О.М. Носенко, д.м.н., **Г.М. Яковець,** Донецький національний медичний університет ім. М. Горького

Тактика ведення пацієнток з безплідністю після хірургічної стимуляції овуляції з приводу кломіфенрезистентної форми синдрому полікістозних яєчників

О.М. Носенко

Синдром полікістозних яєчників (СПКЯ) – одна з найбільш актуальних проблем гінекологічної ендокринології та репродуктології (М.А. Геворкян и соавт., 2008; Н.С. Луценко, 2009; О.М. Юзько і співавт., 2010). Серед пацієнток з ендокринною безплідністю СПКЯ зустрічається у 30-40%, і у 85-94% пацієнток із СПКЯ діагностують безплідність. Відновлення овуляторних циклів при лікуванні пацієнток із СПКЯ досягає 80-90%, проте ефективність відновлення фертильності не перевищує 50-60% (О.Ф. Серова и соавт., 2005; К.С. Рубан, В.В. Сімрок, 2007; К.В. Краснопольская, 2008; S.A. Amer et al., 2009).

Рекомендованим препаратом першої лінії для індукції овуляції залишається антиестроген кломіфену цитрат (КЦ) (Consensus on infertility treatment related to polycystic ovary syndrome/The Thessaloniki ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group, 2008; M.M. Zain et al., 2009). Рекомендованою другою лінією втручання, коли застосування КЦ не приводить до вагітності, є екзогенні гонадотропіни або лапароскопічна оваріальна хірургія. Використання екзогенних гонадотропінів пов'язане зі збільшенням ризику багатоплідної вагітності (Н.А. Маслянюк, 2010) і виникнення синдрому гіперстимуляції яєчників (Л.Н. Щербакова и соавт., 2010; E.J. van Santbrink, 2003). Лапароскопічна оваріальна хірургія є альтернативою терапії гонадотропінами у кломіфенрезистентних ановуляторних жінок із СПКЯ (C. David et al., 2008). Механізм відновлення овуляторної і репродуктивної функції після оваріальної хірургії вивчали багато дослідників (А.В. Чайка, 2003; С.М. Корнієнко, 2003; Г.О. Желєзна, 2004; M.L. Hendriks et al., 2007), але потрібні подальші дослідження з цього питання, у тому числі виявлення чинників порушень селекції фолікулів та інгібіторів біосинтезу естрогенів, наявних у фолікулярній рідині. Настання вагітності після хірургічної стимуляції овуляції (ХСО) реєструють лише у 40-50% пацієнток, що потребує проведення ад'ювантної терапії (Consensus on infertility treatment related to polycystic ovary syndrome/The Thessaloniki ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group, 2008), вид і час призначення якої залишається відкритим питанням.

Наступною лінією втручання у разі негативних репродуктивних результатів є екстракорпоральне запліднення (ЕКЗ), однак оптимальний протокол контрольованої стимуляції овуляції (КОС), який забезпечив би адекватний фолікулогенез і отримання достатньої кількості зрілих овоцитів високої якості та мав мінімальну ймовірність ускладнень (Е.А. Калинина, 2002; Е.А. Осина, 2004; Е.С. Булычева, 2008; А.С. Калугина, 2009), ще на стадії обговорення. Існує необхідність подальшого проведення рандомізованих контрольованих досліджень щодо порівняння ембріологічних і клінічних результатів протоколів ЕКЗ з використанням агоністів і антагоністів гонадотропін-рилізинг-гормону (ГнРГ).

З'ясування позитивних механізмів впливу лапароскопічної оваріальної хірургії на відновлення овуляції, патогенетичне обґрунтування, розробка і впровадження оптимальних режимів ад'ювантної терапії і протоколів КОС при ЕКЗ можуть привести до збільшення кількості вагітностей у пацієнток з кломіфенрезистентною формою СПКЯ.

Мета дослідження – підвищення ефективності й безпечності відновлення репродуктивної функції у жінок з кломіфенрезистентною формою СПКЯ після ХСО шляхом розробки і впровадження патогенетично обґрунтованих режимів ад'ювантної терапії й оптимізації вибору протоколу КОС в циклі ЕКЗ.

Матеріали й методи дослідження

Усього проспективно було обстежено 175 безплідних жінок репродуктивного віку з кломіфенрезистентною формою СПКЯ і 46 пацієнток контрольної групи.

Критеріями відбору пацієнток у групу із СПКЯ були: хронічна оліго- або ановуляція, гіперандрогенізм, полікістозні яєчники, відсутність ендометріозу, захворювань печінки, цукрового діабету, гіперпролактинемії й іншої ендокринної патології; прохідність маткових труб; базальний рівень фолікулстимулюючого гормону (ФСГ) у ранній фолікуліновій фазі не більше ніж 10 МО/мл; кломіфенрезистентність; нормоспермія у чоловіка.

До І групи увійшли 115 жінок із СПКЯ, із них групу ІА становили 33 жінки, які після ХСО не отримували будь-якої ад'ювантної терапії; групу ІБ – 32 жінки, які безпосередньо після ХСО отримали ад'ювантну терапію КЦ; групу ІВ – 50 жінок, які через 3 міс після ХСО отримали ад'ювантну терапію КЦ.

У ІІ групі, до якої увійшли 60 жінок із СПКЯ, виділили дві підгрупи: групу ІІА (30 жінок, які після ХСО пройшли ЕКЗ з використанням агоністів ГнРГ) і групу ІІБ (30 жінок, яких після ХСО включили до циклу ЕКЗ з антагоністами ГнРГ).

До контрольної групи увійшли 46 соматично здорових жінок з трубно-перитонеальною безплідністю з регулярним овуляторним циклом без будь-яких ендокринних порушень. В експериментальне дослідження включили 40 пацієнток І групи, 46 жінок групи контролю і 7 пацієнток, яким було проведено ЕКЗ з приводу трубної безплідності.

Під час загальноклінічного обстеження хворих вивчали дані соціально-економічного статусу, гінекологічного, акушерського, соматичного, інфектологічного й алергологічного анамнезу. Усім жінкам було проведено повне клініко-лабораторне дослідження й обстеження на урогенітальні інфекції, консультації терапевта, ендокринолога. Антропометричне дослідження включало оцінку індексу маси тіла, визначення конституціонального морфотипу і виразності гірсутного синдрому за гормональною шкалою Феррімана-Галвея.

Концентрацію гормонів – лютеїнізуючого гормону (ЛГ), ФСГ, пролактину (ПРЛ), тестостерону (Т), андростендіону (АС), естрадіолу (E_2), дегідроепіандростерону сульфату (ДГЕАС), кортизолу (К), прогестерону (П), інсуліну, антимюллерового гормону (АМГ) – у сироватці периферичної крові і фолікулярній рідині досліджували за допомогою стандартних наборів для імунорадіометричного дослідження.

УЗД органів малого таза проводили з використанням трансабдомінального і трансвагінального конвексних датчиків з частотою 3,5 і 5 МГц відповідно.

Лапароскопію з хромосальпінгоскопією виконували за стандартною методикою (В.І. Кулаков і співавт., 2000).

Усі резектовані частини й біоптати яєчників піддавали гістологічному дослідженню за допомогою світлового мікроскопа, обладнаного цифровим фотоапаратом.

Оцінку кількості і якості отриманих овоцитів і ембріонів проводили з використанням світлового мікроскопа з хоффманівським контрастуванням, обладнаного цифровою відеокамерою.

Фолікулярну рідину забирали з яєчників у І групі і групі контролю під час виконання ендохірургічного втручання на 5-й день менструального циклу. Розмір фолікулів, з яких аспірували вміст, контролювали за допомогою УЗД під час оперативного втручання. У групі з ЕКЗ фолікулярну рідину отримували під час забору яйцеклітин з фолікулів діаметром понад 15 мм. Зібрану фолікулярну рідину негайно центрифугували протягом 30 хв при 3 тис. обертів, заморожували і зберігали при температурі -20°С. Заморожені зразки, обкладені сухим льодом, транспортували з м. Донецька до м. Уппсали (Швеція). На транспортування було отримано дозвіл МОЗ України.

Талу фолікулярну рідину від жінок групи контролю і пацієнток із СПКЯ і свіжу фолікулярну рідину від пацієнток з ЕКЗ – донорів гранульозних клітин використали для підготовки п'яти окремих пулів:

– фолікулярна рідина від жінок групи контролю;

– необроблена фолікулярна рідина від пацієнток із СПКЯ;

– фолікулярна рідина від пацієнток із СПКЯ, попередньо оброблена деревним вугіллям;

– ефірний екстракт фолікулярної рідини від пацієнток із СПКЯ;

– фолікулярна рідина ФСГ-стимульованих жінок у циклі ЕКЗ.

Контрольним інкубатом стало середовище DMEM. Усі п'ять пулів і DMEM було розділено відповідно на дві аліквоти для конверсії й обробки набором ^{11}С-ворозолу. Гранульозні клітини були отримані від 7 пацієнток, у яких здійснили забір овоцитів у циклі ЕКЗ. Після видалення яйцеклітин гранульозні клітини відділяли від фолікулярної рідини центрифугуванням 500 обертів за 10 хв і промивали DMEM і Glutamax IMX з додаванням пеніциліну G 100 Од/мл і стрептоміцину сульфату 100 мкг/мл, підраховували гемоцитометром і зберігали в 1 мл DMEM при температурі 0°С до проведення експерименту.

Ароматазну активність визначали вимірюванням $[^3H]_2O$, який продукується під час стероїдспецифічного вивільнення ^{3}Н із С-1β позиції 4-андростен-3,17-діона ($[1\beta\text{-}^3H]\text{-}A_4$). Сцинтиляційний підрахунок $[^3H]_2O$ радіоактивності здійснювали методом позитронної емісійної томографії (ПЕТ), застосовували короткоживучий позитронвипромінюючий радіонуклід ^{11}С. Пластини відображень були прочитані лазерним фосфорним зчитувачем, а цифрові зображення збережені для наступного кількісного підрахунку з використанням програмного забезпечення. Кількісну оцінку специфічної зв'язувальної радіоактивності провели шляхом вирахування кожного неспецифічного зразка (1 мкмоль ворозолу) з відповідної пари (1 нМ). Читання загального підрахунку 20 мкл стандарту дозволило виразити калькуляцію калібрувального фактора у фмоль/підрахунок. Застосовуючи цей калібрувальний фактор, специфічну зв'язувальну радіоактивність перерахували у фмоль. Тільки 5 із 7 експериментів зі зв'язування були технічно успішними, таким чином, кількість зразків з вивчення зв'язування дорівнювала 5.

Отримані дані було оброблено за допомогою комп'ютера з використанням електронної таблиці і методів аналітичної та варіаційної статистики.

Результати дослідження

На І етапі дослідження здійснили відбір хворих і вивчили у них загальноклінічні, антропометричні, анамнестичні дані, ехо-, відео- і морфоструктуру яєчників, провели рандомізацію груп і підготували їх порівняльну характеристику. Усіх пацієнток із СПКЯ було прооперовано щадним способом шляхом мікрорезекції й аспіраційного дренування фолікулів зі збиранням фолікулярної рідини. У жодної з жінок після оперативного втручання не спостерігалося значного пригнічення початково високої андрогенсекретуючої функції яєчників. Останнє можна розглядати як можливий чинник ризику бідної оваріальної відповіді на гонадотропіни у програмах ЕКЗ, оскільки Т у фізіологічних концентраціях потенціює чутливість рецепторів зростаючих фолікулів до стимулюючого ефекту ФСГ (Е.С. Булычева, 2008).

Середній вік обстежених жінок у групі пацієнток із СПКЯ становив 26,95±0,31, у контрольній групі – 27,30±0,49 року і між групами вірогідно не відрізнявся.

Для пацієнток із СПКЯ характерним було перевищення маси тіла в 1,22 раза ($p<0,01$). Жінок гіперстенічної статури у групі хворих із СПКЯ (47,67 %) було у 4,39 раза більше, ніж у групі контролю. Обстежені пацієнтки із СПКЯ мали надлишковий ріст волосся у всіх зонах Феррімана-Галвея: середнє гірсутне число (11,28±0,20 бала) перевищувало таке в контрольній групі в 3,79 раза ($p<0,01$). Найбільш характерною для обстеженої когорти жінок із СПКЯ була наявність надлишкового росту пушкового волосся в зоні спини (попереку), плечей, задньої поверхні стегон.

Дослідження менструальної функції виявило, що у пацієнток із СПКЯ середня кількість менструальних циклів за останній рік становила 6,35±0,18 і була менша за таку у групі контролю в 1,90 раза ($p<0,01$). Затримка менструації у жінок із СПКЯ варіювала від 0 до 1095 днів, у середньому становила 111,43±15,25 дня і вірогідно між групами жінок із СПКЯ не відрізнялася. У всіх пацієнток контрольної групи менструальні цикли були овуляторними, що було підтверджено графіками базальної температури і тестами на овуляцію, тоді як у пацієнток із СПКЯ менструальні цикли переважно були ановуляторними.

Усі обстежені жінки із СПКЯ страждали на безплідність: первинну – 70,86%

Продовження на стор. 12.

О.М. Носенко, д.м.н., **Г.М. Яковець,** Донецький національний медичний університет ім. М. Горького

Тактика ведення пацієнток з безплідністю після хірургічної стимуляції овуляції з приводу кломіфенрезистентної форми синдрому полікістозних яєчників

Продовження. Початок на стор. 11.

пацієнток, вторинну – 29,14%. Тривалість безплідності вірогідно не відрізнялася в обстежених жінок і становила: у групі з СПКЯ – 5,49±0,29 року, у тому числі у групі ІА – 5,24±0,63; ІБ – 4,59±0,61; ІВ – 4,88±0,50; ІІА – 6,50±0,73; ІІБ – 6,73±0,75, в контрольній групі – 5,90±0,46 року. З приводу безплідності пацієнтки проходили курси протизапального лікування за місцем спостереження, а також стимуляцію овуляції КЦ, до якого були резистентні. За даними метросальпінгографії, прохідність маткових труб обстежуваних пацієнток не була порушена.

Аналіз інфектологічного статусу показав, що у групі пацієнток із СПКЯ урогенітальні інфекції або бактеріальний вагіноз раніше мали 45,14% жінок, у тому числі у групі ІА – 36,36%, ІБ – 43,75%, ІВ – 40,00%, ІІА – 56,67%, ІІБ – 53,33%, у групі контролю – 63,04%. Усі інфіковані пацієнтки були сановані за місцем спостереження або перед початком лікування. Під час контрольного обстеження у жодної жінки не виявили будь-яких урогенітальних інфекцій.

Переважна більшість пацієнток із СПКЯ мали порушення менструального циклу у вигляді олігоменореї або аменореї. Інші гінекологічні захворювання в анамнезі спостерігалися у групі із СПКЯ у 41,52% випадків, у групі ІА – у 51,52%, ІБ – у 75,00%, ІВ – у 66,00%, ІІА – у 76,67%, ІІБ – у 76,67%. У 28,00% пацієнток із СПКЯ реєстрували ерозію шийки матки, у 32,07% – гіперплазію ендометрію, у 26,58% – поліп тіла матки, у 26,58% – сальпінгіти. Усі пацієнтки контрольної групи мали в анамнезі сальпінгіти специфічної й неспецифічної етіології, і цих жінок пролікували за місцем проживання.

В обстежених пацієнток із СПКЯ було виявлено характерний для цієї патології ендокринний дисбаланс, який проявлявся гонадотропною дисфункцією зі збільшенням продукції ЛГ в 1,91 (p<0,01) і ПРЛ в 1,19 (p<0,01) раза на тлі зниження ФСГ в 1,19 раза (p<0,01), що призводило до збільшення коефіцієнта співвідношення ЛГ/ФСГ у 2,23 раза (p<0,01). Гіперандрогенія у пацієнток із СПКЯ проявлялася підвищенням вільного Т у 2,24 (p<0,01), АС – в 1,86 (p<0,01), ДГЕАС – у 2,97 (p<0,01) раза. При цьому вміст стероїдзв'язувального глобуліну був в 1,68 раза (p<0,01) нижчий, ніж у групі контролю. На 5-й день менструального циклу в обстежених жінок із СПКЯ реєстрували збільшення середньої концентрації E_2 в сироватці крові у 1,55 (p<0,01) і П у 2,19 (p<0,01) раза, а на 21-й день рівень П був зменшений у 3,15 раза (p<0,01). Середній рівень сироваткового АМГ у пацієнток із СПКЯ (6,57±0,13 нг/мл) у 2,78 раза перевищував такий у групі контролю. Концентрація цього гормона у групах ІА, ІБ, ІВ, ІІА і ІІБ вірогідно не відрізнялася, однак також перевищувала таку у групі контролю відповідно у 2,84 (p<0,01), 2,84 (p<0,01), 2,82 (p<0,01), 2,80 (p<0,01) і 2,57 (p<0,01) раза. Рівень інсуліну у пацієнток із СПКЯ в 1,53 раза (p<0,01) перевищував такий у групі контролю на тлі зниження концентрації глюкози в периферичній крові в 1,19 раза, що призводило до збільшення співвідношення інсулін/глюкоза у 2,09 раза (p<0,01). Гормональний профіль периферичної крові у пацієнток групи СПКЯ вірогідних розходжень не мав, що дало змогу здійснити оцінку розроблених методів лікування.

УЗД обстежених пацієнток із СПКЯ виявило, що їхні яєчники в усіх випадках мали не менше 12 кістозних включень діаметром 2-9 мм. Середній об'єм правого яєчника при СПКЯ (15,27±0,44 см^3) перевищував аналогічний у групі контролю у 3,81 раза (p<0,01), лівого (13,88±0,25 см^3) – у 3,58 раза (p<0,01).

Гістологічне дослідження 175 пар резектованих частин яєчників від пацієнток з кломіфенрезистентними формами СПКЯ в усіх випадках підтвердило діагноз СПКЯ: потовщення білкової оболонки, множинні атретичні тіла і фолікулярні кісти, вогнища стромального текоматозу й гіперплазії текатканини, склероз строми різного ступеня вираження. Яєчникам пацієнток із СПКЯ була притаманна відсутність білих тіл, що свідчило про наявність хронічної ановуляції. Особливістю біоптатів яєчників таких пацієнток порівняно з пацієнтками контрольної групи були численні білі тіла, що вказувало на наявність овуляторних циклів.

На ІІ етапі було визначено рівні статевих стероїдів і АМГ у фолікулярній рідині й сироватці периферичної крові, проведено парний кореляційно-регресійний аналіз їх зв'язків, експериментально доведено наявність у фолікулярній рідині речовин, які інгібують ароматазу, на підставі вивчення і зв'язування ^{11}С-ворозолу у гранульозних клітинах розроблено схему порушень овуляції у пацієнток із СПКЯ.

Спочатку під час експериментального дослідження вивчали ароматазну активність, константу дисоціації й максимальне зв'язування ^{11}С-ворозолу у гранульозних клітинах після інкубації їх з фолікулярною рідиною від ендокринологічно здорових жінок, пацієнток з кломіфенрезистентною формою СПКЯ і жінок, стимульованих ФСГ у циклі ЕКЗ порівняно з інкубацією з DMEM (табл. 1), а потім – ароматазну активність, константу дисоціації й максимальне зв'язування ^{11}С-ворозолу у гранульозних клітинах після інкубації їх з фолікулярною рідиною від пацієнток із СПКЯ після обробки деревним вугіллям (видалення стероїдів) і ефіром (видалення протеїнів) порівняно з фолікулярною рідиною без обробки (табл. 2).

У результаті експериментального дослідження виявлено, що сполуки, які знаходяться у фолікулярній рідині, можуть швидко регулювати функцію ензиму ароматази у гранульозних клітинах через зміни афінітету субстрату до ензиму й через блокування активних сайтів. У жінок із СПКЯ високі концентрації 5α-редуктованих андрогенів у фолікулярній рідині блокують активні сайти ароматази, знижують продукцію естрогенів і зупиняють розвиток маленьких фолікулів.

Таблиця 1. Ароматазна активність, константа дисоціації й максимальне зв'язування ^{11}С-ворозолу у гранульозних клітинах після інкубації з фолікулярною рідиною від ендокринологічно здорових жінок, пацієнток з кломіфенрезистентною формою СПКЯ і жінок, стимульованих ФСГ у циклі ЕКЗ, виражена у відсотках від інкубації з DMEM, M±m

Група	$[^3H]_2O$ вивільнення, n=7	Зв'язування ^{11}С-ворозолу	
		Кд, n=5	$Зв_{макс}$, n=5
DMEM	100% $^{к, с, ф}$	100% $^{к, с, ф}$	100% $^{к, ф}$
Контроль	39,43±2,03 $^{д, с, ф}$	693,20±75,59 $^{д, с, ф}$	203,40±19,08 $^{д, с, ф}$
СПКЯ	30,29±1,98 $^{д, к, ф}$	420,20±40,58 $^{д, к, ф}$	106,00±6,14 $^{к, ф}$
ФСГ-стимуляція	213,57±10,62 $^{д, к, с}$	246,40±20,20 $^{д, к, с}$	112,20±5,62 $^{к, с}$

Примітка: Кд – константа дисоціації; $Зв_{макс}$ – максимальне зв'язування ^{11}С-ворозолу в гранульозних клітинах; $^{д, с, п, ф}$ – різниця статистично вірогідна відносно показників груп DMEM, контролю, СПКЯ і ФСГ-стимульованих жінок (p<0,05).

Таблиця 2. Ароматазна активність, константа дисоціації й максимальне зв'язування ^{11}С-ворозолу у гранульозних клітинах після інкубації з фолікулярною рідиною від пацієнток із СПКЯ, обробленою деревинним вугіллям і ефіром, виражена у відсотках від значень інкубації з необробленою фолікулярною рідиною від пацієнток із СПКЯ, M±m

Група	$[^3H]_2O$ вивільнення, n=7	Зв'язування ^{11}С-ворозолу	
		Кд, n=5	$Зв_{макс}$, n=5
СПКЯ	100% $^{в, е}$	100% $^{в, е}$	100% $^{в, е}$
СПКЯ-вугілля	421,29±15,41 $^{с, е}$	40,00±6,14 $^{с, е}$	73,80±9,75 $^{с, е}$
СПКЯ-ефір	28,57±1,13 $^{с, в}$	15,00±0,71 $^{с, в}$	25,20±2,69 $^{с, в}$

Примітка: СПКЯ-вугілля – група зразків фолікулярної рідини від пацієнток із СПКЯ, обробленої деревинним вугіллям; СПКЯ-ефір – група зразків фолікулярної рідини від пацієнток із СПКЯ, обробленої ефіром; $^{с, в, е}$ – різниця статистично вірогідна відносно показників груп СПКЯ, СПКЯ-вугілля, СПКЯ-ефір (p<0,05).

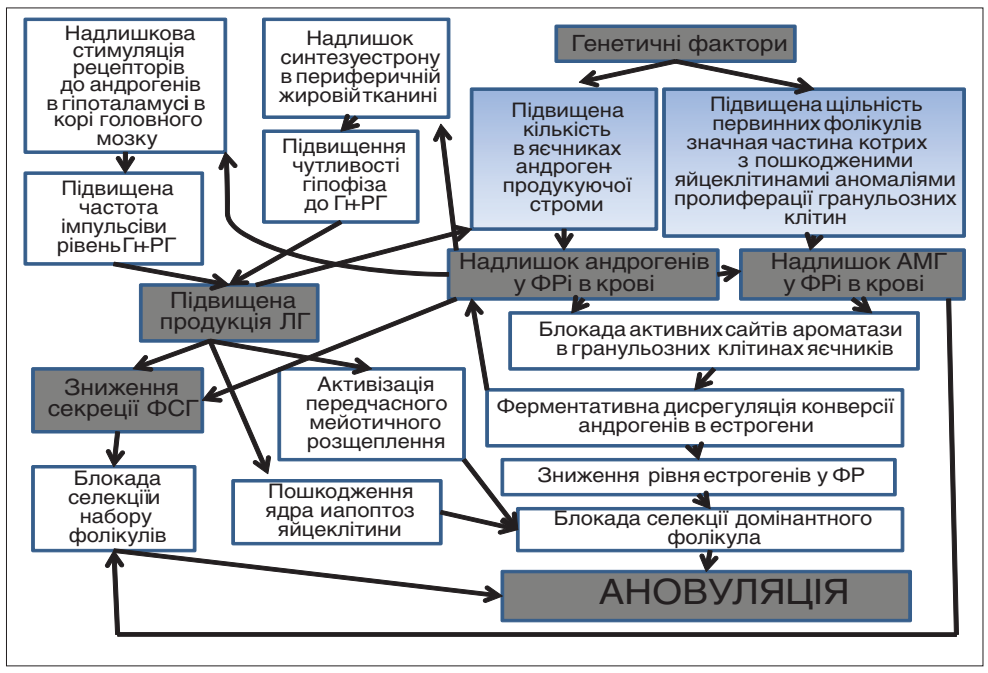

Рис. Патогенез ановуляції при кломіфенрезистентній формі СПКЯ

Для визначення ролі порушень конверсії гормонів при кломіфенрезистентній формі СПКЯ було вивчено вміст статевих гормонів і АМГ у фолікулярній рідині й сироватці периферичної крові в 40 пацієнток із СПКЯ й 46 здорових жінок. У пацієнток із СПКЯ на 5-й день менструального циклу П сироватки периферичної крові був вищий за такий у групі контролю, в 2,40 раза (p<0,01), а у фолікулярній рідині нижчий у 13,74 раза (p<0,01). Концентрація сироваткових АС і Т при СПКЯ була вірогідно вищою за таку в контрольній групі відповідно у 2,67 (p<0,01) і 2,07 (p<0,01) раза, у фолікулярній рідині – у 6,68 (p<0,001) і 2,81 (p<0,01) раза. Рівень сироваткового E_2 при СПКЯ перевищував такий у групі контролю в 1,91 раза (p<0,002), тоді як концентрація його у фолікулярній рідині, навпаки, у групі контролю перевищувала таку при СПКЯ у 35,39 раза (p<0,001). У пацієнток із СПКЯ на 5-й день менструального циклу вміст АМГ у сироватці периферичної крові був вищий за такий у групі контролю у 2,77 раза (p<0,01), а у фолікулярній рідині – у 4,59 раза (p<0,01). Співвідношення E_2/Т у фолікулярній рідині від пацієнток контрольної групи (93,63) перевищувало таке при СПКЯ (0,94) у 99,61 раза (p<0,01), що підтверджує різко знижену активність ароматази у гранульозних клітинах фолікулів при СПКЯ.

Зважаючи на те, що у клінічній практиці потрібні не тільки інформативні, а й доступні методики діагностики, ми вирішили з'ясувати, наскільки вірогідно гормональна активність сироватки периферичної крові визначає вміст статевих гормонів і АМГ у фолікулярній рідині. Рівень сироваткового АМГ поступово збільшувався при підвищенні рівня інтрафолікулярного АМГ, і найбільш точно цю залежність описано за допомогою ступеневої апроксимуючої кривої виду $АМГ_{сир.}=0,103(АМГ_{фол.})^{0,661}$, де коефіцієнт апроксимації $R^2=0,92$ (p<0,01), коефіцієнт кореляції r=0,93 (p<0,01). Кореляційно-регресійний аналіз показав, що залежність між рівнями сироваткового й інтрафолікулярного Т найбільш адекватно апроксимувалася поліноміальною залежністю виду $Т_{сир.}=0,001(Т_{фол.})^2-0,031(Т_{фол.})+1,456$ ($R^2=0,89$, p<0,01, r=0,88, p<0,01); АС – також поліноміальною залежністю $АС_{сир.}=0,001(АС_{фол.})^2-0,031(АС_{фол.})+1,456$ ($R^2=0,98$, p<0,01, r=0,99, p<0,01). Між сироватковим і фолікулярним рівнями E_2 і П не виявлено зв'язку.

Кореляційно-регресійний аналіз взаємовідносин між гормонами у фолікулярній рідині показав, що зв'язок між рівнями АМГ і Т найбільш адекватно апроксимувався експоненціальною залежністю виду $Т_{фол.}=11,95e^{0,002(АМГ_{фол.})}$ ($R^2=0,67$, p<0,01, r=79, p<0,01); між рівнями АМГ і АС – ступеневою залежністю виду $АС_{фол.}=0,997(АМГ_{фол.})^{1,171}$ ($R^2=0,84$, p<0,01, r=0,82, p<0,01); між рівнями АМГ й E_2 – ступеневою залежністю виду $E_{2фол.}=1E+0,8(АМГ_{фол.})^{-2,37}$ ($R^2=0,90$, p<0,01, r=-0,86, p<0,01); між рівнями АМГ і П – ступеневою залежністю виду $П_{фол.}=1E+0,6(АМГ_{фол.})^{-1,63}$ ($R^2=0,65$, p<0,01, r=-0,69, p<0,01). Унаслідок перерахованих кореляцій виявили зворотний зв'язок між вмістом у фолікулярній рідині АМГ і коефіцієнтом співвідношення рівнів E_2/Т, який апроксимувався найбільш адекватною ступеневою залежністю виду $E_{2фол.}/Т_{фол.}=2E+0,8(АМГ_{фол.})^{-3,06}$ ($R^2=0,89$, p<0,01, r=-0,71, p<0,01); коефіцієнтом співвідношення рівнів АС і E_2/Т, який апроксимувався ступеневою залежністю виду $E_{2фол.}/Т_{фол.}=3E+07(АС_{фол.})^{-2,329}$ ($R^2=0,84$, p<0,01, r=-0,60, p<0,01).

Таким чином, репродуктивні порушення при кломіфенрезистентній формі СПКЯ тісно пов'язані з генетично детермінованими порушеннями в системах гормонального і ферментативного гомеостазу (рис.).

Генетично детермінована підвищена кількість андрогенпродукуючої строми у яєчниках і підвищена щільність первинних андрогензалежних фолікулів, значна частина яких має пошкоджені яйцеклітини й аномалії проліферації гранульозних клітин, викликають надлишок андрогенів і

АМГ у фолікулярній рідині і крові. Як показало експериментальне дослідження, це, у свою чергу, спричиняє зміни афінітету субстрату до ензиму, блокаду активних сайтів ароматази і, як результат, – ферментативну дисрегуляцію конверсії андрогенів в естрогени. Ферментативна дисрегуляція конверсії андрогенів в естрогени призводить до надлишку андрогенів у фолікулярній рідині й сироватці крові, зниження вмісту естрогенів у фолікулярній рідині, блокади селекції домінантного фолікула, ановуляції. Підвищений рівень андрогенів викликає зниження секреції ФСГ і, як і надлишок АМГ, спричиняє блокаду селекції й набору фолікулів і ановуляції. Підвищена кількість андрогенів надлишково стимулює рецептори до андрогенів у гіпоталамусі і в корі головного мозку, що може сприяти підвищенню частоти імпульсів і секреції ГнРГ і гіперпродукції ЛГ. Гіперандрогенія також призводить до надлишкового синтезу естрону в периферичних тканинах, що, у свою чергу, підвищує чутливість гіпофіза до ГнРГ і збільшує продукцію ЛГ. Гіперпродукція ЛГ призводить до стимуляції синтезу андрогенпродукуючої теки, зниження секреції ФСГ, блокади селекції й набору фолікулів, активізації передчасного мейотичного розщеплення, пошкодження ядра й апоптозу яйцеклітини, порушення селекції домінантного фолікула, ановуляції.

На III етапі дослідження було вивчено вплив ХСО шляхом лапароскопічної мікрорезекції й аспірації фолікулів на гормональний профіль сироватки периферичної крові, динаміку показників умісту сироваткових гормонів після ХСО протягом півроку, результати відновлення репродуктивної функції протягом року після операції. Було виявлено, що проведення ХСО при СПКЯ за розробленою методикою призвело до зниження концентрації ЛГ у сироватці периферичної крові через місяць після операції у 1,25 раза ($p_д$<0,01), коефіцієнта співвідношення ЛГ/ФСГ – в 1,39 ($p_д$<0,01); ПРЛ – в 1,21 ($p_д$<0,01); Т – в 1,77 ($p_д$<0,01); АС – в 1,32 ($p_д$<0,01); АМГ – в 1,41 ($p_д$<0,01), а також до підвищення рівня ФСГ в 1,12 раза ($p_д$<0,01).

Ці гормональні зміни можна пояснити тим, що видалення частини андрогенпродукуючої строми й аспірація вмісту і гранульозних клітин з фолікулів спричинили зниження вмісту андрогенів і АМГ у фолікулярній рідині й активацію активних сайтів ароматази, підвищення конверсії андрогенів в естрогени. Зниження рівня ЛГ і підвищення рівня ФСГ призвели до набору й селекції фолікулів, росту домінантного фолікула й овуляції. Через місяць унаслідок відновлення андрогенпродукуючої строми починалося поступове повернення вмісту ЛГ, ФСГ, співвідношення ЛГ/ФСГ й АС до передопераційного рівня, і через 6 міс після оперативного втручання вміст цих гормонів вірогідно не відрізнявся від вихідного, що пояснює тимчасовий характер феномена інверсії чутливості до КЦ і робить доцільним призначення ад'ювантної терапії безпосередньо після ХСО. Цю гіпотезу підтвердило вивчення розподілу настання вагітності залежно від часу проведення ад'ювантної терапії (табл. 3).

У групах ІА й ІБ більшість вагітностей настала в перші 3 міс після операції, у групі ІВ – у термін 4-6 міс після хірургічного втручання під час отримання ад'ювантної терапії. Після 6 міс вагітність у всіх групах настала в середньому лише у 6% пацієнток.

Загальна частота настання маткової вагітності у пацієнток, які одразу після оперативного втручання отримували КЦ, була у 2,16 раза більшою (p<0,002), ніж у групі пацієнток, які не отримували КЦ після операції, і в 1,44 раза (p<0,05) більшою за таку у групі пацієнток, які отримували КЦ через 3 міс після операції. Кількість пологів у групі ІБ перевищувала таку у групі ІА у 2,52 раза (p<0,0008) і у групі ІВ – в 1,49 раза (p<0,04). Виявлено вірогідну зворотну кореляційну залежність між частотою настання вагітності й рівнем сироваткового АМГ до операції (r=-0,63) і через місяць після операції (r=-0,80). У 96,64% пацієнток, які не завагітніли, рівень АМГ у сироватці крові перевищував 4,42 нг/мл. У 62,71% жінок, які завагітніли після операції, рівень сироваткового АМГ не перевищував 3,45 нг/мл.

На IV етапі дослідження було здійснено порівняння результатів ЕКЗ у пацієнток із СПКЯ після хірургічної стимуляції овуляції із застосуванням агоністів і антагоністів ГнРГ. Було встановлено, що у пацієнток з кломіфенрезистентними формами СПКЯ, включених до програми ЕКЗ, застосування протоколу з антагоністами порівняно з агоністами не призводило до вірогідної зміни кількості і якості овоцитів, кількості вагітностей і пологів, але характеризувалося меншою тривалістю стимуляції, нижчим рівнем загального витраченого рекомбінантного ФСГ (рФСГ) і значним зменшенням частоти такого ускладнення ЕКЗ, як синдром гіперстимуляції яєчників (СГСЯ) помірного ступеня (табл. 4).

Виявлено вірогідну зворотну кореляційну залежність між частотою настання вагітності при ЕКЗ і рівнем сироваткового АМГ до операції (r=-0,83) і через місяць після операції (r=-0,95).

У літературі було висловлено припущення, що овоцити від пацієнток із СПКЯ часто незрілі, більш низької якості і з меншим потенціалом запліднення (C.M. Boomsmaet et al., 2008; B. Sahu et al., 2008). У проведеному нами дослідженні показано, що зрілі овоцити домінували в когорті отриманих овоцитів без істотних відмінностей між обома протоколами: у групах ІІА і ІІБ було отримано відповідно 70,65 і 73,03% овоцитів на стадії MII, 19,23 і 19,90% – на стадії MI, 4,92 і 3,69% – на стадії GV, 5,22 і 3,37% – дегенеративних форм овоцитів (p>0,05). Крім того, на відміну від згаданих робіт частота запліднення була високою в обох групах, зиготи були головним чином з оптимальною морфологією пронуклеусів без істотних відмінностей між протоколами: у групі ІІА і ІІБ після запліднення овоцитів утворилося 56,04 і 59,71% зигот з двома пронуклеусами, лише в 13,71 і 13,00% випадках відбулося аномальне запліднення. Через 72 години з початку культивування ембріонів у групах ІІА і ІІБ отримано 30,85 і 28,49% ембріонів класу А; 48,67 і 48,66% класу В; 17,02 і 19,09% класу С; 2,66 і 2,69% класу Д; 0,80 і 1,08% морул (p>0,05). При цьому обстежені групи не відрізнялися за розподілом середньої кількості ембріонів класу А2, А4, А6, А8, В2, В4, В6, В8, С2, С4, С6, С8, D, морул. Отримані нами дані збігаються з даними метааналізу G. Griesinger et al. (2006), дослідження M.A. Hosseini et al. (2010).

Таким чином, найбільш оптимальною тактикою ведення хворих на кломіфенрезистентну форму СПКЯ після ХСО є проведення ад'ювантної терапії безпосередньо після оперативного втручання з використанням КЦ. Інверсія чутливості до КЦ зберігається протягом 6 міс після втручання. За відсутності вагітності протягом 6 міс після операції пацієнткам можна рекомендувати ЕКЗ, при цьому протоколом вибору є застосування антагоністів ГнРГ.

Висновки

1. У фолікулярній рідині яєчників від пацієнток з кломіфенрезистентною формою СПКЯ відмічають підвищену концентрацію АС у 6,68 (p<0,001) і АМГ у 4,59 раза (p<0,01), що призводить до зниження активності ферменту ароматази у гранульозних клітинах яєчників і порушення конверсії андрогенів в естрогени через зміни афінітету субстрату до ензиму і блокування активних сайтів ароматази. Тому мікрорезекція яєчників з вилученням андрогенпродукуючої строми й аспірацією вмісту фолікулів з надмірним вмістом АС і АМГ під час хірургічної стимуляції овуляції призводить до відновлення овуляторної функції.

2. Рівень сироваткового АМГ корелює з інтрафолікулярним вмістом АМГ (r=0,93, p<0,01), АС (r=0,82, p<0,01), E_2/Т (r=-0,71, p<0,01) і може використовуватися як маркер активності ароматази у гранульозних клітинах яєчників. Існує вірогідна кореляційна залежність між рівнем сироваткового АМГ до й через місяць після хірургічної стимуляції овуляції з частотою вагітності: після оперативного втручання (відповідно r=-0,63 і r=-0,80) і після ЕКЗ (r=-0,83 і r=-0,95). У 96,64% пацієнток із СПКЯ, які не вагітніють, рівень АМГ через місяць після хірургічної стимуляції овуляції в сироватці крові перевищує 4,42 нг/мл.

3. Після проведення хірургічної стимуляції у жінок з кломіфенрезистентною формою СПКЯ спостерігається зниження рівня ЛГ в 1,25 раза (p<0,01), ЛГ/ФСГ – в 1,39 (p<0,01), вільного Т – у 1,77 (p<0,01), АС – в 1,32 (p<0,01), АМГ – в 1,41 (p<0,01) і підвищення ФСГ в 1,12 раза (p<0,01), що зумовлює феномен інверсії чутливості до КЦ, але через місяць починається поступове повернення вмісту ЛГ, ФСГ, співвідношення ЛГ/ФСГ й АС до передопераційного рівня і через 6 міс після операції вміст цих гормонів вірогідно не відрізняється від вихідного, тому найбільш оптимальним режимом ад'ювантної терапії після оваріальної хірургії є призначення КЦ безпосередньо після операції.

4. Використання в циклах ЕКЗ протоколів контрольованої оваріальної стимуляції з антагоністами ГнРГ порівняно з агоністами ГнРГ вірогідно знижує тривалість стимуляції в 1,25 (p<0,001), загальний витрачений рФСГ – в 1,15 (p<0,002), рівень E_2 у день введення тригерної дози хоріонічного гонадотропіну людини (ХГЛ) – в 1,32 (p<0,004) раза, але якість отриманих овоцитів і ембріонів вірогідно не відрізняється.

5. Застосування розробленої тактики ведення пацієнток з кломіфенрезистентною формою СПКЯ після хірургічної стимуляції овуляції підвищує ефективність і безпечність відновлення репродуктивної функції у цієї категорії хворих: призначення ад'ювантної терапії з КЦ безпосередньо після операції порівняно з призначенням КЦ через 3 міс приводить до збільшення частоти настання маткової вагітності в 2,16 раза (p<0,002), кількості пологів – в 1,49 (p<0,04), а проведення ЕКЗ із застосуванням контрольованої оваріальної стимуляції з антагоністами ГнРГ порівняно з агоністами ГнРГ знижує економічні затрати і зменшує частоту синдрому гіперстимуляції яєчників середнього ступеня в 1,67 (p<0,04) і тяжкого – в 2,0 раза (p>0,05).

Практичні рекомендації

1. Пацієнтки з кломіфенрезистентною формою СПКЯ після проведення ХСО потребують призначення ад'ювантної терапії безпосередньо з 1-го циклу після операції в дозі 100 мг/добу з другого дня після початку менструації протягом 5 днів. Проводиться трансвагінальний ехографічний контроль росту домінантного фолікула в яєчнику, висоти і якості ендометрія на 8-й, 10-й і 12-й день менструального циклу. У разі необхідності оптимізації висоти і якості ендометрія пацієнткам внутрішньом'язово вводять масляний розчин фолікуліну 0,1% по 0,5-1 мл з 8-го по 12-й день менструального циклу; після досягнення домінантним фолікулом розмірів 18-22 мм і висоти ендометрія понад 8 мм вводять овуляторну дозу ХГЛ 10 тис. Од. Подружній парі рекомендують програмований coitus або інсемінацію спермою чоловіка через 36 годин після введення ХГЛ. Підтримку лютеїнової фази здійснюють вагінальним введенням мікронізованого прогестерону по 200 мг тричі на добу. У разі відсутності вагітності проводять повторні 2-3 курси стимуляції овуляції КЦ у дозі 150 мг/добу з другого дня після початку менструації протягом 5 днів.

2. У разі відсутності вагітності протягом 6 міс після операції пацієнткам з кломіфенрезистентною формою СПКЯ пропонують ЕКЗ. Використання проколу з антагоністами ГнРГ є методом вибору. Починаючи з другого дня спонтанного менструального циклу, перед початком циклу ЕКЗ протягом 21 доби призначають комбінований оральний контрацептив (етинілестрадіол – 0,03 мг, дезогестрел – 0,15 мг). З другого дня циклу після відміни комбінованих оральних контрацептивів починають ін'єкції рФСГ зі стартової дози 150 МО/добу. Доза коригується після 5-го дня стимуляції залежно від оваріальної відповіді на підставі даних про рівень E_2 і результатів УЗД. Якщо розмір фолікула досягає 14 мм, рівень E_2 перевищує 600 пг/мл, а вміст сироваткового ЛГ менший за 10 Од/л, призначають приймання антагоніста ГнРГ (ганіреліксу) у дозі 0,25 мг щоденно. Лікування з рФСГ й антагоністом ГнРГ продовжують до дня введення тригера овуляції включно. Коли три фолікули досягають максимального діаметра 15-16 мм, вводять тригер овуляції ХГЛ у дозі 5 тис. Од. Забір овоцитів проводять через 36 годин після ін'єкції ХГЛ пункційною голкою за допомогою трансвагінального УЗД. Перенесення двох ембріонів здійснюють через 72 години.

Таблиця 3. Відновлення репродуктивної функції в жінок з кломіфенрезистентною формою СПКЯ після ХСО залежно від прийому КЦ, n (%)

Показник	Група ІА, n=33	група ІБ, n=32	група ІВ, n=50
Настання маткової вагітності	11 (33,33)[ІБ]	23 (71,88)[ІА,ІВ]	25 (50,00)[ІБ]
- з 1-го по 3-й місяць після операції	7 (21,21)[ІБ]	16 (50,00)[ІА,ІВ]	8 (16,00)[ІБ]
- з 4-го по 6-й місяць після операції	3 (9,09)[ІВ]	5 (15,63)	14 (28,00)[ІА]
- із 7-го по 12-й місяць після операції	1 (3,03)	2 (6,25)	3 (6,00)
Пологи	9 (27,27)[ІБ]	22 (68,75)[ІА,ІВ]	23 (46,00)[ІБ]
Мимовільні аборти	2 (6,06)	1 (3,13)	2 (4,00)

Примітка: [ІА, ІБ, ІВ] – різниця статистично вірогідна за показниками груп ІА, ІБ, ІВ (p<0,05).

Таблиця 4. Результати ЕКЗ в обстежених групах

Показник	Група ІА (з агоністами), n=30	Група ІІБ (з антагоністами), n=30
Тривалість стимуляції, дні	11,60±0,11*	9,27±0,10
Загальний витрачений рФСГ (МО)	1871±50*	1628±54
Середня кількість відпунктованих фолікулів	29,60±1,49	26,57±1,13
Середня кількість отриманих овоцитів	22,33±1,50	20,53±0,96
Рівень E_2 в день уведення ХГЛ (пг/мл)	2843±64*	2156±62
СГСЯ легкого ступеня, n (P±p, %)	8 (26,67±0,94)*	17 (56,67±1,39)
СГСЯ середнього ступеня, n (P±p, %)	20 (66,67±1,49)*	12 (40,00±1,17)
СГСЯ тяжкого ступеня, n (P±p, %)	2 (6,67±0,47)	1 (3,33±0,34)
Біохімічна вагітність, n (P±p, %)**	20 (66,67±1,49)	18 (60,00±1,43)
Клінічна вагітність, n (P±p, %)**	17 (56,67±1,37)	14 (53,33±1,27)
Мимовільний аборт, n (P±p, %)	3 (10,00±0,58)	1 (3,33±0,34)
Пологи, n (P±p, %)	14 (53,33±1,24)	13 (43,33±1,22)
Економічні затрати на 1 цикл, грн	30564±275*	27236±281

*Різниця статистично вірогідна відносно аналогічного показника у групі ІІБ, p<0,05 ** – кумулятивна кількість вагітностей з використанням кріоциклів.