

©М. О. Щербина, О. П. Ліпко, О. Г. Граділь

Харківський національний медичний університет

МЕТОДИКИ ПОКРАЩЕННЯ ОВАРІАЛЬНОЇ ВІДПОВІДІ ПРИ ЗНИЖЕНИХ ПОКАЗНИКАХ ОВАРІАЛЬНОГО РЕЗЕРВУ

МЕТОДИКИ ПОКРАЩЕННЯ ОВАРІАЛЬНОЇ ВІДПОВІДІ ПРИ ЗНИЖЕНИХ ПОКАЗНИКАХ ОВАРІАЛЬНОГО РЕЗЕРВУ. Вивчено вміст мелатоніну і 8-ізопростану в сироватці крові та фолікулярній рідині на тлі оваріальної стимуляції у 66 пацієнток, що страждають від безпліддя, які були поділені на 2 рівноцінні групи. Контрольну групу склали 33 здорові жінки репродуктивного віку. Виявлено, що мелатонін має виражену антиоксидантну дію, тим самим збільшує кількість отриманих ооцитів у поганих відповідачів, а 8-ізопростан є достовірним показником окислювального стресу і роботи антиоксидантної системи в сироватці крові та фолікулярній рідині. Використання антагоністів і агоністів гонадотропних рилізінг-гормонів з метою індукції суперовуляції веде до посилення процесів окислювального стресу у фолікулярній рідині.

МЕТОДИКИ УЛУЧШЕННЯ ОВАРІАЛЬНОГО ОТВЕТА ПРИ СНИЖЕНИИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОВАРІАЛЬНОГО РЕЗЕРВА. Изучено содержание мелатонина и 8-изопростана в сыворотке крови и фолликулярной жидкости на фоне контролируемой овариальной стимуляции у 66 пациенток, страдающих бесплодием, которые были разделены на 2 равноценные группы. Контрольную группу составили 33 здоровые женщины репродуктивного возраста. Обнаружено, что мелатонин оказывает выраженное антиоксидантное действие, тем самым увеличивает количество полученных ооцитов у плохих ответчиков, а 8-изопростан является достоверным показателем окислительного стресса и работы антиоксидантной системы в сыворотке крови и фолликулярной жидкости. Использование антагонистов и агонистов гонадотропных рилизинг-гормонов с целью индукции суперовуляции ведет к усилению процессов окислительного стресса в фолликулярной жидкости.

METHODS TO IMPROVE OVARIAN RESPONSE WHILE REDUCING THE INDICATORS OF OVARIAN RESERVE. There was studied the content of melatonin and 8-isoprostan in serum and follicular fluid on the background of ovarian stimulation in 66 patients who suffer from infertility, who were divided into 2 equal groups. The control group comprised 33 healthy women of reproductive age. It was found that melatonin has a strong antioxidant effect, thereby increasing the number of oocytes obtained in poor responders and 8-isoprostan a reliable indicator of oxidative stress and antioxidant system in blood serum and follicular fluid. The use of antagonists and agonists of gonadotropin releasing hormone for the purpose of inducing superovulation leads to increased oxidative stress processes in follicular fluid.

Ключові слова: безпліддя, окислювальний стрес, мелатонін, 8-ізопростан, оваріальна стимуляція, екстракорпоральне запліднення, ЕКЗ.

Ключевые слова: бесплодие, окислительный стресс, мелатонин, 8-изопростан, овариальная стимуляция, экстракорпоральное оплодотворение, ЭКО.

Key words: infertility, oxidative stress, melatonin, 8-isoprostan, ovarian stimulation, in vitro fertilization, IVF.

ВСТУП. Актуальність вдосконалення допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ) обумовлена зростанням жіночого безпліддя та погіршенням демографічної ситуації. Найпоширенішою методикою визнане екстракорпоральне запліднення (ЕКЗ). Загальновідомо, що однією з важливіших умов для успішного проведення ЕКЗ є ефективна контрольована оваріальна стимуляція (КОС) та отримання достатньої кількості зрілих яйцеклітин. Бажання сучасної жінки народити в якомога пізнішому віці ускладнюється можливостями її репродуктивної системи. Це можливо лише при умові збереженого репродуктивного потенціалу – оваріального резерву (ОР), показника, що відображає величину фолікулярного пулу яєчників і якість ооцитів [1, 2]. При його виснаженні стандартні протоколи ЕКЗ малодієві та потребують удосконалення.

Під ОР розуміють функціональний резерв яєчника, який визначає його здатність до розвитку здорового фолікула з повноцінною яйцеклітиною і адекватною відповіддю на КОС [2, 3]. Найважливішим

фізіологічним фактором, що визначає ОР, є вік жінки, але він не завжди є абсолютним критерієм, що впливає на кінцевий результат. Визначаючими факторами можуть стати індивідуальні особливості, що пов'язані з часом настання менархе та менопаузи, генетичні фактори, перенесені захворювання, що супроводжуються порушенням кровообігу в яєчниках, такі, як хронічний сальпінгоофорит, новоутворення, злуква хвороба, оперативні втручання, зокрема операції на яєчниках. Це підкреслює необхідність індивідуального підходу до оцінки репродуктивного віку, та застосування доступних, ефективних та простих у використанні методик оцінки стану оваріального резерву. Серед запропонованих тестів звертають на себе увагу визначення рівнів фолікулостимулюючого гормону (ФСГ), антимюллерового гормону (АМГ) у сироватці крові, підрахунок числа антральних фолікулів (ЧАФ) та об'єму яєчників за допомогою трансвагінальної ехографії [4, 7].

Згідно з останніми дослідженнями при дозріванні яйцеклітини у фолікулярній рідині відбувається акти-

вація окислювальних процесів, при індукції супер-овуляції перекисне окислення ліпідів і білків збільшується в десятки разів. В даний час відомо, що окислювальний стрес (ОС) супроводжується руйнівною цитотоксичною дією, активацією апоптозу [5]. Загальновідомим маркером ОС є 8-ізопростан, що виробляється кисневими радикалами при окисненні фосфоліпідів тканин. Генерація вільних радикалів навіть при мінімальних проявах ОС є мембранопорушуючим фактором. Тому дуже важливо при проведенні оваріальної стимуляції забезпечити високий рівень антиоксидантного захисту організму. Для оцінки роботи антиоксидантної системи (АОС) використовують різноманітні критерії, при проведенні КОС найбільший інтерес викликає вивчення рівнів мелатоніну (МЛТ) у сироватці крові та фолікулярній рідині. Мелатонін – це гормон шишкоподібної залози, що секретується в нічний час доби і регулює цілий ряд важливих центральних і периферичних функцій [6]. На додаток до опосередкованого рецепторного впливу, активно вивчається дія мелатоніну в якості прямого інгібітора вільних радикалів, що значно розширює розуміння його механізмів дії, які приносять користь репродуктивній фізіології. Новітні дослідження повідомляють, що під час проведення КОС вміст мелатоніну у фолікулярній рідині у декілька разів перевищує його рівень у сироватці крові [6], що обумовлює протекторний вплив на зріючу яйцеклітину, зменшуючи рівень ОС, і потребує подальшого вивчення.

Метою нашого дослідження стало підвищення результативності методик ДРТ, шляхом покращення оваріальної відповіді при знижених показниках ОР, за рахунок вивчення та корекції процесів окиснювального стресу у фолікулярній рідині під час дозрівання яйцеклітини.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. У дослідженні взяли участь 99 жінок репродуктивного віку, без супутньої соматичної патології. 66 з безпліддям, вибірково трубно-перитонеального генезу, що склали основну групу, залежно від лікувальної схеми, були поділені порівну на I та II групи. 33 здорові жінки, що звернулися з метою донорства яйцеклітини, склали контрольну III групу. Усі пацієнтки основної групи мали ті чи інші показники зниженого ОР, і були включені в дослідження за наявності мінімум одного з болонських критеріїв «поганих відповідачів»: пізній репродуктивний вік, отримання 3 і менше ооцитів у попередніх циклах ЕКЗ, зниження показників оваріального тесту: АМГ менше 1,0 нг/мл, ЧАФ менше 5 у кожному яєчнику згідно з УЗД.

Методом випадкового поділу «погані відповідачі» поділені на 2 рівні групи. У I групі (n = 33) середній вік склав 36,61±4,54 року, тривалість безпліддя склала 8,64 ± 4,41 року, індекс маси тіла 24±3,54. Цій групі пацієнток була проведена КОС без попередньої гормональної підготовки з використанням антагоністів гонадотропних рилізінг-гормонів (ант-ГтРГ) в 69,7 % (n = 23), агоністів ГтРГ 30,3 % (n = 10). У II групі (n = 33) середній вік склав 35,30±5,13 року, тривалість безпліддя склала 9,97±5,16 року, індекс маси тіла 24,26±5,34, використовувався протокол з ант-ГтРГ у 81,8 % (n = 27), агоністами ГтРГ у 18,18 % (n = 6).

Враховуючи потужний антиоксидантний ефект мелатоніну, з метою зниження шкідливого впливу окислювального стресу на зріючу яйцеклітину, пацієнтки цієї групи отримували превентивний курс гормонотерапії: мелатонін у таблетках по 3 мг, за схемою 1,5 мг вранці та 3 мг ввечері протягом 4 тижнів, що передували початку стимуляції.

Усім пацієнткам згідно зі стандартним протоколом проводилось визначення рівня гормонів функціонування репродуктивної системи, щитовидної та надниркової залози. З метою оцінки ОР виконувалось визначення АМГ.

Для оцінки мелатонінутворюючої функції епіфіза визначали концентрацію мелатоніну в сироватці крові, взятої з кубітальної вени в 6.00 ранку натщесерце до проведення КОС. Одномоментно проводився набір крові для визначення концентрації 8-ізопростану. При отриманні яйцеклітин під час трансвагінальної пункції також визначався рівень мелатоніну та 8-ізопростану у фолікулярній рідині. Визначення концентрації мелатоніну (МЛТ) і 8-ізопростану проводилося імуноферментними методами з використанням наборів Melatonin ELISA Kit, 8-Isoprostane EIA Kit, IBL (Німеччина). Оскільки відомо, що продукція мелатоніну починається тільки з фази глибокого сну (п'ята фаза), усі пацієнтки дотримувалися стандартного режиму сну (8 годин за відсутності освітлення), та збалансованого харчування.

Отримані дані були статистично оброблені з обчисленням середнього арифметичного значення, середньоквадратичного відхилення. Достовірність відмінностей між групами визначалася за допомогою t-критерію Стьюдента. Відмінності вважали статистично значущими при p<0,05. Всі обчислення проводили з використанням програмного забезпечення Exel XP, Statistica-6.0.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ. В обстежених групах нами було виявлено статистично значущі відмінності в гормональних показниках, а саме ФСГ, АМГ, МЛТ у сироватці крові, МЛТ та 8-ізопростан у фолікулярній рідині. Середні рівні МЛТ у сироватці крові у «поганих відповідачів» на старті протоколу у I і II групах склали 20,94±4,42 пг/мл та 24,78±4,75 пг/мл відповідно, що є в 1,85 і 1,54 раза нижче контрольної групи 37,05±3,32 пг/мл, p<0,001. Середні рівні МЛТ у фолікулярній рідині у «поганих відповідачів» у I і II групах склали 28,92±8,14 пг/мл та 33,66±9,66 пг/мл відповідно, порівняно з контрольною групою 66,29±6,12 пг/мл, p<0,001.

Рівні МЛТ у фолікулярній рідині мали сильний зворотний кореляційний зв'язок з показниками окиснювального стресу (рис. 1, 2) у вигляді рівнів 8-ізопростану у фолікулярній рідині, що складала в I групі 363±64,38 пг/мл, в II групі 318,98±83,17 пг/мл, у контрольній групі 188,01±10,5 пг/мл.

Звертають на себе увагу достовірні відмінності показників, що відображають стан оваріального резерву жінки, ФСГ і АМГ в I і II групах порівняно з контрольною. Високі показники ФСГ визначались у «поганих відповідачів» у I і II групах 12,97±10,05 мМО/мл і 9,28±3,53 мМО/мл відповідно, що майже в 2 рази вище, ніж у здорових жінок 5,1±1,91 мМО/мл, p<0,001.

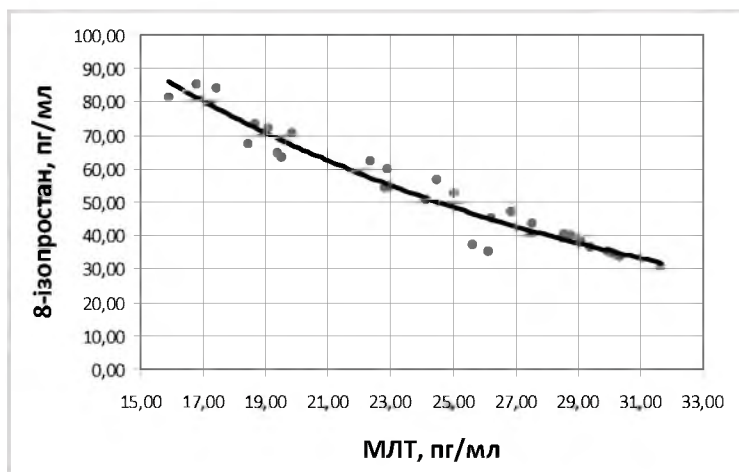


Рис. 1. Відношення рівня мелатоніну до рівня 8-ізопростану в сироватці крові в I групі.

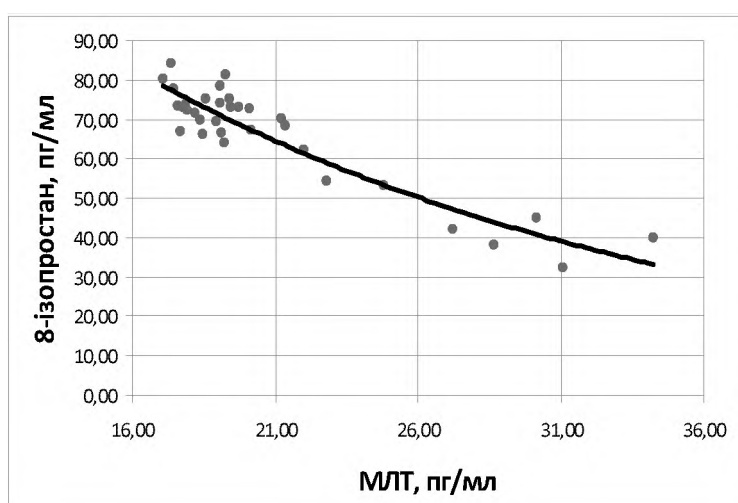


Рис. 2. Відношення рівня мелатоніну до рівня 8-ізопростану в сироватці крові в II групі.

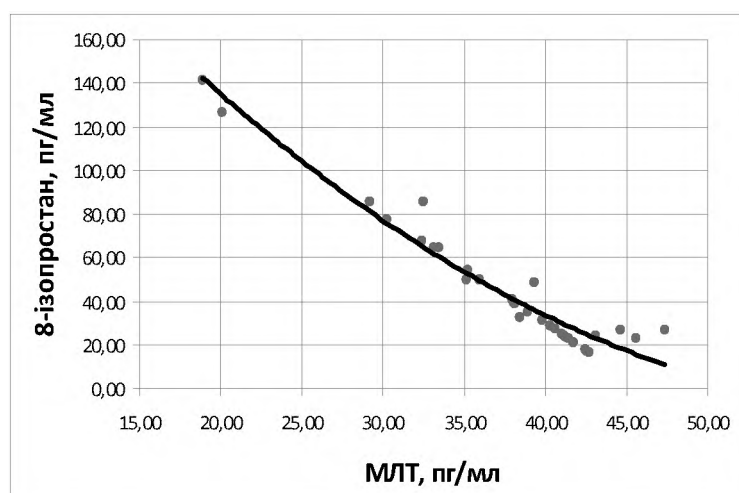


Рис. 3. Відношення рівня мелатоніну до рівня 8-ізопростану в сироватці крові в III групі.

Рівні ФСГ мали зворотну кореляційну залежність з рівнем АМГ у цих же групах. При рівнях АМГ більше 1,1 нг/мл у більшості випадків спостерігалась достатня відповідь на КОС.

Після проведення КОС кількість яйцеклітин, отриманих під час пункції, у «поганих відповідачів» в I групі ($1,85 \pm 0,44$) в 2,7 раза нижче, ніж у пацієток, які отримували превентивну терапію мелатоніном

(5,15±0,67), і в 9,7 раза нижче за контрольну групу (18,06±1,66), $p < 0,001$.

ВИСНОВКИ. Використання ант-ГТРГ і агоністів ГТРГ з метою індукції суперовуляції веде до посилення процесів окиснювального стресу у фолікулярній рідині, які шкідливо впливають на яйцеклітину, тим самим знижуючи результативність ЕКЗ. 8-ізопростан достовірний показник окиснювального стресу та роботи антиоксидантної системи, його вміст має зворотну кореляційну залежність з рівнями МЛП та кількістю отриманих яйцеклітин після КОС. Мелатонін має виражену антиоксидантну дію, тим самим збільшує кількість отриманих ооцитів у пацієнок зі зниженими показниками овариального резерву. Мож-

на вважати доцільним призначення мелатоніну з протекторною антиоксидантною метою у комплексі з підготовчими заходами до проведення ЕКЗ.

ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ ДОСЛІДЖЕНЬ. Для формування повноцінного уявлення про процеси окиснювального стресу у фолікулі під час проведення КОС, та його вплив на якість дозрілої яйцеклітини, доцільно оцінювати не тільки кількість отриманих життєздатних яйцеклітин, а й подальшу їх поведінку, як у якості заплідненої яйцеклітини, так і на стадії ембріотрансферу, ембріона в матці, плода та перебігу вагітності. Доцільним можна вважати поодинокі дослідження фолікулярної рідини в усіх пропунктованих фолікулах та вивчення інших показників АОС.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Боярский К. Ю. Фолликулогенез и современная овариальная стимуляция (обзор литературы) / К. Ю. Боярский // Пробл. репрод. – 2002. – № 1. – С. 36–43.
2. Боярский К. Ю. Функциональные тесты, определяющие овариальный резерв / К. Ю. Боярский // Пробл. репрод. – 1998. – № 3. – С. 3.
3. Экстракорпоральное оплодотворение и его новые направления в лечении женского и мужского бесплодия / под ред. В. И. Кулакова. – М. : МИА, 2000. – 336 с.
4. Мишиева Н. Г. Бесплодие у женщин позднего репродуктивного возраста: принципы диагностики и лечения в зависимости от овариального резерва / Н. Г. Мишиева. – М., 2008. – 36 с.
5. Galano A. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. Review article / A. Galano, Dun Xian Tan // Journal of Pineal Research / J. Pineal Res. – 2011. – Vol. 51. – P. 1–16.
6. Tamura. The role of melatonin as an antioxidant in the follicle / Tamura // Journal of Ovarian Research. – 2012. – Vol. 5. – P. 5.
7. Veleva Z. An initial low response predicts poor outcome invitro fertilization/ intracytoplasmic sperm injection despite improved ovarian response in consecutive cycles / Z. Veleva // Fertil Steril. – 2005. – Vol. 83. – P. 1384–1390.

Отримано 19.03.15