

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**  
( **Н И У « Б е л Г У »** )

ИНСТИТУТ ФАРМАЦИИ, ХИМИИ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА БИОЛОГИИ

**ОВАРИАЛЬНЫЙ РЕЗЕРВ ЖЕНЩИН РЕПРОДУКТИВНОГО  
ВОЗРАСТА В ПРОГРАММЕ СТИМУЛЯЦИИ СУПЕРОВУЛЯЦИИ**

Выпускная квалификационная работа  
обучающегося по направлению подготовки 06.03.01 Биология  
заочной формы обучения, группы 11001455  
Коршуновой Татьяны Дмитриевны

Научный руководитель  
д.б.н., доцент  
Погребняк Т.А.

БЕЛГОРОД 2019

## Оглавление

Введение .....	3
Глава 1. Аналитический обзор литературных источников.....	6
1.1. Фолликулогенез и оогенез в яичниках.....	6
1.2. Классификация стадий развития фолликула.....	8
1.2.1. Этапы фолликулогенеза.....	10
1.2.2. Строение первичных и вторичных фолликулов.....	11
1.2.3. Строение третичных фолликулов.....	14
1.3. АМГ как маркер состояния овариального резерва.....	16
1.3.1. Овариальный резерв и его значение.....	16
1.3.2. Роль АМГ в женском и мужском организме.....	18
1.3.3. Молекулярно-биологические характеристики АМГ.....	19
1.3.4. Изменение уровня АМГ с возрастом женщины.....	22
1.3.5. Роль АМГ в определении овариального резерва.....	25
1.4. АМГ и синдром поликистозных яичников (СПКЯ).....	30
1.5. Причины понижения или повышения уровня АМГ.....	33
Глава 2. Материалы и методы исследования.....	37
Глава 3. Результаты исследования.....	44
3.1. Оценка качества ооцита.....	44
Выводы.....	51
Список использованных источников.....	52

## Введение

Актуальность исследования. Сниженный овариальный резерв у женщин репродуктивного возраста является одной из причин женского бесплодия и соответственно снижения рождаемости. Научно-практический поиск путей её повышения является актуальной и важнейшей проблемой в области современной репродуктивной биологии и медицины. Успешность её решения могла бы решить хотя бы часть актуальных и востребованных временем и обществом задач повышения рождаемости в нашей стране.

Многие современные достижения в сфере развития вспомогательных репродуктивных технологий направлены на активизацию функций яичников, как желез внешней секреции, у женщин репродуктивного возраста по пути повышения овариального резерва у женщин с низким репродуктивным потенциалом. Методика стимуляции суперовуляции с последующей возможностью селекционирования эмбрионов с целью выбора из них генетически и физически полноценных, позволяет повысить частоту оплодотворения и наступления беременности с рождением детей у женщин, которые до этого были лишены возможности родить ребенка в силу врожденных или приобретенных нарушений в области репродуктивной системы. Применение данной технологии изначально было направлено на решение медико-социальных проблемы – снижения процента бесплодных браков, существенно снижающих суммарный коэффициент рождаемости и доли повторных рождений, то есть возможности рождения более одного ребенка.

Ситуация усугубляется также за счет увеличивающегося количества пациенток старшего репродуктивного возраста. Данные обстоятельства приводят к снижению процента наступления беременности и количества родов у этой категории женщин, а также обуславливают низкую эффективность программ ЭКО. Основными причинами увеличения количества пациенток со сниженным овариальным резервом являются:

1. Социально-экономические (позднее формирование браков и отсрочка планирования рождения детей). Количество женщин старшего репродуктивного возраста (старше 35 лет), обращающихся в центры ЭКО, достигает почти 40%; а по данным РАРЧ за 2012–2018 гг. процент пациенток, проходящих лечение методом экстракорпорального оплодотворения 35-ти лет и старше, увеличился с 33,1% до 43,3%.

2. Медицинские (преждевременное истощение яичников, связанное с хромосомными, генетическими, аутоиммунными и другими причинами, оперативные вмешательства на органах малого таза, химиолучевая и другая гонадотоксичная терапия, эндометриоз и др.), включают в данную группу женщин молодого возраста.

Объектом выпускной квалификационной работы являются женщины репродуктивного возраста.

Предмет исследования – репродуктивные гормоны, овариальный резерв женщин репродуктивного возраста, стимуляция суперовуляции, технология ЭКО.

Цель выпускной квалификационной работы – изучить роль стимуляции суперовуляции у женщин репродуктивного возраста с низким овариальным резервом как современной технологии повышения эффективности ЭКО.

Исходя из цели работы, можно выделить следующие задачи:

- изучить роль прогностических критериев овариального резерва яичников гормонов-маркеров (фолликулостимулирующего, лютеинизирующего, Антимюллера гормонов и тестостерона);
- рассмотреть связь маркеров овариального резерва с процессом снижения андрогенсекретирующей функции яичников;
- сравнить влияние уровня АМГ у женщин с различными гинекологическими заболеваниями на процесс формирования количества ооцитов I порядка, извлекаемых при пункции из яичника.

Работа выполнена на базе Центра репродуктивного здоровья «За рождение», находящегося по адресу: г. Белгород, ул. Губкина, д. 44.

В работе были использованы следующие методы исследования:

1. По изучению развития и функционирования яичников.
2. По изучению строения первичных, вторичных и третичных фолликулов.
3. Метод определения Антимюллерова гормона в сыворотке крови женщин репродуктивного возраста.
4. Метод стимуляции суперовуляции с применением гормональных препаратов.
5. Методика получения ооцит-кумулюсных комплексов из фолликулярной жидкости при трансвагинальной пункции.
6. Метод оценки качества ооцитов.
7. Метод экстракорпорального оплодотворения.

Выпускная квалификационная работа изложена на 57 страницах. Она состоит из введения, трех основных глав, списка использованных источников, который насчитывает 71 наименование и выводов. В работе используются таблицы и рисунки.

## Глава 1. Аналитический обзор литературных источников

### 1.1. Фолликулогенез и оогенез в яичниках

Овариальная репродукция непрерывно происходит в течение всей жизни женщины, однако скорость снижения овариального резерва различна в отдельные периоды жизни, что доказано с помощью математического моделирования. В результате дискоординации фолликулогенеза нарушается функционирование репродуктивной системы, что приводит к развитию гинекологических заболеваний.

К настоящему времени физиологические процессы развития фолликул хорошо известны, но, несмотря на это, действие системных регуляторных механизмы, которые контролируют фолликулогенез на эмбриональном и постэмбриональном этапе окончательно не определены и требуют дальнейшего исследования. Например, на современном этапе развития физиологии репродукции, перспективным направлением является изучение факторов рекрутирования примордиальных фолликулов и ранних этапов роста фолликулов, когда качество и количество женских половых клеток еще не предопределено.

Научной основой изучения физиологических механизмов регуляции фолликулогенеза и оогенеза в яичниках являются модельные исследования, проводимые на молекулярно-генетическом уровне. Например, ставятся модельные опыты на экспериментальных животных с целенаправленными нарушениями в хроматидах аллелей разных генов, кодирующих структуру специфических белковых молекул, которые задействованы в процессах фолликулогенеза.

Такие и аналогичные им экспериментальные исследования позволяют изучать различные механизмы взаимодействия факторов фолликулогенеза. Не менее значимыми являются исследования, связанные с изучением механизмов постнатального оогенеза, начиная с вхождения женского организма в период полового созревания. В частности, большое внимание в

постнатальном периоде развития женского организма уделяется изучению герминогенных клеток яичника.

Работающие в области репродуктивной биологии и физиологии исследователи проводят экспериментальные исследования по изучению малоизвестных аспектов развития и функционирования яичников. Изучая их с молекулярно-генетического до организменного уровня, они более детально изучают репродуктивные процессы постнатального оогенеза. Эти знания необходимы им для отладки механизмов регуляции фолликулогенеза, выбора наиболее приемлемых технологий для лечения у женщин бесплодия при нефункционирующих яичниках, например, на основе трансплантации в них аутологичных стволовых клеток или осуществления *in vitro* процесса оогенеза. Но для этого необходимо всесторонне изучать различные аспекты репродуктивного процесса.

Физиологические механизмы регуляции функции яичников достаточно полно изложены в различных отечественных учебных изданиях. Остановимся только на тех аспектах фолликулогенеза и оогенеза, которые имеют наибольшее физиологическое значение.

Фолликулогенез – это рост и созревание фолликулов внутри яичников. Яичники покрыты эпителием, образованным одним слоем кубических клеток (мезотелием). Под ним находится белочная оболочка, состоящая из плотной соединительной ткани, а под ней – корковый слой, под ним в центральной части яичника находится мозговое вещество яичника, в котором локализованы клетки, продуцирующие с наступлением периода полового созревания половые гормоны (рис. 1).

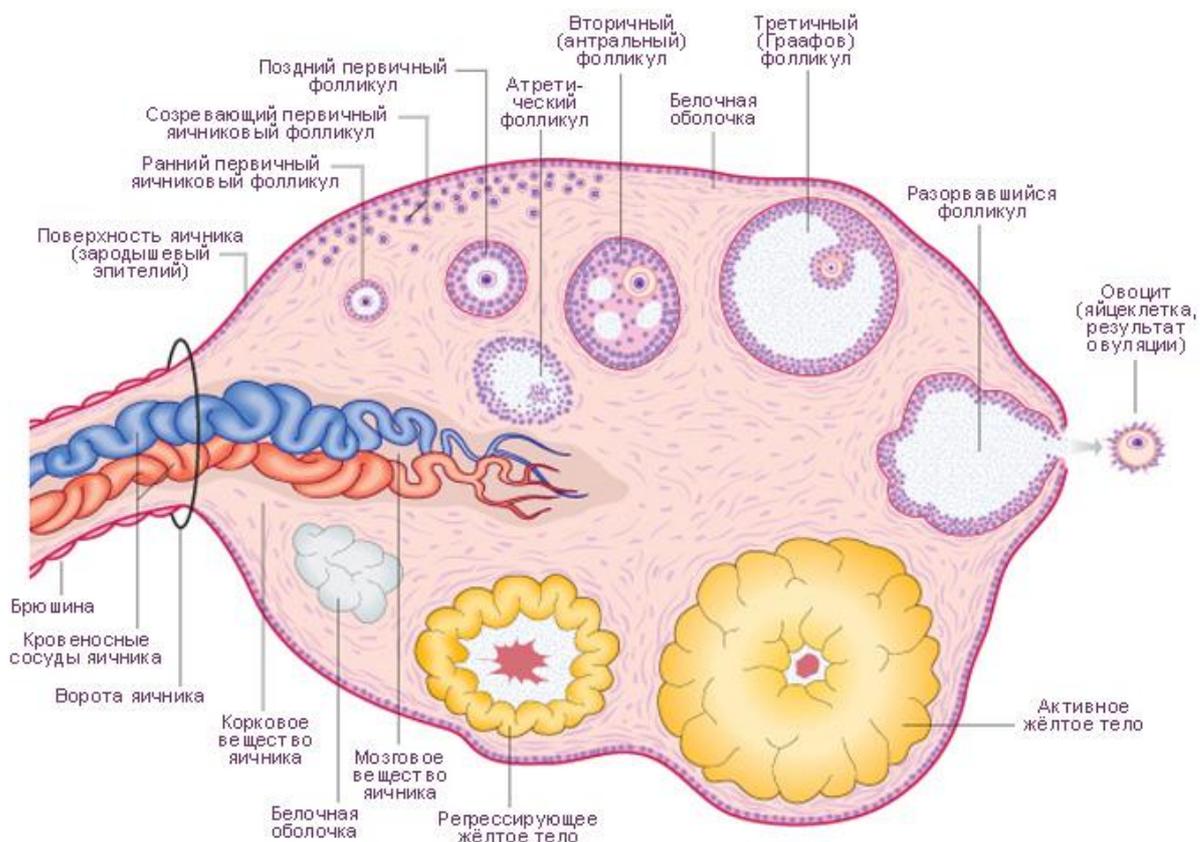


Рис 1. Строение яичника женщины  
(интернет-источник [www.krov.expert](http://www.krov.expert))

Фолликулы разной степени зрелости в основном локализируются в корковой зоне между клетками соединительной ткани – фибробластами, фиброцитами, с большим количеством соединительнотканых волокон. Соединительная ткань (строма) составляет также основу центральной, мозговой зоны яичника, в которой находятся нервы, лимфатические и кровеносные сосуды, эндокринные клетки, синтезирующие эстрогены.

## 1.2. Классификации стадий развития фолликула

На сегодняшний момент разработано несколько классификаций стадий развития фолликула (Pedersen T., 1968; Gougeon A., 1996; McNatty K.P., 1979; Edson M.A., 2009; Emori C., 2014) [50]. Однако ни одна из них не стала общепринятой. Наиболее часто применяется классификация, основанная на

учете размера фолликула и количества клеток, которые входят в его состав (Pedersen Т., 1968) [52]. Согласно ей выделяется 8 типов полостного фолликула, содержащего более 600 клеток. Классификация фолликулов с учетом их размера и наличия в них полости выделяет (С. Emori и соавт., 2014), [61] 5 типов – от примордиального до антрального (граафова). Классификации Т. Pedersen и соавт. (1968) [51] и С. Emori соавт. (2014) [52] не учитывают форму клеток и гормонально зависимые этапы развития фолликула. Gougeon А. (1996) [54] выделил гормонезависимый (вступивший в рост фолликул, вторичный фолликул) и гормонезависимый периоды фолликулогенеза, включающий 8 стадий развития фолликула, представленных в таблице 1.

Таблица 1

Классификация стадий развития фолликулов в гормонезависимом периоде фолликулогенеза

Стадия	Название фолликула	Размер фолликула	Количество клеток гранулезы, $\times 10^*$
1	Преантральный	0,1–0,20	0,6–3,4
2	Ранний антральный	0,2–0,40	3,5–13
3	Малый антральный	0,4–0,90	15–74
4	Антральный	0,9–2,0	75–374
5	Рекрутированный	2,0–5,0	375–1870
6	Ранний доминантный	5,0–10,0	1870–9400
7	Ранний преовуляторный	10,0–16,0	9400–47000
8	Преовуляторный	16,0–20,0	–

М. А. Edson и соавт. (2009) [61] учитывали не только особенности строения фолликула и его роста, но и зависимость роста от гипофизарных гормонов (гормонезависимый и гормонезависимый периоды развития).

Таким образом, в соответствии с особенностями строения практически в любой классификации различают следующие основные типы овариальных фолликулов, соответствующие последовательными стадиями их развития – примордиальные; первичные; вторичные; третичные.

### 1.2.1. Этапы фолликулогенеза

Примордиальные фолликулы образуются у женского зародыша с 11–12-й недели внутриутробного развития. В этот период фолликул содержит ооцита 1-го порядка, который по всей его поверхности окружен одним слоем плоских клеток прегранулезы и слабо организованного мезенхимального слоя (25–30 мкм) текальных клеток.

В процессе формирования примордиального фолликула оогонии утрачивают способность к митотическому делению и вступают интерфазу 1-го мейоза – процессы роста ооцита в этот период завершаются удвоением генетического аппарата с формированием ооцита 1-го порядка (Cohen P.E., 2010) [53]. Каждый ооцит 1-го порядка с разрывом стенки фолликула покидает яичник и с капельками фолликулярной жидкости выходит в полость брюшины и попадает в воронку маточной трубы. Этот процесс соответствует процессу овуляции.

В верхней трети маточной трубы ооцит 1-го порядка встречается со сперматозоидами, которые вызывают вращение яйцеклетки и один из них проникает в ооцит, активируя процесс мейоза, то есть начало профазу I. В ней происходят важные биологические явления, специфические для половых клеток – конъюгация несестринских гомологических хромосом на фоне их спирализации с возможностью кроссинговер-обмена между ними участками аллельных генов, обеспечивая сбалансированную сегрегацию (расхождение) к полюсам клеток гомологичных двухроматидных хромосом при завершении метафазы I (Ottolini C. S., 2015) [52].

В ооцитах первого порядка формируются характерные крупные ядра – герминальные пузырьки (germinal vesicle, GV). Подобно соматическим клеткам, ооцит 1-го порядка содержит диплоидный набор хромосом ( $2n4c$ ). Развитие примордиальных фолликулов приостановлено, и ооцит «арестован» в фазе покоя – диктиотене профазы первого деления мейоза вплоть до

периода полового созревания, когда инициируется фаза роста примордиального фолликула (рис. 2) (Pepling M. E., 2012) [55].

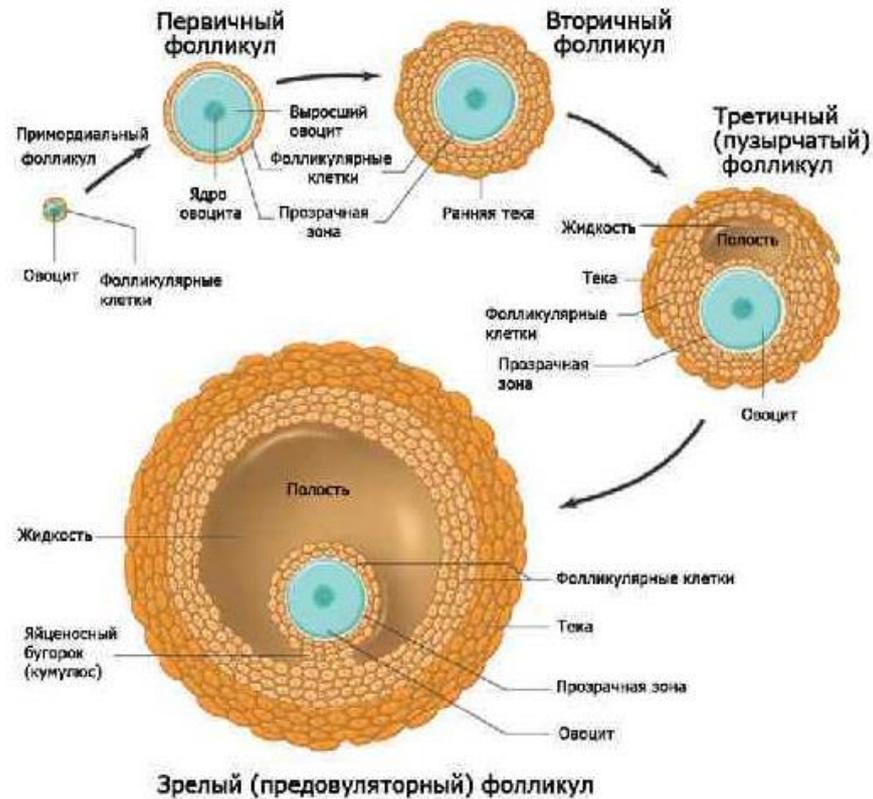


Рис. 2. Этапы развития фолликула в яичнике  
(интернет-источник [www.present5.com](http://www.present5.com))

К моменту формирования первичных ооцитов в яичнике закладывается до 200–300 тыс. первичных фолликулов. Во время первого деления мейоза ооцитов число примордиальных фолликулов резко уменьшается на 90% (Pangas S. A., 2006). [58] К моменту рождения в яичнике девочки в яичнике остается 400–500 фолликул.

### 1.2.2. Строение первичных и вторичных фолликулов

Овариальный резерв определяется пулом жизнеспособных гамет, произведенных задолго до того, как они вступят в фазу финального созревания и будут востребованы. Следовательно, точность и стабильность

каждого этапа образования примордиального фолликула необходимы для правильного завершения оогенеза и потенциала развития будущего эмбриона, который формируется из этого ооцита. Первое деление в первичных фолликулах ооцит 1-го порядка остается в стадии диктиотены и вступает в фазу малого роста. Он окружен одним слоем клеток гранулезы уже кубической формы.

Размер ооцита в первичных фолликулах увеличивается, возрастает объем цитоплазмы и количество органелл, но ядерноцитоплазматическое соотношение не нарушается. На этой стадии в ооците происходит активный синтез всех видов рибонуклеиновой кислоты (РНК) – рибосомальных, транспортных и матричных.

Вокруг ооцита формируется прозрачная оболочка – блестящая зона (*zona pellucida*), состоящая из четырех типов гликопротеинов (ZP1–ZP4), синтезируемых в ооците (Gupta S. K., 2009) [55]. Она реализует ряд функций, связанных с оплодотворением: обеспечивает связывание сперматозоидов с ооцитом, индукцию акросомальной реакции, препятствует полиспермии, реализует защитную функцию ооцита и раннего эмбриона в процессе развития до стадии бластоцисты. Только на 5-е сутки развития эмбриона перед имплантацией происходит её разрыв (хетчинг). В цитоплазме гранулезных клеток на стороне, обращенной к ооциту, хорошо развиты аппарат Гольджи с секреторными включениями, рибосомы и полирибосомы.

На поверхности ооцитов видны два вида микроворсинок: одни проникают в блестящую зону, а другие обеспечивают контакт гранулезных клеток друг с другом. Подобные микроворсинки имеются и на мембране ооцита. Они обеспечивают межклеточные контакты – щелевые контакты, которые позволяют производить обмен между субстратом и сигнальными молекулами, между ооцитом и клетками гранулезы. Формируется гранулезно-ооцитарная связь.

Фолликулярные клетки секретируют факторы дифференцировки и роста ооцита: трансформирующий фактор роста  $\beta 2$  (ТФР $\beta 2$ ), сосудисто-

эндотелиальный фактор роста (СЭФР, VEGF), лептин, фактор роста фибробластов-2 [ФРФ-2 (fibroblast growth factor, FGF-2)]. Ооцит, в свою очередь, играет также важную роль в развитии фолликула: он выделяет паракринные факторы [фактор роста и дифференцировки 9 (growth differentiation factor 9, GDF9), факторы роста семейства ТФРβ]. Они способны стимулировать пролиферацию и дифференцировку окружающих ооцит соматических (гранулезных) клеток.

Строение вторичных фолликулов характеризуется наличием ооцита 1-го порядка, окруженного уже несколькими слоями (до 8) клеток гранулезы. На данной стадии развития формируется соединительнотканная оболочка фолликула – тека, которая разделяется на два слоя – внутренний и наружный. Во внутреннем слое развита капиллярная сеть и клетки внутренней теки, которые после овуляции с клетками гранулезы, превращаются в клетки желтого тела. Наружный слой теки содержит гладкомышечные клетки, активность которых регулируется циклическим аденозин-3', 5'-монофосфатом (цАМФ) и прогестероном. После созревания фолликула гладкомышечные клетки наружного слоя теки участвуют в овуляции. Так, они, сокращаясь, повышают давление в овулирующем фолликуле. Клетки гранулезы отделяет от клеток текальных оболочек базальная мембрана фолликула, состоящая из коллагена четвертого типа и ламинина. С усилением секреторной активности гранулезных клеток между ними постепенно формируются пространства (лакуны), в которых начинает скапливаться фолликулярная жидкость. Блестящая оболочка утолщается, в нее проникают микроворсинки ооцита, обеспечивая его тесный контакт с клетками гранулезы. При этом ооцит с окружающими его фолликулярными клетками в виде яйценосного бугорка (*cumulus oophorus*) смещается к одному полюсу фолликула.

Вторичный фолликул в функциональном отношении принципиально отличается от предыдущих стадий развития:

1) меняется система его кровоснабжения. Формирование капиллярной сети в тека-оболочке обеспечивает тесный обмен между фолликулом и общей системой гемоциркуляции;

2) с усилением экспрессии рецепторов к гонадотропинам (ГТ) в гранулезных клетках фолликул становится чувствительным к их влиянию;

3) постепенно начинает функционировать система синтеза половых стероидных гормонов («две клетки – два гонадотропина»). Так, в тека-клетках под воздействием лютеинизирующего гормона (ЛГ) происходит секреция андрогенов, в клетках гранулезы конверсия их в эстрогены под контролем фолликулостимулирующего гормона (ФСГ).

### 1.2.3. Строение третичных фолликулов

Третичные фолликулы формируются из вторичных, имеют полость (antrum folliculare, антрум) с фолликулярной жидкостью. В образовании фолликулярной жидкости принимает участие сосудистое окружение текального слоя. Кровеносно-фолликулярный барьер определяет состав фолликулярной жидкости. Содержание низкомолекулярных компонентов аналогично содержанию в плазме. Глюкозаминогликаны и протеоглики обеспечивают осмотический потенциал фолликулярной жидкости. В ней находятся гонадотропины, стероидные гормоны, факторы роста, ферменты и липопротеины.

При увеличении антрума ооцит располагается эксцентрично в составе так называемого яйценосного бугорка (cumulus oophorus). Удлиненные отростки гранулезных клеток, окружающих ооцит в составе яйценосного бугорка, связанные с блестящей оболочкой, хорошо развиты и образуют лучистый венец (corona radiata). Гранулезные клетки яйценосного бугорка и блестящей оболочки составляют единый ооцит-кумуляный комплекс, который сопровождает ооцит во время овуляции. Во время пункции

яичников получают ооцит в составе ооцит-кумуляусного комплекса. Размер предовуляторного фолликула составляет 17–22 мм.

Под воздействием значительно повышающихся концентраций ГТ, факторов роста, эстрогенов ооцит 1-го порядка вступает в третью, финальную фазу оогенеза – созревания, которая включает координацию интегрированных, но независимых друг от друга событий, происходящих в ооците. Ядерное созревание связано с возобновлением процесса деления первого мейоза (МI). Ядерная оболочка герминального пузырька разрушается, нуклеоплазма смешивается с цитоплазмой, формируя веретено деления, завершается рекомбинация и происходит сегрегация гомологичных хромосом. Первое деление мейоза завершается уменьшением числа хромосом вдвое ( $1n2c$ ) и образованием 1-го редукционного тельца.

Цитогенетические исследования показали, что преобладающее большинство нарушений хромосомной сегрегации в ооците у женщин старшего репродуктивного возраста происходят в процессе разделения и расхождения сестринских хроматид в первом мейозе (МI) (Ottolin & S., 2015) [69]. Созревание цитоплазмы протекает с изменениями локализации органелл и установлением полярности ооцита. Увеличивается число митохондрий и рибосом. Происходит изменение мембранных транспортных систем, развивающийся аппарат Гольджи мигрирует к периферии. В цитоплазме появляются органеллы, отвечающие за запасание и экспорт питательных веществ: мембраносвязанные пузырьки, мультивезикулярные и кристаллиновые тельца, жировые включения и гликогеновые гранулы. Все процессы клеточного цикла контролируются ключевыми факторами и происходят строго последовательно. Завершение первого мейотического деления запускает второе с остановкой цикла в метафазе II, образуется ооцит второго порядка (MII), готовый к овуляции. Возобновление второго мейотического деления ( $1n1c$ ) наступает после осеменения и называется активацией ооцита.

Развитие фолликула от примордиального до зрелого третичного, предовуляторного составляет, по разным оценкам, несколько месяцев (120–300 сут). Весь этот длительный период подразделяют на следующие этапы: первичное рекрутирование примордиальных фолликулов, или прегонадотрофная стадия (рост примордиальных до стадии первичных); развитие вторичных и так называемых «малых» антральных фолликулов (2–5 мм) (гонадотропинчувствительная стадия); циклическое рекрутирование когорты антральных фолликулов с последующей селекцией одного доминантного фолликула (гонадотропинзависимая стадия). Совершенно очевидно, что подобное разделение фолликулогенеза позволяет выделить этапы данного процесса, которые зависят от гормональной терапии.

### **1.3. АМГ как маркерам состояния овариального резерва**

#### **1.3.1. Овариальный резерв и его значение**

Овариальный резерв (ОР) – это индивидуальный запас ооцитов, неизрасходованных к данному возрасту и способных адекватно отвечать на овариальную стимуляцию ростом полноценных фолликулов, содержащих здоровые яйцеклетки. На сегодняшний день проблема оценки овариального резерва является актуальной при бесплодии, в программах вспомогательных репродуктивных технологий. Существует множество методов, позволяющих определить овариальный резерв (трансвагинальное ультразвуковое исследование, определение уровня гормонов, динамические тесты), но большинство из них достоверны лишь при комплексном применении.

Для оценки ОР в настоящее время применяется определение базальной концентрации ФСГ (на 2–3 день менструального цикла), АМГ и ингибина В, а также УЗ оценка яичников. При стимуляции яичников в программах ВРТ практически всегда возникает необходимость оценить функциональное состояние репродуктивной системы женщины и потенциал яичников с целью прогнозирования ответа и выбора адекватной схемы индукции овуляции.

Истощение яичникового резерва является предполагаемой причиной снижения частоты живорождения, которое имеет место после естественного зачатия в возрасте старше 32 лет и старше 35 лет в циклах ЭКО.

Исследования последних лет направлены на поиск более точных маркеров, способных оценить индивидуальные особенности старения репродуктивной системы женщины и определить биологический возраст яичников.

В настоящее время большой интерес вызывает антимюллеровский гормон (АМГ), он является членом суперсемейства трансформирующих факторов роста (TGF- $\beta$ ). Роль АМГ как периферического сигнала размеров пула растущих фолликулов в настоящее время имеет также клиническую ценность. Неоднократные исследования показали, что АМГ является прекрасным маркером для определения овариального ответа в программах ЭКО. У женщин, получающих лечение по поводу бесплодия, зачастую овариальное старение выражается в виде снижения овариального ответа.

Оценка овариального резерва особенно важна для клиник ЭКО, где АМГ может использоваться как прогностический индикатор бедного ответа. Так как значительная часть причин субфертильности приходится на позднюю первую беременность, измерение АМГ для оценки овариального резерва полезно для всех женщин в целом. Оценка овариального резерва может дать прогноз на продолжительность репродуктивного возраста женщины.

На лечение бесплодия направлены многие отрасли медицины, государствами обеспечиваются программы помощи для бесплодных пар, например, с 2014 года ЭКО по полису ОМС. Созданы ассоциации врачей во всем мире для решения данной проблемы РАРЧ (Российская Ассоциация Репродукции Человека), ESHRE (Европейское общество репродукции человека и эмбриологии). Овариальный резерв понятие обширное, мы в этой работе остановимся на исследовании Антимюллера гормона как маркера овариального резерва женщины, методику определения и его биологическое значение.

### 1.3.2. Роль АМГ и его в женском и мужском организме

Антимюллеров гормон (АМГ), другие названия – антимюллеровый фактор или антимюллеровская субстанция, является одним из наиболее интересных маркеров репродуктивной системы женщины, появившихся за последние несколько лет. Измерение этого нового нестероидного яичникового гормона позволило изучить более глубокие процессы роста и созревания фолликулов и выяснить отдельные вопросы патогенеза ряда гинекологических заболеваний.

Немецкий анатом Йохан Мюллер (1801–1858 гг.) описал эмбриональный проток, предшественник матки, маточных труб и верхней трети влагалища. Этот проток получил название мюллерова. А другой немецкий и российский анатом Каспар Вольф (1733–1794 гг.) описал проток, предшественник семявыводящих путей, эпидидимиса и семенных пузырьков. Этот проток получил название вольфова.

Во время эмбрионального развития в мужском организме проток рассасывается на сроке 8–10 недель. В середине XX века были произведены эксперименты, которые показали, что эмбриональное яичко выделяет субстанцию, которая способна вызывать рассасывание мюллерова протока. Это вещество получило название антимюллеров гормон (АМГ). Физиологическая функция данного гормона различается в женском и мужском организме. В мужском организме в фетальный период формирующиеся клетки Лейдега продуцируют тестостерон, под воздействием которого развивается вольфов проток. Клетки Сертоли продуцируют АМГ, что вызывает регрессию мюллерового протока. В мужском организме АМГ выделяется клетками Сертоли с большой интенсивностью в течение фетального периода и в детстве, однако уровень экспрессии снижается, когда половые клетки в яичках начинают процесс мейоза, в пубертатный период, и во взрослом возрасте.

Долгое время функция Антимюллера гормона в женском организме была неизвестна. Это связано с тем, что этот гормон могут вырабатывать только клетки гранулезы фолликулов от преантральной стадии до стадии больших антральных фолликулов. В яичниках девочки первые признаки продукции АМГ появляются в пренатальный период (32–36 недель беременности) и уровень этого гормона в крови медленно повышается с возрастом. Максимум уровня АМГ достигает к расцвету репродуктивной функции женщины в 20–30 лет, после чего постепенно снижается и к менопаузе равняется нулю.

По сравнению с другими биохимическими и биофизическими маркерами, АМГ дает более правильную и достоверную оценку овариального резерва. Важную роль играет определение уровня АМГ при контролируемой овариальной стимуляции в программе вспомогательных репродуктивных технологий у женщин с низким овариальным резервом.

### **1.3.3. Молекулярно-биологические характеристики АМГ**

Антимюллеров гормон (АМГ) или Mullerian-inhibiting substance (MIS) человека представляет собой димерный гликопротеин с молекулярным весом 140 кДа, при активации от него отделяется биологически активный фрагмент весом 25 кДа. Ген этого гормона у человека находится на хромосоме 19 p13.3–p13.2. АМГ относится к гликопротеинам, относящимся к суперсемейству трансформирующего фактора роста бета (ТФР- $\beta$ ). Кроме АМГ к регуляторам функции яичников, относятся также члены этого суперсемейства: BMP – 4, BMP – 8, BMP – 15, CDF – 9, ингибины А и В.

Роль АМГ в фолликулогенезе конца не изучена и разнообразна. Эксперименты на мышах, с выключенной функцией АМГ, показали, что у таких животных скорость входа примордиальных фолликулов в число растущих резко увеличена. Авторы этого исследования считают, что АМГ может защищать примордиальные фолликулы от выхода из покоящегося

состояния. Недавно было найдено подтверждение подобного механизма у человека. Были описаны женщины с уменьшенной активностью АМГ, которая объяснялась полиморфизмом в гене рецептора к АМГ второго типа (АМН–RII). У таких женщин наступала раньше менопауза, чем в популяции.

В яичниках женщины АМГ вырабатывается от пренатального периода до менопаузы. Этот гормон выделяется клетками гранулезы растущих фолликулов, от преантральной стадии вплоть до размера антральных фолликулов 6–8 мм в диаметре. После достижения фолликулов размера 8 мм и более уровень АМГ резко падает и возрастает активность ароматазы и, соответственно, продукция эстрадиола. Имеется четкое обратное взаимодействие между продукцией гранулезой преобладающего фолликула эстрадиола и АМГ. Отмечено, что доминантные и атретические фолликулы содержат крайне низкие уровни АМГ. У пациенток с полиморфизмом в гене рецептора к АМГ (АМН–RII) и уменьшенной функцией этого гормона наблюдается более ускоренный рост доминантного фолликула.

Эти исследования говорят о том, что АМГ характеризует фолликулы на стадии предшествующей гормон – зависимому периоду роста фолликулов и сам АМГ защищает гранулезу растущих фолликулов от избыточного митогенного влияния фолликулостимулирующего гормона. Это позволяет получить информацию о более глубоких процессах фолликулогенеза и оценить число растущих фолликулов на гормон–чувствительной стадии роста.

Уровень АМГ в течение менструального цикла женщины остается постоянным и не сильно зависит от колебаний ингибинов, гипофизарных гонадотропинов, половых стероидов. Однократное измерение АМГ, на любой день менструального цикла дает полную клиническую информацию о состоянии овариального резерва. Когда тщательно изучили колебания АМГ в течение менструального цикла женщины с помощью особо чувствительного набора, способного определять уровни АМГ порядка 0,01 нг/мл, было обнаружено, что АМГ подвержен незначительным, но статистически

значимым колебаниям. Наибольшего значения АМГ достигает за четыре дня до овуляторного пика лютеинизирующего гормона, после чего снижается до минимума на четвертый день после пика ЛГ. После этого значения АМГ повышается в течение первой половины лютеиновой фазы цикла и остается относительно стабильным в течение поздней лютеиновой фазы вплоть до середины фолликулярной фазы следующего цикла.

У женщин концентрация АМГ в сыворотке низкая на протяжении периода препубертата. До периода полового развития АМГ повышается только у дочерей от матерей с СПКЯ (синдромом поликистозных яичников), АМГ присутствует в сыворотке взрослых людей обоих полов. У женщин сывороточная концентрация АМГ постепенно снижается в течение репродуктивной жизни, и приближается к нулю в менопаузе. Колебания уровня АМГ в сыворотке в течение менструального цикла не значительны, что говорит о том, что гормон не принимает участие в гипоталамо–гипофизарно–яичниковой оси регуляции.

В яичнике синтез АМГ ограничен гранулезными клетками преантральных и ранних антральных фолликулов диаметром не более 4 мм. АМГ не определяется в примордиальных фолликулах. Экспрессия АМГ быстро повышается при переходе фолликула из преантральной в антральную стадию. Большие антральные (4–8 мм), доминантные и преовуляторные фолликулы не секретируют АМГ. Желтое тело на всех стадиях развития также не секретирует АМГ.

Выход фолликулов из примордиального пула происходит постоянно в течение репродуктивной жизни женщины до наступления менопаузы. Возможно, это связано с тем, что АМГ участвует в регуляции выхода фолликулов из «состояния покоя», устанавливает темп, в котором фолликулы возобновляют мейоз и регулирует скорость уменьшения примордиального пула. АМГ оказывает сдерживающее влияние на рост фолликула. Гранулезные клетки маленьких антральных фолликулов секретируют АМГ как в фолликулярную жидкость, так и в кровоток. АМГ является уникальным

среди известных продуктов секреции фолликула, так как в доминирующем фолликуле происходит снижение его синтеза. В отличие от ингибина В и яичниковых эстрогенов, концентрация АМГ во время средней и поздней фолликулярной фазы отражает не функцию доминантного фолликула, но, прежде всего, дает информацию о числе маленьких фолликулов, входящих в фазу роста перед селекцией фолликула доминантного. Согласно этой гипотезе экспрессия АМГ практически не зависит от факторов, которые подавляют поздние ФСГ–зависимые стадии развития фолликула (прием оральных контрацептивов, АГНРГ, беременность).

Механизмы регуляции выхода пула примордиальных фолликулов из спящей стадии, их роста и возобновления мейоза остаются до сих пор неизвестными. У мышей, семейство TGF–b, кроме АМГ, включает протеины морфогенеза кости 4,7 и 15, а также фактор роста и дифференцировки – 9. Загадка фертильности человечества состоит в остановке роста фолликулов в первом мейотическом делении в фетальный период. Затем в течение многих лет женской репродуктивной жизни «избранные» фолликулы возобновляют фазу роста. Связь между ооцитом и окружающей его оболочкой гранулезных клеток играет ключевую роль в определении точки, в которой фолликул покидает фазу покоя. Процесс имеет сложную значительные межвидовые различия и сложную регуляцию.

Только один фолликул в течение цикла становится доминантным и достигает овуляции, остальные подвергаются атрезии. Количество фолликулов, которые каждый месяц входят в фазу роста с возрастом постепенно снижается и коррелирует с объемом пула оставшихся примордиальных фолликулов.

#### **1.3.4. Изменение уровня АМГ с возрастом женщины**

АМГ является важным показателем старения женской репродуктивной системы. Van Rooij [63], исследовали 81 здоровую женщину в возрасте 24–46

лет с целью изучить изменение таких показателей старения яичников, как число антральных фолликулов (ЧАФ), уровень АМГ, базальные уровни ФСГ, ингибина В и эстрадиола. Все женщины были исследованы дважды, с промежутком в 4 года. Выяснилось, что у женщин любого возраста уровень АМГ и ЧАФ имели корреляцию с возрастом, тогда как базальные уровни ФСГ и ингибина В имели такую корреляцию только у пациенток после 40 лет, а уровень эстрадиола вообще не имел такой корреляции. Уменьшение уровня АМГ было лучшим показателем старения яичников, вторым после него авторы считают уменьшение числа антральных фолликулов. Базальные уровни ФСГ и ингибина В авторы считают показателями старения яичников средней степени достоверности, а уровень эстрадиола как не имеющим значения.

Группа ВОЗ по изучению менопаузы в 1980 году ввело ряд определений. Под «естественной менопаузой» понимается прекращение месячных из-за потери яичниками фолликулярной активности. Естественная менопауза возникает после 12 месяцев аменореи, когда нет другой причины для ее возникновения. Под «переходом к менопаузе» понимают период между началом нарушения менструального цикла и последними месячными. Более подробно стадии репродуктивного старения (STRAW) рассмотрела группа исследователей Американского общества репродуктивной медицины под руководством профессора Майкла Саулеса. Исследователями было предложено разделить репродуктивный период женщины на три фазы: раннюю, пик и позднюю. Переход к менопаузе – на ранний и поздний. Постменопаузу – на раннюю и позднюю. Уровень фолликулостимулирующего гормона растет, начиная с позднего репродуктивного периода, достигая максимума в раннюю постменопаузу. Продолжительность менструального цикла начинает быть подвержена колебаниям во время ранней стадии перехода к менопаузе, затем нарушения становятся более выраженными и наконец, после отсутствия месячных более 12 месяцев можно поставить диагноз «менопауза».

Hale G. [62] подробно изучили уровни гормонов в крови пациенток согласно классификации STRAW. Выяснилось, что самым ранним маркером, который показывает переход от пика репродуктивной функции к позднему репродуктивному периоду, является падение уровня АМГ в десять раз, с  $3,9 \pm 2,3$  нг/мл до  $0,32 \pm 0,24$  нг/мл. В тоже время такие показатели как увеличение базального уровня ФСГ, падение базального уровня ингибина В гораздо менее выражены, а уровень прогестерона в середине лютеиновой фазы цикла остается неизменным. Все это говорит о роли АМГ как перспективном маркере уменьшения репродуктивной функции женщины с возрастом.

С приближением менопаузы отмечается дальнейшее падение уровня АМГ. В ранний и поздний период перехода к менопаузе уровень этого гормона составляет  $0,15 \pm 0,2$  и  $0,06 \pm 0,08$  нг/мл, соответственно. В постменопаузу уровень этого гормона равен нулю. Авторы делают выводы об АМГ, как наиболее чувствительном маркере старения яичников у женщин.

Группа голландских исследователей[51] на основе популяционного исследования создали модель, которая может предсказывать возможное время наступления менопаузы по однократному измерению АМГ. В этой работе представлена таблица, согласно которой можно предсказать возможное время наступления менопаузы. Так, если у женщины в возрасте 37 лет наблюдается низкий уровень АМГ – 0,3 нг/мл, то возможное время наступления менопаузы у такой женщины составляет 41–44 года, что на 7–10 лет раньше, чем в популяции (51 год). И наоборот, если у женщины в возрасте 42 лет наблюдается высокий уровень АМГ – 2 нг/мл, то время наступления менопаузы у этой женщины должно составлять 51–53 года, что на 2 года позже, чем в среднем по популяции.

Американские исследователи[51] изучили уровни базального ингибина В и АМГ у женщин в течении 5 лет до наступления менопаузы и выяснили, что крайне низкие уровни обоих гормонов являются достоверными

маркерами, предсказывающими время наступления последних месячных, однако АМГ является наиболее достоверным показателем.

### 1.3.5. Роль АМГ в определении овариального резерва

Под овариальным резервом понимают функциональный резерв яичника, который определяет способность последнего к развитию здорового фолликула с полноценной яйцеклеткой и адекватному ответу на овариальную стимуляцию. Овариальный резерв отражает количество находящихся в яичниках фолликулов (примордиальный пул и растущие фолликулы) и зависит от физиологических и патофизиологических факторов.

Впервые измерение АМГ как метод определения овариального резерва был предложен Seifer D.[66] в 2002 году. Авторы обнаружили, что у пациенток с числом полученных ооцитов 6 и менее, по сравнению с пациентками, у которых было получено 11 и более ооцитов, статистически различаются уровни АМГ, измеренного перед началом стимуляции,  $1,0 \pm 0,4$  нг/мл и  $2,5 \pm 0,3$  нг/мл, соответственно.

Назаренко Т. А. с соавторами [29] исследовали АМГ у 30 здоровых женщин и у 210 пациенток с бесплодием. Авторы выявили, что у пациенток с трубно перитонеальным фактором имелась тенденция к увеличению доли женщин с низкими показателями АМГ. Авторы делают вывод о применимости измерения АМГ как показателя овариального резерва.

Van Rooj [67] тщательно изучили клиническое значение определения АМГ в программе ЭКО. Выяснилось, что уровень АМГ имеет корреляцию с возрастом пациентки ( $R = -0,30$ ,  $P < 0,01$ ), с базальным уровнем ФСГ ( $R = 0,54$ ,  $P < 0,01$ ), с базальным уровнем ингибина В ( $R = 0,32$ ,  $P < 0,01$ ), с числом антральных фолликулов (ЧАФ) ( $R = 0,77$ ,  $P < 0,01$ ) и с числом полученных ооцитов ( $R = 0,57$ ,  $P < 0,01$ ). При логистическом регрессионном анализе влияния АМГ на частоту плохого ответа на стимуляцию (наличие менее 4 полученных ооцитов) выяснилось, что уровень АМГ определял

статистически достоверно вероятность этого состояния, независимо от уровня ФСГ и ингибина В.

Fanchin R. [66] установили, что уровень АМГ имеет более выраженную корреляцию с числом антральных фолликулов, чем остальные гормональные тесты определяющие овариальный резерв (базальные уровни ФСГ, ЛГ, ингибина В и эстрадиола).

Hazout A. [68] обнаружили статистически значимое различие в уровне АМГ в группе пациенток, у которых наступила беременность в результате ЭКО и тех у которых беременность не наступила. В группе беременных уровень АМГ составил  $2,4 + 0,9$  нг/мл, в группе небеременных –  $1,1 + 0,6$  нг/мл,  $P < 0,002$ . В тоже время возраст, базальные уровни ФСГ, ЛГ, ингибина В и эстрадиола не различались в обеих группах пациенток.

Muttukrishna S. [65] изучили влияния АМГ как маркера плохого ответа, который авторы определили, как наличие менее, чем 4 фолликулов 15 мм в диаметре, после проведения стимуляции яичников в программе ЭКО. Выяснилось, что АМГ является главным фактором, который может определять вероятность плохого ответа и включение в анализ базальных уровней ФСГ и ингибина В не дают дополнительную клиническую информацию. Группа французских исследователей выявила, что уровень АМГ мало подвержен колебаниям при измерении в разных менструальных циклах одной женщины, по сравнению с другими показателями овариального резерва, базальными уровнями ФСГ, ингибина В, эстрадиолом и числом антральных фолликулов.

Ebner T. [60] обнаружили, что уровень АМГ может быть фактором, определяющим не только число ооцитов, полученных в программе ЭКО, но и их качество, т.е. отсутствие центральной темной грануляции и агрегации гладкого эндоплазматического ретикулума. Было показано, что пациентки с высоким уровнем АМГ имеют более высокую вероятность получить ооциты хорошего качества, чем пациентки с низким уровнем этого гормона. Уровни базального ФСГ не определяли качество ооцитов. В то же время частота

оплодотворения и развитие эмбрионов до стадии бластоцисты не зависели от уровня АМГ.

Группа американских исследователей [55] изучала влияние измерения уровня АМГ у пациенток старшей возрастной группы, проходящих лечение методом ЭКО. Пациентки 37 лет и старше были разделены на 3 группы. В первую вошли женщины, у которых цикл стимуляции яичников был отменен из-за неудовлетворительного ответа. Во вторую вошли пациентки, у которых были получены ооциты в результате стимуляции. В третью группу вошли пациентки, которым было отказано в лечении из-за высокого уровня базального ФСГ (более 15 мЕд/л). Выяснилось, что уровень АМГ был статистически выше у пациенток с полученными ооцитами ( $1,1 \pm 0,2$  нг/мл) и фактически не различался у пациенток с плохим ответом на стимуляцию яичников ( $0,20 \pm 0,03$  нг/мл) и теми, у которых наблюдался высокий уровень ФСГ ( $0,15 \pm 0,07$  нг/мл). Другие клинические показатели, такие как возраст, базальные уровни ФСГ, ЛГ и эстрадиола не различались в трех группах.

Согласно данным британских исследователей [61] уровень АМГ является значимым прогностическим фактором не только для отсутствия ответа на овариальную стимуляцию, но и для чрезмерного ответа на препараты ФСГ. Более того, было показано, что АМГ может предсказывать вероятность рождения живого ребенка после лечения методом ЭКО. Авторы подчеркивают, что измерение уровня АМГ может помочь в подборе индивидуальной дозы ФСГ при стимуляции суперовуляции.

Австралийские исследователи [62] показали, что у пациенток с низким уровнем АМГ (менее 2 нг/мл) наблюдалась более низкая частота оплодотворения ооцитов, чем у женщин с высоким уровнем этого гормона, причем вне зависимости от способа оплодотворения – стандартного ЭКО или интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в яйцеклетку. У пациенток с низким уровнем АМГ наблюдалось меньшее число полученных ооцитов, меньшее число полученных эмбрионов и более высокая частота выкидышей в сроке до 12 недель, что в общем приводило к тому, что частота

беременности на сроке более 12 недель была в два раза выше у пациенток с высоким уровнем АМГ (выше 2 нг/мл), чем у пациенток с низким уровнем гормона.

Kwee J. [65] сравнили однократное измерение уровня АМГ с определением овариального резерва с помощью гормональных тестов с нагрузкой (теста с нагрузкой кломифенцитратом – (ТНКЦ) и тестом с нагрузкой экзогенным ФСГ – (ТЭФСГ)). Несмотря на то, что ТНКЦ и ТЭФСГ, были лучшими показателями для предсказания вероятности беременности после процедуры ЭКО, авторы считают одиночное определение АМГ наиболее применимым методом оценки овариального резерва в клинической практике.

Nardo L. [59] изучали клиническое значение измерения уровня АМГ по сравнению с базальным уровнем ФСГ и числом антральных фолликулов. Авторы делают вывод, что измерение уровня АМГ может помочь как в прогнозе плохого ответа на овариальную стимуляцию, так и чрезмерного ответа, что делает измерение данного гормона привлекательным в плане индивидуального планирования лечения в программе ЭКО. Число антральных фолликулов и базальный уровень ФСГ не обладают схожей с АМГ клинической значимостью.

Fraisse T. [68] описали 2 случая спонтанной беременности у женщин 29 лет и 41 года со вторичным бесплодием и уровнем АМГ не определяемым стандартными методиками – менее 0,4 нг/мл (24). Эти данные говорят о необходимости разработки более чувствительных методов определения АМГ и изучения более тонких механизмов фолликулогенеза. Однако строить клинические рекомендации для программ ЭКО на двух наблюдениях спонтанных беременностей не стоит, так как у пациенток с крайне низкими уровнями АМГ наблюдается крайне низкая частота наступления беременности как при применении стимуляции с высокими стартовыми дозами ФСГ, так и при использовании модифицированного естественного цикла.

Nelson S. [44] использовали уровень АМГ, как фактор, определяющий выбор схемы для стимуляции в ЭКО. У пациенток с низким уровнем АМГ (от 0,14 до 0,7 нг/мл) была применена схема овариальной стимуляции с применением антагонистов и высоких стартовых доз ФСГ (300 мЕд). У этой группы пациенток частота отмены цикла из-за отсутствия ответа на стимуляцию составила 8,2% и частота наступления беременности на начатый цикл – 14,7%. У пациенток с уровнем АМГ от 0,7 до 2,1 нг/мл был применен длинный протокол с применением препаратов агонистов люлиберина и ежедневной дозой ФСГ 225–300 мЕд. В этой группе пациенток не было отмечено случаев плохого ответа на овариальную стимуляцию и синдрома гиперстимуляции яичников (СГЯ) и частота наступления беременности на начатый цикл составила 32,9%. В группе пациенток с уровнем АМГ более 2,1 нг/мл применялся протокол с антагонистами и дозой ФСГ 150 мЕ в день. В данной группе пациенток у двух (6%) наблюдался плохой ответ на овариальную стимуляцию, однако не было отмечено случаев СГЯ. Частота наступления беременности на начатый цикл составила 61,7%.

Авторы делают вывод о большом клиническом значении определения уровня АМГ в плане индивидуального ведения пациенток и уменьшении вероятности таких осложнений как плохой ответ на стимуляцию яичников и СГЯ. Для пациенток с высокими рисками уменьшенного и чрезмерного ответа на стимуляцию авторы предлагают использовать схемы с антагонистами люлиберина и высокими или низкими начальными дозами ФСГ.

Поэтому уровень АМГ можно рассматривать как маркер овариального резерва (ОР) (количество примордиальных фолликулов в яичниках в определенный период репродуктивной жизни женщины). ОР максимальный в последние месяцы фетальной жизни, затем непреклонно снижается до периода менопаузы, когда остается 1000 и менее фолликулов. Женщины отмечают прекращение менструаций и симптомы, присущие гипоэстрогении. Средний возраст наступления менопаузы в России составляет около 50–51

года, хотя границы колебания этого периода значительно шире (между 26 и 60 годами). Генетические и эпидемиологические исследования, включая близнецовый метод, доказывают, что на возраст наступления менопаузы в значительной мере влияет наследственность. Несмотря на многочисленные научно-популярные публикации, влияние факторов окружающей среды на возраст менопаузы является ограниченным. Курение может приблизить возраст менопаузы на 1–2 года у длительно курящих женщин, выкуривающих до 20 сигарет в день, однако изменение образа жизни не обеспечивает продления репродуктивной жизни.

#### **1.4. АМГ и синдром поликистозных яичников (СПКЯ)**

Современные международные диагностические критерии включают в себя следующие признаки: во-первых, наличие ановуляции, которая выражается в олигоменореи или аменореи, во-вторых, в признаках гиперандрогении яичникового генеза, которая выражается клинически (наличие гирсутизма) или по изменению биохимических показателей (повышение уровней андрогенов) и, в-третьих, в морфологических признаках мультифолликулярных яичников (определяется при ультразвуковом исследовании). Наличие двух из этих трех признаков является современным диагностическим критерием СПКЯ. Согласно современному представлению о патогенезе этого синдрома, причиной его является нарушение резистентности к инсулину, что сопровождается повышенным выделением клетками теки и гранулы растущих фолликулов андрогенов, что в свою очередь вызывает остановку роста фолликулов на стадии, предшествующей селекции доминантного, 4–10 мм в диаметре. Недавно была предложена теория, объясняющая сочетание инсулинрезистентности и гиперандрогении. Активация в серин киназной системе приводит к фосфорилированию рецептора к инсулину и инактивации субстрата инсулинового рецептора – 1 (IRS–1), которая в свою очередь ведет к резистентности к действию этого гормона.

Одновременно активация этой же киназной системы приводит к фосфорилированию цитохрома P450c17, которая ведет к гиперандрогении.

Многие исследования показывают, что при СПКЯ уровень АМГ в крови повышен в 2–3 раза. Также показано, что уровень АМГ в крови имеет положительно корреляцию с такими гормональными маркерами наличия СПКЯ, как уровни тестостерона, андростендиона и число антральных фолликулов. Более того, было показано, что у пациенток с СПКЯ измерение уровня АМГ может заменить ультразвуковой подсчет числа фолликулов. Это важно у тех пациенток, у которых сложно произвести ультразвуковое обследование яичников, например, при ожирении.

Стоит отметить, что увеличение продукции АМГ яичниками при СПКЯ вызвано не только увеличением числа фолликулов, вырабатывающих АМГ, но и увеличением выработки АМГ гранулезой этих фолликулов. Более того, увеличение в уровне АМГ наблюдается у пациенток с СПКЯ до наступления менархе, а также у дочерей пациенток с этим синдромом. Также измерение уровня АМГ у пациенток старшей возрастной группы, помогло разобраться с таким феноменом, как наступление поздней менопаузы у пациенток с СПКЯ. Действительно у таких женщин менопауза наступает позже на 1–2 года, чем в среднем по популяции и уровни АМГ выше, чем в контрольной группе здоровых женщин. Все это говорит о большой роли АМГ в патогенезе этого синдрома.

Причина, по которой при СПКЯ фолликулы остаются на стадии предшествующей селекции доминантного, остается неизвестной, и по этой причине трудно судить, является ли повышенный уровень АМГ продуктом остановки роста фолликулов или это повышение играет самостоятельную патогенетическую роль. В любом случае повышенный уровень АМГ блокирует ароматазу и препятствует дальнейшему росту продукции гранулезой эстрадиола.

Исследования показали, что на клетках гранулезы фолликулов, полученных у пациенток с СПКЯ наблюдается повышенное число

рецепторов к ФСГ и андрогенам, а также повышенная экспрессия уровня мРНК АМГ и соответственно повышенная продукция этого гормона. Более того, наблюдается феномен уменьшения продукции АМГ в ответ на добавление ФСГ и увеличение продукции этого гормона в ответ на добавление ЛГ. Уровень выделения АМГ клетками гранулезы, полученной от здоровых пациенток, не менялся в ответ на добавление в культуру ФСГ или ЛГ. Все это говорит о повреждении в секрети АМГ у пациенток с СПКЯ. Вероятно, высокий уровень АМГ в фолликулах пациенток с СПКЯ определяет резистентность к ФСГ.

Дальнейшее подтверждение этого предположения нашло подтверждение в работе Бебия З. Н. с соавторами, [3] которые обнаружили, что при иммуногистохимической оценке содержания АМГ в гранулезных клетках больших антральных фолликулов полученных у пациенток с СПКЯ отмечается интенсивное окрашивание. В то же время у пациенток контрольной группы не наблюдалось окрашивания клеток гранулезы больших антральных фолликулов. Stubbs S. [43] исследовали ранние стадии роста фолликулов у пациенток с СПКЯ с помощью иммуногистохимического анализа. Было обнаружено парадоксально меньшее число АМГ–позитивных клеток гранулезы в примордиальных и первичных фолликулах у пациенток с СПКЯ, по сравнению с яичниками здоровых женщин. Авторы делают вывод о вовлеченности в процесс формирования СПКЯ самых ранних этапов роста фолликулов.

При анализе клеток гранулезы, полученной из фолликулярной жидкости, программе ЭКО, у пациенток с СПКЯ и у пациенток с трубно–перитонеальным фактором, выяснилось, что у пациенток с СПКЯ наблюдается более высокий уровень экспрессии АМГ и рецептора к ФСГ, как в фолликулах большого размера (17–22 мм в диаметре), так и малого (8–13 мм в диаметре). Также в гранулезе, полученной из фолликулов малого размера, у пациенток с СПКЯ наблюдалась повышенная экспрессия рецепторов к АМГ второго типа (АМН–RII) и к андрогенам, по сравнению с

пациентками со здоровыми яичниками. Все это говорит о том, что высокий уровень АМГ может играть одну из ключевых ролей в патогенезе СПКЯ. Также имеется сообщение о повышенном содержании АМГ в фолликулярной жидкости и сыворотки крови у пациенток с этим синдромом по сравнению с пациентками со здоровыми яичниками,  $7,01 \pm 1,52$  и  $1,65 \pm 0,23$  нг/мл и  $2,7 \pm 0,52$  и  $0,92 \pm 0,19$  нг/мл, соответственно.

Высокий уровень АМГ в фолликулярной жидкости, и часто наблюдаемое плохое качество ооцитов у пациенток с СПКЯ, ставит вопрос о возможном действии АМГ как ингибитора мейоза в ооците. Однако дальнейшие исследования на животной модели показали, что АМГ не ингибирует процесс мейоза в ооцитах. Однако необходимые дальнейшие исследования этого механизма у человека.

Интересно отметить, что к фенотипу, характерному для СПКЯ могут приводить различные мутации в генах рецепторов к андрогенам, инсулину, к ЛГ и ФСГ. Недавно был обнаружен полиморфизм в гене к АМГ первого типа, который был ассоциирован с уровнем АМГ у пациенток с СПКЯ. Это позволяет направленно производить дальнейшие исследования, направленные на изучение влияния на резистентность к ФСГ изменений в рецепторах к АМГ у пациенток с СПКЯ.

### **1.6. Причины понижения или повышения уровня АМГ**

При использовании таблиц с показателями норм проводится расшифровка данных аналитических исследований на уровень АМГ. Квалифицированный врач-эндокринолог после изучения результата проведенного теста аналитического исследования на уровень АМГ может делать заключение. Для этого ему надо ответить на два вопроса. Первый: «Имеет ли женский организм патологическое изменение?» Если ответ будет положительным, то он должен дать ответ на второй вопрос: «Какое лечение позволит его устранить?».

Если по результатам тестирования у обследуемой выявлен повышенный уровень АМГ против нормы, то причиной этого могли быть следующие факторы:

- 1) задержка полового развития;
- 2) новообразования яичников в виде гранулёзоклеточных опухолей;
- 3) нарушения в функционировании рецептора ЛГ.

Высокий уровень Антимюллера гормона регистрируется у женщин и при отсутствии овуляция, постановки диагноза нормогонадотропное ановуляторное бесплодие, при мутации АМГ–рецептора или на фоне развивающегося в яичнике поликистоза. Снижение АМГ проявляется при:

- снижении овариального резерва, наличия с рождения малого количества (запаса) ооцитов I порядка в яичниках;
- очень раннем половом развитии – до 11–12 лет или с появлением признаков полового созревания у девочек уже в 8 лет;
- раннем климаксе у женщин репродуктивного возраста;
- дефиците половых гормонов, обусловленном снижением секреции гонадотропного гормона или её резким повышением;
- употреблении токсических или наркотических веществ (алкоголя, наркотиков, табакокурение);
- у женщин с избыточной массой тела и ожирением на фоне завершения репродуктивного возраста.

Разрешение на проведение процедуры ЭКО возможно только в том случае, если концентрация в крови АМГ составляет 0,08–0,11 нг/мл. Если концентрация гормона будет ниже, включая его отсутствие в крови, то процесс ЭКО будет неэффективным, так как качество яйцеклеток в таком случае не будет соответствовать необходимым критериям его проведения. Но и высокие показатели АМГ не дают желаемого эффекта, так как в таком случае проявляется синдром гиперстимуляции яичников, который, по данным литературы обеспечивает приживание эмбриона при проведении

процедура ЭКО в летнее время, так как наличие яркого солнечного света повышает уровень гормона. К признакам низкого концентрации в крови АМГ относят нерегулярный менструальный цикл, длительное отсутствие беременности, постоянная усталость, приливы жара. В таких ситуациях необходимо обследовать женщину и с учетом полученных результатов разработать схему повышения к крови АМГ.

Для развития жизнеспособных яйцеклеток проводится их искусственная стимуляция с последующим проведением ЭКО. Поднять гормональный уровень невозможно, если наступила ранняя менопауза. Также и в других клинических случаях с выявлением низкого Антимюллера гормона эффективное лечение практически невозможно, поскольку яичниковый резерв вырасти не может, так как имеет стабильную величину. Но согласно результатам теста появляется возможность своевременно провести лечение заболеваний, вызвавших отклонение уровня АМГ от нормы.

Если выявлен чрезмерно повышенный АМГ, то при назначении традиционного лечения или при применении народных средств учитываются многие факторы – возраст, причины, сопутствующие патологии и т.д., например, при синдроме поликистозных яичников, нужны мероприятия, приводящие к его устранению – нормализация веса, сбалансированный рацион, оптимальные физические нагрузки, достаточный отдых. Затем назначается терапия, призванная нормализовать гормональный статус.

Нормальный овариальный резерв определяется при наличии следующих параметров: регулярный менструальный цикл – 28–30 дней; уровень ФСГ не более 10 МЕ/л; уровень АМГ не менее 1.0 нг/мл; число антральных фолликулов не менее 5 в каждом фолликуле.

При анализе гормонального профиля важно учитывать референсные значения (табл. 2).

Таблица 2

Референсные значения гормонов в сыворотке крови у женщин  
репродуктивного возраста

Показатель	Единица измерения	Референсные значения
ФСГ (фолликулостимулирующий гормон)	мМЕ/мл	Средняя фолликулярная фаза: 3.85–8.78 Овуляторный пик: 4.54–22.51 Средняя лютеиновая фаза: 1.79–5.12 Постменопауза: 19.8–136.0
ЛГ (лютеинизирующий гормон)	мМЕ/мл	Средняя фолликулярная фаза: 2.12–10.89 Овуляторный пик: 19.18–103.03 Средняя лютеиновая фаза: 1.2–12.86 Постменопауза: 9.0–61.9
Эстрадиол	Пмоль/л	Средняя фолликулярная фаза: 99.1–447.862 Овуляторный пик: 348.7–1589.5 Средняя лютеиновая фаза: 179.9–1068.3 Постменопауза: 0–227.0
Антимюллеровский гормон	Нг/мл	0–1.15
Тестостерон общий	Нмоль/мл	0.21–2.15

Сниженный овариальный резерв: укорочение менструального цикла на 2–3 дня; эпизоды повышения уровня ФСГ более 15 МЕ/л; уровень АМГ меньше 1.0 нг/мл; число антральных фолликулов не более 3 в каждом яичнике.

## Глава 2. Материалы и методы исследования

Для стимуляции яичников у женщин с нарушениями репродуктивной функции использовали гонадотропины, агонисты и антагонисты гонадотропин-рилизинг гормона и триггера овуляции (рис. 3, 4, 5, 6).



Рис. 3. Человеческий менопаузальный гонадотропин Менопур, содержащий 75 МЕ ФСГ и 75 МЕ ЛГ (Германия)



Рис. 4. Аналог гонадотропин-рилизинг гормона Цетротид 0.25 мг (Швейцария)

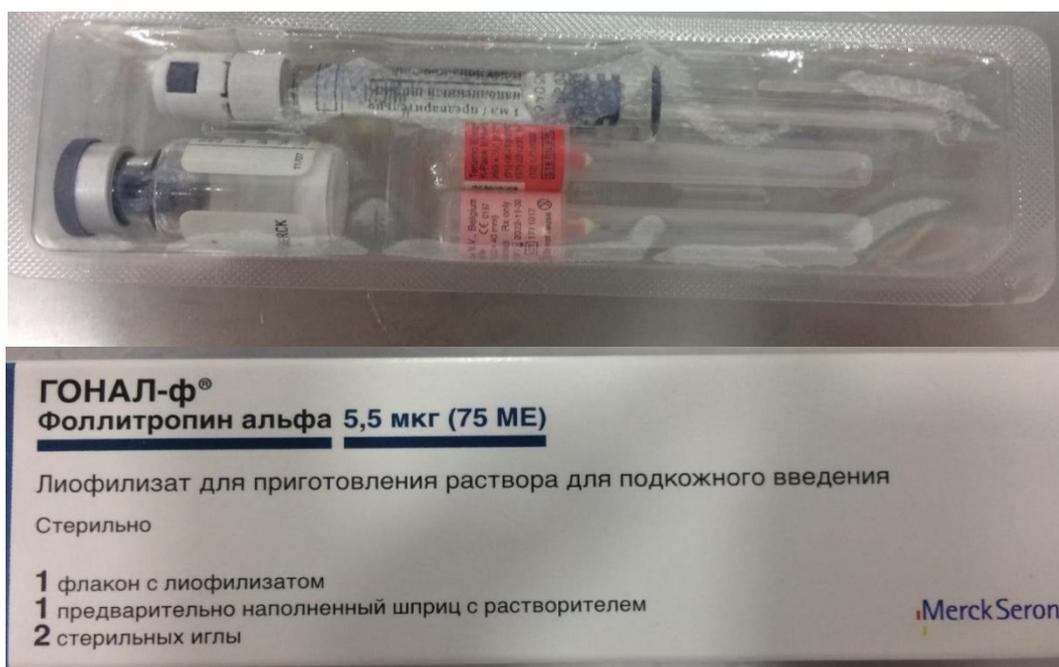


Рис. 5. Рекombинантный гонадотропин, препарат ФСГ Гонал-Ф, который содержит 150 МЕ (Швейцария)



Рис. 6. Триггер овуляции Овитрель 250 мкг (Швейцария)

В исследовании использовали данные, полученные в результате подготовки 20 женщин, заинтересованных в проведении вспомогательных репродуктивных технологий.

Стимуляцию овуляции проводили на третий день цикла, учитывая, что она может продолжаться от 12 до 20 дней. На следующем этапе женщине проводили трансвагинальную пункцию, под наркозом и под контролем УЗИ. С помощью иглы врач иглой прокалывал фолликул и аспирировал из него

фолликулярную жидкость в стерильную пробирку, которую передавали эмбриологу для определения в жидкости ооцит-кумулюсных комплексов с помощью стереомикроскопа (Olympus CX 6), встроенного в ламинарный шкаф (рис. 7).



Рис. 7. Стереомикроскоп Olympus CX 6

С помощью инвертированного микроскопа Olympus выявленные ооциты классифицировали по степени зрелости. Далее осуществляли процесс осеменения, стимулировали созревание ооцита с последующим осуществлением оплодотворения с образованием зиготы, которая вступала в стадию бластуляции – включался процесс дроблением с образованием эмбриона (рис. 8).

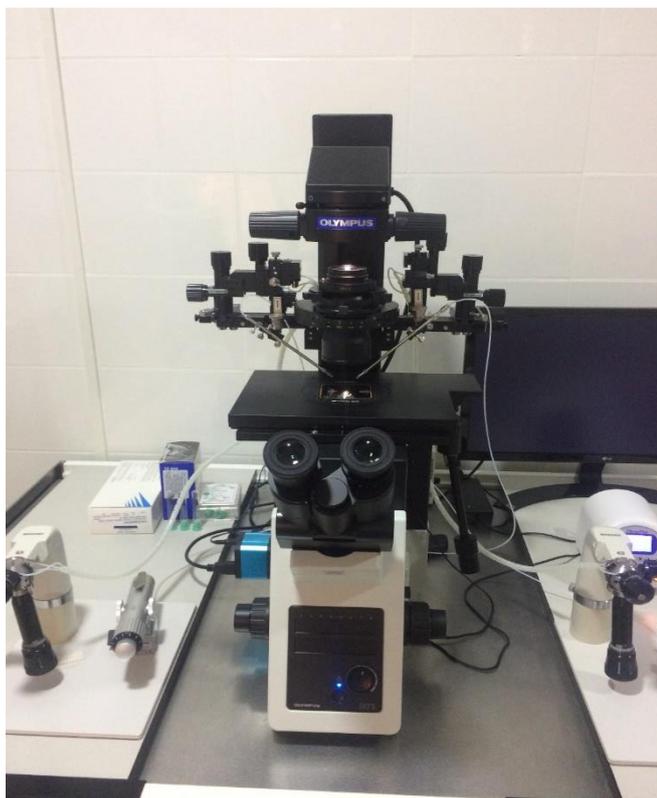


Рис. 8. Инвертированный микроскоп Olympus с микроманипуляторами Narishige (Дания)

Методика определения Антимюллера гормона, как основного маркера овариального резерва, проводилась по стандартной схеме. Первоначально для определения у женщины функционального резерва яичников, согласно методике врач назначал проведение расширенного Efort-Теста крови на АМГ. Данный тест является обязательным при наличии проблем с оплодотворением; неудачных попыток с ЭКО; подозрением на формирование поликистозных яичников или гранулёзноклеточной опухоли яичников; по показателям мониторинга результативности антиандрогенной терапии; проявления бесплодия неясного генеза; при высоком против нормы уровне фолликулостимулирующего гормона; установления причин отклонения полового созревания.

Стандартная подготовка к сдаче аналитического материала требует в течение трех суток вести спокойный образ жизни, без стрессового напряжения и выраженных физических нагрузок, исключая прием

тиреоидных и стероидных гормонов. Последним приемом пищи осуществляется за 8 часов до проведения процедуры и в этот день исключается курение и прием алкогольных напитков. При различных формах плохого самочувствия, симптомов проявления ОРВИ, ОРЗ, острых стадий других заболеваний взятие аналитического материала недопустимо.

Определители уровня АМГ в крови, основанные на энзим-связанном иммуносорбентном методе (ELISA) (фирм Medgenix, Serotec, Bayer, Immunotech-Coulter) позволяют определить уровень АМГ от 0,01 нг/мл. При указании уровня в пмолях на литр коэффициент пересчета составляет 7,14 пмоль/л = 1 нг/мл.

Нижнее пороговое значение АМГ в диагностике овариального резерва составляет от 0,2 до 0,5 и даже 1,0 нг/мл, верхнее значение – от 11 нг/мл. и более высокие его значения могут свидетельствовать о возможном наличии гранулезо-клеточной опухоли яичников. Уровень данного гормона может фиксироваться с 12 лет.

Далее в таблице 3 приводятся гормональные исследования и их референсные значения.

Таблица 3

## Гормоны и их референсные значения в сыворотке крови

Показатель	Единица измерения	Референсные значения
ФСГ (фолликулостимулирующий гормон)	мМЕ/мл	Средняя фолликулярная фаза: 3.85–8.78 Овуляторный пик: 4.54–22.51 Средняя лютеиновая фаза: 1.79–5.12 Постменопауза: 19.8–136.0
ЛГ (лютеинизирующий гормон)	мМЕ/мл	Средняя фолликулярная фаза: 2.12–10.89 Овуляторный пик: 19.18–103.03 Средняя лютеиновая фаза: 1.2–12.86 Постменопауза: 9.0–61.9
Эстрадиол	Пмоль/л	Средняя фолликулярная фаза: 99.1–447.862 Овуляторный пик: 348.7–1589.5 Средняя лютеиновая фаза: 179.9–1068.3 Постменопауза: 0–227.0
Антимюллеровский гормон	Нг/мл	0–1.15
Тестостерон общий	Нмоль/мл	0.21–2.15

Нормальный овариальный резерв определяется при наличии следующих параметров: регулярный менструальный цикл – 28–30 дней; уровень ФСГ не более 10 МЕ/л; уровень АМГ не менее 1.0 нг/мл; число антральных фолликулов не менее 5 в каждом фолликуле сниженный овариальный резерв; укорочение менструального цикла на 2–3 дня; эпизоды повышения уровня ФСГ более 15 МЕ/л; уровень АМГ меньше 1.0 нг/мл; число антральных фолликулов не более 3 в каждом яичнике.

Если с 14 лет уровень АМГ чрезмерно снижается, то прибегают к технологии замораживания яйцеклеток; если в возрасте 24–31 год его уровень составляет 3 или чуть выше (до 4,2 нг/мл), то это свидетельствует о возможности зачатия и рождения здорового ребенка

Методика проведения АМН Gen II ELISA A79765 проводится по следующей схеме:

1) метод Anti-Mullerian Hormone (АМН) Gen II (Антимюллеров гормон, АМН) основан на твердофазном иммуноферментном анализе (ELISA) и предназначен для диагностики *in vitro* с целью количественного определения АМН в человеческой сыворотке и гепариновой плазме;

2) АМН-гликопротеин, гомодимер, принадлежит семейству трансформирующего фактора роста, состоит из двух субъединиц с м.м. 72 kDa, связанных дисульфидными мостиками 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8. Данный гормон выполняет следующие функции: у мужчин он секретируется клетками Сертоли и в период эмбрионального развития АМН отвечает за регрессию Мюллеровых протоков: тестикулы продуцируют его до начала пубертата, а затем его уровень медленно снижается до остаточных постпубертатных величин. У женщин АМН в небольших количествах продуцируется гранулезными клетками яичников до наступления менопаузы, после которой его уровень выявить невозможно;

3) данный метод АМН Gen II ELISA основан на принципе ферментатически усиленного «сэндвича» иммуноферментного анализа. В ходе постановки стандарты, контроли и образцы инкубируют в лунках

микропланшета, покрытых антителами к АМН. После инкубации и промывки детектирующие антиАМН антитела, конъюгированные с биотином, вносят в лунки микропланшета. После второй инкубации и промывки, в лунки вносят конъюгат стрептавидин/пероксидазу (стрептавидин-HRP). После третьей инкубации и промывки в лунки вносят субстрат тетраметилбензидин (ТМВ). На последнем этапе процедуры в лунки вносят кислый завершающий раствор. Определяют интенсивность окрашивания, измеряя абсорбцию в лунках при длине волны 450 nm, против длины волны в диапазоне 600–630 nm. Измеренное значение абсорбции прямо пропорционально концентрации АМН в образцах. Для построения калибровочной кривой используют набор стандартов АМН, откладывая значения абсорбции стандартов против соответствующих концентраций стандартов АМН. Концентрация АМН в образцах может быть рассчитана непосредственно из калибровочной кривой.

#### 4) Контроль качества:

1. Каждая лаборатория должна самостоятельно установить средние значения и допустимый диапазон для контроля достоверности результатов.

2. Значения, получаемые для контролей АМН Gen II ELISA или других коммерчески доступных контрольных материалов, должны попадать в установленный диапазон допустимых значений.

3. Установленные диапазоны допустимых значений для контролей АМН Gen II ELISA предоставляются вместе с набором АМН Gen II Calibrator and Control.

4. Полная калибровочная кривая и контроли высокого и низкого уровней должны быть включены в каждую постановку.

5. Раствор хромогена ТМВ должен быть бесцветным или светло-желтым. Появление голубого окрашивания может указывать на контаминацию или нестабильность реагента.

### Глава 3. Результаты и их обсуждение

Проведение подготовки женщин к процедуре суперстимуляции с применением гормонов к процессу созревания в яичниках ооцитов является важным этапом и от него зависит возможность дальнейшего проведения репродуктивной технологии. Результаты анализа гормонального профиля у каждой из обследуемых женщин представлены в сводной таблице 4.

Таблица 4

Концентрация гормонов в сыворотке крови у женщин до проведения ЭКО

Показатели	Ед. изм.	Концентрация гормона		
		M±m	Min	Max
АМГ	Нг/мл	3,15±0,551 2,465	0,26	10,1
ФСГ	мМЕ/мл	7,43±0,525 2,349	4,2	13,85
ЛГ	мМЕ/мл	5,93±0,556 2,485	3,45	12,64
Эстрадиол	Пмоль/л	121,3±32,22 132,8	25,2	595
Тестостерон	Нмоль/мл	1,03 ±0,163 0,6045	0,16	2,68

Выявленный в работе референсный показатель средней концентрации в сыворотке крови АМГ представлен в таблице 4. АМГ следует считать наиболее точным маркером состояния овариального резерва, так как он не зависит от уровня ФСГ, дня менструального цикла и отражает величину пула примордиальных фолликулов.

Концентрация АМГ была повышена против нормы, равной 0–1.15 Нг/мл, почти в 3 раза, но у женщин его индивидуальные значения проявлялись в пределах от 0,26 до 10,1 Нг/мл (рис. 9). Следует отметить, что даже самый низкий его показатель был выше нормы и, следовательно, подготовка женщин к процедуре ЭКО проходила успешно.

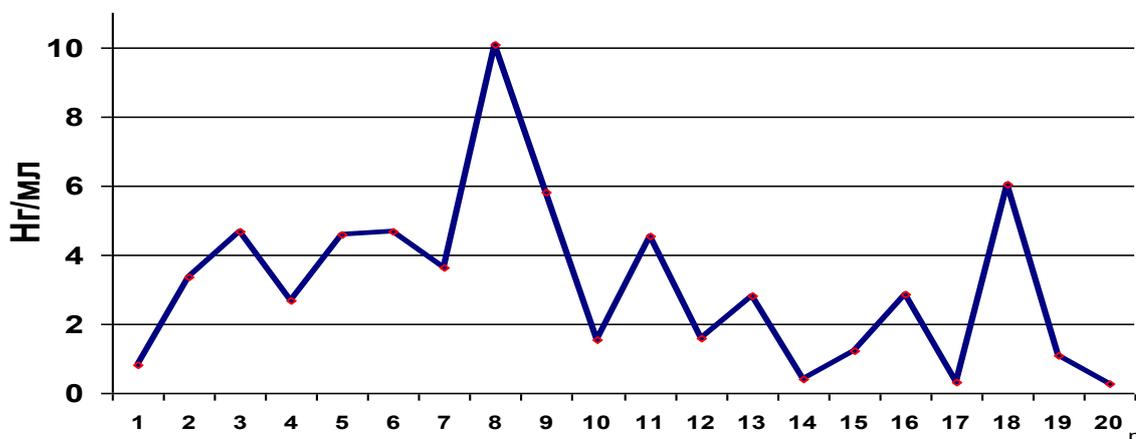


Рис. 9. Вариабельность индивидуальных показателей концентрации АМГ в сыворотке крови у женщин до проведения процедуры ЭКО

Референсные значения ФСГ в период средней фолликулярной фазы составляют от 3.85 до 8.78 мМЕ/мл. Средний уровень концентрации данного гормона проявлялся у женщин в пределах верхних границ нормы (см. табл. 4), обеспечивая необходимый физиологический эффект для проведения ЭКО-процедуры (рис. 10) – созревание фолликулов.

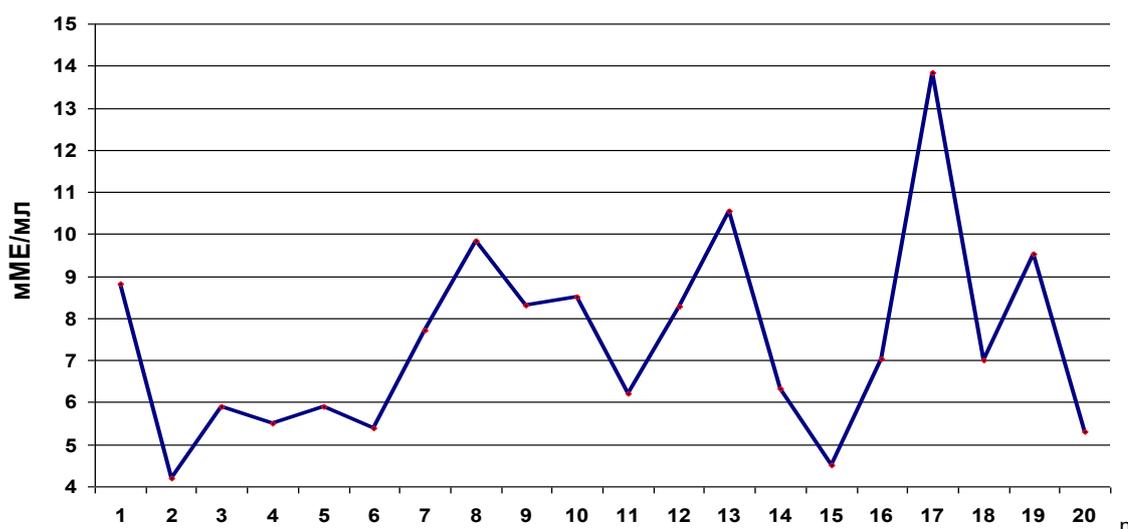


Рис. 10. Вариабельность индивидуальных показателей концентрации ФСГ в сыворотке крови у женщин до проведения процедуры ЭКО

Согласно нормативным данным средняя концентрация в сыворотке крови у ЛГ в средней период фолликулярной фазе в норме составляет 2,12–10,89 мМЕ/мл. Выявленная у женщин его средняя концентрация проявлялась в пределах нормы (рис. 11). Только у 5 женщин отмечен наиболее низкий физиологический уровень ЛГ был отмечен в пределах 3,5 мМЕ/мл.

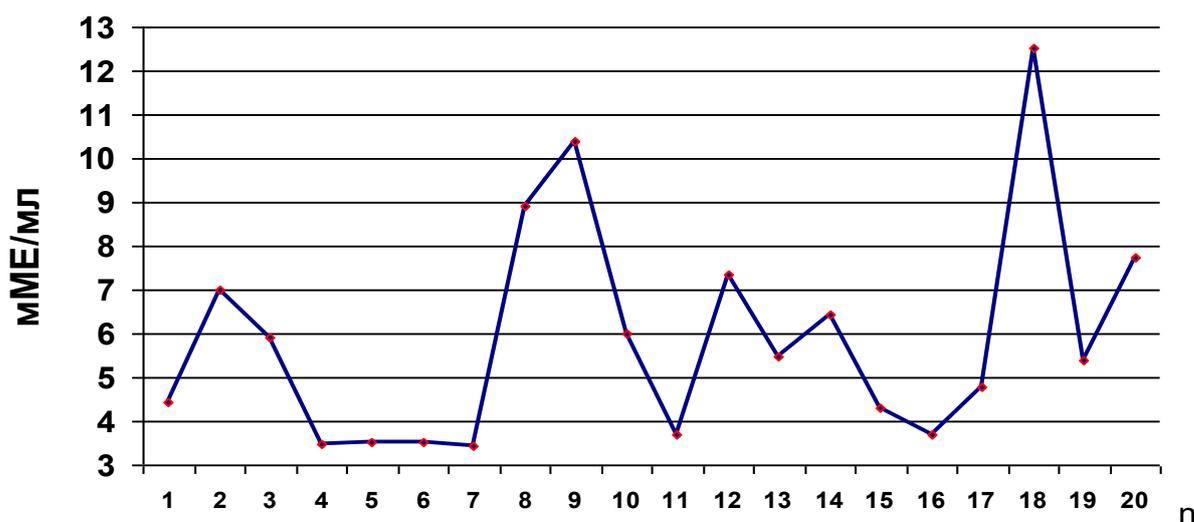


Рис. 11. Вариабельность индивидуальных показателей концентрации ЛГ в сыворотке крови у женщин до проведения процедуры ЭКО

Средняя референсная концентрация эстрадиола в сыворотке крови во время проявления фолликулярной фазы составляет 99,1–447,9 Пмоль/л. У обследуемых женщин индивидуальные колебания данного гормона отмечены в более узком диапазоне со смещением его концентрации ниже нормы, с проявлением в пределах от 25 до 184 Пмоль/л.

Эстрадиол в женском организме определяет процесс пролиферации (рост) фолликулярных клеток и экспрессию в них новых рецепторов к ФСГ и стероидам. Так, тестостерон тормозит пролиферацию первичных фолликул. синтез эстрогенсинтазы на стадии вторичного фолликулеза индицирует ФСГ, при этом под её воздействием из тестостерона образуется эстрадиол. Рост его концентрации в крови по механизму обратной связи определяет

резко выраженный преовуляторный пик ЛГ и менее значимый пик ФСГ. При этом часть тестостерона и эстрадиола секретируются в фолликулярную жидкость, с резким повышением в крови эстрадиола (рис. 12).

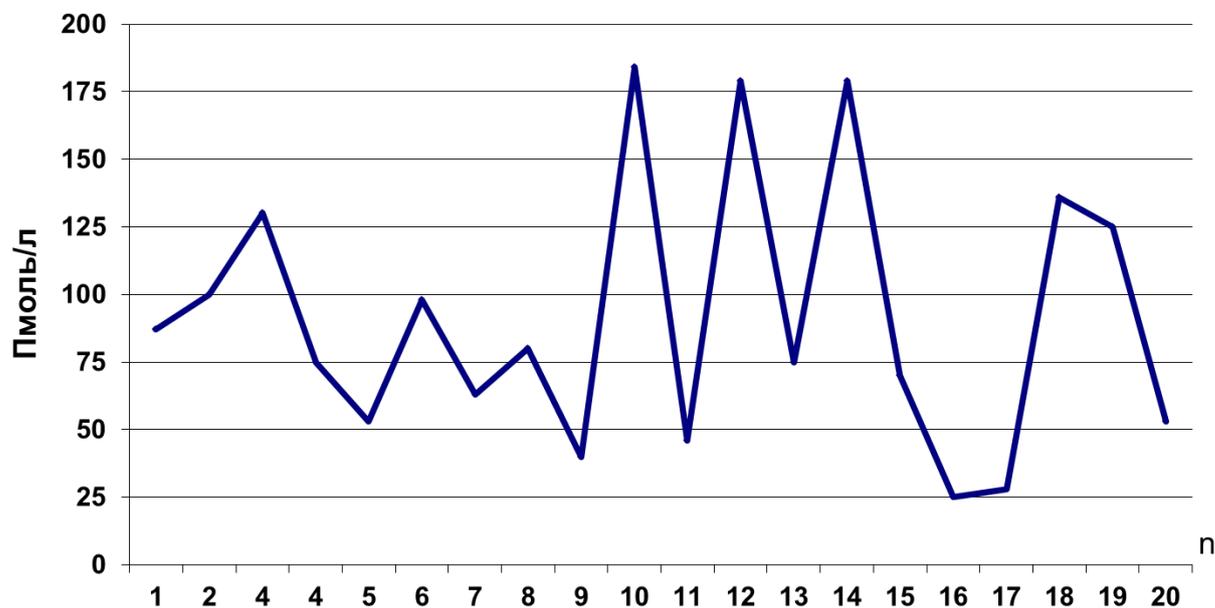


Рис. 12. Вариабельность индивидуальных показателей концентрации эстрадиола в сыворотке крови у женщин до проведения процедуры ЭКО

Средняя концентрация тестостерона у женщин соответствовала норме, равной 0.21–2.15 Нмоль/мл. На рисунке 13 представлен график индивидуальных показателей содержания в крови женщин тестостерона. Только у одной женщины он был выше нормы.

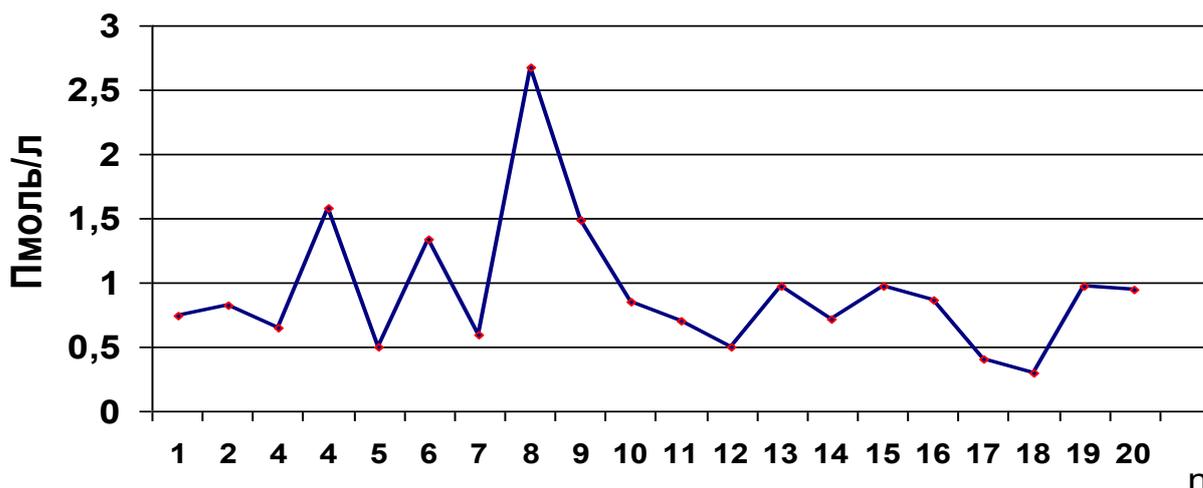


Рис. 13. Вариабельность индивидуальных показателей концентрации тестостерона в сыворотке крови у женщин до проведения процедуры ЭКО

После проведения у женщин процедуры стимуляции суперовуляции из их яичников извлекали ооциты, оценивали их количество (табл. 5).

Таблица 5

Количество антральных фолликулов и яйцеклеток

Показатели	Ед. изм.	Концентрация гормона		
		M±m	Max	Min
Антральные фолликулы	шт.	7,3±1,13 5,06	20	2
Полученные ооциты	шт.	6,0±0,75 4,69	11	1

В среднем у женщин было извлечено из яичников 6–8 антральных фолликулов, из которых были получено в среднем 5–7 ооцитов, в которых после введения в них сперматозоидов был запущен процесс осеменения с последующим формированием яйцеклетки, её оплодотворением и развитием из зиготы зародыша, включения процесса эмбрионального развития.

Качественную оценку полученных ооцитов производили по внешним признакам, исследуя их микроскопически (рис. 14–17).

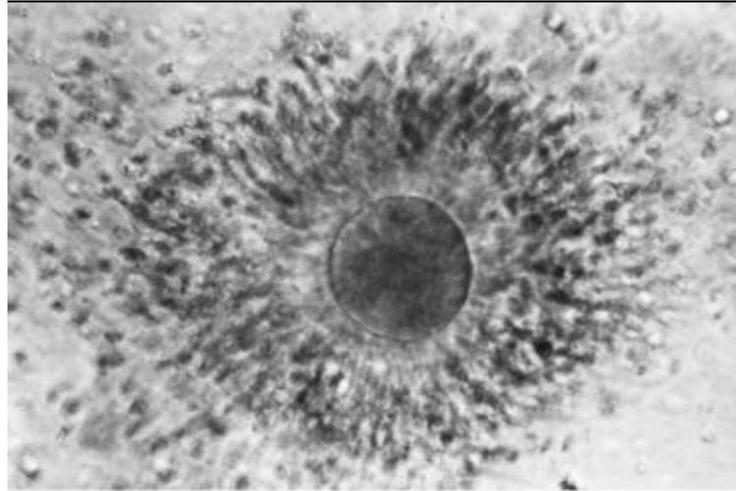


Рис. 14. Ооцит-кумулюсный комплекс (фото из Human Cell Atlas)

Исследуя антральные фолликулы, учитывали внешний вид ОКК-комплексов; «прозрачность», размер и «степень разрыхления» клеток кумулюса и лучистого венца (*corona radiata*). Незрелые ОКК-комплексы обычно имеют небольшой размер. У них клетки кумулюса и лучистого венца плотно упакованы вокруг ооцита. Сам ооцит обычно выглядит как темная округлая структура.

Инвертированный микроскоп позволяет увидеть ооциты, находящиеся на стадии профазы первого мейотического деления.



Рис. 15. Ооцит I порядка незрелый ооцит GV, находящийся на стадии профазы первого деления мейоза (фото из Human Cell Atlas)

Зрелые ОКК-комплексы более крупные, имеют разросшийся кумулюс с различной клеточной структурой. Клетки corona radiate расходятся лучами от ооцита.

У ооцитов I порядка них можно выявить ядро (зародышевый пузырек, germinal vesicle GV). Но, если ядро не визуализируется, то в этот период ооцит находится на стадии метафазы первого мейотического деления (M1).



Рис. 16. Ооцит на стадии метафазы первого деления мейоза  
(фото из Human Cell Atlas)

На стадии метафазы второго мейотического деления в перивителлиновом пространстве под инвертированным микроскопом можно выявить ооцит II порядка и первое полярное (редукционное или направительное тельце) (рис. 17).



Рис. 17. Ооцит II порядка и 1-ое редукционное тельце на стадии созревания  
метафазы второго деления мейоза (фото из Human Cell Atlas)

## Выводы

1. Овариальный резерв женщины определяет функциональное состояние её репродуктивной системы, но с возрастом его потенциал снижается и для реализации репродуктивной функции женщины необходимо применять медицинские технологии стимуляции суперовуляции.

2. Концентрация в плазме крови АМГ, как основного маркера овариального резерва, превышала у женщин норму в 3 раза, проявляясь в пределах от 0,26 до 10,1 Нг/мл.

3. У женщин в процессе стимуляции оогенеза средний уровень концентрации ФСГ проявлялся в пределах верхних границ нормы, обеспечивая процесс созревания фолликулов в яичниках.

4. Концентрации ЛГ, эстрадиола и тестостерона способствовали созреванию у женщин полноценных фолликулов.

5. Успешность получения после овуляции и процесса осеменения из антральных фолликулов ооцитов II порядка составляет 82,2%.

### Список литературных источников

1. Адамян Л. В., Курило Л. Ф., Арсланян К. Н., Шуляк И. Ю. Фолликулогенез при некоторых формах эндометриоза // Проблемы репродукции. 2009. №1. С. 78–85.
2. Бебия З. Н., Орлов В. М. Антимюллеровый фактор // Журнал акушерства и женских болезней. 1999. № 2. С. 66–70.
3. Бебия З. Н., Орлов В. М., Гаджиева Т. С. Новый взгляд на патогенез синдрома поликистозных яичников // Новые подходы к решению проблем женского здоровья. СПб.: Изд-во СПбМАПО, 2000. С 11–18.
4. Бесплодный брак. Современные подходы к диагностике и лечению: руководство / под ред. Г. Т. Сухих, Т. А. Назаренко. 2-е изд., испр. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 784 с.
5. Бесплодный брак: версии и контраргументы / под ред. В. Е. Радзинского. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2018. 305 с.
6. Боярский К. Ю. Фолликулогенез и современная овариальная стимуляция // Проблемы Репродукции. 2002. Т. 8, № 3. С. 43–49.
7. Боярский К. Ю. Молекулярные основы формирования фетального яичника и получение гамет из стволовых клеток // Проблемы репродукции. 2004. № 5. – С. 15–21.
8. Боярский К. Ю. Роль показателей овариального резерва при лечении бесплодия методом ЭКО–ПЭ // Лечение женского и мужского бесплодия (вспомогательные репродуктивные технологии) / под ред. В. И. Кулакова, Б. В. Леонова, Л. Н. Кузьмичева. М.: Медицинское информационное агентство, 2005. С. 53–60.
9. Боярский К. Ю., Гайдуков С. Н., Чинчаладзе А. С. Факторы, определяющие овариальный резерв // Журнал акушерства и женских болезней. 2009. № 58 (2). С. 65–71.

10. Буренкова Н. Б., Комличенко Э. В., Иванов А. В. Проблема выбора тактики лечения женщин со сниженным овариальным резервом // Репродуктивная медицина. 2014. № 3–4. С. 28–33.

11. Вестник РГМУ. Периодическое медицинское издание. М.: ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, 2013. Специальный выпуск № 2. 208 с.

12. Виноградова Л. В., Мишиева Н. Г., Сорвачева М. В., Абубакиров А. Н. Влияние преждевременной лютеинизации фолликулов на исходы программ ВРТ в циклах с антагонистами гонадотропин-рилизинг гормона // Акушерство и гинекология. 2013. № 3. С. 21–25.

13. Гармашева Н. Л., Константинова Н. Н. Патофизиологические основы охраны внутриутробного развития человека. Л.: Медицина, 1985. 158 с.

14. Гюльмамедова И. Д., Доценко О. С. Антимюллеров гормон как прогностический маркер контролируемой овариальной стимуляции. 4-е изд., перераб. и доп. М.: ГЕОТАР-Медиа, 2017. 145 с.

15. Дедов И. И., Мельниченко Г. А. Синдром поликистозных яичников: Руководство для врачей. М.: МИА, 2007. 361 с.

16. Довгань А. А. Особенности клинической характеристики женщин с репродуктивными потерями в анамнезе // Всеукраинский научно-практический журнал «Здоровье женщины». 2014. № 2 (88). С. 127–128.

17. Довгань А. А. Роль медико-социальных и психологических факторов в отягощенном репродуктивном анамнезе // Всеукраинский научно-практический журнал «Здоровье женщины». 2016. № 8 (114). С. 98.

18. Дыбан А. П., Баранов В. С. Оогенез млекопитающих // Современные проблемы оогенеза. М.: Наука, 1977. С. 200–233.

19. Захарова Н. Н., Дворянский С. А. Синдром поликистозных яичников // Вятский медицинский вестник. 2010. № 2. С. 3–8.

20. Иванов И. И., Попова-Петросян Е. В., Довгань А. А. Изменение овариального резерва при эндокринном бесплодии // Таврический медико-биологический вестник. 2017. № 2. С. 46–50.

21. Коган И. Ю., Гзгзян А. М., Лесик Е. А. Протоколы стимуляции яичников в циклах ЭКО: руководство для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2017. 128 с.

22. Крстич Е. В., Краснопольская К. В., Кабанова Д. И. Новые подходы к повышению эффективности ЭКО у женщин старшего репродуктивного возраста // Акушерство и гинекология. 2010. № 2. С. 48–53.

23. Кулаков В. И. Лечение женского и мужского бесплодия. М.: Медицинское информационное агентство, 2005. 592 с.

24. Курило Л. Ф. Динамика преобразования хромосом в профазе мейоза в оогенезе человека // Цитология. 1980. Т. 22, № 1. С. 154–160.

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

26. Меркулова А. И., Ниаури Д. А., Гзгзян А. М. и др. Повышенный уровень прогестерона в день введения триггера овуляции как предиктор неудачи имплантации в цикле ЭКО. 2014. № 8 (96). С. 24–30.

27. Милованов А. П. Патология системы мать-плацента-плод. М.: Медицина, 1999. 445 с.

28. Мотовилова Н. О., Коган И. Ю., Тотолян А. А. Секретия колониестимулирующих факторов в яичниках у больных с бесплодием в циклах ЭКО // Журнал акушерства и женских болезней. 2012. Вып. 3. С. 35–40.

29. Назаренко Т. А., Мишиева Н. Г., Фанченко Н. Д. Роль антимюллера гормона в оценке овариального резерва // Проблемы репродукции. 2005. №. С. 5–10.

30. Овариальный резерв и фертильность: сложности XXI века // Рациональный подход к сохранению репродуктивного резерва как залог

фертильности и осознанного деторождения. Информационное письмо / под ред. В. Е. Радзинского. М.: StatusPraesens, 2015. 24 с.

31. Пайкачева Ю.М. Профилактика и лечение невынашивания беременности у женщин после ЭКО. СПб., 2000. 23 с.

32. Позднякова А. А., Жахур Н. А., Ганичкина М. Б., Марченко Л. А. Новое в лечении бесплодия при преждевременной недостаточности яичников // Акушерство и гинекология. 2015. № 7. С. 26–32.

33. Попова-Петросян Е. В. Изменение гормонального фона у женщин с идиопатическим бесплодием в разных возрастных группах // Актуальные проблемы медицины в России и за рубежом: Сборник научных трудов по итогам III международной научно-практической конференции. 2017. С. 9–12.

34. Попова-Петросян Е. В. Перспективы восстановления фертильности женщин с эндометриозом // Актуальные вопросы современной медицины: Сборник научных трудов по итогам международной научно-практической конференции. 2017. С. 27–29.

35. Попова-Петросян Е. В., Довгань А. А. Изменение овариального резерва в зависимости от возраста // Информационные технологии в медицине и фармакологии: Сборник научных трудов по итогам международной научно-практической конференции. 2017. С. 7–9.

36. Репродуктивная медицина // Научно–практический журнал Казахстанской Ассоциации репродуктивной медицины. 2013. № 2 (15). 28 с.

37. Савельева Е. М., Перминова С. Г., Демура Т. А., Стрельченко Д. А. Влияние поддержки лютеиновой фазы агонистом гонадотропин-рилизинг гормона на рецептивность эндометрия и исходы программы экстракорпорального оплодотворения // Гинекология. 2016. № 3. С. 48–53.

38. Тотчиев Г. Ф., Котиков Н. П., Семятов С. Д., Токтар Л. Р. Менопауза. Современные аспекты прогнозирования // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2012. № 5. С. 494–499.

39. Филиппова Е. С., Козаченко И. Ф., Быков А. Г., Бобров М. Ю., Адамян Л. В. Современный взгляд на овариальный резерв у женщин

репродуктивного возраста с эндометриоидными кистами яичников // Проблемы репродукции. 2017. № 23 (2). С. 72–80.

40. Шамилова Н. Н. Клинико-прогностическое значение молекулярно-биологических маркеров при преждевременной недостаточности яичников: дисс. ...канд. мед. наук. М., 2009. 202 с.

41. Эдлер К., Дэйл Б. Экстракорпоральное оплодотворение. Пер. с англ. М.: МЕДпресс-информ, 2008. 211 с.

42. Alarcon V. B., Marikawa Y. Spatial alignment of the mouse blastocyst axis across the first cleavage plane is caused by mechanical constraint rather than developmental bias among blastomeres // Molecular Reproduction and Development. 2008. V. 75. P. 1143–1153.

43. Anti-Müllerian hormone protein expression is reduced during the initial stages of follicle development in human polycystic ovaries / Stubbs S. A. [et al.] // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2005. Vol. 90. P. 5536–5543.

44. Anti-Müllerian hormone-based approach to controlled ovarian stimulation for assisted conception / Nelson S. M. [et al.] // Hum. Reprod. 2009. Vol. 24. P. 867–87.

45. Artus J, Hadjantonakis A. K. Generation of chimeras by aggregation of embryonic stem cells with diploid or tetraploid mouse embryos // Methods Mol Biol. 2011. V. 693. P. 37–56.

46. Ashkin A. Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime // Biophysical Journal. 1992. V. 61. P. 569–582.

47. Ashkin A. Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 4853–4860.

48. Ashkin A., Dziedzic J. M. Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria // Science. 1987. V. 235. P. 1517–1520.

49. Basal level of anti-Müllerian hormone is associated with oocyte quality in stimulated cycles / Ebner T. [et al.] // Hum. Reprod. 2006. Vol. 21. P. 2022–2026.

50. Bider D, Livshits A, Yonish M, Yemini Z, Mashiach S, Dor J. Assisted hatching by zona drilling of human embryos in women of advanced age // *Hum Reprod*. 1997. V. 12. P. 317–320.

51. Boada M., Carrera M., De La Iglesia C., Sandalinas M., Barri P. N., Veiga A. Successful use of a laser for human embryo biopsy in preimplantation genetic diagnosis: report of two cases // *J Assist Reprod Genet*. 1998. V. 15. P. 302–307.

52. Buican T. N., Smyth M. J., Crissman H. A., Salzman G. C., Stewart C. C., Martin J. C. Automated single-cell manipulation and sorting by light trapping. // *Appl Opt*. 1987. V. 26, № 24. P. 5311–5316.

53. Carlson B. M. *Human embryology and developmental biology*. Fourth edition. Mosby Inc. 2009.

54. Chan S. A., Lin S. W., Yu K. J., Liu T. Y., Fuh M. R. Quantitative analysis of isoflavone aglycones in human serum by solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *Talanta*. 2006. V. 69, № 4. P. 952–956.

55. Chen S. U., Chang C. Y., Lu C. C., Hsieh F. J., Ho H. N., Yang Y.S. Microtubular spindle dynamics and chromosome complements from somatic cell nuclei haploidization in mature mouse oocytes and developmental potential of the derived embryos // *Hum Reprod*. 2004. V. 19, № 5. P. 1181–1188.

56. Daniel J. C. Jr., Takahashi K. Selective laser destruction of rabbit blastomeres and continued cleavage of survivors in vitro // *Exp Cell Res*. 1965. V. 39. P. 475–482.

57. De Vos A., Van Steirteghem A. Aspects of biopsy procedures prior to preimplantation genetic diagnosis // *Prenatal diagnosis*. 2001. V. 21. P. 767–780.

58. Dholakia K., MacDonald M. P., Zemánek P., Cizmár T. Cellular and colloidal separation using optical forces // *Methods Cell Biol*. 2007. V. 82. P. 467–495.

59. Dholakia K., Reece P. Optical micromanipulation takes hold // *Nano Today*. 2006. V. 1. P. 18–27.

60. Dokras A., Sargent I. L., Ross C., Gardner R. L., Barlow D. H. Trophectoderm biopsy in human blastocysts // *Hum Reprod.* 1990. V. 5. P. 821–825.

61. Ehrlicher A., Betz T., Stuhmann B., Koch D., Milner V., Raizen M. G., Kas J. Guiding neuronal growth with light // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002. V. 99. № 25. P. 16024–16028.

62. Endocrine features of menstrual cycles in middle and late reproductive age and the menopausal transition classified according to the Staging of Reproductive Aging Workshop (STRAW) staging system / Hale G. E. [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007. Vol. 92, № 8. P. 3060–3067.

63. Enger J., Goksör M., Ramser K., Hagberg P., Hanstorp D. Optical tweezers applied to a microfluidic system // *Lab Chip.* 2004. V.4. № 3. P. 196–200.

64. Evaluation of anti-Müllerian hormone as a test for the prediction of ovarian reserve / Kwee J. [et al.] // *Fertil. Steril.* 2008. Vol. 90, № 3. P. 737–743.

65. Inhibin B and anti-Müllerian hormone: markers of ovarian response in IVF/ICSI patients? / Muttukrishna S. [et al.] // *BJOG.* 2004. Vol. 111. P. 1248–1253.

66. Serum anti-Müllerian hormone dynamics during controlled ovarian hyperstimulation / Fanchin R. [et al.] // *Hum. Reprod.* 2003. Vol. 18, № 2. P. 328–332.

67. Serum anti-Müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve / van Rooij I. A. [et al.] // *Hum. Reprod.* 2002. Vol. 17. P. 3065–3071.

68. Serum antimüllerian hormone/müllerian-inhibiting substance appears to be a more discriminatory marker of assisted reproductive technology outcome than follicle-stimulating hormone, inhibin B, or estradiol / Hazout A. [et al.] // *Fertil. Steril.* 2004. Vol. 82. P. 1323–1329.

69. Tal R., Seifer D. B. Ovarian reserve testing: a user's guide. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2017. 217 (2). P. 129–40.

70. Undetectable serum anti-Müllerian hormone levels and occurrence of ongoing pregnancy / Fraisse T. [et al.] // *Fertil. Steril.* 2008. Vol. 89, № 3. P. 723.

71. Wallace W. H., Kelsey T. W. Human ovarian reserve from conception to the menopause. *PLoS One.* 2010. № 5 (1). P. 8772.