

ОСОБЕННОСТИ РЕАКЦИИ ЖЕНСКОЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ НА СТИМУЛЯЦИЮ СУПЕРОВУЛЯЦИИ В ЦИКЛЕ ЭКО

УДК 612.621.9

Поступила 25.11.2010 г.



Н.В. Хрулева, соискатель кафедры нормальной физиологии им. Н.Ю. Беленкова¹, врач²;
Т.Г. Щербатюк, д.б.н., профессор, зав. кафедрой биологии¹;
Ю.П. Потехина, д.м.н., профессор кафедры нормальной физиологии им. Н.Ю. Беленкова¹

¹Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород;

²ООО «Аист-НН», Н. Новгород

Цель исследования — изучение патофизиологических особенностей реакции женской репродуктивной системы на стимуляцию суперовуляции.

Материалы и методы. Проведен анализ результатов обследования 70 женщин, страдающих бесплодием, и их лечения методом экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). При пункции фолликулов измеряли объем фолликулярной жидкости из каждого фолликула и исследовали показатели свободно-радикального баланса методом индуцированной хемилюминесценции.

Результаты. Установлено, что активация свободно-радикального окисления является признаком доминантных фолликулов, из которых получают наиболее качественные ооциты. Выявлено, что в цикле ЭКО наиболее соответствующими признакам доминантных являются не самые большие фолликулы, а средние — объемом 2,0—4,5 мл. Показателем «физиологического» ответа репродуктивной системы на стимуляцию суперовуляции является большой разброс уровней свободно-радикального окисления в фолликулярной жидкости, взятой из разных фолликулов.

Ключевые слова: фолликулярная жидкость, экстракорпоральное оплодотворение, свободно-радикальное окисление, доминантный фолликул.

English

Peculiarities of a female reproductive system response to the superovulation stimulation in the IVF cycle

N.V. Khrulyova, Post-graduate of the Normal Physiology Department after N.Yu. Belenkov¹, Physician²;
T.G. Sherbatyuk, PhD, Professor, the Normal Physiology Department after N.Yu. Belenkov¹;
Yu.P. Potekhina, MD, Professor, the Normal Physiology Department after N.Yu. Belenkov¹

¹Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod;

²“Aist-NN” LLC, Nizhny Novgorod

The aim of the investigation is to study pathophysiologic peculiarities of the female reproductive system response to the superovulation stimulation.

Materials and methods. The analysis of examination results of 70 females with sterility and their treatment with the in vitro fertilization (IVF) method has been made. A follicular fluid volume was measured from each follicle in the follicle paracentesis and the free-radical balance values were investigated with a method of induced chemiluminescence.

Results. Activation of the free-radical oxidation appears to be a sign of dominant follicles, from which the most qualitative oocytes are received. It is revealed, that the average follicles with a 2,0—4.5 ml volume are the most corresponding sign of the dominant ones in the IVF cycle. A great variety of free-radical oxidation levels in a follicular fluid taken from different follicles is a sign of a reproductive system “physiologic” response to the superovulation stimulation.

Key words: follicular fluid, in vitro fertilization, free-radical oxidation, dominant follicle.

Для контактов: Потехина Юлия Павловна, тел. моб. +7 910-880-50-81; e-mail: newtmed@gmail.com.

Важнейшим достижением в лечении бесплодия явилось внедрение в клиническую практику методов экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). Стимуляция суперовуляции в цикле ЭКО проводится на фоне существующих структурно-функциональных изменений женской репродуктивной системы. При этом происходит созревание гораздо большего количества фолликулов, чем во время физиологического менструального цикла. Однако далеко не всегда удается получить ооциты надлежащего качества, а затем добиться наступления беременности и рождения ребенка. Эффективность ЭКО в настоящее время не превышает 35—40%, около трети всех беременностей прерываются на ранних сроках [1]. Причины отрицательных результатов часто остаются неизвестными.

Фолликулярная жидкость (ФЖ) — это биологическая жидкость, которая синтезируется фолликулярным эпителием, расположенным вокруг ооцита второго порядка. Она является микроокружением развивающегося ооцита. Избыток или недостаток биологически активных веществ в ФЖ оказывает на развитие ооцита негативное влияние [2]. Чаще всего в ФЖ определяют содержание половых гормонов и других биологически активных веществ [3]. Данных об уровне показателей свободно-радикального окисления в ФЖ в доступной литературе не обнаружено.

Цель исследования — изучение патофизиологических особенностей реакции женской репродуктивной системы на стимуляцию суперовуляции.

Материалы и методы. Работа основана на анализе результатов тщательного обследования и лечения 70 женщин, страдающих бесплодием, возраст которых варьировал от 25 до 38 лет (Me — 32 года). Индукцию суперовуляции в лечебных циклах ЭКО осуществляли по стандартным протоколам. Трансвагинальную пункцию фолликулов размером 1 см и более проводили под ультразвуковым контролем.

Полученную при пункции фолликулов ФЖ помещали в гепаринизированные градуированные пробирки, измеряли ее объем из каждого фолликула. Всего было исследовано 235 проб ФЖ. Показатели свободно-радикальной активности и общей антиоксидантной активности (АОА) исследовали методом индуцированной хемилюминесценции на биохемилюминометре БХЛ-06, сопряженном с компьютером. Измеряли I_{max} — максимальную интенсивность свечения исследуемой пробы (мВ), отражающую свободно-радикальную активность образца, и S — светосумму хемилюминесценции за определенное время, значение которой обратно пропорционально общей АОА пробы [4].

Ооциты культивировали в 4-луночных планшетах в среде IVF (ф. MediCult, Дания). Через 18—20 ч после оплодотворения ооциты исследовали на наличие пронуклеусов на инвертированном микроскопе при увеличении 400. Дальнейшую оценку дробления яйцеклетки и качества эмбрионов проводили через 46—48 ч культивирования. Рассчитывали индекс оплодотворения (ИО) по следующей формуле:

$$\text{ИО} = \frac{\text{число оплодотворенных яйцеклеток}}{\text{общее число ооцитов}} \times 100\%$$

Перенос эмбрионов проводили под ультразвуковым контролем на 3-й или 5-й день культивирования. Для переноса отбирали эмбрионы с наиболее высокой оценкой их качества. Наступление клинической беременности диагностировали через 3—4 нед после переноса эмбрионов при ультразвуковом исследовании по наличию плодного яйца в полости матки. У 24 женщин наступила беременность (34%), у 46 — нет.

Математическую обработку полученных результатов проводили методами непараметрической статистики с помощью программ Microsoft Excel и Statistica 6.0 [5].

Результаты и обсуждение. Из данных свободно-радикального баланса ФЖ (табл. 1) видно, что у пациенток, у которых наступила беременность, АОА фолликулярной жидкости статистически значимо ниже, чем у пациенток другой группы, и свободно-радикальный баланс сдвинут в сторону преобладания свободно-радикального окисления над АОА.

Известно, что в фолликуле перед овуляцией накапливаются провоспалительные факторы, а некоторые исследователи даже называют эти процессы «физиологическим воспалением» [6]. Результаты тестов, показывающих уровень свободно-радикального окисления, характеризуют активность воспалительного процесса. Можно предположить, что активация свободно-радикального окисления в ФЖ женщин, у которых затем наступила беременность, свидетельствует о подготовке фолликулов к овуляции.

В физиологическом менструальном цикле созревает только один доминантный фолликул, гораздо реже — два. Следовательно, только в доминантном фолликуле происходит активация процессов, ведущих к овуляции. То есть состав ФЖ этого фолликула должен значительно отличаться от остальных, которые подвергаются атрезии. В цикле ЭКО при стимуляции суперовуляции растут несколько фолликулов, однако остается открытым вопрос о том, насколько физиологичен этот процесс.

У обследованных нами женщин в цикле ЭКО были пропунктированы с целью получения яйцеклеток все фолликулы, достигшие размеров 1 см. Мы попытались установить, насколько велик разброс показателей свободно-радикального окисления в ФЖ, взятой из фолликулов у одной женщины. С этой целью для каждого показателя находили максимальное и минимальное

Таблица 1

Сравнение показателей свободно-радикального баланса фолликулярной жидкости при разных результатах ЭКО

Показатель	Беременности нет	Беременность наступила	Отличие по критерию Манна—Уитни
I _{max} , мВ	0,68—2,04 Me — 1,6	1,04—2,08 Me — 1,68	p=0,08
АОА	0,09—2,0 Me — 0,4	0,11—1,0 Me — 0,33	p=0,03
I _{max} /АОА	0,81—11,3 Me — 3,93	0,89—16,7 Me — 4,94	p=0,02

Таблица 2

Сравнение коэффициентов разброса показателей свободно-радикального баланса в фолликулярной жидкости при разных результатах ЭКО

Показатель	Беременности нет	Беременность наступила	Отличие по критерию Манна–Уитни
$KP_{I_{max}}$ МВ	0,053—0,57 Me — 0,22	0,14—0,85 Me — 0,32↑	$p=0,047$
KP_{AOA}	0,006—0,037 Me — 0,019	0,012—0,18 Me — 0,028↑	$p=0,021$

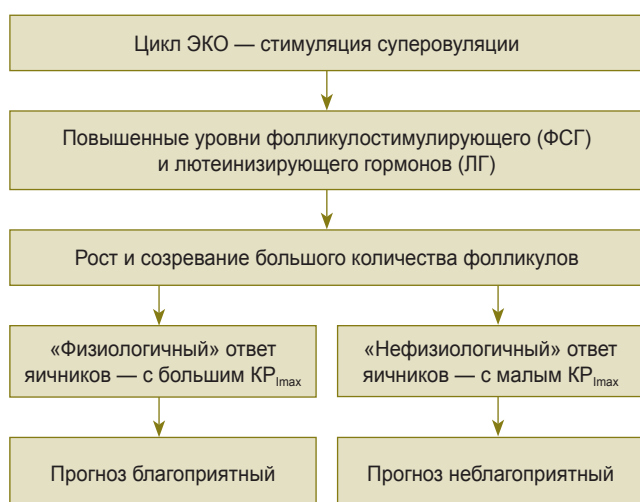


Рис. 1. Варианты ответа яичников на стимуляцию суперовуляции

значения, а затем между ними вычисляли разницу — коэффициент разброса (КР):

$$KP_{I_{max}} = \text{макс } I_{max} - \text{мин } I_{max};$$

$$KP_{AOA} = \text{макс } AOA - \text{мин } AOA.$$

Коэффициенты разброса показателей свободно-радикального баланса статистически значимо больше были у женщин, у которых после цикла ЭКО наступила беременность (табл. 2). Следовательно, у этих женщин действительно выделились один-два фолликула, созревание которых в большей степени соответствовало физиологическому.

Таким образом, исследование показывает, что в программе ЭКО могут наблюдаться различные реакции женской репродуктивной системы на стимуляцию суперовуляции (рис. 1).

В норме доминантный фолликул выделяется своими большими размерами и перед овуляцией достигает 18—20 мм в диаметре [7]. Можно предположить, что при стимуляции суперовуляции в цикле ЭКО наиболее зрелые ооциты находятся в самых больших фолликулах. В литературе указано, что пункцию преовуляторных фолликулов нужно проводить, когда они достигают диаметра 18—20 мм [1]. Фолликул представляет собой сферу, толщиной стенки

которой можно пренебречь, поэтому если рассчитать объем фолликула по формуле для объема шара, то диаметру 18—20 мм соответствует объем содержащейся в фолликуле ФЖ, равный 3—4 мл. Мы разделили все пропунктированные фолликулы на три группы по объему ФЖ и сравнили их по результатам ЭКО:

- 1) 19,5% проб — объем ФЖ менее 2 мл (0,5—1,5 мл, Me — 1 мл), беременность наступила в 23% случаев;
- 2) 61,7% проб — объем ФЖ от 2 до 4,5 мл (2—4,5 мл, Me — 3 мл), беременность наступила в 58% случаев;
- 3) 18,8% проб — объем ФЖ 5 мл и более (5—11 мл, Me — 6 мл), беременность наступила в 37,5% случаев.

Из этих результатов следует, что при индукции суперовуляции самые большие фолликулы не являются «доминантными». Именно самые большие фолликулы чаще оказываются пустыми, именно из них чаще всего получают некачественные ооциты. Сравнение этих трех групп по значению ИО показало статистически значимые различия (рис. 2). Обращает на себя внимание наибольший ИО в фолликулах среднего размера (Me — 45%) и наименьший ИО в фолликулах объемом 5 мл и более (Me — 23%).

Анализ связи показателей свободно-радикального баланса ФЖ с объемом фолликулов (табл. 3) показал следующее:

самый высокий уровень свободно-радикального окисления наблюдается в фолликулах средних размеров, самый низкий — в больших фолликулах, этот показатель коррелирует с ИО: $r=0,4$; $p=0,03$;

повышение индекса I_{max}/AOA в средних по объему фолликулах обусловлено активацией свободно-радикального окисления, а в больших — снижением AOA.

По-видимому, именно уровень свободно-радикального окисления свидетельствует о том, что фолликул имеет свойства доминантного и готовится к овуляции. Фолликулы средних размеров в наибольшей степени соответствуют характеристикам доминантных. Маленькие фолликулы, объемом меньше 2 мл, чаще всего

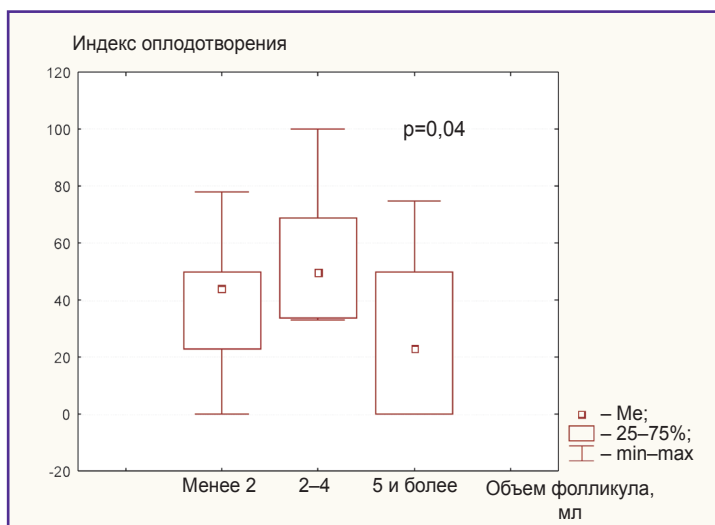


Рис. 2. Сравнение индекса оплодотворения в разных по объему фолликулах

Таблица 3

Сравнение показателей свободно-радикального баланса в разных по объему фолликулах

Показатель	Объем фолликула, мл			Отличие по критерию Крускала–Уоллеса
	менее 2	2–4,5	5 и более	
I _{max} , мВ	1,28—2,01 Me — 1,61	1,17—2,08 Me — 1,67	1,05—1,88 Me — 1,5	p=0,025
АОА	0,67—2,0 Me — 1,0	0,22—0,50 Me — 0,33	0,09—0,20 Me — 0,17	p<0,001
I _{max} /АОА	0,81—5,05 Me — 2,86	2,04—7,48 Me — 5,64	6,2—16,7 Me — 8,7	p<0,001

имеют незрелый ооцит, т.е. находятся в процессе роста. Фолликулы объемом 5 мл и более часто содержат ооциты, практически не способные к дальнейшему делению. В ФЖ этих фолликулов наблюдается наименьший уровень свободно-радикального окисления, т.е., несмотря на их большие размеры, биохимические сдвиги в ФЖ, свидетельствующие об их готовности к овуляции, выражены слабее.

Заключение. Активация свободно-радикального окисления является признаком доминантных фолликулов, из которых получают наиболее качественные ооциты. В цикле ЭКО наиболее соответствуют признакам доминантных не самые большие фолликулы, а средние — объемом 2,0—4,5 мл. Показателем «физиологического» ответа репродуктивной системы на стимуляцию суперовуляции является большой разброс уровня свободно-радикального окисления в фолликулярной жидкости, взятой из разных фолликулов.

Литература

1. Практическая гинекология. Под ред В.И. Кулакова, В.Н. Прилепской. М: МЕДпресс-информ; 2001; 720 с.
2. Яманова М.В., Светлаков А.В., Салмина А.Б., Пожиленкова Е.А., Гончарова Л.Л. Микроокружение ооцитов при эндокринном бесплодии. Проблемы репродукции 2004; 4: 17—20.
3. Баркалина Н.В. Фолликулярная жидкость и прогноз исходов программ ВРТ. Проблемы репродукции 2006; 6: 57—64.
4. Кузьмина Е.И., Нелюбин А.С., Щенникова М.К. Применение индуцированной хемилюминесценции для оценки свободно-радикальных реакций в биологических субстратах. В кн.: Межвузовский сборник биохимии и биофизики микроорганизмов. Горький; 1983; с. 179—183.
5. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение прикладных программ STATISTICA. М: МедиаСфера; 2002; 312 с.
6. Arici A., Oral E., Bukulmez O. et al. IL-8 expression and modulation in human preovulatory follicles and ovarian cells. Endocrinology 1996; 12: 1233—1239.
7. Манухин И.Б., Тумилович Л.Г., Геворкян М.А. Клинические лекции по гинекологической эндокринологии. М: Медицинское информационное агентство; 2001; 247 с.