

Проскурнина Е.В.¹, Шестакова М.А.², Рабаданова А.К.¹, Созарукова М.М.¹, Шалина Р.И.²
АНТИОКСИДАНТНЫЙ СТАТУС Фолликулярной жидкости у пациенток с бесплодием, проходящих процедуру экстракорпорального оплодотворения, и его связь с качеством эмбриона

¹ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», факультет фундаментальной медицины, 119991, г. Москва, Ломоносовский проспект, 27-1;

²ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1

Для корреспонденции: Проскурнина Елена Васильевна, канд. хим. наук, доц. каф. медицинской биофизики факультета фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», proskurnina@gmail.com

Цель исследования — оценка антиоксидантных свойств фолликулярной жидкости новым хемилуминесцентным методом у женщин со сниженным овариальным резервом и трубным фактором бесплодия, проходящих процедуру экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), а также сопоставление полученных данных с качеством эмбриона.

Материал и методы. Образцы фолликулярной жидкости получали во время забора ооцитов у 16 женщин со сниженным овариальным резервом и 16 женщин с трубно-перитонеальным фактором бесплодия. Пациентки в обеих группах были сопоставимы по возрасту, индексу массы тела и протоколу гормональной стимуляции (короткий протокол). Измерение антиоксидантной активности фолликулярной жидкости производили методом люминолактивированной хемилуминесценции с использованием 2,2'-азобис(2-амидинопропан) дигидрохлорида в качестве источника радикалов. Определяли общую антиоксидантную активность (АОА) и антиоксидантную активность, обусловленную действием белков (АОА-б).

Результаты. Кинетическая кривая хемилуминесценции фолликулярной жидкости аналогична по виду кривой антиоксидантной активности плазмы крови. Как и в плазме крови, антиоксидантная активность обусловлена мочевой кислотой и белками — альбуминами и глобулинами. В результате исследования выделены три группы пациенток: пациентки с низким качеством эмбриона и пониженной антиоксидантной активностью, АОА $11,4 \pm 2,5$ мМ аскорбата ($n = 16$); с эмбрионом хорошего качества, АОА $21,4 \pm 3,8$ мМ ($n = 10$); с низким качеством эмбриона и повышенной АОА, равной $33,7 \pm 2,9$ мМ ($n = 6$).

Выводы. Исходя из сопоставления АОА (в единицах аскорбата) с качеством эмбриона, можно предложить три области: 1) зона сниженной антиоксидантной активности (менее 15 мкМ, оксидативный стресс) — у этих пациенток наблюдали эмбрионы плохого качества; 2) зона нормальной АОА (15–30 мкМ) — у пациенток получены эмбрионы хорошего качества; 3) зона повышенной АОА (более 30 мкМ, антиоксидантный стресс) — эмбрионы плохого качества. Таким образом, можно предположить, что для успешного развития эмбрионов в фолликуле требуется оптимальное значение антиоксидантной активности, так как и уменьшение её (окислительный стресс), и увеличение (антиоксидантный стресс) отрицательно сказываются на качестве эмбриона и исходе ЭКО. Эти данные соответствуют современной концепции о том, что для успешного развития ооцита требуется оптимальный уровень продукции активных форм кислорода.

Ключевые слова: фолликулярная жидкость; экстракорпоральное оплодотворение; антиоксидантная активность.

Для цитирования: Проскурнина Е.В., Шестакова М.А., Рабаданова А.К., Созарукова М.М., Шалина Р.И. Антиоксидантный статус фолликулярной жидкости у пациенток с бесплодием, проходящих процедуру экстракорпорального оплодотворения, и его связь с качеством эмбриона. *Архив акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирёва.* 2017; 4 (3): 159–163. DOI <http://dx.doi.org/10.18821/2313-8726-2017-4-3-159-163>

Proskurnina E.V.¹, Shestakova M.A.², Rabadanova A.K.¹, Sozarukova M.M.¹, Shalina R.I.²
ANTIOXIDANT STATUS OF THE FOLLICULAR LIQUID AND ITS RELATION WITH THE QUALITY OF EMBRYON IN INFERTILITY PATIENTS PASSING THROUGH THE PROCEDURE OF EXTRACORPORAL FERTILIZATION

¹M.V. Lomonosov State Moscow University, Moscow, 119991, Russian Federation;

²N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997, Russian Federation

The aim of the study is to evaluate the antioxidant properties of the follicular fluid with a new chemiluminescent method in women with a reduced ovarian reserve and tubal factor of the infertility, undergoing in vitro fertilization (IVF) procedure, and to compare the obtained data with embryo quality.

Material and methods. Samples of the follicular fluid were obtained during oocyte sampling in 16 women with a reduced ovarian reserve and 16 women with a tubal peritoneal factor of the infertility. Patients in both groups were matched for the age, body mass index and hormonal stimulation protocol (short protocol). The antioxidant activity of the follicular fluid was measured by the method of luminol-activated chemiluminescence using 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride as a source of radicals. The total antioxidant activity (AOA) and antioxidant activity due to the action of proteins (AOA-b) were determined.

Results. The kinetic curve of chemiluminescence of the follicular fluid is similar in shape to the curve of the antioxidant activity of the blood plasma. As in blood plasma, antioxidant activity is caused by uric acid and proteins — albumins and globulins. As a result of the study, three groups of patients were identified, whose AOA significantly differed: patients with low embryo quality and decreased antioxidant activity, AOA 11.4 ± 2.5 mM ascorbate ($n = 16$); patients with a good quality embryo, AOA 21.4 ± 3.8 mM ($n = 10$); patients with a low embryo quality and an elevated AOA of 33.7 ± 2.9 mM ($n = 6$).

Conclusions. Based on the comparison of AOA (in ascorbate units) with the quality of the embryo, three areas can be proposed:

1) a zone of reduced antioxidant activity (less than 15 μM , oxidative stress) — these patients had embryos of poor quality; 2) the zone of normal AOA (15–30 μM) — the patients received good quality embryos; 3) zone of increased AOA (more than 30 μM , antioxidant stress) — embryos of poor quality. Thus, it can be assumed that optimal development of embryos in the follicle requires the optimal value of antioxidant activity, since both its reduction (oxidative stress) and increase (antioxidant stress) adversely affect the quality of the embryo and the outcome of IVF. These data correspond to the modern concept that optimal development of the oocyte requires an optimal level of production of reactive oxygen species.

Key words: follicular fluid; in vitro fertilization; antioxidant activity.

For citation: Proskurnina E.V., Shestakova M.A., Rabadanova A.K., Sozarukova M.M., Shalina R.I. Antioxidant status of the follicular liquid and its relation with the quality of embryo in infertility patients passing through the procedure of extracorporeal fertilization. *V.F. Snegirev Archives of Obstetrics and Gynecology, Russian journal.* 2017; 4(3): 159–163. (In Russ.).
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/2313-8726-2017-4-3-159-163>

For correspondence: Elena V. Proskurnina, MD, PhD, Associate Professor of the Department of Medical Biophysics of the Faculty of Fundamental Medicine of the M.V. Lomonosov State Moscow University, Moscow, 119991, Russian Federation; e-mail: proskurnina@gmail.com

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received 24.06.2017

Accepted 03.07.2017

Введение

В современной науке актуальным является вопрос об участии активных форм кислорода (АФК) в различных физиологических и патологических процессах, протекающих в организме. Обнаружена роль АФК в функционировании многих систем органов, в том числе репродуктивной. С начала 2000-х годов начали появляться работы, в которых предпринимаются попытки найти корреляцию между антиоксидантным статусом фолликулярной жидкости (ФЖ) и исходом процедуры экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). Эти исследования представляют интерес для клинической медицины, так как использование вспомогательных репродуктивных технологий получило в последние годы широкое распространение. Однако накопленные к настоящему времени экспериментальные данные неполны и во многом противоречат друг другу, поэтому изучение антиоксидантного статуса ФЖ при ЭКО должно быть продолжено.

Фолликулярная жидкость заполняет полость преовуляторного фолликула и представляет собой трансудат плазмы с содержащимися в нем секретами фолликулярных клеток. По данным различных авторов, в состав ФЖ входят стероидные гормоны, цитокины, ферменты, антикоагулянты, электролиты, метаболиты (аминокислоты, жирные кислоты, липиды), факторы роста, источники АФК, ферментные и неферментные антиоксиданты [1]. В ней также обнаруживают клетки гранулёзы (фолликулярные клетки) и лейкоциты, которые начинают мигрировать в фолликул в перивариальной фазе и частично попадают в образец в ходе пункции фолликула [2].

В числе возможных источников АФК в фолликулярной жидкости рассматривают гранулёзу, нейтрофилы, макрофаги, эндотелиоциты [3]. Главными источниками АФК в клетках гранулёзы считаются цепь электронного транспорта в митохондриях и сигнальный каскад сквенджер-рецептора LOX-1 для окисленных липопротеинов низкой плотности [4]. Недавно было показано наличие НАДФН-оксидаз типа NOX4 и NOX5 в

клетках гранулёзы [5]. Кроме того, в них обнаружены NO-синтазы эндотелиального типа [6].

ФЖ образуется главным образом из плазмы и содержит похожий набор антиоксидантов: супероксиддисмутазу (СОД), каталазу, селензависимую глутатионпероксидазу и глутатионредуктазу, а также жирно- и водорастворимые антиоксиданты, такие как витамин А, С, Е и глутатион [7–10].

Данные, имеющиеся в литературе, касаются роли прооксидантного статуса ФЖ в исходе ЭКО и представляют трудность для сопоставления и осмысления. Это связано с тем, что на результат процедуры, как и на состав ФЖ, влияют такие параметры, как возраст пациенток [8, 11, 12], причина бесплодия [13, 14], наличие или отсутствие гормонального вмешательства (ЭКО в стимулированном или естественном цикле) [3, 15, 16], а также образ жизни пациенток [11]. Кроме того, имеют значение параметры, выбираемые исследователями (например, оценка общего статуса или содержания отдельных антиоксидантов и др.) [17]. Некоторые исследователи пришли к выводу, что роль окислителей может отличаться на разных этапах репродуктивного цикла и развития эмбриона [17].

Недавно разработан новый метод анализа антиоксидантных свойств плазмы крови, основанный на кинетической хемилюминесценции, позволяющий описать антиоксидантные свойства несколькими показателями [18]. В связи с этим целью данной работы стали адаптация разработанного метода, определение антиоксидантного статуса фолликулярной жидкости и оценка антиоксидантных свойств фолликулярной жидкости новым хемилюминесцентным методом у женщин со сниженным овариальным резервом и трубным фактором бесплодия, проходящих процедуру ЭКО, а также сопоставление полученных данных с качеством эмбриона.

Материал и методы

Образцы фолликулярной жидкости получали во время забора ооцитов у 16 женщин со сниженным ова-

риальным резервом (СОР) и 16 женщин с трубно-перитонеальным фактором (ТПФ) бесплодия. Забор ооцитов проводился путём трансвагинальной пункции фолликулов под контролем УЗИ. Пациентки в обеих группах были сопоставимы по возрасту, индексу массы тела и протоколу гормональной стимуляции (короткий протокол). Средний возраст пациенток в группе с ТПФ составлял $31,6 \pm 1,8$ года и в группе СОР — $37,6 \pm 2,7$ года. Пациентки наблюдались в Центре планирования семьи и репродукции (Москва).

Оценку качества эмбрионов осуществляли по классификации Gardner на 5-е сутки после оплодотворения: степень зрелости бластоцисты (1—6), внутриклеточная масса (А — плотно упакованная с большим количеством клеток, В — более свободная группировка среднего количества клеток, С — незначительное количество клеток), трофэктодермальный слой (А — много клеток, формирующих трофэктодерму, В — немного клеток, С — незначительное количество больших клеток).

Определение антиоксидантной активности плазмы крови методом кинетической люминолактизированной хемилюминесценции

Для оценки антиоксидантной активности фолликулярной жидкости использовали методику, основанную на подавлении хемилюминесценции (ХЛ). В качестве источника свободных радикалов в системе использовали диазосоединение 2,2'-азобис(2-амидинопропан) дигидрохлорид — АБАП («Fluka», США). В качестве хемилюминесцентного зонда использовали люминол (5-амино-1,2,3,4-тетрагидро-1,4-фталазиндион, гидразид-3-аминофталевой кислоты, «Sigma-Aldrich»). Хемилюминесцентный анализ плазмы проводили на однокюветном хемилюминометре SmartLum 100 («ДИСофт», Россия).

В микропробирку объёмом 1,5 мл помещали 50 мкл 50 мМ раствора АБАП и 20 мкл 0,1 мМ люминола. Смесь перемешивали в течение 2 мин на встряхивателе «Vortex yellow line tts2» при частоте 1400 об/мин и инкубировали 20 мин в темноте при комнатной температуре. Образование свободных радикалов в системе инициировали добавлением в кювету 930 мкл нагретого (37°C) фосфатного буферного раствора (100 мМ $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$, pH 7,4; «Sigma», США) к 70 мкл смеси АБАП и люминола. Помещали пробирку в кюветное отделение хемилюминометра. Регистрировали свечение до достижения стационарного уровня (I_0) при 37°C, затем добавляли 10 мкл фолликулярной жидкости, предварительно разбавленной в 10 раз. После добавления пробы свечение прекращалось благодаря нейтрализации радикалов антиоксидантами фолликулярной жидкости. После расходования антиоксидантов свечение вновь нарастало и достигало нового стационарного уровня I (рис. 1). Общий объём пробы в кювете составлял 1 мл.

В качестве аналитических сигналов использовали S (АОА) — площадь над кривой, «вырезаемая» антиоксидантами, и $\text{tg}\alpha$ — угол наклона восходящей части кри-

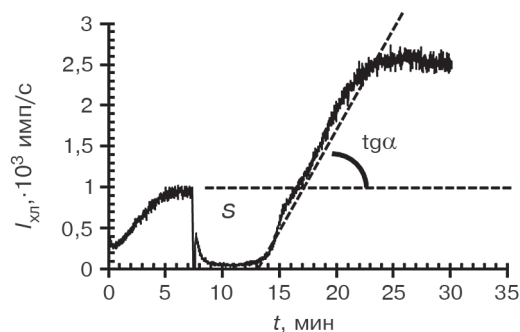


Рис. 1. Типичная кривая развития хемилюминесценции при исследовании антиоксидантных свойств фолликулярной жидкости.

вой, характеризующий антиоксидантную активность белковой части.

Результаты и обсуждение

Исследование антиоксидантных свойств фолликулярной жидкости

На первом этапе исследования проводили адаптацию разработанного для плазмы крови метода к анализу фолликулярной жидкости. Выяснилось, что методика определения АОА может быть без изменений применена для анализа фолликулярной жидкости. Кинетическая кривая хемилюминесценции фолликулярной жидкости аналогична по виду кривой антиоксидантной активности плазмы крови. В ней присутствуют те же фазы: 1) фаза действия сильного антиоксиданта мочевой кислоты; 2) фаза действия антиоксидантов средней силы, которые представлены прежде всего альбумином (см. рис. 1). Активность сильных антиоксидантов может быть оценена по площади S , а антиоксидантная активность альбумина — по тангенсу угла наклона второй фазы восходящей части кривой.

Для того чтобы оценить, действительно ли сильный антиоксидант представляет собой мочевую кислоту, в реакционную среду добавляли уриказу в количестве 144 Ед/мл. Такую активность ранее использовали для полной нейтрализации мочевой кислоты в плазме крови. Действительно, в присутствии уриказы исчезает фаза действия сильного антиоксиданта, который, по всей вероятности, является мочевой кислотой. Следовательно, как и в плазме крови, антиоксидантная активность фолликулярной жидкости обусловлена мочевой кислотой и альбумином (рис. 2).

На рисунке приведены кинетические кривые развития ХЛ фолликулярной жидкости, фолликулярной жидкости в присутствии уриказы, а также контроль — ХЛ-система, в которую вносили фосфатный буферный раствор (без ФЖ).

Анализ антиоксидантного статуса пациенток, проходящих процедуру ЭКО, и сопоставление результатов с качеством эмбриона

При помощи этого метода были проанализированы 32 образца фолликулярной жидкости женщин обеих

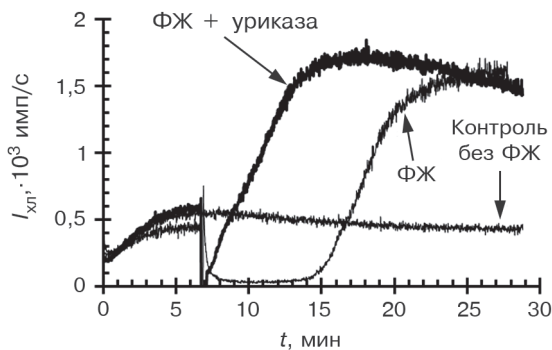


Рис. 2. Добавление уриказы в ХЛ-систему приводит к исчезновению фазы сильного антиоксиданта мочевой кислоты.

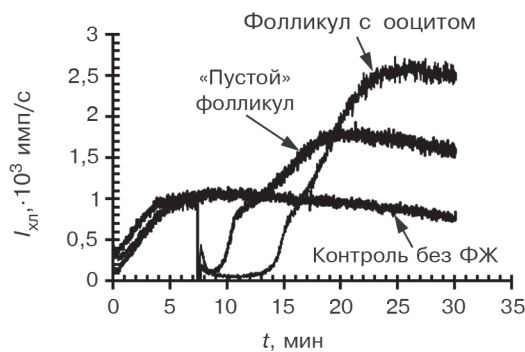


Рис. 3. В «пустом» фолликуле наблюдается резкое снижение антиоксидантной активности (площадь над кривой S существенно меньше, а тангенс угла наклона падает) по сравнению с фолликулярной жидкостью фолликула с ооцитом.

групп. Измеряли общую антиоксидантную активность и антиоксидантную активность в присутствии уриказы, отражающую вклад альбумина. Рассчитывали параметр S для общей АОА, который переводили в единицы концентрации аскорбиновой кислоты, а также S для варианта с уриказой. Данные приведены в таблице.

В качестве наблюдения интересно отметить резко сниженную АОА фолликулярной жидкости фолликулов, не содержащих ооцит, у пациенток вне исследуемых групп со сниженным овариальным резервом и проходящим ЭКО в естественном цикле (рис. 3). Таких пациенток было три. Резко сниженная АОА свидетельствует о выраженном окислительном стрессе в фолликуле, в котором не произошло развитие ооцита.

Проверка нормальности распределения по Шапиро—Уилку показала, что распределение данных в группе СОР не является нормальным ($p = 0,004$), в отличие от группы ТПФ ($p = 0,34$), поэтому для сравнения групп использовали непараметрический критерий.

Сравнение общей АОА в двух группах по критерию Манна—Уитни показало, что различие статистически незначимо ($p = 0,34$), однако и медиана, и межквартильный размах в группе СОР сдвинуты в сторону меньших значений по сравнению с группой ТПФ, что может свидетельствовать об окислительном стрессе в фолликуле у женщин в этой группе. Возможно, значимые различия проявятся при увеличении численности групп. Сравнение белковой части АОА в двух группах по критерию

Манна—Уитни показало, что различие также не было статистически значимым ($p = 0,41$).

При сопоставлении данных по общей АОА с качеством эмбриона в объединённой выборке были выделены три группы пациенток, АОА у которых значительно различались: пациентки с низким качеством эмбриона и пониженной антиоксидантной активностью, АОА $11,4 \pm 2,5$ мМ аскорбата ($n = 16$); пациентки с эмбрионом хорошего качества, АОА $21,4 \pm 3,8$ мМ ($n = 10$); пациентки с низким качеством эмбриона и повышенной АОА: $33,7 \pm 2,9$ мМ ($n = 6$). Пониженная антиоксидантная активность свидетельствует о развитии локального окислительного стресса в фолликулах. Повышенная антиоксидантная активность свидетельствует о состоянии, которое мы предлагаем называть «антиоксидантным стрессом», поскольку в этих условиях также не происходит удовлетворительного развития эмбриона.

Заключение

Исходя из сопоставления АОА (в единицах аскорбата) с качеством эмбриона, можно предложить три области: 1) зона сниженной АОА (менее 15 мкМ, окислительный стресс) — у этих пациенток наблюдали эмбрионы плохого качества; 2) зона нормальной АОА (15—30 мкМ) — у пациенток получены эмбрионы хорошего качества; 3) зона повышенной АОА (более 30 мкМ, антиоксидантный стресс) — у пациенток получены эмбрионы плохого качества.

Таким образом, можно предположить, что для успешного развития эмбрионов в фолликуле требуется оптимальное значение антиоксидантной активности. Как уменьшение её (окислительный стресс), так и увеличение (антиоксидантный стресс) отрицательно сказываются на качестве эмбриона и исходе ЭКО. Эти данные соответствуют современной концепции о том, что для успешного развития ооцита требуется оптимальный уровень продукции АФК.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Результаты расчёта общей антиоксидантной активности в единицах аскорбата натрия и белковой антиоксидантной активности для пациенток со сниженным овариальным резервом и трубно-перитонеальным фактором (приведены медианы и межквартильный размах)

Группа	АОА общая	АОА, белковая часть, по tga
Сниженный овариальный резерв ($n = 16$):		
медиана	9,9	0,27
межквартильный размах	7,3—12,9	0,13—0,36
Трубно-перитонеальный фактор ($n = 16$):		
медиана	11,2	0,29
межквартильный размах	8,2—22,5	0,14—0,38

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Basuino L., Silveira C.F. Human follicular fluid and effects on reproduction. *JBRA Assist. Reprod.* 2016; 20: 38—40. doi: 10.5935/1518-0557.20160009.
2. Neubourg D.D., Robins A., Fishel S., Gibbon L. Flow cytometric analysis of granulosa cells from follicular fluid after follicular stimulation. *Hum. Reprod.* 1996; 11: 2211—4.
3. Jancar N., Virant-Klun I., Osredkar J., Vrtacnik Bokal E. Apoptosis, reactive oxygen species and follicular anti-Müllerian hormone in natural versus stimulated cycles. *Reprod. Biomed. Online.* 2008; 16: 640—8.
4. Karuputhula N.B., Chattopadhyay R., Chakravarty B., Chaudhury K. Oxidative status in granulosa cells of infertile women undergoing IVF. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 2013; 59: 91—8. doi: 10.3109/19396368.2012.743197.
5. Hunter R.H.F. (ed.). *Physiology of the Graafian Follicle and Ovulation.* Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2003.
6. Hanukoglu I. Antioxidant protective mechanisms against reactive oxygen species (ROS) generated by mitochondrial P450 systems in steroidogenic cells. *Drug. Metab. Rev.* 2006; 38: 171—96. doi: 10.1080/03602530600570040.
7. Angelucci S., Ciavardelli D., Di Giuseppe F., Eleuterio E., Sulpizio M., Tiboni G.M. et al. Proteome analysis of human follicular fluid. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006; 1764: 1775—85. doi: 10.1016/j.bbapap.2006.09.001.
8. Carbone M.C., Tatone C., Delle Monache S., Marci R., Caserta D., Colonna R., Amicarelli F. Antioxidant enzymatic defences in human follicular fluid: characterization and age-dependent changes. *Mol. Hum. Reprod.* 2003; 9: 639—43.
9. Schweigert F.J., Steinhagen B., Raila J., Siemann A., Peet D., Buscher U. Concentrations of carotenoids, retinol and alpha-tocopherol in plasma and follicular fluid of women undergoing IVF. *Hum. Reprod.* 2003; 18: 1259—64.
10. Paszkowski T., Clarke R.N. The Graafian follicle is a site of L-ascorbate accumulation. *J. Assist. Reprod. Genet.* 1999; 16: 41—5.
11. Crha I., Hrubá D., Ventruba P., Fiala J., Totusek J., Visnová H. Ascorbic acid and infertility treatment. *Cent. Eur. J. Public Health.* 2003; 11: 63—6.
12. Tatone C., Carbone M.C., Falone S., Aimola P., Giardinelli A., Caserta D. Age-dependent changes in the expression of superoxide dismutases and catalase are associated with ultrastructural modifications in human granulosa cells. *Mol. Hum. Reprod.* 2006; 12(11): 655—60.
13. Prieto L., Quesada J.F., Cambero O., Pacheco A., Pellicer A., Codoceo R., Garcia-Velasco J.A. Analysis of follicular fluid and serum markers of oxidative stress in women with infertility related to endometriosis. *Fertil. and Steril.* 2012; 98: 126—30. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.03.052.
14. Singh A.K., Chattopadhyay R., Chakravarty B., Chaudhury K. Markers of oxidative stress in follicular fluid of women with endometriosis and tubal infertility undergoing IVF. *Reprod. Toxicol.* 2013; 42: 116—24. doi: 10.1016/j.reprotox.2013.08.005.
15. Zamah A.M., Hassis M.E., Albertolle M.E., Williams K.E. Proteomic analysis of human follicular fluid from fertile women. *Clin. Proteomics.* 2015; 12: 5. doi: 10.1186/s12014-015-9077-6.
16. Nuñez-Calonge R., Cortés S., Gutierrez Gonzalez L.M., Kireev R., Vara E., Ortega L. et al. Oxidative stress in follicular fluid of young women with low response compared with fertile oocyte donors. *Reprod. Biomed. Online.* 2016; 32: 446—56. doi: 10.1016/j.rbmo.2015.12.010.
17. Oyawoye O., Abdel Gadir A., Garner A., Constantinovici N., Perrett C., Hardiman P. Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome. *Hum. Reprod.* 2003; 18: 2270—4.
18. Alekseev A.V., Proskurnina E.V., Vladimirov Y.A. Determination of antioxidants by sensitized chemiluminescence using 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane). *Moscow University Chemistry Bulletin.* 2012; 67(3): 127—32.

Поступила 24.06.2017
Принята к печати 03.07.2017