

И.Ю. Коган, А.М. Гзгзян, Е.А. Лесик

ПРОТОКОЛЫ СТИМУЛЯЦИИ ЯИЧНИКОВ В ЦИКЛАХ ЭКО

Руководство для врачей



Москва
ИЗДАТЕЛЬСКАЯ ГРУППА
«ГЭОТАР-Медиа»
2017

Основные сведения о фолликулогенезе и оогенезе в яичниках

Физиологические механизмы регуляции функции яичников достаточно полно изложены в различных отечественных учебных изданиях. Именно поэтому в данном руководстве мы кратко остановимся только на тех аспектах фолликулогенеза и оогенеза, которые имеют наибольшее клиническое значение в работе репродуктолога. Понимание ряда положений этого раздела, безусловно, потребует наличия базовых знаний биологии и генетики, без которых практическая работа в настоящее время не может быть эффективной.

Хорошо известно, что яичники покрыты эпителием, образованным одним слоем кубических клеток (мезотелием). Под ним находится белочная оболочка (*tunica albuginea*), состоящая из плотной соединительной ткани. Под белочной оболочкой располагается корковый слой, в глубине — мозговое вещество яичника. Фолликулы разной степени зрелости присутствуют, в основном, в корковой зоне. Между фолликулами располагается строма яичника, представленная клетками соединительной ткани (фибробластами, фиброцитами), а также соединительнотканными волокнами. Соединительная ткань (строма) составляет также основу центральной, мозговой зоны яичника, в которой находятся кровеносные, лимфатические сосуды и нервы.

Существует несколько классификаций стадий развития фолликула (Pedersen T. et al., 1968;

Gougeon A., 1996; McNatty K.P. et al., 1979; Edson M.A. et al., 2009; Emori C. et al., 2014). Однако ни одна из них не является общепринятой, поскольку каждая имеет свои особенности, недостатки и преимущества. Одной из наиболее известных является классификация, основанная на размерах фолликулов и количестве клеток, которые входят в его состав (Pedersen T. et al., 1968). Она насчитывает 8 типов фолликулов (от I до VIII типа, полостного, в состав которого входит более 600 клеток). Классификация С. Emori и соавт. (2014) учитывает размер фолликулов и наличие в них полости (5 типов фолликулов, от примордиального до антрального, граафова). В классификациях Т. Pedersen и соавт. (1968) и С. Emori соавт. (2014) не учитывается форма клеток и не определены гормонально зависимые этапы развития фолликула.

Gougeon A. (1996) выделил гормонезависимый (вступивший в рост фолликул, вторичный фолликул) и гормонозависимый периоды фолликулогенеза. Причем последний период развития включает 8 стадий развития фолликула, представленных в табл. 1.

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

Таким образом, в соответствии с особенностями строения практически в любой классификации различают следующие типы овариальных фолликулов (они же являются последовательными стадиями их развития):

- примордиальные;
- первичные;

Таблица 1. Классификация стадий развития фолликулов в гормонозависимом периоде фолликулогенеза

Стадия	Название фолликула	Размер фолликула, мм	Количество клеток гранулезы, $\times 10^3$
1	Преантральный	0,1–0,2	0,6–3,5
2	Ранний антральный	0,2–0,4	3,5–15
3	Малый антральный	0,4–0,9	15–75
4	Антральный	0,9–2	75–375
5	Рекрутированный	2–5	375–1870
6	Ранний доминантный	5–10	1870–9400
7	Ранний преовуляторный	10–16	9400–47 000
8	Преовуляторный	16–20	–

- вторичные;
- третичные.

Примордиальные фолликулы образуются с 11–12-й недели внутриутробного развития плода и состоят из ооцита 1-го порядка, окруженного одним слоем плоских клеток прегранулезы и низко организованного мезенхимального слоя текальных клеток (25–30 мкм) (рис. 1, см. цв. вклейку).

В процессе организации примордиального фолликула оогонии теряют способность к митотическому делению и вступают в профазу первого деления

мейоза (Cohen P.E. et al., 2010). Формируется ооцит 1-го порядка. На этом этапе происходят важные биологические явления, специфические для половых клеток — конъюгация гомологических хромосом и кроссинговер — обмен участками между ними, что обеспечивает сбалансированную сегрегацию (расхождение) гомологичных хромосом при завершении метафазы I (Ottolini C.S. et al., 2015).

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 (Pepling M.E. et al., 2012). К моменту формирования первичного яичника закладывается около 200–300 тыс. первичных фолликулов. Во время первого деления мейоза ооцитов число примордиальных фолликулов резко уменьшается на 90% (Pangas S.A. et al., 2006). К моменту рождения у девочки в яичнике остается около 400 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.

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 (рис. 2, см. цв. вклейку). Размер ооцита в первичных фолликулах увеличивается, возрастают объем его цитоплазмы и содержание органелл. При этом ядерно-цитоплазматическое соотношение не нарушается. На этой стадии в ооците происходит активный синтез всех видов рибонуклеиновой кислоты (РНК) — рибосомальных, транспортных и матричных. Все эти типы РНК синтезируются преимущественно впрок, то есть для использования уже оплодотворенной яйцеклеткой.

Вокруг ооцита формируется прозрачная оболочка — блестящая зона (*zona pellucida*), состоящая из четырех типов гликопротеинов (ZP1–ZP4), синтезируемая ооцитом (Gupta S.K. et al., 2009). Блестящая оболочка имеет особое функциональное значение в оплодотворении: отвечает за связывание сперматозоидов с ооцитом, индукцию акросомальной реакции, препятствует полиспермии, а также выполняет защитную функцию ооцита и раннего эмбриона в процессе развития до стадии бластоцисты. Разрыв ее (хетчинг) происходит только на 5-е сутки развития эмбриона перед имплантацией.

В цитоплазме гранулезных клеток на стороне, обращенной к ооциту, хорошо развиты аппарат Гольджи с секреторными включениями, рибосомы и полирибосомы. На поверхности клеток 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. Эти межклеточные

контакты, так называемые щелевые контакты, позволяют производить обмен субстратом и сигнальными молекулами между ооцитом и клетками гранулезы. Формируется гранулезно-ооцитарная связь. Фолликулярные клетки секретируют факторы роста и дифференцировки: 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)], которые позволяют ооциту расти. 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 ТФР β], способные стимулировать пролиферацию и дифференцировку окружающих соматических (гранулезных) клеток.

Строение **вторичных фолликулов** характеризуется наличием ооцита 1-го порядка, окруженного уже несколькими слоями (до 8) клеток гранулезы (рис. 3, см. цв. вклейку).

На данной стадии развития формируется соединительнотканная оболочка фолликула — *тека*, которая разделяется на два слоя — внутренний и наружный. Во внутреннем слое располагается обширная капиллярная сеть. Клетки внутренней теки, как и клетки гранулезы, после овуляции 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. В частности, за счет их сокращения

повышается давление в овулирующем фолликуле. Клетки гранулезы от клеток текальных оболочек отделяет базальная мембрана фолликула, состоящая в основном из коллагена четвертого типа и ламинина.

Постепенно в связи с усилением секреторной активности гранулезных клеток между ними формируются пространства (*лакуны*), где начинает скапливаться фолликулярная жидкость. Блестящая оболочка утолщается, в нее проникают микроворсинки ооцита, которые обеспечивают его тесный контакт с клетками гранулезы. При этом ооцит с окружающими его фолликулярными клетками в виде яйценосного бугорка (*citulus oophorus*) смещается к одному полюсу фолликула.

Вторичный фолликул в функциональном отношении принципиально отличается от предыдущих стадий развития. Во-первых, меняется система кровоснабжения фолликула. Формирование капиллярной сети в тека-оболочке обеспечивает тесный обмен между фолликулом и общей системой гемодиализации. Во-вторых, в связи с усилением экспрессии рецепторов к гонадотропинам (ГТ) в гранулезных клетках фолликул становится чувствительным к их влиянию. В-третьих, постепенно начинает функционировать система синтеза половых стероидных гормонов («две клетки — два гонадотропина»). Так, в тека-клетках под действием лютеинизирующего гормона (ЛГ) происходит выработка андрогенов, а в клетках гранулезы под действием фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) — конверсия их в эстрогены.

Третичные фолликулы формируются из вторичных. Их отличительной чертой является наличие

полости (*antrum folliculare*, антрум) с фолликулярной жидкостью (рис. 4; рис. 5, см. цв. вклейку). В образовании фолликулярной жидкости принимает участие сосудистое окружение текального слоя. Кровеносно-фолликулярный барьер определяет состав фолликулярной жидкости. Содержание низкомолекулярных компонентов аналогично содержанию в плазме, концентрация компонентов >100 кДа, и это ниже, чем в плазме. Глюкозаминогликаны и протеоглики способствуют осмотическому потенциалу жидкости. Гонадотропины, стероидные гормоны, факторы роста, ферменты и липопротеины также присутствуют в фолликулярной жидкости. 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

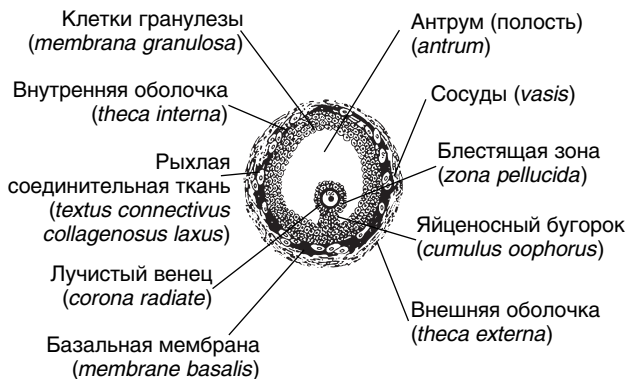


Рис. 4. Строение третичного фолликула

клетки яйценосного бугорка и блестящей оболочки составляют единый ооцит-кумулюсный комплекс, который сопровождает ооцит во время овуляции. Во время пункции яичников получают ооцит в составе ооцит-кумулюсного 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 — созревание. Процесс созревания включает координацию интегрированных, но независимых друг от друга событий, происходящих в ооците. Ядерное созревание связано с возобновлением процесса деления первого мейоза (MI). Ядерная оболочка герминального пузырька разрушается, происходит смещение нуклеоплазмы с цитоплазмой, формируется веретено деления, завершается рекомбинация и происходит сегрегация гомологичных хромосом. Первое мейотическое деление завершается с уменьшением числа хромосом ($1n2c$) и образованием первого полярного 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 (MI) (Ottolini C.S. et al., 2015). Созревание цитоплазмы протекает с изменениями локализации органелл и установлением полярности ооцита. Увеличивается число митохондрий и рибосом. Происходит изменение мембранных транспортных систем, развивающийся аппарат Гольджи расширяется и мигрирует к периферии. В цитоплазме появляются органеллы, отвечающие за

запасание и экспорт материалов: мембраносвязанные пузырьки, мультивезикулярные и кристаллиновые тельца, жировые включения и гликогеновые гранулы. Все процессы клеточного цикла контролируются ключевыми факторами и происходят строго последовательно.

Сразу после завершения первого мейотического деления запускается второе мейотическое деление с остановкой цикла в метафазе II, образуется ооцит второго порядка (MII), готовый к овуляции. Возобновление второго мейотического деления (1n1c) наступает после оплодотворения и называется *активацией ооцита*.

Схема стадий последовательного развития фолликула представлена на рис. 6.

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);

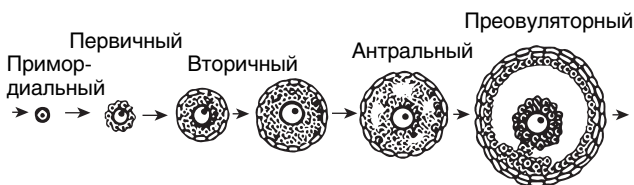


Рис. 6. Стадии последовательного развития фолликула

- 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 ГТ.

Кратко изложим ключевые моменты каждого этапа.

Первичное рекрутирование фолликулов (прегонадотрофная стадия) представляет собой преобразование примордиального фолликула в первичный. Считается, что этот процесс не зависит от эндогенной гонадотропной стимуляции, а определяется только тесным функциональным взаимодействием ооцита, гранулезных клеток и стромы яичника. Так, например, в эксперименте доказано, что первичное рекрутирование фолликулов возможно при удалении гипофиза, а также у животных, нокаутных по гену, кодирующему β -субъединицу ФСГ (Дыбан А.П. и др., 1977). У человека первичный рекрутинг выявлен также у женщин с мутациями гена *FSH*-рецептора.

Можем ли мы повлиять на данный этап? К сожалению, в настоящее время ответ на этот вопрос отрицательный. Первичное рекрутирование фолликулов полностью определяется внутриовариальными факторами и не зависит от действия ГТ. Сегодня даже наши знания о физиологии данного этапа остаются неполными. Представленная далее информация о механизмах первичного рекрутинга пока имеет относительное клиническое значение.

Обнаружены факторы, которые могут способствовать росту примордиального фолликула. К ним

относят: костный морфогенетический протеин (bone morphogenetic protein BMP 4/7/15), лейкемия-ингибирующий фактор (leukemia inhibitory factor, LIF); фактор роста кератиноцитов (keratinocyte-growth factor, KGF); ФРФ-2, Kit-лиганд (KL, Kit-ligand). При этом следующие факторы препятствуют росту примордиального фолликула: фактор PTEN (tumor suppressor gene или phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10); анти-мюллеров гормон (АМГ — anti-Mullerian hormone, АМН); белки семейства Foxo (forkhead box O) — Foxo3A, FoxI2, мультимолекулярный сигнальный комплекс, включающий mTOR (mammalian target of rapamycin, мишень для рапамицина у млекопитающих). Ежегодно появляются данные о новых факторах, задействованных в первичном рекрутировании, и новых точках приложения уже изученных веществ.

Гонадотропинчувствительная стадия фолликулогенеза представляет собой переход из стадии первичного фолликула к вторичному, а затем к малому антральному (до 5 мм).

На этом этапе также определяющее влияние оказывают внутрияичниковые факторы. Так, BMP4/BMP7/BMP15, фактор роста и дифференцировки 9 (GDF9); ФРФ-2, а также андрогены имеют активирующее, а АМГ — ингибирующее влияние на процесс формирования вторичных и малых антральных фолликулов.

У вторичных фолликулов появляются рецепторы к ФСГ, действие которого необходимо для продукции гранулезными клетками фолликулярной жидкости и формирования полости (Gougeon A., 1996). Тоническая стимуляция эндогенного ФСГ доста-

точна для развития фолликулов диаметром до 5 мм. Их наличие хорошо видно при ультразвуковом исследовании (УЗИ) у девочек в подростковом возрасте. Однако для дальнейшего роста малых антральных фолликулов требуется усиление гонадотропного влияния, что обеспечивается только после формирования овариального цикла и включения в работу механизма положительной обратной связи между гипоталамо-гипофизарной системой и яичниками. По некоторым данным в малых антральных фолликулах уже могут экспрессироваться рецепторы к ЛГ.

Наиболее изученными являются действия BMP4/BMP7/BMP15, GDF9, андрогенов, АМГ.

GDF9 относится к семейству β -трансформирующих факторов роста (ТФР β), продуцируется ооцитом; стимулирует пролиферацию гранулезных клеток, активируя их переход из G0/G1- в S- и G2/M-фазы клеточного цикла. У подопытных животных мутации гена приводят к нарушению фолликулогенеза, дифференцировке гранулезных клеток, инфертильности. У человека мутации гена данного фактора, нарушение его экспрессии могут быть ассоциированы с развитием некоторой гинекологической патологии (синдромом преждевременного истощения яичников, синдромом поликистозных яичников). Возможно, что GDF9 стимулирует рост фолликула посредством влияния на биосинтез тека-клетками андрогенов (тестостерона). GDF9 повышает также уровень экспрессии KL в клетках гранулезы, который в свою очередь оказывает влияние на клетки стромы и ооцит, так как на их поверхности есть рецептор к KL — лиганд c-Kit (рецептор фактора стволовых клеток).

KL стимулирует рост ооцита и поддерживает блок мейоза (Knight P.G. et al., 2006).

BMP15 также имеет отношение к семейству ТФРβ; продуцируется ооцитом, является индуктором KL в клетках гранулезы, который, в свою очередь взаимодействуя с рецептором фактора стволовых клеток на тека-клетках, может оказывать влияние на синтез андрогенов.

GDF9 и BMP15 обладают синергетическим действием по отношению к росту фолликула. Они влияют на клетки гранулезы через рецепторы типа I и II: GDF9 связывается с рецептором типа I (BMPRI); BMP15 — с рецептором II типа (BMPRII). При этом они регулируют продукцию друг друга с помощью локального механизма отрицательной обратной связи посредством системы c-Kit/KL. В культуре *in vitro* BMP15 и GDF9 также оказывают влияние на сам ооцит, способствуя его созреванию.

В последних исследованиях было показано, что BMP15 и GDF9 оказывают свое действие на клетки гранулезы не только на ранних этапах фолликулогенеза. Это обеспечивается изменением экспрессии внутриклеточных сигнальных белков SMAD (Similar to Mothers Against Decapentaplegic), посредством которых эти факторы действуют на гранулезу по мере развития фолликулов. Так, например, в первичных фолликулах экспрессируются SMAD2/3, в преантральных SMAD2/3 и SMAD1/5/8, а в крупных фолликулах — SMAD1/5/8. Показано, что в фолликулах, которые впоследствии будут подвергаться атрезии, уровень экспрессии мРНК-рецепторов к BMP I и II типа выше, чем в фолликуле, который станет доминантным. BMP15 и GDF9 оказывают влияние на клет-

ки фолликула, окружающие ооцит, вызывая их дифференцировку в клетки кумулюса (Emori C. et al., 2014).

Описано несколько полиморфных вариантов аллелей гена GDF9 и BMP15, которые могут быть ассоциированы с нарушением репродуктивной функции и особенностями стимуляции яичников в протоколах ЭКО (табл. 2).

Система c-Kit/KL. KL известен как фактор, участвующий в росте и дифференцировке стволовых клеток. Что касается системы ооцит–гранулеза–тека, то он, взаимодействуя с рецептором на ооците, индуцирует рост и выход последнего из примордиальной стадии. Кроме этого, система c-Kit/KL принимает участие в дифференцировке клеток стромы яичника в тека–клетки.

Таблица 2. Полиморфные варианты аллелей генов GDF9 и BMP15

Фактор	Полиморфизмы	Краткие итоги исследований
GDF9	• 169G/A. • 447C/A (rs 254286). • 546G/A (rs 10491279)	Аллель 546 А ассоциирован с неблагоприятным исходом стимуляции и протокола ЭКО у женщин со сниженным резервом яичников
BMP15	• –673C/T (rs 58995369). • –9C/G (rs 3810682). • Asn103Ser (rs 41308602). • IVS1 + 905A/G (rs 3897937)	Аллели –673 Т, –9 G и IVS1 + 905 G ассоциированы с избыточным ответом яичников на стимуляцию. Гаплотипы TGGA (–673, –9, IVS1 + 905, Asn103Ser) могут служить факторами риска синдрома гиперстимуляции яичников

Андрогены и андрогеновые рецепторы (АР).

В настоящее время получено достаточно экспериментальных (на грызунах, жвачных, свиньях, приматах) и клинических данных у человека для того, чтобы утверждать, что андрогены и АР имеют большое значение в фолликулогенезе. Показано, что АР экспрессируются во всех клетках фолликула (ооците, гранулезе, теке), строме яичника. Причем экспрессия АР в гранулезных клетках усиливается по мере роста фолликула, достигая максимальной выраженности на антральной стадии. Андрогены усиливают экспрессию ФСГ-рецепторов в гранулезных клетках, их пролиферативную, ароматазную активность, синтез эстрадиола. Не исключается негативное влияние андрогенов на активность апоптоза клеток фолликула. Например, у человека в фолликулах диаметром 3–9 мм имеется положительная взаимосвязь между содержанием в фолликулярной жидкости тестостерона и мРНК рецепторов ФСГ. По данным J.M. Young и соавт. (2010), тестостерон даже способствует первичному рекрутированию фолликулов. Возможно, это влияние опосредованное, через выработку инсулиноподобного фактора роста-1 (ИФР-1), поскольку АР в примордиальном фолликуле обычно не определяются.

Инсулиноподобные факторы роста. мРНК ИПФ-1 выявлена в клетках гранулезы, клетках теки; ИФР-2 — только в клетках теки. В условиях *in vitro* показано, что ИФР-1 активирует уровень экспрессии рецепторов к ЛГ, синтез эстрадиола, прогестерона в мелких и крупных фолликулах, а также синтез андростендиона в крупных фолликулах.

АМГ, гликопротеид, относится к семейству ТФР, продуцируется гранулезными клетками первичных, преантральных, небольших антральных фолликулов (менее 5–6 мм), а также клетками кумулуса. Можно предположить, что АМГ влияет на функцию яичников через угнетающее действие на рекрутирование примордиальных фолликулов и чувствительность к ФСГ.

Хорошо известно, что физиологическое действие того или иного фактора зависит от активации его рецептора. АМГ взаимодействует с соответствующими рецепторами 1-го и 2-го типов (АМГР 1 и АМГР 2). АМГР 2 локализован на гранулезных клетках фолликулов и является высокоспецифичным. Роль АМГР 1 пока не ясна. У плода человека АМГ начинает синтезироваться с 36-й недели гестации, что обеспечивает развитие из мюллеровых протоков матки, маточных труб и верхней трети влагалища и способствует деградации мюллерова протока в эмбрионах мужского пола (Josso N. et al., 2005).

Предполагается, что АМГ тормозит развитие фолликулов на прегонадотрофной и гонадотропинчувствительной стадиях развития. АМГ ингибирует ароматазу и продукцию эстрадиола в гранулезных клетках, снижает экспрессию рецепторов к ЛГ и чувствительность антральных фолликулов к ФСГ.

Нужно обратить внимание на тот факт, что по мере роста фолликулов продукция АМГ снижается вплоть до полного исчезновения в зрелом фолликуле. АМГ не продуцируется в примордиальных фолликулах, в доминантном фолликуле (или ничтожно мало), в атрезирующихся фолликулах,

в тека-клетках, клетках стромы, в желтом теле. Концентрация АМГ в течение менструального цикла остается постоянной! Более того, содержание АМГ в крови прямо зависит от количества имеющихся в яичниках первичных, преантральных и малых антральных фолликулов. Следовательно, *уровень АМГ в крови является характеристикой овариального резерва, то есть количества фолликулов, потенциально способных к росту и развитию!*

Колокализация первичных ооцитов, синтез АМГ и его рецептора, по-видимому, свидетельствует об аутокринном механизме действия АМГ на клетки фолликула.

Ген, кодирующий АМГ, локализуется на участке хромосомы 19p13.3, а ген рецептора АМГ 2-го типа расположен на хромосоме 12q13 (Altmae S. et al., 2011). Существуют сведения о наличии нескольких полиморфных вариантов аллелей гена АМГ и его рецептора (табл. 3). Предполагается, что некоторые из них могут иметь значение в генезе синдрома поликистозных яичников (СПЯ), а также избыточном ответе яичников на гонадотропную стимуляцию. Анализируя возможную клиническую значимость генетических вариаций, можно выделить группу пациенток с тем или иным типом овариального ответа еще до начала лечения.

Гонадотропинзависимая фаза фолликулогенеза (циклическое рекрутирование фолликулов). Основное значение в заключительной стадии фолликулогенеза: росте и развитии когорты антральных фолликулов (5–9 мм), селекции доминантного фолликула, его созревании, играют гонадотропины — ФСГ и ЛГ.

Таблица 3. Полиморфные варианты аллелей гена анти-мюллера гормона и рецептора 2-го типа антимюллера гормона

АМГ	АМГР 2
• AMH –649T/C (rs 4807216). • AMH Ile49Ser (rs 10407022)	• AMHR2 –482A/G (rs 2002555). • AMHR2 1749C/T (rs 2071558). • AMHR2 4952G/A (rs 3741664). • AMHR2 10A/G (rs 11170555)

Начало роста когорты антральных фолликулов обеспечивается возрастанием содержания ФСГ с конца лютеиновой фазы цикла. Когда содержание ФСГ в крови достигает определенного (порогового) уровня, начинается рост нескольких (когорты) антральных фолликулов. В естественном менструальном цикле фолликулы растут неодинаково (асинхронно), поскольку каждый из когорты имеет свою, индивидуальную чувствительность к ФСГ. Считается, что она определяется экспрессией ФСГ-рецепторов на клетках гранулезы. Число фолликулов, подвергающихся циклическому рекрутированию, зависит от возраста женщины (в среднем 11 в яичнике). ФСГ стимулирует деление гранулезных клеток, продукцию ими фолликулярной жидкости, активирует ароматазу и, соответственно, конверсию андрогенов (андростендиона) в эстрадиол. Обычно у одного фолликула экспрессия ФСГ-рецепторов достаточно высока, он имеет низкий порог чувствительности к ФСГ и поэтому он растет быстрее остальных. Так происходит селекция (или выбор) доминантного фолликула из когорты растущих фолликулов (McNatty K.P. et al., 1979). Как правило, это событие происходит на 7–8-й день менструального цикла. По мере роста фолликулов содержание эстрадиола в крови постепенно повы-

шается. Кроме этого, доминантный фолликул интенсивно секреторирует ингибин В. Вследствие этих причин, приблизительно с 7–8-го дня цикла, начинается падение уровня ФСГ в крови.

Период времени, в течение которого уровень ФСГ превышает пороговый, необходимый для селекции и роста доминантного фолликула, называется *ФСГ-окном*. В естественном менструальном цикле ФСГ-окно обеспечивает селекцию одного доминантного фолликула.

Доминантный фолликул продолжает свое развитие и рост вплоть до овуляции, интенсивно продуцируя эстрадиол даже в условиях физиологического снижения уровня ФСГ. Считается, что это обеспечивается высокой чувствительностью клеток гранулезы доминантного фолликула не только к ФСГ, но также и к ЛГ. В ряде исследований было показано, что экспрессия ЛГ-рецепторов на гранулезных клетках достаточно высока, и это позволяет доминантному фолликулу продолжить развитие в среднюю и позднюю фолликулярные фазы цикла. Остальные фолликулы когорты подвергаются атрезии. Высокая чувствительность доминантного фолликула к ЛГ обеспечивается одной из важных функций ФСГ — индукцией экспрессии ЛГ-рецепторов на гранулезных клетках.

Постепенно уровень эстрадиола достигает порогового значения для включения уникального по своей природе механизма положительной обратной связи между яичниками и гипофизом — когда повышение уровня эстрогенов не «угнетает», а стимулирует секрецию ГТ гипофизом. Положительная обратная связь начинает работать при повышении уровня эстрадиола в крови до 500–800 пмоль/л обычно на 12-й день менструального цикла и функ-

ционирует в течение 2–3 дней (рис. 7). Реализация механизма положительной обратной связи абсолютно необходима для овуляторного пика ГТ и овуляции (рис. 8).

Считается, что достаточное содержание ЛГ-рецепторов в гранулезных клетках имеется в фолликулах диаметром 14 мм и более. Именно поэтому данные фолликулы чувствительны к ЛГ и при наличии паразитарного (преждевременного) пика ЛГ могут овулировать преждевременно или подвергнуться преждевременной лютеинизации.

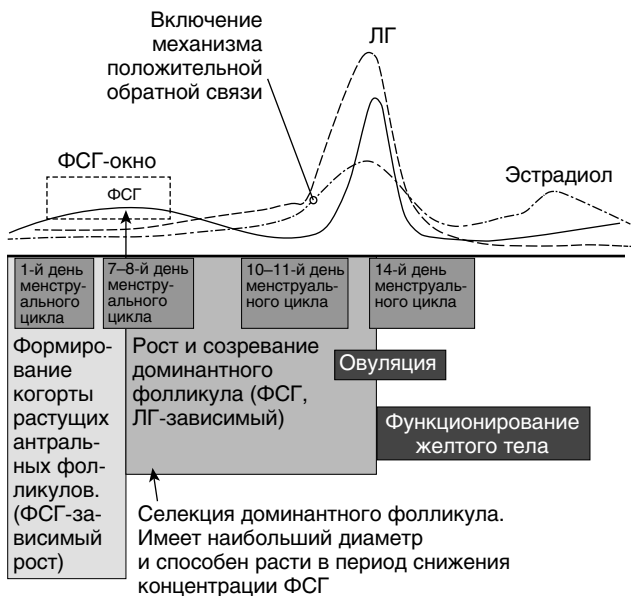


Рис. 7. Динамика уровня в крови фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), лютеинизирующего гормона (ЛГ) и эстрадиола в течение физиологического менструального цикла

Уровень гонадотропинов
в крови

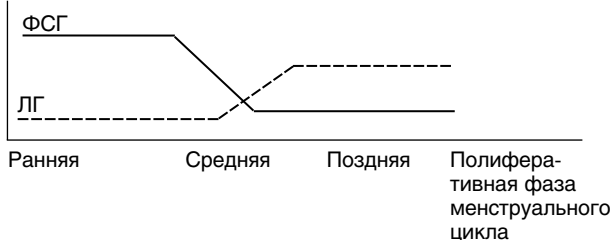


Рис. 8. Относительная динамика изменения уровня гонадотропинов в крови в течение пролиферативной фазы менструального цикла: ФСГ — фолликулостимулирующий гормон; ЛГ — лютеинизирующий гормон

Каким образом предотвратить атрезию и «выход» в рост не одного, а нескольких фолликулов? Считается, что это достигается «расширением» ФСГ-окна. Действительно, введение препаратов, содержащих ФСГ, приводит к соответствующему увеличению концентрации последнего. Это вызывает рост и развитие не одного, а нескольких фолликулов (рис. 9)! Понимание теории ФСГ-окна необходимо для осуществления так называемой «мягкой» стимуляции — стимуляции низкими дозами ФСГ для получения небольшого количества фолликулов.

Важным аспектом рассматриваемой проблемы как с научной, так и с практической точек зрения является роль ЛГ в фолликулогенезе.

ЛГ имеет следующие точки приложения:

- активация синтеза андрогенов в тека-клетках с последующей их конверсией в эстрогены в гранулезе;
- стимуляция роста доминантного фолликула в среднюю и позднюю пролиферативную фазы

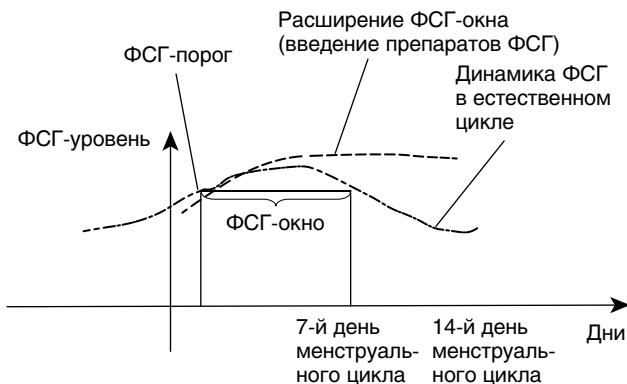


Рис. 9. Схематическое изображение динамики уровня в крови фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) в естественном менструальном цикле и при введении ФСГ-содержащих препаратов

менструального цикла (ФСГ-, ЛГ-зависимый рост), при этом влияние ЛГ на клетки гранулезы обеспечивает дополнительную активацию ароматазы и продукцию эстрадиола;

- овуляция;
- лютеинизация клеток гранулезы;
- регуляция гормонпродуцирующей функции желтого тела.

Считается, что реализация вышеперечисленных функций ЛГ возможна, когда содержание этого гормона находится в некотором оптимальном коридоре значений. Каковы границы этого коридора? До сих пор ответ на этот вопрос не получен. По данным большинства исследований, посвященных указанной проблеме, уровень ЛГ должен находиться в пределах 0,5–3 МЕ/л.

Предполагается, что для обеспечения физиологического стероидогенеза в яичниках достаточно активации <1% ЛГ-рецепторов фолликулов. Имен-

но поэтому количество эндогенного ЛГ в период десенсилизации гипофиза агонистами гонадотропин-рилизинг-гормона (ГнРГ) является достаточным для эффективной стимуляции препаратами ФСГ. Однако в отдельных работах было показано, что значительная супрессия синтеза ЛГ может быть ассоциирована со снижением эффективности протокола ЭКО, а также повышением частоты невынашивания. Очень низкая концентрация ЛГ приводит к нарушению созревания и роста фолликулов, снижению синтеза в них андрогенов и эстрадиола, а высокая концентрация ЛГ — к атрезии недоминантных фолликулов, торможению пролиферации гранулезы, преждевременной лютеинизации, нарушению созревания ооцита.

В последние годы получены данные о том, что одиночные нуклеотидные полиморфизмы (инсерции либо делеции одного или нескольких оснований) в гене, кодирующем β -субъединицу ЛГ, могут иметь клиническое значение. Наличие вариантов β -субъединицы ЛГ может приводить к снижению эффективности стимуляции препаратами ФСГ, к использованию больших курсовых доз ФСГ у пациенток с нормальными показателями овариального резерва. Предполагается, что в этом случае может проявляться разная биологическая активность и/или фармакокинетика эндогенного ЛГ, обусловленная его разными генетическими вариантами. Назначение препаратов с ЛГ-активностью таким пациенткам в следующем протоколе снижает потребность в ФСГ. Выделены следующие неблагоприятные полиморфизмы β -субъединицы ЛГ (Alviggi C. et al., 2009):

- Trp8Arg (rs 1800447);
- Ile15Thr (rs 34349826).

Полиморфизмы также обнаружены в генах рецептора ФСГ, что может являться причиной снижения эффективности стимуляции яичников и повышения потребности в ФСГ:

- Asn680Ser (rs 6166);
- Thr307Ala (rs 6165);
- -29G/A (rs 1394205);
- Ile160Thr (rs 121909659).

Согласно данным F.G. Moron и соавт. (2010), вариант Asn680Ser (rs6166) является прогностическим фактором «бедного» ответа яичников на гонадотропную стимуляцию.

Таким образом, фолликуло- и оогенез представляют собой длительные, генетически детерминированные сопряженные физиологические процессы, в регуляцию которых вовлечены локальные (внутрияичниковые) и гормональные факторы.

Рост и развитие фолликулов под влиянием гонадотропинов наблюдается в течение заключительной, так называемой гонадотропинзависимой фазы фолликулогенеза. При этом основную роль играет фолликулостимулирующий (ФСГ), а на последних этапах развития — лютеинизирующий гормон (ЛГ).

В обычных условиях пороговый уровень эндогенного ФСГ обеспечивает рост до стадии предовуляторного, как правило, одного фолликула.

В протоколах ЭКО для обеспечения роста нескольких фолликулов необходимо увеличение периода времени, в течение которого уровень ФСГ превышает пороговый, необходимый для селекции и роста одного доминантного фолликула. Это достигается с помощью экзогенного введения препаратов, содержащих гонадотропины.