvieto, K. C-reactive protein level in patients in the cycle of the ovarian hiperstimulation / K. Orvieto // Hum. Reprod. – 2004. – Vol. 2. – P. 453–455.

152. Othman H., Subein M., [et al.] // Hum. Reprod. – 2003. – Vol. 18, Suppl. 1: Abstract Book of the 19th ESHRE Annual Meeting (Madrid, Spain). – P. 104.

153. Ovarian responses and pregnancy outcome related to mid-follicular LH levels in women undergoing assisted reproduction with GnRH agonist down-regulation and recombinant FSH stimulation / P. Humaidan, L. Bungum, M. Bungum [et al.] // Hum. Reprod. – 2002. – Vol. 17. – P. 2016–2021.

154. Ovarian responses in women to recombinant follicle-stimulating hormone and luteinising hormone (LH): a role for LH in the final stages of follicular maturation / M. W. Sullivan, A. Stewart-Akers, J. S. Krasnow [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 1999. – Vol. 84. – P. 228–232.

155. Perifollicular Doppler flow and follicular fluid vascular endothelial growth factor concentrations in poor responders / C. Battaglia, A. D. Genazzani, G. Regnani [et al.] // Fertil. Steril. – 2000. – Vol. 74. – P. 809–812.

156. Poor responder-high responder: the importance of soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 in ovarian stimulation protocols / J. Neulen, D. Wenzel, C. Hornig [et al.] // Hum. Reprod. – 2001. – Vol. 16. – P. 621–626.

157. Poor responders in IVF--is there any evidence-based treatment for them? / I. Szymusik, P. Marianowski, A. Zygula, M. Wielgos // Neuro Endocrinol Lett. – 2015. – Vol. 36, No. 3. – P. 209–213.

158. Pouly, J. L. Abstract Book of the 20-th ESRE Annual Meeting (Berlin, Germany) / J. L. Pouly, A. Deveaux // Hum. Reprod. – 2004. – Vol. 19, Suppl. 1. – P. 117.

159. Prapas, N. GnRH agonist versus GnRH antagonist in oocyte donation cycles: a prospective randomized study / N. Prapas, Y. Prapas, Y. Panagiotidis // Hum. Reprod. 2005. – Vol. 20, No. 6. – P. 1516–1520.

160. Premature elevation of plasma progesterone alters pregnancy rates of in vitro fertilization and embryo transfer / R. Fanchin, D. de Ziegler, J. Taieb [et al.] // Fertil. Steril. – 1993. – Vol. 59. – P. 1090–1094.

161. Premature luteinizing hormone during gonadotropin-releasing hormone antagonist cycles and its relationship with in vitro fertilization outcome / E. Bosch, I. Valencia, E. Escudero [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2003. – Vol. 80. – P. 1444–1449.

162. Press, M. F. Localization of progesterone receptor with monoclonal antibodies to the human progestin receptor / M. F. Press, G. L. Greene // *Endocrinology.* – 1988. – Vol. 122, No. 3. – P. 1165–1175.

163. Purified urinary follicle stimulating hormone induces different hormone profiles compared with menotrophins, dependent upon the route of administration and endogenous luteinizing hormone activity / R. Fleming, C. C. Chung, R. W. Yates [et al.] // *Hum. Reprod.* – 1996. – Vol. 11. – P. 1854–1858.

164. Puscheck, E. Infertility / E. Puscheck. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://emedicine.medscape.com/article/274143-overview> (дата обращения 07.10.15).

165. Recombinant follicle-stimulating hormone versus human menopausal gonadotropin in the late follicular phase during ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization / M. Commenges-Ducos, S. Piau, A. Papaxanthos [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2002. – Vol. 78. – P. 1049–1054.

166. Recombinant human follicle-stimulating hormone versus human menopausal gonadotropin induction: effects in mature follicle endocrinology / M. P. Teissier, H. Chable, S. Paulhac, Y. Aubard // *Hum. Reprod.* – 1999. – Vol. 14, No. 9. – P. 2236–2241.

167. Recombinant human LH supplementation during GnRH antagonist administration in IVF/ICSI cycles: a prospective randomized study / I. Cedrin-Durnerin, D. Grange-Dujardin, A. Laffy [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2004. – Vol. 19. – P. 1979–1984.

168. Recombinant human luteinizing hormone (LH) to support recombinant human follicle-stimulating hormone (FSH)-induced follicular development in LH- and FSH-deficient anovulatory women: a dose-finding study / The European

Recombinant Human LH Study Group // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 1998. – Vol. 83, No. 5. – P. 1507–1514.

169. Recombinant human luteinizing hormone: an effective new gonadotropin preparation / M. Hull, E. Corrigan, A. Piazzini [et al.] // *Lancet.* – 1994. – Vol. 344. – P. 334–335.

170. Recombinant LH in ovarian stimulation / G.S. Caglar, B. Asimakopoulos, N. Nikolettos [et al.] // *Reprod. Biomed. Online.* – 2005. – Vol. 10, No. 6. – P. 774–785.

171. Recombinant LH supplementation during IVF cycles with a GnRH-antagonist in estimated poor responders: A cross-matched pilot investigation of the optimal daily dose and timing / S. Gizzo A. Andrisani, M. Noventa [et al.] // *Molecular Medicine Reports.* – 2015. – Vol.12, No. 3. – P. 4219–4229.

172. Recombinant luteinizing hormone (rLH) for controlled ovarian hyperstimulation in assisted reproductive cycles / M. H. Mochtar, F. Van der Veen, M. Ziech [et al.] // *Cochrane Database Syst. Rev.* – 2007. – Vol. 2. – CD005070.

173. Reddy, P. Mechanisms maintaining the dormancy and survival of mammalian primordial follicles / P. Reddy, W. Zheng, K. Liu // *Trends Endocrinol. Metab.* – 2010. – Vol. 21. – P. 96–103.

174. Regulation of ovarian function by the TGF-beta superfamily and follistatin / S. Y. Lin, J. R. Morrison, D. J. Phillips [et al.] // *Reproduction.* – 2003. – Vol. 126. – P. 133–148.

175. Relationship between follicle size and gonadotropin surge attenuating factor (GnSAF) bioactivity during spontaneous cycles in women / P. Fowler [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2001. – Vol. 16. – P. 1353–1358.

176. Results of ovulation induction using human menopausal gonadotropin or purified folliclestimulating hormone in hypogonadotropic hypogonadism patients / Z. Shoham, A. Balen [et al.] // *Fertil. Steril.* – 1991. – Vol. 56, No. 6. – P. 1048–1053.

177. Richards, J. S. Molecular Aspects of Hormone Action in Ovarian Follicular Development, Ovulation, and Luteinization / J. S. Richards, E. Hedin // *Annual Review of Physiology*. – 1988. – Vol. 50. – P. 441–463.

178. Role of periovulatory luteinizing hormone concentrations during assisted reproductive technology cycles stimulated exclusively with recombinant folliclestimulating hormone / M. A. Esposito, K. T. Barnhart, C. Coutifaris [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2001. – Vol. 75. – P. 519–524.

179. Seminal elastase-inhibitor complex, a marker of genital tract inflammation, and negative IVF outcome measures: role for a silent inflammation? / B. Zorn, I. Virant-Klun, G. Vidmar [et al.] // *Int. J. Androl.* – 2004. – Vol. 27. – P. 368–374.

180. Serum AMH and inhibin B levels as predictive markers of ovarian hyperstimulation syndrome in IVF patients / P. Okal [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2010. – Vol. 25, Suppl. 1: Abstract of the 26th Annual Meeting of ESHRE, Rome, Italy, 27-30 June, 2010. – P. 280.

181. Shoham, Z. Luteinizing hormone: its role, mechanism of action and detrimental effects when hypersecreted during the follicular phase / Z. Shoham, H. Jacobs, V. Insler // *Fertil. Steril.* – 1993. – Vol. 59, No. 6. – P. 1153–1161.

182. Shoham, Z. The clinical therapeutic window for luteinizing hormone in controlled ovarian stimulation / Z. Shoham // *Fertil. Steril.* – 2002. – Vol. 77. – P. 1170–1177.

183. Silva, J. R. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis / J. R. Silva, J. R. Figueiredo, R. van den Hurk // *Theriogenology* – 2009. – Vol. 71. – P. 1193–1208.

184. Soren Ziebe, Arce for the MERIT (Menotrophin vs Recombinant FSH in vitro Fertiisation Trial) Group Influence of ovarian stimulation with HP-hMG or recombinant FSH on embryo quality parameters in patients undergoing IVF / Ziebe Soren, Lundin Kersti, Ronny Janssens [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2007. – Vol. 22, No. 9. – P. 2404–2413.

185. Stimulation and growth of antral ovarian follicles by selective LH activity administration in women / M. Filicori, G. E. Cognigni, C. Tabarelli [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2002. – Vol. 87. – P. 1156–1161.

186. Stimulation of ovarian follicular maturation with pure follicle-stimulating hormone in women with gonadotropin deficiency / B. Couzinet, N. Lestrat, S. Brailly [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 1988. – Vol. 66, No. 3. – P. 552–556.

187. Stimulation of ovarian follicular maturation with pure folliclestimulating hormone in women with gonadotropin deficiency / B. Couzinet [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 1988. – Vol. 66, No. 3. – P. 552–556.

188. Stokes, P. J. Metabolism of human embryos following cryopreservation: implications for the safety and selection of embryos for transfer in clinical IVF / P. J. Stokes, J. A. Hawkhead [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2006. – Vol. 22, No. 3. – P. 829–835.

189. Stokman, P. G. W. Human chorionic gonadotropine in commercial human menopausal gonadotropine preparation / P. G. W. Stokman // *Fertil. Steril.* – 1993. – Vol. 60, No. 1. – P. 175–178.

190. Suboptimal response to GnRHa long protocol is associated with a common LH polymorphism / C. Alviggi, R. Clarizia, K. Pettersson [et al.] // *Reprod. Biomed. Online.* – 2009. – Vol. 18. – P. 9–14.

191. Suppression of LH during ovarian stimulation: effects differ in cycles stimulated with purified urinary FSH and recombinant FSH / R. Fleming, P. Rehka, N. Deshpande [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2000. – Vol. 15. – P. 1440–1445.

192. Tavaniotou, A. Luteal phase “behaviour” in GnRH antagonist cycles / A. Tavaniotou // *ESHRE Campus 2004. GnRH antagonist in IVF.* – Belgium, 2004.

193. Tesarik, J. Effects of exogenous LH administration during ovarian stimulation of pituitary down-regulated young oocyte donors on oocyte yield and

developmental competence / J. Tesarik, C. Mendoza // *Hum. Reprod.* – 2002. – Vol. 17. – P. 3129–3137.

194. The effect of recombinant human luteinizing hormone on oocyte/embryo quality and treatment outcome in down-regulated women undergoing in vitro fertilization / P. M. Perin, M. Maluf, C. E. Czeresnia [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2003. – Vol. 80. – P. 76–77.

195. The effects of insulin, insulin-like I and II on human ovarian follicles in long-term culture / H. Louhio, O. Hovatta, J. Sjoberg [et al.] // *Mol. Hum. Reprod.* – 2000. – Vol. 6. – P. 694–698.

196. The evaluation of recombinant LH supplementation in patients with suboptimal response to recombinant FSH undergoing IVF treatment with GnRH agonist down-regulation / F. Yazıcı Yılmaz, H. Görkemli, M.C. Çolakoğlu [et al.] // *Gynecol Endocrinol.* – 2015. – Vol. 31, No. 2. – P. 141–144.

197. The impact of LH, E2, and P level of HCG administration day on outcomes of in vitro fertilization in controlled ovarian hyperstimulation / M. Wei, X.M. Zhang, F.L. Gu [et al.] // *Clin Exp Obstet Gynecol.* – 2015. – Vol. 42, No. 3. – P. 361–366.

198. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation / L. Scott, R. Alvero, M. Leondires et al. // *Hum. Reprod.* – 2000. – Vol. 15. – P. 2394–2403.

199. The neglected morula/compact stage embryo transfer / J. Tao, R. Tamis, K. Fink, B. Williams, T. Nelson-White, R. Craig // *Hum. Reprod.* – 2002. – Vol. 17. – P. 1513–1518.

200. The ratios of serum bioactive/immunoreactive luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in various clinical conditions with increased and decreased gonadotropin secretion: reevaluation by a highly sensitive immunometric assay / T. Jaakkola, Y. Q. Ding, P. Kellokumpu-Lehtinen [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 1990. – Vol. 70, No. 6. – P. 1496–1505.

201. The role of LH in ovarian stimulation: exogenous LH: let's design the future / D. P. Levy, J. M. Navarro, G. L. Schattman [et al.] // Hum. Reprod. – 2000. – Vol. 15. – P. 2258–2265.

202. The role of luteinizing hormone in human follicle development and oocyte fertility: evidence from in-vitro fertilization in a woman with long-standing hypogonadotropic hypogonadism and using recombinant human follicle stimulating hormone / J. Balasch, F. Miró, I. Burzaco [et al.] // Hum. Reprod. – 1995. – Vol. 10. – P. 1678–1683.

203. The use of LH activity to drive folliculogenesis: exploring uncharted territories in ovulation induction / M. Filicori, G. E. Cognigni, A. Samara [et al.] // Hum. Reprod. Update. – 2002. – Vol. 8. – P. 543–557.

204. The use of recombinant luteinizing hormone in patients undergoing assisted reproductive techniques with advanced reproductive age: a systematic review and meta-analysis / J. Hill Micah, D. Levens Eric, Levy Gary [et al.] // Fertil. Steril. – 2012. – Vol. 97, No. 5. – P. 1108–1114.

205. Use of recombinant LH in a group of unselected IVF patients / F. Lisi [et al.] // Reprod. Biomed. Online. – 2002. – Vol. 5. – P. 104–108.

206. Van Blerkom J. Perifollicular vascularity and oocyte developmental competence / J. van Blerkom // Hum. Reprod. – 1999. – Vol. 14. – P. 119.

207. Van den Hurk Robert. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles / Robert van den Hurk, Jia Zhao // Theriogenology. – 2005. – Vol. 63. – P. 1717–1751.

208. Very low level of anti-Mullerian hormone (AMH) in a large cohort of assisted reproductive technology (ART) patients / J. Rodriguez-Purata, M. Luna, E. Cervantes [et al.] // Fertil. Steril. – 2015. – Vol. 104, Issue 3. – P. 321–322.

209. Vuong, T.N. Recombinant follicle-stimulating hormone and recombinant luteinizing hormone versus recombinant follicle-stimulating hormone alone during GnRH antagonist ovarian stimulation in patients aged ≥ 35 years: a randomized controlled trial / T.N. Vuong H.T. Phung, M.T. Ho // Hum. Reprod. –

2015. – Vol. 30, No. 5. – P. 1188–1195.

210. Westergaard L. G. Increased risk of early pregnancy loss by profound suppression of luteinizing hormone during ovarian stimulation in IVF treated normogonadotropic women / L. G. Westergaard, S. B. Laursen, C. Yding Andersen // *Hum. Reprod.* – 2000. – Vol. 15. – P. 100–1008.

211. Who needs LH in ovarian stimulation? / C. Alviggi [et al.] // *Reprod. Biomed. Online.* – 2006. – Vol. 12. – P. 35.

212. Younis, J.S. The Bologna criteria for poor ovarian response: a contemporary critical appraisal / J.S. Younis, M. Ben-Ami, I. Ben-Shlomo // *J Ovarian Res.* – 2015. – Vol. 8, No. 1. – P. 76.