

## УРОВЕНЬ АНДРОГЕНОВ В КРОВИ И Фолликулярной жидкости у женщин с бесплодием и сниженным овариальным резервом в программах ВРТ

А. А. Гависова <sup>✉</sup>, М. А. Шевцова, С. В. Киндышева, Н. Л. Стародубцева, В. Е. Франкевич, Т. А. Назаренко, Н. В. Долгушина

Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова, Москва, Россия

Концентрация андрогенов в образцах фолликулярной жидкости у пациенток в программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) может быть связана с процессами оогенеза и эмбриогенеза. Целью исследования было проанализировать связь уровня андрогенов в плазме крови и фолликулярной жидкости у пациенток с бесплодием и сниженным овариальным резервом яичников в программах ВРТ. Проведено одномоментное исследование в параллельных группах 300 пациенток 18–42 лет с бесплодием с 2019 по 2021 гг., обратившихся для проведения программы ЭКО/ИКСИ и ПЭ. Определяли андрогенный профиль в плазме крови и фолликулярной жидкости методом масс-спектрометрии жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС). Полученные результаты показали, что андрогены в плазме крови и фолликулярной жидкости, а именно уровни ДГЭА-С, андростендиона и общего тестостерона, могут быть ранними маркерами снижения овариального резерва (СОР) у женщин с бесплодием. Статистически значимая корреляционная связь между уровнями андрогенов в крови и фолликулярной жидкости свидетельствует об их вкладе в формирование снижения овариального резерва. Таким образом, при сниженном овариальном резерве выявлено снижение концентрации андрогенов в плазме крови и в фолликулярной жидкости, что свидетельствует о роли андрогенов в процессах фолликулогенеза, таких как тестостерон и андростендион.

**Ключевые слова:** андрогены, андрогенный дефицит, тестостерон, дегидроэпиандростерон, андростендион, репродуктивный возраст, бесплодие, ВРТ, ВЭЖХ-МС/МС, фолликулярная жидкость

**Вклад авторов:** А. А. Гависова, Н. В. Долгушина — концепция и дизайн исследования; А. А. Гависова, М. А. Шевцова — сбор и обработка материала, обзор литературы, написание статьи; С. В. Киндышева — лабораторная постановка и статистическая обработка материала; Н. Л. Стародубцева, В. Е. Франкевич, Т. А. Назаренко, Н. В. Долгушина — редактирование.

**Соблюдение этических стандартов:** исследование одобрено этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ Акушерства гинекологии и перинатологии им. В. И. Кулакова» (протокол № 2 от 07 февраля 2019 г.); все участники подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Алла Анатольевна Гависова  
ул. Академика Опарина, д. 4, г. Москва, 117997; gaviiala@ya.ru

**Статья получена:** 29.07.2022 **Статья принята к печати:** 13.08.2022 **Опубликована онлайн:** 19.08.2022

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2022.041

## ANDROGEN LEVELS IN BLOOD AND FOLLICULAR FLUID OF IVF PATIENTS WITH DIMINISHED OVARIAN RESERVE

Gavisova AA <sup>✉</sup>, Shevtsova MA, Kindysheva SV, Starodubtseva NL, Frankevich VE, Nazarenko TA, Dolgushina NV

Kulakov national medical research center for obstetrics, gynecology and perinatology, Moscow, Russia

Androgen concentrations in follicular fluid samples collected from patients undergoing in vitro fertilization (IVF) may provide useful clinical indicators. This study aimed to analyze possible associations of the androgen levels in follicular fluid and blood plasma in patients with diminished ovarian reserve (POR) in IVF programs. Cross-sectional study with a parallel group design, conducted in 2019–2021, enrolled 300 patients with infertility, aged 18–42 years, applying for assisted reproduction involving IVF/intracytoplasmic sperm injection and embryo transfer. The androgen profiles of blood plasma and follicular fluid were determined by liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Androgen concentrations in blood plasma and follicular fluid, particularly those of dehydroepiandrosterone (DHEA-S), androstenedione and total testosterone, significantly correlated. The results implicate androgen levels in blood plasma and follicular fluid as early markers of POR in patients with infertility.

**Keywords:** androgens, androgen deficiency, testosterone, dehydroepiandrosterone, androstenedione, reproductive age, infertility, assisted reproductive technologies, LC-MS/MS, follicular fluid

**Author contribution:** Gavisova AA, Dolgushina NV — study concept and design; Gavisova AA, Shevtsova MA — analysis, manuscript writing; Kindysheva SV — laboratory tests, statistical analysis; Starodubtseva NL, Nazarenko TA, Frankevich VE, Dolgushina NV — manuscript editing.

**Compliance with ethical standards:** the study was approved by the ethical review board at the Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology (protocol № 140 of 15 December 2014). The informed consent was submitted by all study participants.

✉ **Correspondence should be addressed:** Alla A. Gavisova  
Akademika Oparina, 4, Moscow, 117997; gaviiala@ya.ru

**Received:** 29.07.2022 **Accepted:** 13.08.2022 **Published online:** 19.08.2022

**DOI:** 10.24075/brsmu.2022.041

Сниженный овариальный резерв (СОР) у пациенток с бесплодием сопряжен с низкой эффективностью лечения в программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Снижение уровня андрогенов с возрастом и при СОР дает основание предполагать, что андрогены играют неотъемлемую роль в регуляции процессов фолликулогенеза и ухудшении результатов программ ВРТ.

Несмотря на большое разнообразие андрогенов, высокой биологической активностью обладают только тестостерон и дигидротестостерон. Оценка взаимосвязи между концентрациями андрогенов в плазме крови и

фолликулярной жидкости является одним из актуальных направлений, особенно в аспекте изучения женщин с бесплодием и СОР. На сегодняшний день не ясно, какой из представителей андрогенов и в какой биологической среде является наиболее диагностически ценным маркером снижения овариального резерва.

Роль фолликулярной жидкости как биологической среды, которая окружает ооцит, участвует в метаболических процессах в фолликуле и в которой происходят важные для последующей фертилизации этапы оогенеза, ученые исследуют как при гиперандрогенных,

так и при гипоандрогенных состояниях [1–3]. Показано, что эндокринная среда, в частности концентрация антимюллера гормона (АМГ) в фолликулярной жидкости ассоциирована с количеством ооцитов и имплантационным потенциалом эмбрионов [4–6]. Данные биологические феномены зависят от сложных динамических взаимоотношений между развивающейся яйцеклеткой и ее микроокружением — фолликулярной жидкостью и структурными компонентами фолликула.

С возрастом отмечается снижение концентрации АМГ в сыворотке крови и тестостерона, что ассоциировано с уменьшением числа фолликулов у женщин позднего репродуктивного возраста [7]. В нескольких исследованиях изучали гормональный профиль в сыворотке крови и в фолликулярной жидкости в зависимости от возраста пациентки при ЭКО в естественном цикле. Было обнаружено снижение уровня тестостерона в фолликулярной жидкости у женщин в возрасте 40–45 лет, по сравнению с женщинами в возрасте 20–25 лет [8].

Результаты фундаментальных исследований, в которых проводили анализ концентрации тестостерона в сыворотке крови и в фолликулярной жидкости, достаточно противоречивы. Так, при снижении уровня тестостерона в сыворотке крови с возрастом не обнаружено снижения концентрации в фолликулярной жидкости у пациенток с бедным ответом в естественном цикле [9]. В связи с этим необходимы исследования по оценке эндокринной связи между кровью и фолликулярной жидкостью, чтобы дать ответ, насколько концентрация андрогенов в крови взаимосвязана с процессами фолликулогенеза и оценить роль андрогенов у пациенток с бесплодием и сниженным овариальным резервом.

В ранее опубликованных исследованиях измерения стероидов в фолликулярной жидкости проводили с использованием иммунохимических методов, недостатком которых является перекрестная реакция со структурно родственными соединениями [10–12]. Методы жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии более специфичны [13] и позволяют проводить точное количественное определение одновременно нескольких стероидов [14, 15].

Цель исследования — проанализировать связь уровня андрогенов в плазме крови и фолликулярной жидкости у пациенток с бесплодием и сниженным овариальным резервом яичников в программах ВРТ.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Было проведено одномоментное исследование в параллельных группах. В нем участвовали 300 пациенток репродуктивного возраста (18–42 года) с бесплодием и сниженным овариальным резервом, обратившиеся в ФБГУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России с 2019 по 2021 год для проведения программы ВРТ. Все пациентки сдавали кровь на 2–3-й день менструального цикла. Критерии включения в исследование: возраст участниц — 18–42 лет; бесплодие в анамнезе; наличие подписанного добровольного информированного согласия. Критерии исключения: хирургическая менопауза; гистерэктомия; надпочечниковая недостаточность; гормонпродуцирующие опухоли; ожирение ( $ИМТ \geq 30 \text{ кг/м}^2$ ); дефицит массы тела ( $ИМТ \leq 18 \text{ кг/м}^2$ ); ВИЧ-инфекция и другие иммунодефицитные состояния; иммуновоспалительные ревматические заболевания, иммуномодулирующая терапия, прием глюкокортикостероидов, онкологические заболевания.

Пациентки были разделены на группы в зависимости от возраста: группу 1 составили 149 пациенток раннего репродуктивного возраста (18–35 лет), группу 2 — 151 пациентка позднего репродуктивного возраста (35–42 лет).

В соответствии с критериями POSEIDON (The Patient-Oriented Strategies Encompassing Individualized Oocyte Number) пациентки каждой возрастной группы разделены на подгруппы в зависимости от овариального резерва: подгруппа 0 — нормальный овариальный резерв (76 пациенток раннего и 69 пациенток позднего репродуктивного возраста;  $АМГ \geq 1,2 \text{ нг/мл}$ ), количество антральных фолликулов (КАФ)  $\geq 5$ ), подгруппа 1 — сниженный овариальный резерв (73 пациентки раннего и 82 пациентки позднего репродуктивного возраста;  $АМГ < 1,2 \text{ нг/мл}$ ,  $КАФ < 5$ ). Блок-схема представлена на рис. 1.

При сборе анамнеза учитывали следующие факторы: возраст пациентки; возраст наступления менопаузы у матери женщины; указание на проведенные операции или травмы внутренних половых органов в анамнезе; перенесенные воспалительные и инфекционные заболевания половых органов; наличие эндометриоза / спаечной болезни; число попыток экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) в анамнезе; акушерский анамнез.

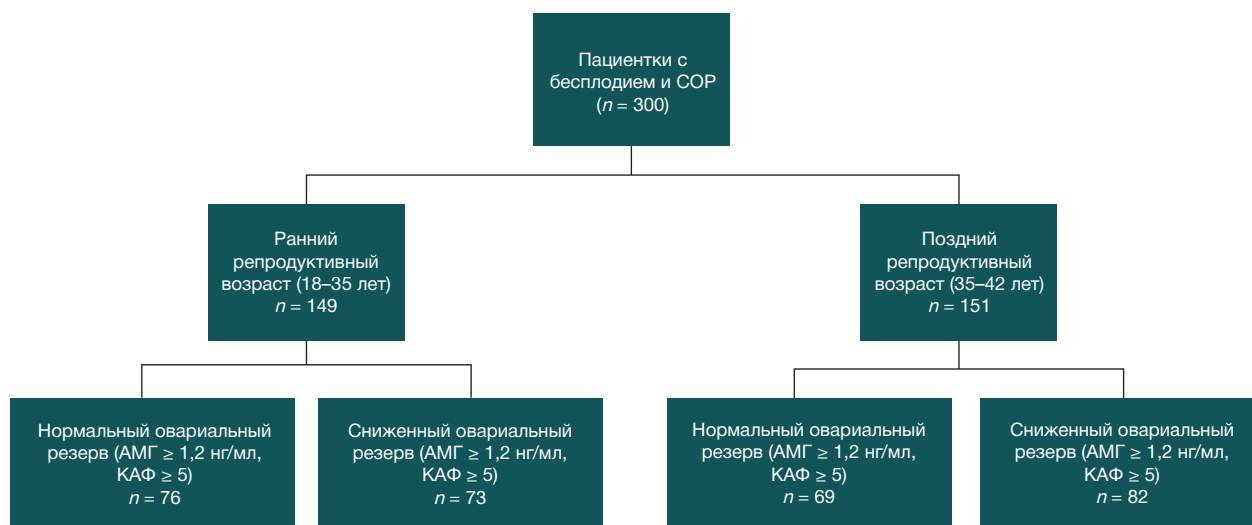


Рис. 1. Блок-схема исследования

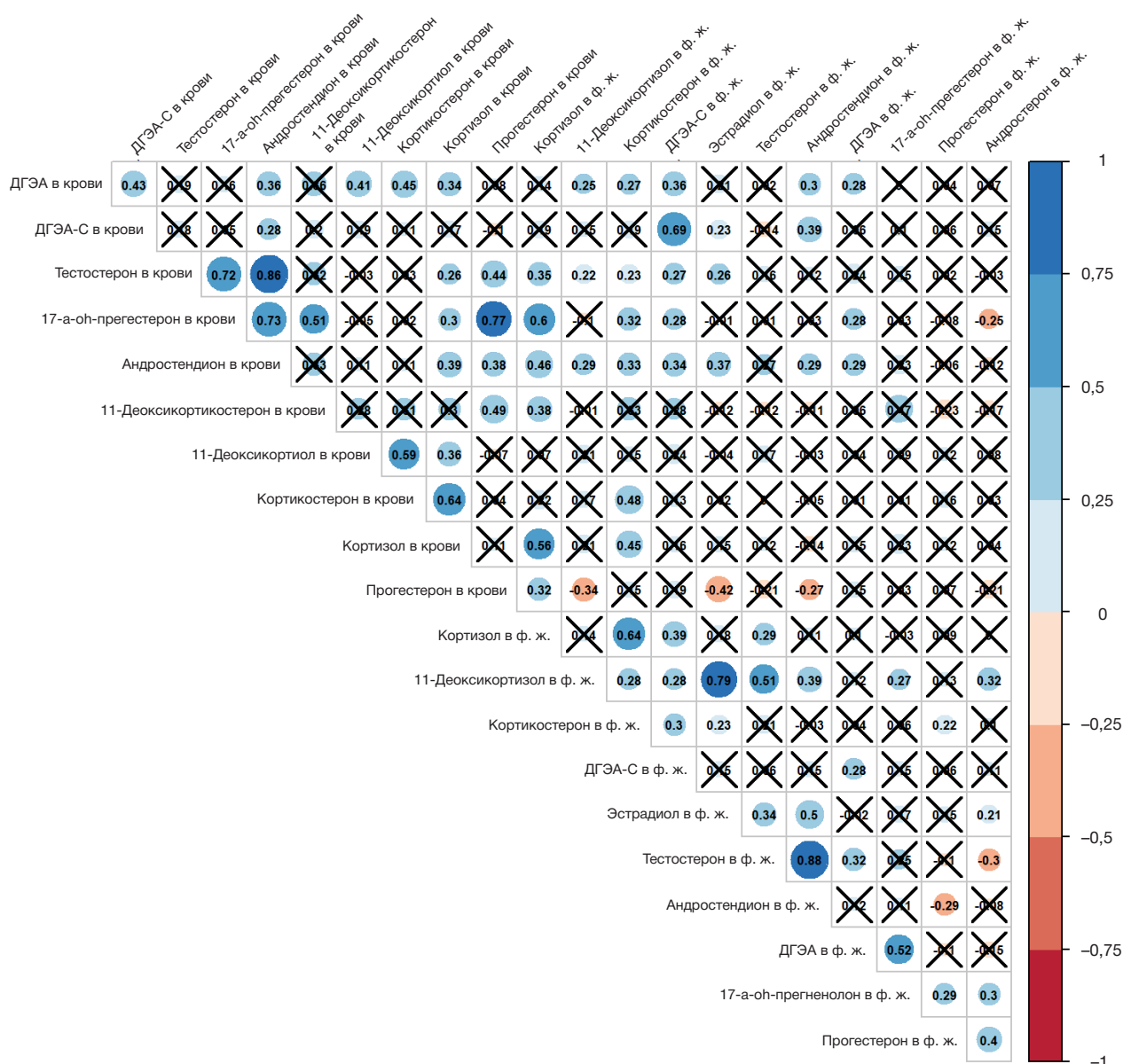


Рис. 2. Коэффициенты корреляции между уровнями концентрации гормонов в плазме крови и в фолликулярной жидкости (ф. ж.) методом ВЭЖХ – МС/МС у женщин с бесплодием и СОР

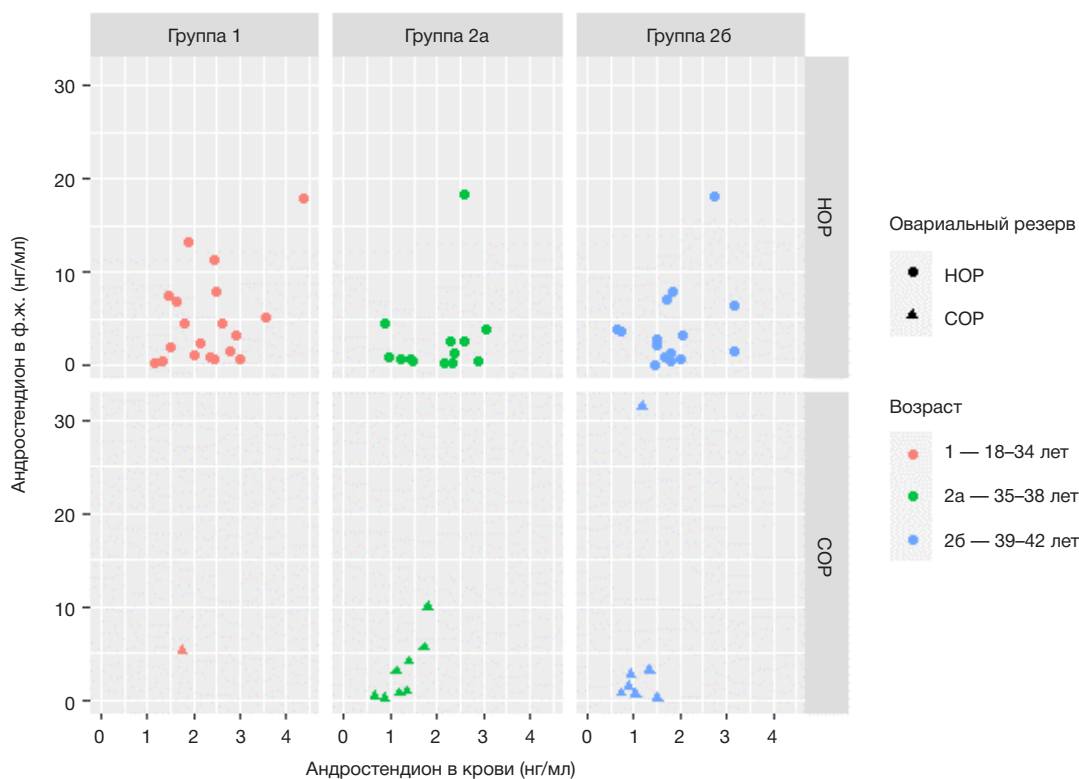
Для мониторинга фолликулогенеза выполняли УЗИ. Программу ЭКО проводили стандартно, в протоколе с антагонистами гонадотропин-рилизинг гормона (ГнРГ), в качестве индукторов фолликулогенеза использовали мочевые, рекомбинантные гонадотропины или их комбинацию. Ежедневную дозу гонадотропинов определяли индивидуально, в зависимости от состояния овариального резерва, но она была не менее 225 Ме в сутки; в качестве триггера овуляции использовали хорионический гонадотропин. Во время трансвагинальной пункции яичников производили забор крови и фолликулярной жидкости из первого фолликула.

Для измерений концентрации гормонов (тестостерона, дегидроэпиандростерона (ДГЭА), дегидроэпиандростерон-сульфата (ДГЭА-С), андростендиона, дигидротестостерона, прогестерона, гидроксипрогестерона, прегненолона, гидроксипрегнолона, кортизола) методом тандемной масс-спектрометрии использовали набор аналитических стандартов стероидных гормонов Steroid Hormones in Serum LC-MS/MS Analysis Kit (JASEM; Турция). Набор содержал четыре калибровочных смеси 16 стероидных гормонов в

лиофилизованном виде, двух уровней контроля качества в лиофилизованном виде и смеси внутренних стандартов (IS). Подвижные фазы А (дистиллированная вода milliQ с 0,01% муравьиной кислоты) и В (ацетонитрил с 0,01% муравьиной кислоты), а также МТВБЕ (≥ 99,5%, HPLC grade, Fisher Chemical; США), MeOH (99,9%, HPLC Basic, Scharlau; Испания), ацетонитрил (99,9%, HPLC Gradient grade, Fisher Chemical; США) и муравьиная кислота (98%, Sigma-Aldrich; США), которые использовали для подготовки фазы и пробоподготовки образцов. Разделение гормонов осуществляли на колонке Poroshel 120 EC-C18 (Agilent; США) длиной 100 мм, внутренним диаметром 2,1 мм и размером зерна сорбента 2,7 мкм.

В процессе пробоподготовки смесь 460 мкл образца и 25 мкл IS дважды экстрагировали 1 мл МТВБЭ с последующим снятием 800 мкл супернатанта в отдельный эппендорф и его высушиванием в токе азота при 50 °С. Полученный сухой остаток разбавляли 100 мкл 50%-го MeOH и переносили в виал со вставкой для ВЭЖХ-МС/МС-измерений.

Для анализа образцов использовали систему ВЭЖХ-МС/МС, которая включает в себя квадрупольный масс-



**Рис. 3.** Зависимость концентрации андростендиона в фолликулярной жидкости (ф. ж.) от его концентрации в плазме крови для разных возрастных групп. Младше 35 лет (группа 1), от 35 до 38 лет включительно (группа 2а), старше 39 лет (группа 2б) со снижением овариального резерва (подгруппа 1) и нормальным овариальным резервом (подгруппа 0)

спектрометрический детектор AB Sciex QTRAP 5500 с источником электрораспылительной ионизации и жидкостной хроматограф Agilent 1260 Infinity (Agilent; США) с насосом высокого давления, термостатом колонок и автосемплером на 108 виал.

### Статистический анализ

Для статистического анализа использовали скрипты, написанные на языке программирования R [16].

Для определения возможной связи между переменными использовали корреляционный анализ. Оценку статистической значимости осуществляли с помощью непараметрического критерия по Спирмену. В случае отсутствия части численных значений у исследуемых переменных коэффициент корреляции вычисляли по всем имеющимся полным парам значений измерений для каждой исследуемой пары отдельно. Для оценки статистической значимости корреляции параметров опросника использовали непараметрический критерий Кендела. При описании количественных данных использовали медианы (Me) и квартили  $Q_1$  и  $Q_3$  в формате Me ( $Q_1$ ;  $Q_3$ ).

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

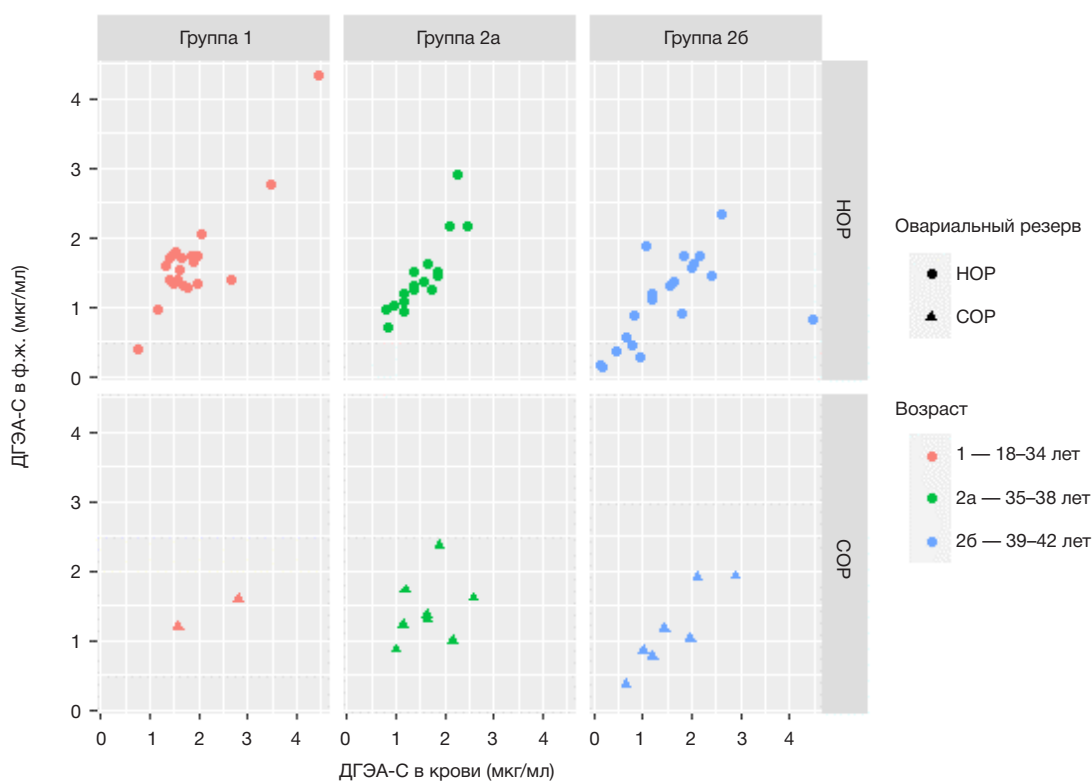
Средний возраст исследуемых женщин составил  $37,3 \pm 2,4$  года. При оценке индивидуальной массы тела (ИМТ) была выявлена тенденция к увеличению этого показателя с возрастом: у пациенток позднего репродуктивного возраста со сниженным овариальным резервом он достигал  $24,6 \pm 5,4$ , хотя статистически значимой разницы не выявлено.

Репродуктивный анамнез характеризовался в среднем наличием более трех безуспешных программ

ЭКО и криопротоколов, завершившихся негативным результатом на этапе гормональной верификации наличия беременности. Длительность бесплодия статистически значимо увеличивалась в зависимости от возраста и овариального резерва и составила  $7,2 \pm 2,4$  лет в группе пациенток старшего репродуктивного возраста с СОР, среди которых 65,4% имели первичное бесплодие. Число проводимых циклов ВРТ в анамнезе тоже было статистически значимо больше в группе пациенток старшего репродуктивного возраста с СОР и составило  $2,3 \pm 0,9$ .

Был проведен сравнительный анализ данных о концентрациях гормонов, полученных в плазме крови и в фолликулярной жидкости в день аспирации ооцитов. Значения концентрации большинства анализируемых гормонов (ДГЭА-С, тестостерон общий, 17-ОП, андростендион) в плазме крови и в фолликулярной жидкости коррелировали между собой (рис. 2). Выявлена корреляция между уровнями андростендиона в крови и в фолликулярной жидкости (коэффициент корреляции — 0,29), умеренная корреляция между ДГЭАС в крови и в фолликулярной жидкости (коэффициент корреляции — 0,69). Сильная корреляция между концентрациями андростендиона и тестостерона в крови (коэффициент корреляции — 0,86) и андростендиона и тестостерона в фолликулярной жидкости (коэффициент корреляции 0,88) патогенетически может объяснить снижение овариального резерва и связь уровня андрогенов и фолликулогенеза.

Был проведен сравнительный анализ концентраций андростендиона и ДГЭА-С в крови и в фолликулярной жидкости у пациенток разных возрастных групп в зависимости от овариального резерва. С целью детального анализа зависимости концентраций андрогенов (маркеров снижения овариального резерва), ДГЭА-С и андростендиона в крови и в фолликулярной жидкости в



**Рис. 4.** Зависимость концентрации ДГЭА-С в фолликулярной жидкости (ф. ж.) от его концентрации в плазме крови для разных возрастных групп. Младше 35 лет (группа 1), от 35 до 38 лет включительно (группа 2.1), старше 39 лет (группа 2.2) со снижением овариального резерва (подгруппа 1) и нормальным овариальным резервом (подгруппа 0)

зависимости от возраста, пациентки группы 2 (от 35–42 лет) были разделены на подгруппы 35–38 лет (подгруппа 2а) и 39–42 лет (подгруппа 2б).

На рис. 3 по данным сравнительного анализа концентраций андростендиона в крови и в фолликулярной жидкости выявлено снижение уровня андростендиона в обеих биологических средах по мере снижения овариального резерва.

На рис. 4 по данным сравнительного анализа концентраций ДГЭА-С в крови и в фолликулярной жидкости отмечено также снижение его уровня в обеих биологических средах по мере снижения овариального резерва.

Даже без стратификации по группам в зависимости от возраста и снижения овариального резерва можно увидеть прямую линейную зависимость для ДГЭА-С (рис. 5), что свидетельствует о его ценности, как предшественника андростендиона и маркера андрогенной активности вне зависимости от возраста.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Данное исследование было направлено на определение уровня андрогенов как предшественников эстрогенов с помощью чувствительного и специфического метода ВЭЖХ-МС/МС [9, 15] в образцах плазмы крови и в фолликулярной жидкости в программе ЭКО. Снижение овариального резерва было сопряжено с овариальной гипоандрогенией, при которой избирательно снижаются уровни андрогенов, синтезируемых тека-клетками. Это можно расценивать как ранние проявления возрастного андрогенного дефицита. Выявлена также взаимосвязь между концентрациями андрогенов в крови и в фолликулярной жидкости как среды для роста и развития ооцитов. Отмечено снижение концентрации андростендиона как предшественника

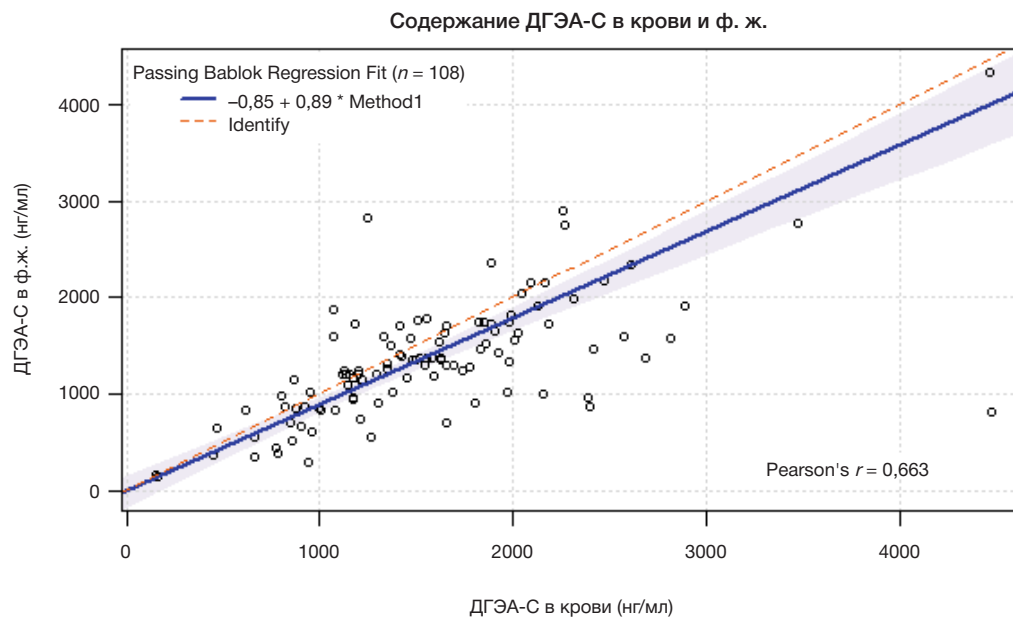
тестостерона, а также ДГЭА-С как предшественника андростендиона и маркера андрогенной активности в фолликулярной жидкости; более того, концентрация каждого из изучаемых гормонов прямо пропорционально коррелировала с таковой в плазме крови.

Существующие маркеры овариального резерва, в частности АМГ и КАФ, не всегда полноценно отражают истинную клиническую картину и показатели эмбриологического этапа у женщин раннего и позднего репродуктивного возраста и сильно различаются как по количеству зрелых ооцитов, так и по количеству зигот и частоте бластуляции, равно как различаются и уровни андрогенов, и концентрация [15, 17, 18], и активность их рецепторов. Фолликулярная жидкость обеспечивает микроокружение, в котором развивается и созревает ооцит, и доступна во время пункции фолликулов в программе ЭКО для биохимических измерений, позволяющих получить представление о процессах оогенеза.

По некоторым данным, концентрация тестостерона в зрелых фолликулах выше у женщин с синдромом поликистозных яичников (СПКЯ), по сравнению с его концентрацией у пациенток с нормальным овариальным резервом, а овариальная стимуляция у пациенток с СПКЯ незначительно увеличивает уровень тестостерона в фолликулярной жидкости, по сравнению с естественными циклами [10].

В проспективном когортном исследовании при определении концентраций эндогенных стероидов методом жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии в фолликулярной жидкости был определен ведущий андроген в фолликулярной жидкости, которым оказался андростендион [9].

В одном из исследований при изучении концентраций эстрадиола, прогестерона, 17-гидроксипрогестерона, андростендиона и тестостерона в периовуляторный



**Рис. 5.** Корреляционный и линейный регрессионный анализ по всем точкам данных между концентрациями ДГЭА-С в крови и в фолликулярной жидкости (ф. ж.)

период забор фолликулярной жидкости осуществляли в день введения триггера овуляции, а затем через 12, 17, 32 и 36 ч от введения триггера [17]. Было выявлено, что для концентрации эстрадиола и тестостерона была характерна динамика в периовуляторный период, а концентрация андростендиона не подвергалась существенным изменениям на протяжении всего периовуляторного периода, ни в плазме крови, ни в фолликулярной жидкости. Тем не менее, аналогично нашим данным, корреляционный анализ показал положительную взаимосвязь уровней андростендиона и тестостерона в фолликулярной жидкости. С учетом того, что концентрации общего тестостерона в крови у женщин низкие и есть трудности их измерения, корреляция уровней андростендиона и общего тестостерона как в плазме, так и в фолликулярной жидкости, позволяет говорить об андростендионе, как о возможном маркере снижения овариального резерва у женщин репродуктивного возраста с бесплодием.

Выявлено также статистически значимое увеличение концентрации андрогенов в фолликулярной жидкости при использовании менотропинов для стимуляции функции яичников [18]; однако в нашем исследовании связь с препаратами для стимуляции не обнаружена.

Авторы другой работы исследовали концентрации андрогенов в сыворотке крови и в фолликулярной жидкости у пациенток с бедным ответом, которые были разделены на четыре группы согласно критериям POSEIDON. Они продемонстрировали сопоставимые уровни тестостерона, андростендиона, ДГЭА-С в крови между пациентками с нормальным резервом и первой группой по POSEIDON. Однако выявлено значимое снижение уровней гормонов между контролем и группой 3 по POSEIDON в сыворотке крови. Концентрация ДГЭА-С в фолликулярной жидкости была статистически значимо ниже в группе 3 по POSEIDON, в то время как концентрации тестостерона,

андростендиона, эстрадиола и ГСПС в фолликулярной жидкости оказались сопоставимы между группами. Уровень сывороточного тестостерона был статистически значимо ниже в группах пациенток старше 35 лет, независимо от показателей овариального резерва (группа 2 и 4 по POSEIDON). Авторы выявили прямую корреляцию между сывороточной и фолликулярной концентрацией ДГЭА-С [19]. Полученные нами данные тоже подтверждают высокую корреляцию уровней гормонов в фолликулярной жидкости и в плазме крови.

## ВЫВОДЫ

Представленные данные свидетельствуют, что при сниженном овариальном резерве отмечается избирательное снижение уровней андрогенов в фолликулярной жидкости, что подтверждает гипотезу о вкладе андрогенов и роли их дефицита. Полученные данные о корреляции между общим тестостероном и андростендионом не только в плазме крови, но и в фолликулярной жидкости свидетельствуют о диагностической ценности данных андрогенов как ранних маркеров формирования андрогенного дефицита у женщин с бесплодием при сниженном овариальном резерве. Использование ВЭЖХ-МС/МС для определения уровня андрогенов у женщин с бесплодием в программе ЭКО может быть предиктивно значимо для выявления взаимосвязи между концентрациями тестостерона и андростендиона в плазме крови и фолликулярной жидкости как микроокружения ооцитов. Дискуссия о возможности прогнозирования исходов ВРТ по уровню андрогенов требует проведения более углубленных исследований вследствие растущей клинической необходимости повышения эффективности программ ВРТ и прогнозирования их исходов на этапе анализа состава фолликулярной жидкости.

## Литература

- Hill MJ, Levens ED, Levy G, Ryan ME, Csokmay JM, DeCherme AH, et al. The use of recombinant luteinizing hormone in patients undergoing assisted reproductive techniques with advanced reproductive age: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* 2012; 97 (5): 1108–14.
- Luo S, Li S, Li X, Qin L, Jin S. Effect of pretreatment with transdermal testosterone on poor ovarian responders undergoing IVF/ICSI: a meta-analysis. *Exp Ther Med.* 2014; 8 (1): 187–94.
- Von Wolff M, Kollmann Z, Flück CE, Stute P, Marti U, Weiss B, et al. Gonadotrophin stimulation for in vitro fertilization significantly alters the hormone milieu in follicular fluid: a comparative study between natural cycle IVF and conventional IVF. *Hum Reprod.* 2014; 29 (5): 1049–57.
- Fanchin R, Mendez Lozano DH, Frydman N, Gougeon A, di Clemente N, Frydman R, et al. Anti-Müllerian hormone concentrations in the follicular fluid of the preovulatory follicle are predictive of the implantation potential of the ensuing embryo obtained by in vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007. 92 (5): 1796–802.
- Pabuccu R, Kaya C, Çağlar GS, Oztas E, Satiroglu H. Follicular-fluid anti-Mullerian hormone concentrations are predictive of assisted reproduction outcome in PCOS patients. *Reprod Biomed Online.* 2009; 19 (5): 631–37.
- Takahashi C, Fujito A, Kazuka M, Sugiyama R, Ito H, Isaka K. Anti-Müllerian hormone substance from follicular fluid is positively associated with success in oocyte fertilization during in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2008; 89 (3): 586–91.
- Van Disseldorp J, Faddy MJ, Themmen AP, de Jong FH, Peeters PH, van der Schouw YT. Relationship of serum antimüllerian hormone concentration to age at menopause. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93 (6): 2129–34.
- Barbieri RL, Sluss PM, Powers RD, McShane PM, Vitonis A, Ginsburg E, et al. Association of body mass index, age, and cigarette smoking with serum testosterone levels in cycling women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2005; 83 (2): 302–8.
- Kushnir M, Naessen T, Wanggren K, Hreinsson J, Rockwood AL, Meikle AW. 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.
- Kim J, Lee J, Chang H, Jee BC, Chang SS, Kim SH. Anti-Mullerian hormone levels in the follicular fluid of the preovulatory follicle: a predictor for oocyte fertilization and quality of embryo. *J Korean Med Sci.* 2014; 29 (9): 1266–70.
- Wen X, Li D, Tozer A, Suzanna MD, Ray KI. Estradiol, progesterone, testosterone profiles in human follicular fluid and cultured granulosa cells from luteinized pre-ovulatory follicles. *Reprod Biol Endocrinol.* 2010; 8: 117.
- Handelsman D. Mass spectrometry, immunoassay and valid steroid measurements in reproductive medicine and science. *Hum Reprod.* 2017; 32 (6): 1–4.
- Yang Z, Zhou W, Zhou C, Zhou Y, Liu X, Ding G, et al. Steroid metabolome profiling of follicular fluid in normo- and hyperandrogenic women with polycystic ovary syndrome. *J Steroid Biochem Mol Biol Epub.* 2021; 206: 105806.
- Bongrani A, Plotton I, Mellouk N, Ramé C, Guerif F, Froment P, et al. High androgen concentrations in follicular fluid of polycystic ovary syndrome women. *Reprod Biol Endocrinol.* 2022; 20 (1): 88.
- Harwood DT, Handelsman DJ. Development and validation of a sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay to simultaneously measure androgens and estrogens in serum without derivatization. *Clin Chim Acta.* 2009; 409 (1–2): 78–84.
- Jonas Schäler, Georg Thaller, Dirk Hinrichs. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2018. R Studio: Integrated Development for R. R Studio, Inc., Boston MA.
- Poulsen LC, Englund ALM, Andersen AS, Bøtkjær JA, Mamsen LS, Damdimopoulou P, et al. Follicular hormone dynamics during the midcycle surge of gonadotropins in women undergoing fertility treatment. *Mol Hum Reprod.* 2020; 26 (4): 256–68.
- Бурдули А. Г., Кициловская Н. А., Сухова Ю. В., Ведикина И. А., Иванец Т. Ю. и др. Фолликулярная жидкость и исходы программ вспомогательных репродуктивных технологий (обзор литературы). *Гинекология.* 2019; 21 (6): 36–40.
- Fuentes A, Sequeira K, Tapia-Pizarro A, Muñoz A, Salinas A, Céspedes P. et al. Androgens profile in blood serum and follicular fluid of women with poor ovarian response during controlled ovarian stimulation reveals differences amongst POSEIDON stratification groups: a pilot study. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019; 10: 458.

## References

- Hill MJ, Levens ED, Levy G, Ryan ME, Csokmay JM, DeCherme AH, et al. The use of recombinant luteinizing hormone in patients undergoing assisted reproductive techniques with advanced reproductive age: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* 2012; 97 (5): 1108–14.
- Luo S, Li S, Li X, Qin L, Jin S. Effect of pretreatment with transdermal testosterone on poor ovarian responders undergoing IVF/ICSI: a meta-analysis. *Exp Ther Med.* 2014; 8 (1): 187–94.
- Von Wolff M, Kollmann Z, Flück CE, Stute P, Marti U, Weiss B, et al. Gonadotrophin stimulation for in vitro fertilization significantly alters the hormone milieu in follicular fluid: a comparative study between natural cycle IVF and conventional IVF. *Hum Reprod.* 2014; 29 (5): 1049–57.
- Fanchin R, Mendez Lozano DH, Frydman N, Gougeon A, di Clemente N, Frydman R, et al. Anti-Müllerian hormone concentrations in the follicular fluid of the preovulatory follicle are predictive of the implantation potential of the ensuing embryo obtained by in vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007. 92 (5): 1796–802.
- Pabuccu R, Kaya C, Çağlar GS, Oztas E, Satiroglu H. Follicular-fluid anti-Mullerian hormone concentrations are predictive of assisted reproduction outcome in PCOS patients. *Reprod Biomed Online.* 2009; 19 (5): 631–37.
- Takahashi C, Fujito A, Kazuka M, Sugiyama R, Ito H, Isaka K. Anti-Müllerian hormone substance from follicular fluid is positively associated with success in oocyte fertilization during in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2008; 89 (3): 586–91.
- Van Disseldorp J, Faddy MJ, Themmen AP, de Jong FH, Peeters PH, van der Schouw YT. Relationship of serum antimüllerian hormone concentration to age at menopause. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93 (6): 2129–34.
- Barbieri RL, Sluss PM, Powers RD, McShane PM, Vitonis A, Ginsburg E, et al. Association of body mass index, age, and cigarette smoking with serum testosterone levels in cycling women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2005; 83 (2): 302–8.
- Kushnir M, Naessen T, Wanggren K, Hreinsson J, Rockwood AL, Meikle AW. 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.
- Kim J, Lee J, Chang H, Jee BC, Chang SS, Kim SH. Anti-Mullerian hormone levels in the follicular fluid of the preovulatory follicle: a predictor for oocyte fertilization and quality of embryo. *J Korean Med Sci.* 2014; 29 (9): 1266–70.
- Wen X, Li D, Tozer A, Suzanna MD, Ray KI. Estradiol, progesterone, testosterone profiles in human follicular fluid and cultured granulosa cells from luteinized pre-ovulatory follicles. *Reprod Biol Endocrinol.* 2010; 8: 117.
- Handelsman D. Mass spectrometry, immunoassay and valid steroid measurements in reproductive medicine and science.

- Hum Reprod. 2017; 32 (6): 1–4.
13. Yang Z, Zhou W, Zhou C, Zhou Y, Liu X, Ding G, et al. Steroid metabolome profiling of follicular fluid in normo- and hyperandrogenic women with polycystic ovary syndrome. *J Steroid Biochem Mol Biol Epub.* 2021; 206: 105806.
  14. Bongrani A, Plotton I, Mellouk N, Ramé C, Guerif F, Froment P, et al. High androgen concentrations in follicular fluid of polycystic ovary syndrome women. *Reprod Biol Endocrinol.* 2022; 20 (1): 88.
  15. Harwood DT, Handelsman DJ. Development and validation of a sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay to simultaneously measure androgens and estrogens in serum without derivatization. *Clin Chim Acta.* 2009; 409 (1–2): 78–84.
  16. Jonas Schäler, Georg Thaller, Dirk Hinrichs. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2018. R Studio: Integrated Development for R. R Studio, Inc., Boston MA.
  17. Poulsen LC, Englund ALM, Andersen AS, Bøtkjær JA, Mamsen LS, Damdimopoulou P, et al. Follicular hormone dynamics during the midcycle surge of gonadotropins in women undergoing fertility treatment. *Mol Hum Reprod.* 2020; 26 (4): 256–68.
  18. Burduli AG, Kitsilovskaya NA, Sukhova YV, Vedikhina IA, Ivanets TY, Chagovets VV, Starodubtseva NL, Frankevich VE. Follicular fluid and assisted reproductive technology programs outcomes (literature review). *Gynecology.* 2019; 21 (6): 36–40. Russian.
  19. Fuentes A, Sequeira K, Tapia-Pizarro A, Muñoz A, Salinas A, Céspedes P. et al. Androgens profile in blood serum and follicular fluid of women with poor ovarian response during controlled ovarian stimulation reveals differences amongst POSEIDON stratification groups: a pilot study. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019; 10: 458.