



М. О. Щербина, О. Г. Граділь

Харківський національний
медичний університет

© Щербина М. О., Граділь О. Г.

ОЦІНКА РЕЗУЛЬТАТІВ ТРАНСВАГІНАЛЬНОЇ ПУНКЦІЇ У ЖІНОК З НИЗЬКИМ ОВАРІАЛЬНИМ РЕЗЕРВОМ В ЦИКЛАХ ЕКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ЗАПЛІДНЕННЯ

Резюме. Вивчено вміст мелатоніну і 8-ізопростана в сироватці крові та фолікулярній рідині, які отримані під час трансвагінальної на тлі контрольованої оваріальної стимуляції у 66 пацієнток з безпліддям з низьким оваріальним резервом. Контрольну групу склали 30 здорових жінок-донорів. Виявлено, що мелатонін має виражену антиоксидантну дію, тим самим збільшує кількість отриманих ооцитів у жінок з низьким оваріальним резервом. Достовірним маркером окисного стресу та роботи антиоксидантної системи в сироватці крові та фолікулярній рідині є 8-ізопростан. Використання гонадотропінів з метою індукції суперовуляції веде до посилення процесів окислювального стресу в фолікулярній рідині.

Ключові слова: *безпліддя, оваріальний резерв, окисний стрес, мелатонін, 8-ізопростан, контрольована оваріальна стимуляція, екстракорпоральне запліднення, ЕКЗ, трансвагінальна пункція.*

Вступ

Загальновідомо, що однією з важливіших умов для успішного проведення екстракорпорального запліднення (ЕКЗ) є ефективна контрольована оваріальна стимуляція (КОС) та отримання достатньої кількості зрілих яйцеклітин з фолікулярної рідини, які отримані шляхом вакуум аспірації під час трансвагінальної пункції (ТВП). В останній час спостерігається тенденція до збільшення кількості хворих на безпліддя жінок пізнього репродуктивного віку, які потребують застосування допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ). З віком відбувається генетично обумовлене зменшення репродуктивного потенціалу — оваріального резерву (ОР), показника, що відображає величину фолікулярного пула яєчників і якість ооцитів [1, 2]. Важливу роль у передчасному виснаженні ОР відіграють перенесені оперативні втручання на яєчниках в гінекологічному анамнезі пацієнток, які призводять до часткової (резекції яєчників) або радикальної (однобічна аднексектомія) втрати оваріальної тканини. У жінок зі зниженим ОР стандартні протоколи КОС малодієві та потребують удосконалення [2, 3, 4, 5].

Згідно з останніми дослідженнями при дозріванні яйцеклітини в фолікулярній рідині відбувається активація окислювальних процесів, при індукції суперовуляції перекисне окислення ліпідів і білків збільшується в десятки разів [8]. В даний час відомо, що окисний стрес (ОС) супроводжується руйнівною цитотоксичною дією та активацією апоптозу [7]. Загальновідомим маркером ОС є 8-ізопростан, що виробляється кисневими ради-

калами 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, 7]. 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 в фолікулярній рідині у декілька разів перевищує його рівень у сироватці крові [6, 8], що обумовлює протекторний вплив на зріючу яйцеклітину, зменшуючи рівень ОС, і потребує подальшого вивчення.

Мета дослідження

Підвищення ефективності ЕКЗ за рахунок покращення якості та кількості яйцеклітин, які отримані шляхом вакуум аспірації під час ТВП у хворих на безпліддя жінок з низьким оваріальним резервом (НОР), за допомогою вивчення та корекції процесів ОС в фолікулярній рідині при дозріванні яйцеклітини.

Матеріали та методи досліджень

У дослідженні взяло участь 96 жінок репродуктивного віку, без супутньої соматичної патології. З них 66 жінок з безпліддям, вибірково трубно-перитонеального генезу, що склали основну групу, в залежності від лікувальної схеми, були поділені порівну на I та II групи. Контрольну групу склали 30 здорових жінок, що звернулися з метою донорства яйцеклітини. 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, перенесені оперативні втручання на яєчниках: отримання 3-х і менше ооцитів у попередніх циклах ЕКЗ; зниження показників оваріального тесту: АМГ менше за 1,1 нг/мл, ЧАФ менше за 5 у кожному яєчнику згідно УЗД.

Методом випадкового поділу жінок з НОР розподілено на 2 рівні групи. У I групі (n=33) середній вік склав (36,61±4,54) років, тривалість безпліддя склала (8,64±4,41) років, індекс маси тіла (24±3,54). Цій групі пацієнток був проведений стандартний протокол КОС з гонадотропінами (ГТ). З використанням антагоністів гонадотропних рилізінг гормонів (ант-ГнРГ) та людського менопаузального ГТ (лМГ) (n=16), агоністів ГнРГ (а-ГнРГ) + лМГ (n=17). У II групі (n=33) середній вік склав (35,30±5,13) років, тривалість безпліддя склала (9,97±5,16) років, індекс маси тіла (24,26±5,34); використовувався протокол з ант-ГнРГ + лМГ (n=16), а-ГнРГ + лМГ (n=17). Враховуючи потужний антиоксидантний ефект мелатоніну, з метою зниження шкідливого впливу ОС на зріючу яйцеклітину, пацієнтки цієї групи отримували ад'ювантну мелатонін-гормонотерапію (АМГТ) за схемою: мелатонін в таблетках по 3 мг перед сном на протязі 4 тижнів до моменту призначення овуляторної дози хоріонічного гонадотропіну (ХГ) та проведення ТВП. 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 правил збалансованого харчування.

Усім пацієнткам згідно стандартного протоколу проводилось визначення рівня гормонів функціонування репродуктивної системи, щитоподібної та надниркової залози. З метою оцінки ОР виконувалось визначення АМГ.

Для оцінки мелатонін-утворюючої 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 (8-ІЗП).

Трансвагінальну пункцію яєчників виконували через 35–36 годин після введення овуляторної дози ХГ в умовах малої операційної під короткочасним внутрішньовенним наркозом і ультразвуковим контролем. Використовували трансвагінальний датчик, на який щільно фіксували адаптер для прикріплення спеціальної голки. Застосовували голку довжиною 25 см, з зовнішнім діаметром 1,6 мм, на кінчику якої була ехо-контрастна насічка, видима при проведенні трансвагінального ультразвукового дослідження. На екрані монітора ультразвукового апарату напрямок голки визначався пунктирною лінією. Зіставляючи напрямок цієї лінії з центром фолікула, виконували пункцію фолікула. За допомогою вакуум-аспірації (під тиском 150–160 мм в. ст.) фолікулярна рідина надходила в стерильні пробірки. Отриману фолікулярну рідину передавали ембріологу для ідентифікації ооцитів і подальшого їх запліднення.

Аспірована фолікулярна рідина негайно проглядалася ембріологом. Вміст пробірок переливалт в чашки Петрі і досліджували під стереомікроскопом або інвертованим мікроскопом за невеликого збільшення. Знайдені ооцити переносили в спеціальне середовище для відмивання, яке містило HEPES-буфер, що дозволяло маніпулювати з ооцитами на повітрі без ризику зміни рН в лужну сторону, потім відмивали в культуральному середовищі, після чого оцінювали кількість, якість і ступінь зрілості ооцитів. Визначався рівень мелатоніну та 8-ізопростану в фолікулярній рідині. Визначення концентрації мелатоніну (МЛТ) і 8-ізопростану проводилося імуноферментними методами з використанням наборів Melatonin ELISA Kit, 8-Isoprostane EIA Kit, IBL (Німеччина).

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 за $p < 0,05$. Усі обчислення проводили з використанням програмного забезпечення Excel XP, Statistica-6.0.

Результати досліджень та їх обговорення

У обстежених групах нами було виявлено статистично значущі відмінності в гормональних показниках, а саме ФСГ, АМГ, МЛТ в сироватці крові, МЛТ та 8-ізопростан в фолікулярній рідині. У трьох пацієнток I групи відбулася відміна циклу через відсутність оваріальної відповіді на КОС, що було обумовлено критично низьким ОР.



Рівні МЛТ в сироватці крові пацієнок з безпліддям варіювали від 14,80 до 35,04 пг/мл, середнє значення складало (21,60±4,77) пг/мл, медіана і мода склали 19,44 і 19,08, відповідно, що свідчило про відносно симетричний розподіл даних. В контрольній групі рівні МЛТ варіювали від 18,10 до 47,36 пг/мл, середній показник складав (37,55±6,65) пг/мл, що в 1,73 разу перевищувало показники основної групи (p<0,001).

Індивідуальний інтервал вмісту 8-ІЗП в сироватці крові обстежених жінок в основній групі варіював від 32,27 до 81,34 пг/мл, середній показник і медіана склали (66,87±10,51) пг/мл та 67,47 пг/мл відповідно і в 1,5 разу перевищували показники контрольної групи (p<0,001).

Діапазон показників МЛТ у сироватці крові від 30 до 40 пг/мл був специфічним для контролю, тому що значення 30-40 пг/мл були виявлені у 50 % осіб контрольної групи. При цьому, цей спектр показників не визначався серед хворих на безпліддя жінок (p <0,001).

Діапазон показників 8-ІЗП у сироватці крові від 30 до 49 пг/мл був специфічним для контролю, тому що значення 40-49 пг/мл були виявлені у 50 % осіб контрольної групи. При цьому, цей спектр показників майже не визначався серед хворих на безпліддя жінок (9 %; p <0,001).

Підвищений вміст 8-ІЗП та знижений рівень МЛТ в фолікулярній рідині у пацієнок І групи, свідчив про високий рівень ОС та зниження антиоксидантної активності під час КОС. Що пояснювалось більш високими дозами ГТ у зв'язку з низькою оваріальною відповіддю під час стандартних протоколів КОС у пацієнок І групи. Середні показники МЛТ у фолікулярній рідині у пацієнок І групи склали (33,86±5,76) пг/мл, які були у 1,5 разу нижче за середні показники в ІІ групі (58,41±4,96) пг/мл (p<0,05), і в 1,8 разу нижче за середні показники контрольної групи (62,08±11,99) пг/мл (p<0,001). Тоді як рівні 8-ІЗП в цій групі були найвищими, і склали (346,05±65,13) пг/мл, що свідчить на користь високої активності ОС в фолікулярній рідині.

Заслужують увагу рівні МЛТ та 8-ІЗП в фолікулярній рідині ІІ групи, яка отримувала

ла протокол КОС з мелатоніном. На користь антиоксиданного впливу цього препарату свідчать нижчі рівні 8-ІЗП (256,53±53,76) пг/мл, порівняно з І групою (346,05±65,13) пг/мл (p<0,001), яка знаходилась в таких же умовах, проте не отримувала АМГТ.

Динаміка показників ОС в сироватці крові до і після протоколів КОС, свідчила про виражений окисний вплив ГТ на організм. Під впливом ГТ рівні 8-ІЗП збільшуються в десятки разів, що відображають показники І групи: на старті протоколу середні рівні 8-ІЗП склали (56,87±10,51) пг/мл, що в 20 разів менше порівняно з (1061,70±173,26) пг/мл (p<0,001) після стандартного протоколу КОС. Рівні МЛТ також мають тенденцію до зниження в ході КОС. У пацієнок І групи на старті протоколу КОС середні значення МЛТ склали (0,32±5,11) пг/мл, порівняно з (8,25±1,24) після протоколу стимуляції (p<0,001). Така ж тенденція відмічається і у пацієнтів ІІ групи, які додатково отримували препарати мелатоніну, початкові рівні МЛТ в сироватці крові склали (25,04±4,93) пг/мл і вірогідно не відрізнялися від І групи. Після КОС спостерігалось вірогідне зниження в 3,5 разу рівнів МЛТ, порівняно зі стартом протоколу (7,97±1,38) пг/мл (p<0,001). Хоча АМГТ не підвищує рівні МЛТ в сироватці крові хворих на безпліддя пацієнок в програмах ЕКЗ, проте вона вірогідно зменшує рівень ОС, про що свідчить в 3 рази нижчий вміст 8-ІЗП — (313,89±41,22) пг/мл, порівняно з І групою — (1061,70±173,26) пг/мл (p<0,001), і в 1,2 разу порівняно з КГ — (352,82±68,60) пг/мл (p<0,01) у фолікулярній рідині ІІ групи, яка отримувала модифікований протокол КОС.

Високі показники ФСГ визначались у жінок з НОР І і ІІ групі (12,97±10,05) 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. Рівні ФСГ мали зворотну кореляційну залежність з рівнем АМГ в цих же групах.

Оцінка ефективності протоколів КОС у жінок з НОР представлена у таблиці.

Згідно до даних таблиці не виявлено достовірних відмінностей у якості оваріальної відповіді в залежності від використаної схеми

Таблиця

Оцінка результатів ТВП та ефективності КОС у жінок з НОР

Показник	I група (n=30) стандартний протокол КОС без АМГТ		II група (n=33) модифікований протокол КОС з АМГТ	
	(n=15) а-ГнРГ+лМГ	(n=15) ант-ГнРГ+лМГ	(n=16) аГнРГ+лМГ+АМГТ	(n=17) ант-ГнРГ+лМГ +АМГТ
Кількість фолікулів	3,83 ± 0,39	3,92 ± 0,29	8,01 ± 0,92	7,85 ± 0,69
Кількість ооцитів	3,04 ± 0,43	2,95 ± 0,42	5,98 ± 0,96	5,03 ± 0,87
Кількість ПЕ	2,61 ± 0,33	1,98 ± 0,32	4,22 ± 0,77	3,91 ± 0,55
Зрілі ооцити	2,98 ± 0,37	2,34 ± 0,34	4,01 ± 0,68	3,78 ± 0,56
Заліднені ооцити	2,76 ± 0,43	2,04 ± 0,23	3,89 ± 0,56	3,67 ± 0,45
Незрілі ооцити	1,19 ± 0,31	1,21 ± 0,32	0,78 ± 0,09	0,86 ± 0,05



КОС з а-ГнРГ або ант-ГнРГ, проте зафіксовано вірогідну різницю в кількості фолікулів, ооцитів та перенесених ембріонів між пацієнтками I групи які отримували стандартні протоколи КОС, і пацієнтками II групи, які отримували модифіковану схему КОС з АМГТ. Також спостерігається вірогідне покращення зрілості ооцитів і відсоток запліднюваності у жінок II групи, порівняно з I групою ($p < 0,05$), що свідчить на користь протекторного впливу АМГТ на зріючий ооцит в циклах ЕКЗ.

Висновки

Використання ант-ГнРГ і а-ГнРГ з метою індукції суперовуляції веде до посилення процесів окисного стресу в фолікулярній рідині, які шкідливо впливають на яйцеклітину, знижуючи результативність ЕКЗ. 8-ізопростан достовірний показник ОС, його вміст має зворотню кореляційну залежність з рівнями МЛТ та кількістю отриманих яйцеклітин після КОС. Застосування модифікованої схеми КОС з АМГТ дозволяє покращити оваріальну відповідь на КОС та якість отриманих яйцеклітин, які отримані під час ТВП у жінок з НОР.

ЛІТЕРАТУРА

1. Боярский К. Ю. Фолликулогенез и современная овариальная стимуляция / К. Ю. Боярский // Проблемы репродукции. — 2002. — № 1. — С. 36–43.
2. Боярский К. Ю. Функциональные тесты, определяющие овариальный резерв / К. Ю. Боярский // Проблемы репродукции. — 1998. — № 3. — С. 3.
3. Кулаков В. И. 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: автореф. дис. док. мед. наук / Н. Г. Мишиева. — М., 2008. — 36 с.
5. An initial low response predicts poor outcome invitro fertilization, intracytoplasmic sperm injection despite improved ovarian response in consecutive cycles / Z. Veleva [et al.] // Fertil Steril. — 2005. — Vol. 83. — P. 1384–1390.
6. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination / A. Galano, Dun Xian Tan [et al.] // Journal of Pineal Research. — 2011. — Vol. 51. — P. 1–16.
7. Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle / H. Tamura, A. Takasaki, T. Taketani [et al.] // Endocr J. — 2013. — Vol. 60. — P. 1–13.
8. The role of melatonin as an antioxidant in the follicle / H. Tamura, A. Takasaki, T. Taketani [et al.] // Journal of Ovarian Research. — 2012. — Vol. 26. — P. 5.



ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ
ТРАНСВАГИНАЛЬНОЙ
ПУНКЦИИ У ПАЦИЕНТОК
С НИЗКИМ ОВАРИАЛЬНЫМ
РЕЗЕРВОМ В ЦИКЛАХ
ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО
ОПЛОДОТВОРЕНИЯ

Н. А. Щербина, О. Г. Градиль

Резюме. Изучено содержание мелатонина и 8-изопростана в сыворотке крови и фолликулярной жидкости, полученной путем трансвагинальной пункции на фоне контролируемой овариальной стимуляции у 66 пациенток страдающих бесплодием с низким овариальным резервом. Контрольную группу составили 30 здоровых женщин-доноров. Обнаружено, что мелатонин оказывает выраженное антиоксидантное действие, тем самым увеличивает количество полученных ооцитов пациенток с низким овариальным резервом, а 8-изопростан является достоверным маркером окислительного стресса и работы антиоксидантной системы в сыворотке крови и фолликулярной жидкости. Использование гонадотропинов с целью индукции суперовуляции ведет к усилению процессов окислительного стресса в фолликулярной жидкости.

Ключевые слова: бесплодие, овариальный резерв, окислительный стресс, мелатонин, 8-изопростан, контролируемая овариальная стимуляция, экстракорпоральное оплодотворение, ЭКО, трансвагинальная пункция.

ASSESSMENT OF THE
RESULTS OF THE
TRANSVAGINAL PUNCTURE
IN PATIENTS WITH LOW
OVARIAN RESERVE USING
IN VITRO FERTILIZATION

M. O. Scherbina, O. G. Gradil

Summary. The content of melatonin and 8-isoprostan in serum and follicular fluid using transvaginal puncture after ovarian stimulation in 66 infertility women with low ovarian reserve was studied. The control group comprised 33 healthy women, who were donors of oocytes. Found that melatonin has a strong antioxidant effect, thereby increasing the number of oocytes obtained in infertility women with low ovarian reserve and 8-isoprostan a reliable indicator of oxidative stress and antioxidant system in blood serum and follicular fluid. The use gonadotropins for the purpose of inducing superovulation leads to increased oxidative stress processes in follicular fluid.

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