

# Андростендион как потенциальный предиктор овариального ответа в программах вспомогательных репродуктивных технологий

А.Г. Бурдули<sup>✉</sup>, Н.А. Кициловская, Ю.В. Сухова, И.А. Ведихина, Т.Ю. Иванец, В.В. Чаговец, Н.Л. Стародубцева, В.Е. Франкевич

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия

<sup>✉</sup>burdulianna@gmail.com

## Аннотация

**Цель.** Оценить возможность использования уровня андростендиона в сыворотке крови и фолликулярной жидкости для прогнозирования овариального ответа в программах вспомогательных репродуктивных технологий и провести сравнительный анализ результатов, полученных 2 методами – иммунохемилюминесцентного анализа (ИХЛА) и высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС).

**Материалы и методы.** В проспективное исследование были включены 55 супружеских пар, проходивших лечение в рамках программы экстракорпорального оплодотворения/интрацитоплазматической инъекции сперматозоида и переноса эмбрионов. Пациенток разделили на 3 группы в зависимости от ответа яичников на овариальную стимуляцию: 1-я – 1–3 ооцита (n=4), 2-я – 4–9 ооцитов (n=27), 3-я – свыше 10 ооцитов (n=24). Определение уровня андростендиона осуществляли в сыворотке крови, полученной в день проведения трансвагинальной пункции яичников, и в образцах фолликулярной жидкости на базе лабораторий ФГБУ «НМИЦ АП им. акад. В.И. Кулакова» с использованием ИХЛА и метода ВЭЖХ-МС/МС.

**Результаты.** Уровень андростендиона в сыворотке крови в день проведения трансвагинальной пункции яичников, определенный методом ВЭЖХ-МС/МС, повышался по мере увеличения числа полученных ооцитов. Метод ИХЛА позволил выявить разницу в концентрации андростендиона между группами с полученным числом ооцитов менее 3 и более 10. При этом уровень андростендиона, определенный с помощью ИХЛА, достоверно различался между группами пациенток ( $p < 0,05$ ). Сравнение уровня андростендиона в сыворотке крови, определенного ИХЛА и ВЭЖХ-МС/МС, показало высокие корреляции между значениями [ $\rho = 0,73$  ( $p < 0,001$ )], что позволяет равноценно применять оба метода с учетом имеющейся оснащённости клинической базы.

**Заключение.** Предикция ответа яичников на овариальную стимуляцию является важным этапом программ вспомогательных репродуктивных технологий. Определение концентрации андростендиона в сыворотке крови в день проведения трансвагинальной пункции яичников на основе высокоспецифичных методов (ИХЛА и ВЭЖХ-МС/МС) может быть использовано в прогнозировании степени овариального ответа наряду с традиционной оценкой овариального резерва на основании определения уровня антимюллерова гормона в раннюю фолликулярную фазу менструального цикла.

**Ключевые слова:** овариальный ответ, программа вспомогательных репродуктивных технологий, фолликулярная жидкость, стероидные гормоны, андростендион, высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрией, иммунохемилюминесцентный анализ.

**Для цитирования:** Бурдули А.Г., Кициловская Н.А., Сухова Ю.В. и др. Андростендион как потенциальный предиктор овариального ответа в программах вспомогательных репродуктивных технологий. Гинекология. 2020; 22 (1): 38–44. DOI: 10.26442/20795696.2020.1.200010

Original Article

## Androstenedione as a potential predictor of ovarian response in assisted reproductive technology programs

Anna G. Burduli<sup>✉</sup>, Natalia A. Kitsilovskaya, Yuliya V. Sukhova, Irina A. Vedikhina, Tatiana Yu. Ivanets, Vitaliy V. Chagovets, Nataliia L. Starodubtseva, Vladimir E. Frankevich

Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

<sup>✉</sup>burdulianna@gmail.com

## Abstract

**Aim.** To assess the possibility of using androstenedione levels in blood serum and follicular fluid to predict ovarian response in assisted reproductive technology programs and to conduct a comparative analysis of the results obtained by 2 methods – chemiluminescent immunoassay (CLIA) and high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS/MS).

**Materials and methods.** A prospective study included 55 couples who received in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection and embryo transfer program therapy. The patients were divided into 3 groups depending on the ovarian response to stimulation: 1st (1–3 oocytes, n=4), 2nd (4–9 oocytes, n=27), 3rd (over 10 oocytes, n=24). Androstenedione levels were measured in blood serum obtained on the day of transvaginal ovarian puncture and in follicular fluid samples with CLIA and HPLC-MS/MS methods at the laboratories of Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology.

**Results.** On the day of transvaginal ovarian puncture, the serum androstenedione levels, which were measured by HPLC-MS/MS, were increasing with an increase of the number of oocytes obtained. The CLIA method revealed a difference in the androstenedione levels between the groups with the number of oocytes obtained of less than 3 and more than 10. Moreover, the androstenedione levels measured by CLIA were significantly different between the patient groups ( $p < 0,05$ ).

Comparison of serum androstenedione levels measured by CLIA and HPLC-MS/MS, showed high correlations between the values [ $\rho = 0,73$  ( $p < 0,001$ )], which makes it possible to use both methods equally, given the existing equipment of the clinical base.

**Conclusion.** Prediction of ovarian response to stimulation is an important step in assisted reproductive technology programs. Measuring androstenedione concentration in blood serum on the day of transvaginal ovarian puncture with highly specific methods (CLIA and HPLC-MS/MS) can be used to predict the degree of ovarian response along with the traditional assessment of the ovarian reserve based on determining anti-Mullerian hormone levels in the early follicular phase of the menstrual cycle.

**Key words:** ovarian response, assisted reproductive technology program, follicular fluid, steroid hormones, androstenedione, high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, chemiluminescent immunoassay.

**For citation:** Burduli A.G., Kitsilovskaya N.A., Sukhova Yu.V. et al. Androstenedione as a potential predictor of ovarian response in assisted reproductive technology programs. Gynecology. 2020; 22 (1): 38–44. DOI: 10.26442/20795696.2020.1.200010

Ответ яичников на стимуляцию в программах экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) – число ооцитов, получаемых при проведении трансвагинальной пункции (ТВП) яичников, представляет собой

один из предиктивных параметров исхода вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) [1]. Идентификация предиктивных факторов исходов программ ВРТ (ЭКО) [2, 3], таких как возраст, показатели овариального резерва,

планируемое число полученных ооцитов, является важным шагом как на этапе выбора схемы стимуляции, так и на этапе консультирования разных групп пациентов, существенную часть которых составляют женщины с бедным ответом и/или неудовлетворительным прогнозом ответа яичников на овариальную стимуляцию [4]. Известно, что при получении меньшего числа ооцитов снижается вероятность успеха в программах ВРТ [5].

Установлено оптимальное число ооцитов ( $n=8-18$ ), обеспечивающее наилучшие показатели живорождения в циклах овариальной стимуляции [3, 6]. Одним из ключевых исследований, оценивающих овариальный ответ и кумулятивную частоту живорождения как при селективном переносе одного эмбриона в свежих циклах, так и в криоцикле женщин, является работа P. Drakopoulos и соавт. (2016 г.) [7]. Продемонстрирована более высокая частота живорождения ( $p<0,05$ ) в группах с гипер-, нормо-, субоптимальным ответом по сравнению с пациентами с числом полученных ооцитов в 1–3 яйцеклетках. Показано, что кумулятивная частота живорождения возрастает с увеличением числа получаемых ооцитов. При проведении множественной логистической регрессии определено, что ответ яичников на стимуляцию суперовуляции является независимым предиктивным фактором кумулятивной частоты живорождения (показатель, нормированный на такие параметры, как вид фертилизации, возраст, день переноса). Отношение шансов кумулятивной частоты живорождения возрастает от 2,4 (1,3–4,4) для категории 4–9 ооцитов к 3,5 (1,90–6,7) и 5,99 (3,1–11,6) для категорий 10–15 и свыше 15 яйцеклеток соответственно.

Установлены факторы, влияющие на степень овариального ответа яичников: клиничко-анамнестические характеристики пациентки, параметры овариального резерва, а также протокол стимуляции суперовуляции, дозировка и вид применяемых гонадотропинов (с ЛГ-активностью и без). Среди клиничко-анамнестических параметров одними из ведущих являются возраст, наличие оперативных вмешательств на яичниках, молекулярно-генетические особенности (например, полиморфизмы генов рецепторов гонадотропинов [8]).

При нормальных показателях овариального резерва, оцениваемого как по уровню антимюллера гормона (АМГ)  $\geq 1,2$  нг/мл, так и по ультразвуковым параметрам (свыше 5 антральных фолликулов в яичниках), у ряда женщин может быть получен так называемый гипоответ яичников на стандартные дозировки препаратов рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона/человеческих менопаузальных гонадотропинов (рФСГ/ЧМГ). Это связывают как с генетическими причинами [9], так и с факторами окружающей среды [10]. Одними из возможных путей решения проблемы получения оптимального числа ооцитов у таких пациентов может быть как увеличение дозы гонадотропинов, так и добавление гонадотропинов с ЛГ-активностью [11]. Основной задачей, решаемой, по мнению многих ученых, при использовании ЛГ-содержащих препаратов гонадотропинов, является необходимость добавления экзогенного лютеинизирующего гормона (ЛГ) на уровне финального созревания ооцитов для завершения оогенеза. Снижение уровня ЛГ в процессе индукции суперовуляции ниже определенных значений на 6–7-й день стимуляции может быть ассоциировано и с ухудшением качества получаемых ооцитов [12]. Однако уровни ЛГ в фолликулярной жидкости в день проведения ТВП не отражают количество и качество полученных ооцитов. По данным исследований A Ferraretti и соавт. (2004 г.) [13] и G. de Placido и соавт. (2005 г.) [14] не обнаружено связи между уровнями ЛГ в сыворотке крови при стимуляции и ответом яичников на добавление препаратов рекомбинантного ЛГ.

Известно, что ФСГ и ЛГ играют ключевые роли в процессе фолликулогенеза в рамках так называемой двухклеточной модели синтеза стероидных гормонов [15]. Роль ЛГ в рамках данной модели заключается в воздействии на рецепторы в текальных клетках яичника, таким образом стимулируя синтез андрогенов. Также рецепторы к ЛГ обнаружены и в

клетках гранулезы с высокой степенью экспрессии на уровне преовуляторных фолликулов по сравнению с показателями экспрессии на стадии антральных фолликулов. ЛГ оказывает модулирующее влияние на продукцию эстрадиола и уровень экспрессии мРНК ароматазы CYP19. По данным крупного систематического обзора 2018 г. [11], добавление препаратов рекомбинантного ЛГ в циклах стимуляции суперовуляции может быть показано у пациентов с гипоответом в длинных протоколах с агонистами гонадотропин-рилизинг-гормона (ГнРГ) при монотерапии препаратами рФСГ, а также у женщин в возрасте 36–39 лет. Положительный эффект в группе пациенток указанного возраста в крупном исследовании E. Bosch и соавт. (2011 г.) [16] в протоколах с антагонистами ГнРГ может быть связан с увеличением продукции андрогенов, которая снижается с возрастом [17]. Назначение препаратов ФСГ не позволяет компенсировать возрастассоциированное снижение синтеза андростендиона [18], но данные по изучению уровня андростендиона как одного из важных гормонов, образующегося в процессе стероидогенеза в циклах овариальной стимуляции в программах ВРТ и его связи с параметрами лечебных циклов ЭКО, в литературе представлены недостаточно.

В нашей работе мы провели оценку уровня андростендиона с учетом овариального ответа в циклах овариальной стимуляции в день проведения ТВП в сыворотке крови и фолликулярной жидкости на основании иммунохемилюминесцентного анализа (ИХЛА) и метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС).

## Материалы и методы

Проведено проспективное исследование 55 супружеских пар, проходивших лечение в связи с различными формами бесплодия в рамках программы ЭКО/интрацитоплазматической инъекции сперматозоида и переноса эмбрионов в отделении вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. Б.В. Леонова ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова» в 2018–2019 гг. Исследование одобрено комиссией по этике биомедицинских исследований при ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова» (от 17.05.2018).

Критериями включения пациенток в исследование стали возраст от 18 до 40 лет; женское бесплодие трубно-перитонеального происхождения; регулярный менструальный цикл; мужское бесплодие без выраженной патозооспермии, информированное согласие на участие в исследовании.

В исследование не включались пациентки со стандартными противопоказаниями для проведения ЭКО согласно приказу Минздрава России от 30.08.2012 №107н «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению», в том числе с экстрагенитальной патологией, онкологическими заболеваниями, а также с наличием оперативных вмешательств на яичниках в анамнезе и снижением овариального резерва.

Для определения уровня андростендиона выполняли взятие крови из кубитальной вены в день проведения ТВП яичников в рамках индуцированного цикла и осуществляли забор фолликулярной жидкости из первого фолликула в каждом яичнике, с промывкой иглы после каждого фолликула, в индивидуальные маркированные пробирки без гепарина. Каждую порцию фолликулярной жидкости центрифугировали в течение 20 мин. В исследование были включены те образцы фолликулярной жидкости, в которой найден ооцит ( $n=48$ ).

Определение уровня андростендиона в сыворотке крови и фолликулярной жидкости выполняли иммунохемилюминесцентным методом (Immulate 2000 Androstendione, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., США) в клиничко-диагностической лаборатории и методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием LC: Agilent 1290 Infinity MS/MS: APCi; ABSciex QTRAP 5500 в лаборатории протеомики и метаболомики репродукции человека на базе ФГБУ «НМИЦ АГП им. акад. В.И. Кулакова».

Таблица 1. Сравнительная характеристика уровня АМГ в сыворотке крови (нг/мл) в исследуемых группах  
Table 1. Comparative characteristics of serum AMH levels (ng/ml) in the studied groups

	1-я группа (n=4)	2-я группа (n=27)	3-я группа (n=24)	p
АМГ, Ме (25%; 75%)	3,06 (1,43; 4,53)	2,61 (1,48; 3,43)	4,24 (2,77; 5,17)	$p_1=0,807; p_2=0,256; p_3=0,004$

Примечание. Здесь и далее в табл. 2:  $p_1$  – 1–2-я группа,  $p_2$  – 1–3-я;  $p_3$  – 2–3-я.  
Note. Hereinafter in the table 2:  $p_1$  – the 1st–2nd groups,  $p_2$  – the 1st–3rd groups;  $p_3$  – 2–3rd groups.

Таблица 2. Сравнительная характеристика уровня андростендиона (нмоль/л), определяемого методами ИХЛА и ВЭЖХ-МС/МС, в сыворотке крови в день проведения ТВП в исследуемых группах пациентов  
Table 2. Comparative characteristics of the serum androstenedione levels (nmol/L), determined by the CLIA and HPLC-MS/MS methods, on the day of transvaginal ovarian puncture (TOP) in the studied groups

	1-я группа (n=4)	2-я группа (n=25)	3-я группа (n=19)	p
ИХЛА	4,89 (3,44; 8,75)	10,4 (7,60; 13,80)	13,55 (9,84; 17,85)	$p_1=0,088; p_2=0,013; p_3=0,120$
ВЭЖХ-МС/МС	4,54 (3,56; 6,56)	7,57 (5,86; 9,91)	11,83 (8,73; 15,67)	$p_1=0,051; p_2=0,009; p_3=0,002$

Препараты рФСГ/ЧМГ вводили со 2–4-го дня менструального цикла подкожно или внутримышечно 1 раз в день в одно и то же время суток. Дозировка препаратов рФСГ/ЧМГ подбиралась индивидуально от 150 до 300 МЕ в зависимости от данных клинико-гормональных показателей. Затем с 5–6-го дня стимуляции суперовуляции осуществляли коррекцию дозы исходя из овариального резерва пациенток. Препараты ГнРГ применяли в рамках «длинного» протокола с агонистами ГнРГ и протокола с антагонистами ГнРГ. С целью финального созревания ооцитов в качестве триггера овуляции при достижении диаметра фолликулов 18–17 мм вводились препараты хорионического гонадотропина человека в дозе 5–10 тыс. ЕД/сут или агонистами ГнРГ в дозе 0,2 мг за 35–36 ч до планируемой ТВП яичников. Аспирацию фолликулярной жидкости осуществляли под кратковременным внутривенным наркозом посредством вакуумной аспирации фолликулов под трансвагинальным ультразвуковым мониторингом с использованием одноразовых игл (система Vitrolife, Швеция). Аспират помещали в подогретые стерильные пробирки, которые содержали среду с гепарином (0,5 мл), предотвращающую образование кровяных сгустков. Пробирки незамедлительно передавали эмбриологу. Содержимое каждой из доставленных пробирок помещали в чашку Петри, изучали на предмет присутствия ооцит-кумуляного комплекса, оценивали степень зрелости полученных ооцитов.

### Статистическая обработка

Статистическую обработку данных выполняли на индивидуальном компьютере с помощью электронных таблиц Microsoft Excel и пакета прикладных программ SPSS Statistics 25.0. Все полученные количественные данные обработаны методом вариационной статистики. Для оценки характера распределения количественных данных перед проведением сравнительного анализа выполняли тест Колмогорова–Смирнова или Шапиро–Уилка, определяемых в зависимости от размера выборки, а также при помощи построения графиков распределения анализируемых данных.

Учитывая небольшое число наблюдений для количественных параметров, не подчиняющихся нормальному распределению, использовали методы непараметрической статистики с указанием медианы (Me), 1 и 3-го квартилей – Q1 (25%) и Q3 (75%) соответственно и интерквартильного интервала – Me (Q1–Q3).

При сравнении переменных на I этапе использовали непараметрический тест Краскела–Уоллиса для определения переменных, которые не отличались друг от друга. На II этапе оставшиеся значения сравнивали попарно с использованием критерия Манна–Уитни для несвязанных совокупностей.

Зависимые данные оценивали с помощью коэффициента корреляции. Корреляционный анализ проводили с использованием непараметрического корреляционного критерия Спирмена.

Математические модели прогноза создавали при помощи метода логистической регрессии, на основании ко-

торой построены уравнения для предсказания вероятности наступления анализируемого события.

Различия между величинами считали статистически значимыми при уровне достоверности  $p < 0,05$ .

### Результаты

Пациенты были разделены на группы в соответствии с показателями ответа на овариальную стимуляцию: 1-я – число полученных ооцитов составило 1–3 (n=4); 2-я – число полученных ооцитов 4–9 (n=27); 3-я – число полученных ооцитов свыше 10 (n=24).

Средний возраст женщин в группах [представлен в виде Ме (25%; 75%)] составлял: 1-я – 36 лет (34; 39), 2-я – 33 года (31; 35), 3-я – 33 года (31; 34);  $p > 0,05$ . По данным весоростовых показателей (рост, масса тела, индекс массы тела) группы также не различались ( $p > 0,05$ ).

В рамках работы произведена оценка результатов уровня АМГ, определенного в раннюю фолликулярную фазу цикла, значение которого получено по материалам предварительного обследования согласно приказу Минздрава России от 30.08.2012 №107н (табл. 1).

Статистически значимые различия в уровне АМГ получены только при сравнении 2 и 3-й групп, показатели в других группах могли не отличаться в связи с небольшим числом женщин с бедным ответом яичников (1-я группа). По данным литературы, бедный ответ яичников может встречаться в 9–28% случаев [19].

При анализе корреляционной связи между значениями АМГ и числом получаемых ооцитов определены следующие показатели:  $\rho = 0,547$ ,  $p = 0,001$ , что свидетельствует о средней корреляции.

В дальнейшем для определения уровня андростендиона (в сыворотке крови и фолликулярной жидкости) в исследовании включены те женщины, в образцах фолликулярной жидкости которых найден ооцит (n=48).

При сравнении уровня андростендиона в день проведения ТВП яичников в сыворотке крови на основании ИХЛА и метода ВЭЖХ-МС/МС в группах в зависимости от степени овариального ответа яичников на стимуляцию получены данные, представленные в табл. 2.

Уровень андростендиона при использовании метода ВЭЖХ-МС/МС повышался по мере увеличения числа полученных ооцитов. Выявлено пограничное значение  $p = 0,051$  при сравнении уровня андростендиона в 1 и 2-й группах, что может быть связано с небольшой выборкой в 1-й группе; с учетом выявленного пограничного уровня статистической значимости  $p$  в дальнейшем полученные данные рассмотрены как выраженная тенденция в разнице концентраций андростендиона в сыворотке крови в день проведения ТВП во всех группах при определении значений гормона методом ВЭЖХ-МС/МС. В то же время при оценке тех же образцов ИХЛА выявлена разница в концентрации андростендиона между группами с полученным числом ооцитов менее 3 и более 10. При этом уровень андростендиона, определенный с помощью ИХЛА, достоверно различался между группами пациенток ( $p < 0,05$ ).

Рис. 1. Сравнение результатов определения содержания андростендиона (нмоль/л) в сыворотке крови в день ТВП, полученных методами ИХЛА и ВЭЖХ-МС/МС.  
Fig. 1. Comparison of the serum androstenedione levels (nmol/L) on the day of TOP obtained with the CLIA and HPLC-MS/MS methods.

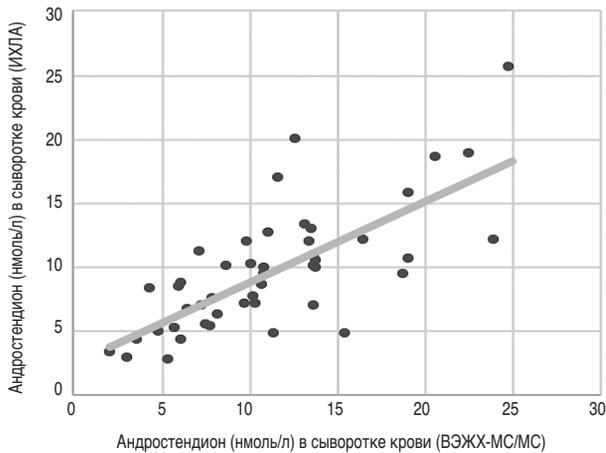
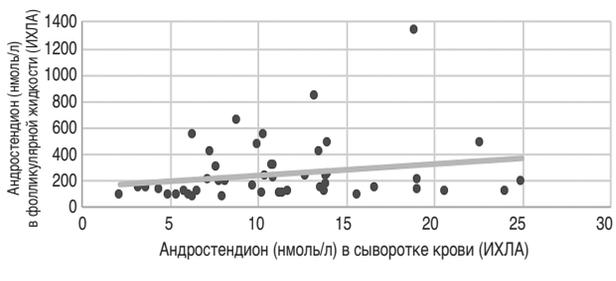


Рис. 2. Сравнение результатов определения содержания андростендиона (нмоль/л) в день ТВП в сыворотке крови и фолликулярной жидкости иммунохемилюминесцентным методом.  
Fig. 2. Comparison of the androstenedione levels (nmol/L) on the day of TOP in blood serum and follicular fluid determined by the chemiluminescent immunoassay.



При оценке уровня андростендиона в фолликулярной жидкости не выявлено зависимости ни от степени овариального ответа, ни от используемого метода.

При анализе корреляционной связи между концентрацией андростендиона и числом полученных ооцитов/числом фолликулов выявлены следующие статистически значимые отношения:

- 1) в сыворотке крови в день ТВП при определении значений андростендиона иммунохемилюминесцентным методом определены слабые показатели корреляционной связи как с числом ооцитов ( $\rho=0,339$ ,  $p=0,017$ ), так и с числом фолликулов ( $\rho=0,442$ ,  $p=0,002$ );
- 2) в сыворотке крови в день ТВП при определении значений андростендиона методом ВЭЖХ-МС/МС получены показатели средней корреляционной связи с числом ооцитов ( $\rho=0,561$ ,  $p=0,001$ ), включая число ооцитов стадии МП ( $\rho=0,519$ ,  $p=0,001$ ) и число фолликулов ( $\rho=0,552$ ,  $p=0,001$ ).

В фолликулярной жидкости в день ТВП при определении значений андростендиона иммунохемилюминесцентным методом и методом ВЭЖХ-МС/МС корреляционные связи с числом ооцитов/числом фолликулов не установлены.

При анализе корреляционной связи между концентрацией андростендиона (как в сыворотке крови в день проведения ТВП, так и в фолликулярной жидкости), определяемой 2 используемыми методами (ИХЛА и ВЭЖХ-МС/МС) и показателем фертилизации (соотношение, равное числу эмбрионов на стадии зиготы к числу зрелых ооцитов стадии МП) статистически значимых различий не выявлено.

При создании математической модели прогноза числа получаемых ооцитов с учетом концентрации андростен-

диона в сыворотке крови (определяемой методом ВЭЖХ-МС/МС) в день проведения ТВП на основании метода линейной регрессии построено уравнение для предсказания вероятности наступления анализируемого события:

$$\text{количество ооцитов} = 1,444 \times [\text{концентрация андростендиона}] + 4,479,$$

при этом значение коэффициента детерминации ( $r^2$ ) составило 0,239, что говорит о невысокой мощности данной предиктивной модели, но не может не указывать на выявленную тенденцию связи концентрации андростендиона сыворотки крови в день проведения ТВП яичников и степени овариального ответа яичников на стимуляцию.

На следующем этапе проведено сравнение уровня андростендиона в сыворотке крови ( $n=48$ ), полученного с помощью ИХЛА и методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена, который составил  $\rho=0,73$  ( $p<0,001$ ), что свидетельствует о высокой силе связи между изучаемыми параметрами (рис. 1).

Выявлены слабые корреляционные зависимости между концентрациями андростендиона в сыворотке крови в день проведения ТВП и фолликулярной жидкости, определяемые иммунохимическим методом ( $n=48$ ) [ $\rho=0,3$  ( $p=0,038$ )] (рис. 2), и крайне слабые статистически незначимые зависимости при использовании метода ВЭЖХ-МС/МС ( $n=48$ ) [ $\rho=0,137$  ( $p=0,352$ )].

## Обсуждение

Стероидные гормоны, в частности андрогены, оказывают существенное влияние на развитие фолликула и созревание ооцита [20]. Андрогены синтезируются в организме женщины в надпочечниках, яичниках, периферических тканях (жировая ткань, мышцы, кожа). Наиболее активные андрогены – тестостерон и дигидротестостерон образуются путем конверсии андростендиона, его источником в 50% являются яичники, 25% – надпочечники, 25% – периферические ткани. Синтез андрогенов в фолликуле происходит с участием гранулезных и текальных клеток. Известно, что возрастное снижение синтеза андрогенов [в первую очередь предшественников тестостерона – дегидроэпиандростерона (ДГЭА)/дегидроэпиандростеронсульфата (ДГЭА-С)] происходит в основном в надпочечниках [21], но до конца не установлено, сопутствует ли этому процессу возрастассоциированное снижение уровня самого тестостерона, синтезируемого яичниками. В исследовании женщин перименопаузального периода – The Massachusetts Women's Health Study [22] зарегистрированы как снижение уровней дигидротестостерона и ДГЭА-С, так и повышение уровней андростендиона.

Помимо синтеза тестостерона из андростендиона происходит конверсия последнего с участием фермента ароматазы в эстрон ( $E_1$ ) с последующим образованием эстрадиола ( $E_2$ ). Таким образом, андростендион представляет собой один из ключевых этапов синтеза как андрогенов, так и эстрогенов.

Одними из определяющих факторов, влияющих на степень овариального ответа и в определенной степени на эффективность программ ВРТ, являются гормональные параметры фолликулогенеза, в первую очередь уровень АМГ. В нашей работе продемонстрирована связь уровня АМГ, определенного на этапе подготовки к проведению программы ЭКО, с числом полученных ооцитов ( $\rho=0,547$ ,  $p=0,001$ ), что может указывать на зависимость между показателем АМГ и возможностью получения компетентных ооцитов. Результаты ряда исследований также подтверждают, что АМГ – важный маркер в предикции количества ооцитов [23, 24].

Большинство исследований андрогенов в программах ЭКО сконцентрировано на определении уровня тестостерона в сыворотке крови на этапе до начала введения препаратов гонадотропинов, установлены позитивные корреляции между его значениями и параметрами циклов ВРТ (число зрелых ооцитов/эмбрионов, преовуляторные концентрации эстрадиола), что позволяет судить о связи

между овариальным ответом и синтезом андрогенов, усиливающимся при стимуляции [25].

В работе М. Ferrario и соавт. (2015 г.) [26] при оценке связи сывороточных базальных концентраций андрогенов и параметров программ ВРТ у пациентов с бедным ответом обнаружена позитивная корреляция между концентрацией андростендиона и числом зрелых и оплодотворенных ооцитов, а также количеством эмбрионов в группе забеременевших пациенток, что позволяет авторам судить об андростендионе в качестве одного из предиктивных маркеров исхода программ ВРТ.

В нашем исследовании мы определяли концентрацию андростендиона в качестве возможного предиктивного маркера степени овариального ответа (не исхода программы ЭКО) и, соответственно, успеха выбранных протоколов стимуляции. При разделении пациентов на 3 группы в соответствии с овариальным ответом на стимуляцию нами получены ассоциации между числом полученных ооцитов и уровнями андростендиона, определяемыми в день проведения ТВП в сыворотке крови, но не в фолликулярной жидкости. Андростендион, синтезируемый в текальных клетках из предшественника ДГЭА, транспортируется в гранулезные клетки, где далее подвергается конверсии в эстрон и 17 $\beta$ -эстрадиол с участием фермента ароматазы. Влияние андростендиона на процесс оогенеза и созревания яйцеклетки продемонстрировано *in vitro* на моделях животных [27].

Отсутствие корреляции между уровнем андростендиона в фолликулярной жидкости и показателями ответа яичников на стимуляцию могло быть связано с ограничениями нашего исследования: как с небольшой выборкой пациентов, так и с анализом фолликулярной жидкости из доминантного фолликула, а не из всех фолликулов, из которых получены компетентные ооциты, что технически представляло бы сложность при проведении ТВП и последующем индивидуальном культивировании эмбрионов. Отсутствие связи уровня андростендиона фолликулярной жидкости доминантного фолликула и показателей фертилизации также могло быть обусловлено данным ограничением, так как для выявления подобной связи нужно определение уровня гормонов из индивидуальных фолликулов с прослеживанием «судьбы» каждого ооцита. Это ограничение пока не позволило подтвердить идею о влиянии фолликулярных андрогенов на качество ооцитов и его способность к оплодотворению. В литературе опубликованы результаты исследований о связи концентраций стероидных гормонов фолликулярной жидкости и исходов программ ВРТ. Так, в проспективном когортном исследовании М. Kushnig и соавт. (2016 г.) [28] у 14 женщин с бесплодием в цикле стимуляции овуляции в фолликулярной жидкости определены концентрации 14 эндогенных стероидов (методом жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии – LC-MS/MS), в том числе и концентрация андростендиона. Десять аспирированных ооцитов и, соответственно, эмбрионов в дальнейшем ассоциированы с живорождением, 12 – с ненаступлением беременности. Ведущим андрогеном, определенным в фолликулярной жидкости, был андростендион. С живорождением ассоциированы низкое соотношение андростендиона к ДГЭА, тестостерона к ДГЭА, высокие соотношения эстрадиола к тестостерону, эстрогена к андростендиону. В группе с ненаступившей беременностью в 4 из 12 образцов фолликулярной жидкости общие концентрации андрогенов были в среднем выше, чем в группе с живорождением. Авторы объясняют полученные результаты повышенным потреблением предшественников, необходимых в процессе биосинтеза эстрогенов в фолликулах, ассоциированных с живорождением.

Результаты исследования К. Walters и соавт. (2019 г.) [29] позволяют сделать вывод, что все же уровень ряда стероидных гормонов (прогестерона, эстрадиола, эстрогена, ДГЭА, андростендиона, тестостерона, дигидротестостерона, 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -андростендиола, 3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -андростендиола) в фолликулярной жидкости доминантного фолликула и сыворотке крови после стимуляции суперовуляции не может высту-

пать в качестве предиктора исхода программ ЭКО. Авторы провели проспективное обсервационное когортное исследование образцов фолликулярной жидкости и сыворотки крови женщин с использованием LC-MS/MS. Изучался уровень гормонов в сыворотке крови до начала стимуляции и в день забора ооцитов, а также в фолликулярной жидкости самого крупного антрального фолликула. Ведущим гормональным предиктором таких параметров, как число преовуляторных фолликулов, полученных/оплодотворенных ооцитов, blastocist, определен исходный уровень АМГ. Однако оценка уровня гормонов в фолликулярной жидкости только в одном доминантном фолликуле является существенным ограничением данного исследования.

Установленные крайне слабые корреляции между концентрацией андростендиона в фолликулярной жидкости и уровнем андростендиона в сыворотке крови в день проведения ТВП, определенные как ИХЛА, так и методом ВЭЖХ-МС/МС [ИХЛА:  $\rho=0,3$  ( $p=0,038$ ); ВЭЖХ-МС/МС:  $\rho=0,137$  ( $p=0,352$ )], возможно, связаны с локальной конверсией/синтезом гормонов из предшественников в фолликуле без выхода в системный кровоток, а также с забором фолликулярной жидкости только из доминантного фолликула.

Наше исследование позволило использовать преимущества 2 методов определения уровня андростендиона (ИХЛА и ВЭЖХ-МС/МС). Применение метода ВЭЖХ-МС/МС позволило выявить повышение концентрации андростендиона в сыворотке крови в день проведения ТВП при увеличении числа получаемых ооцитов, в свою очередь, ИХЛА позволил выявить разницу концентраций андростендиона только между группами с числом ооцитов менее 3 и более 10. При этом уровень андростендиона, определенный с помощью ИХЛА, достоверно различался между группами пациенток. Это может быть объяснено как присутствием в сыворотке крови целого ряда соединений (при отсутствии предварительной экстракции), вмешивающихся в реакцию антитела и определяемого лиганда при использовании ИХЛА [30], так и маленьким числом пациенток с бедным ответом яичников (1-я группа).

Сравнение уровня андростендиона, определяемого 2 используемыми методами в сыворотке крови на основе ИХЛА и метода ВЭЖХ-МС/МС, показало высокие корреляции [ $\rho=0,73$  ( $p<0,001$ )]. С учетом продолжающейся активной дискуссии в научной среде по вопросу наилучшего способа определения концентрации андрогенов (в первую очередь тестостерона) [31, 32], выявленная высокая корреляционная связь при оценке уровня андростендиона сравниваемыми методами свидетельствует о возможности использования обоих методов в зависимости от технической оснащенности клинической базы.

Исходя из полученных пилотных данных о связи концентрации андростендиона и степени овариального ответа представляются важными как для исследователя, так и для практикующего врача возможность выбора высокоспецифичного метода исследования гормональных параметров при проведении программы ЭКО, а также правильная интерпретация полученных результатов определения стероидных гормонов с учетом поставленных клинических и научных задач.

Таким образом, на сегодняшний день стоит учитывать возможность использования стероидных гормонов сыворотки крови и фолликулярной жидкости (при условии оценки уровня андростендиона в фолликулярной жидкости из пунктируемых фолликулов с аспирированными из них ооцитами, а не только из доминантного фолликула) в предикции ответа яичников на стимуляцию, принимая во внимание гипотезу изменений в гормональном профиле фолликулов [33, 34] и связанных с этим особенностями ответа яичников на стимуляцию овуляции в рамках программ ВРТ. В частности, требуется проведение комплексных исследований гормонального профиля, в том числе концентраций других андрогенов (тестостерон, ДГЭА/ДГЭА-С и др.) в разных группах пациентов, учитывая результаты работ, продемонстрировавших положительное влияние назначения предшественников андрогенов/тестостерона на ис-

ходы программ ЭКО в группах пациентов позднего репродуктивного возраста и с бедным ответом яичников на стимуляцию [35].

### Заключение

Проведенная работа и дальнейшие планируемые исследования стероидов крови и их связи с ответом на овариальную стимуляцию позволят ближе подойти к пониманию особенностей фолликулогенеза/оогенеза, а также использовать полученные данные с целью поиска новых подходов для улучшения исходов программ ВРТ.

**Финансирование.** Статья опубликована в рамках гранта Президента РФ для поддержки молодых ученых МК-5090.2018.7 «Изучение гормонального профиля в сыворотке крови и в фолликулярной жидкости пациенток в рамках программы ЭКО на основании использования иммуноферментного метода и метода масс-спектрометрии».

**Funding.** The article was published as part of a grant from the President of the Russian Federation to support young scientists МК-5090.2018.7 “The study of the hormonal profile in blood serum and follicular fluid of patients as part of an IVF program using the enzyme-linked immunosorbent assay and mass spectrometry methods”.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interests.** The authors declare that there is no conflict of interests.

### Литература/References

1. Van Loendersloot LL, van Wely M, Limpens J et al. Predictive factors in *in vitro* fertilization (IVF): a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2010; 16 (Issue 6): 577–89.
2. Conforti A, Cariati F, Vallone R et al. Individualization of treatment in controlled ovarian stimulation: myth or reality? *Biochim Clin* 2017; 41: 294–305.
3. Sunkara SK, Rittenberg V, Raine-Fenning N et al. Association between the number of eggs and live birth in IVF treatment: an analysis of 400 135 treatment cycles. *Hum Reprod* 2011; 26: 1768–74.
4. Alviggi C, Andersen CY, Buehler K et al. Poseidon Group (Patient-Oriented Strategies Encompassing Individualized Oocyte Number). A new more detailed stratification of low responders to ovarian stimulation: from a poor ovarian response to a low prognosis concept. *Fertil Steril* 2016; 105: 1452–3.
5. Conforti A, Esteves SC, Picarelli S et al. Novel approaches for diagnosis and management of low prognosis patients in assisted reproductive technology: the POSEIDON concept. *Panminerva Medica* 2019; 61 (1). DOI: 10.23736/s0031-0808.18.03511-5
6. Baker VL, Brown MB, Luke B, Conrad KP. Association of number of retrieved oocytes with live birth rate and birth weight: an analysis of 231,815 cycles of *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 2015; 103: 931–938e932.
7. Drakopoulos P, Blockeel C, Stoop D et al. Conventional ovarian stimulation and single embryo transfer for IVF/ICSI. How many oocytes do we need to maximize cumulative live birth rates after utilization of all fresh and frozen embryos? *Hum Reprod* 2016, dev316. DOI: 10.1093/humrep/dev316
8. Riccetti L, De Pascali F, Gilioli L et al. Genetics of gonadotropins and their receptors as markers of ovarian reserve and response in controlled ovarian stimulation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2017; 44: 15–25. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2017.04.002
9. Conforti A, Alfano S, De Rosa P et al. The role of gonadotropin polymorphisms and their receptors in assisted reproductive technologies and controlled ovarian stimulation: A prospective observational study. *Ital J Gynaecol Obstet* 2017; 29: 15–21.
10. Alviggi C, Guadagni R, Conforti A et al. Association between intrafollicular concentration of benzene and outcome of controlled ovarian stimulation in IVF/ICSI cycles: a pilot study. *J Ovarian Res* 2014; 7: 67.
11. Alviggi C, Conforti A, Esteves SC et al. International Collaborative Group for the Study of r-hLH (iCOSLH). Recombinant luteinizing hormone supplementation in assisted reproductive technology: a systematic review. *Fertil Steril* 2018; 109: 644–64.
12. Мамедова Н.Р. Роль экзогенного ЛГ в фолликуло- и оогенезе при проведении программ вспомогательной репродукции. Автореф. ... дис. канд. мед. наук. М., 2012. [Mamedova N.R. Rol' ekzogenogo LG v follikulo- i oogeneze pri provedenii programm vspomogatel'noi reproduksii. Avtoref. ... dis. kand. med. nauk. Moscow, 2012 (in Russian).]
13. Ferraretti AP, Gianaroli L, Magli MC et al. Exogenous luteinizing hormone in controlled ovarian hyperstimulation for assisted reproduction techniques. *Fertil Steril* 2004; 82: 1521–6.
14. De Placido G, Alviggi C, Perino A et al. Recombinant human LH supplementation versus recombinant human FSH (rFSH) step-up protocol during controlled ovarian stimulation in normogonadotrophic women with initial inadequate ovarian response to rFSH. A multi-centre, prospective, randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2005; 20: 390–6.
15. Falck B. Site of production of oestrogen in rat ovary as studied in micro-transplants. *Acta Physiol Scand (Suppl.)* 1959; 47: 1–101.
16. Bosch E, Labarta E, Crespo J et al. Impact of luteinizing hormone administration on gonadotropin-releasing hormone antagonist cycles: an age-adjusted analysis. *Fertil Steril* 2011; 95: 1031–6.
17. Davison SL, Bell R, Donath S et al. Androgen levels in adult females: changes with age, menopause, and oophorectomy. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 3847–53.
18. Welt CK, Jimenez Y, Sluss PM et al. Control of estradiol secretion in reproductive aging. *Hum Reprod* 2006; 21: 2189–93.
19. Venetis CA, Kolibianakis EM, Tarlatzi TB, Tarlatzis BC. Evidence-based management of poor ovarian response. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1205: 199–206.
20. Lebbe M, Woodruff TK. Involvement of androgens in ovarian health and disease. *Mol Hum Reprod* 2013; 19: 828–83.
21. Maninger N, Wolkowitz OM, Reus VI et al. Neurobiological and neuropsychiatric effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate (DHEAS). *Front Neuroendocrinol* 2009; 30 (1): 65–91. DOI: 10.1016/j.yfrne.2008.11.002
22. Longcope C, Franz C, Morello C et al. Steroid and gonadotropin levels in women during the peri-menopausal years. *Maturitas* 1986; 8: 189–96.
23. Goswami M, Nikolaou D. Is AMH Level, Independent of Age, a Predictor of Live Birth in IVF? *J Hum Reprod Sci* 2017; 10 (1): 24–30.
24. Kedem-Dickman A, Maman E, Yung Y et al. Anti-Mullerian hormone is highly expressed and secreted from cumulus granulosa cells of stimulated preovulatory immature and atretic oocytes. *Reprod BioMed Online* 2012; 24 (5): 540–6.
25. Frattarelli JL, Gerber MD. Basal and cycle androgen levels correlate with *in vitro* fertilization stimulation parameters but do not predict pregnancy outcome. *Fertil Steril* 2006; 86: 51–7.
26. Ferrario M, Secomandi R, Cappato M et al. Ovarian and adrenal androgens may be useful markers to predict oocyte competence and embryo development in older women. *Gynecol Endocrinol* 2015; 31 (2): 125–30. DOI: 10.3109/09513590.2014.964639
27. Taketsuru H, Hirao Y, Takenouchi N et al. Effect of androstenedione on the growth and meiotic competence of bovine oocytes from early antral follicles. *Zygote* 2012; 20: 407–15.
28. Kushnir M, Naessen T, Wanggren K et al. Exploratory study of the association of steroid profiles in stimulated ovarian follicular fluid with outcomes of IVF treatment. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2016; 162: 126–33.
29. Walters K, Eid S, Edwards M et al. Steroid profiles by liquid chromatography-mass spectrometry of matched serum and single dominant ovarian follicular fluid from women undergoing IVF. *Reprod BioMed Online* 2018. DOI: 10.1016/j.rbmo.2018.10.006
30. Мальшиева Н.М., Колесникова Г.С., Иоутси В.А. и др. Сравнительный анализ результатов определения тестостерона в сыворотке крови на анализаторах Architect и Vitros и методом высокоэффективной жидкостной хроматографии – тандемной масс-спектрометрии. *Клин. лабораторная диагностика*. 2017; 10. [Malysheva N.M., Kolesnikova G.S., Ioutsy V.A. et al. Sravnitel'nyi analiz rezul'tatov opredeleniia testosterona v syvorotke krovi na analizatorakh Architect i Vitros i metodom vysokoeffektivnoi zhidkostnoi khromatografii – tandemnoi mass-spektrometrii. *Klin. laboratornaia diagnostika*. 2017; 10 (in Russian).]
31. Handelsman D. Mass spectrometry, immunoassay and valid steroid measurements in reproductive medicine and science. *Hum Reprod* 2017; 32: 1147–50.

32. McCartney CR, Burt Solorzano CM, Patrie JT et al. Estimating testosterone concentrations in adolescent girls: Comparison of two direct immunoassays to liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Steroids* 2018; 140. DOI: 10.1016/j.steroids.2018.09.001
33. Abide Yayla, C, Ozkaya E, Kayatas Eser S et al. Association of basal serum androgen levels with ovarian response and ICSI cycle outcome. *Ir J Med Sci* 2018; 187: 409.
34. De los Santos MJ, García-Laez V, Beltrán D et al. The follicular hormonal profile in low-responder patients undergoing unstimulated cycles: is it hypoandrogenic? *Hum Reprod* 2013; 28 (Issue 1): 224–9.
35. Zhang M, Niu W, Wang Y et al. Dehydroepiandrosterone treatment in women with poor ovarian response undergoing IVF or ICSI: a systematic review and meta-analysis. *J Assist Reprod Genet* 2016 33: 981–91.

#### ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Бурдули Анна Георгиевна** – канд. мед. наук, ст. науч. сотр. отд-ния вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. Б.В. Леонова ФГБУ «НМИЦ АПП им. акад. В.И. Кулакова». E-mail: burdulianna@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2849-5426>

**Кициловская Наталья Алексеевна** – специалист лаб. протеомики и метаболизма в репродукции человека в отд. системной биологии ФГБУ «НМИЦ АПП им. акад. В.И. Кулакова». E-mail: kitsilovskiyana@gmail.com

**Сухова Юлия Вячеславовна** – врач клинической лабораторной диагностики клинико-диагностической лаб. ФГБУ «НМИЦ АПП им. акад. В.И. Кулакова». E-mail: j\_bezzubenko@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9657-5375>

**Ведихина Ирина Александровна** – биолог клинико-диагностической лаб. ФГБУ «НМИЦ АПП им. акад. В.И. Кулакова». E-mail: i\_vedikhina@oparina4.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0591-4325>

**Иванец Татьяна Юрьевна** – д-р мед. наук, зав. клинико-диагностической лаб. ФГБУ «НМИЦ АПП им. акад. В.И. Кулакова». E-mail: t\_ivanets@oparina4.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7990-0276>

**Чаговец Виталий Викторович** – канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотр. лаб. протеомики и метаболизма репродукции человека отд. системной биологии в репродукции ФГБУ «НМИЦ АПП им. акад. В.И. Кулакова». E-mail: vvchagovets@gmail.com

**Стародубцева Наталия Леонидовна** – канд. биол. наук, зав. лаб. протеомики репродукции человека ФГБУ «НМИЦ АПП им. акад. В.И. Кулакова». E-mail: n\_starodubtseva@oparina4.ru

**Франкевич Владимир Евгеньевич** – канд. физ.-мат. наук, рук. отд. системной биологии в репродукции ФГБУ «НМИЦ АПП им. акад. В.И. Кулакова». E-mail: v\_frankevich@oparina4.ru

**Anna G. Burduli** – Cand. Sci. (Med.), Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology. E-mail: burdulianna@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2849-5426>

**Natalia A. Kitsilovskaya** – specialist, Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology. E-mail: kitsilovskiyana@gmail.com

**Yuliya V. Sukhova** – doctor, Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology. E-mail: j\_bezzubenko@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9657-5375>

**Irina A. Vedikhina** – biologist, Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology. E-mail: i\_vedikhina@oparina4.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0591-4325>

**Tatiana Yu. Ivanets** – D. Sci. (Med.), Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology. E-mail: t\_ivanets@oparina4.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7990-0276>

**Vitaliy V. Chagovets** – Cand. Sci. (Phys.-Math.), Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology. E-mail: vvchagovets@gmail.com

**Nataliia L. Starodubtseva** – Cand. Sci. (Biol.), Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology. E-mail: n\_starodubtseva@oparina4.ru

**Vladimir E. Frankevich** – Cand. Sci. (Phys.-Math.), Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology. E-mail: v\_frankevich@oparina4.ru

Статья поступила в редакцию / The article received: 30.12.2019

Статья принята к печати / The article approved for publication: 25.02.2020