

Влияние низкотемпературного хранения на стабильность содержания стероидных гормонов в фолликулярной жидкости яичника человека

Е.А. ЯКОВЛЕВА, А.Г. ГЕРОДЕС

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Low Temperature Storage on Steroid Hormones Content Stability in Human Oocyte Follicular Fluid

YAKOVLEVA E.A., GERODES A.G.

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Исследовано содержание эстрадиола (Э), прогестерона (П) и тестостерона (Т) в фолликулярной жидкости (ФЖ) преовуляторных фолликулов яичника человека, нативной и хранившейся в условиях низкотемпературного банка (-196°C). Проведено сравнение влияния двух режимов замораживания ФЖ (одноэтапного погружения в жидкий азот и двухэтапного с предварительным выдерживанием в парах азота) на стабильность сохранения концентрации данных гормонов в ФЖ в течение 1-го и 6-ти месяцев. Показано, что стабильность эстрадиола, прогестерона и тестостерона сохраняется на протяжении всего периода наблюдений и не зависит от выбора режима замораживания ФЖ.

Ключевые слова: фолликулярная жидкость яичника человека, эстрадиол, прогестерон, тестостерон, гормоны, низкотемпературное хранение.

Досліджено вміст естрадіолу, прогестерону та тестостерону в фолікулярній рідині (ФР) яєчника людини, нативної та тієї, що зберігалася в умовах низькотемпературного банку (-196°C). Проведено порівняння впливу двох режимів заморожування ФР (одноетапного занурювання у рідкий азот та двоетапного з попереднім утриманням у парах азоту) на стабільність збереження концентрації наведених гормонів у ФР протягом 1-го та 6-ти місяців. Показано, що стабільність естрадіолу, прогестерону та тестостерону зберігається протягом усього періоду дослідження та не залежить від вибору режиму заморожування ФР.

Ключові слова: фолікулярна рідина яєчника людини, естрадіол, прогестерон, тестостерон, гормони, низькотемпературне зберігання.

There was studied the estradiol (E), progesterone (P) and testosterone (T) content in follicular fluid (FF) of human oocyte preovulatory follicles, native and low-temperature-stored one (-196°C). We have compared the effect of two freezing regimens (one-step immersion into liquid nitrogen and a two-step one with the preliminary exposure in nitrogen vapors) on the stability of concentration maintenance of these hormones in FF for 1 and 6 months. Stability of estradiol, progesterone and testosterone was shown to be kept within the whole observation period and to be independent upon the FL freezing regimen selected.

Key words: follicular fluid of human oocyte, estradiol, progesterone, testosterone, low temperature storage.

Фолликулярная жидкость яичника женщины – сложная по биохимическому составу биологическая среда, которая окружает ооцит в процессе его роста и созревания [5, 10]. Селекция из когорты единственного доминантного фолликула неотделимо связана с тем, насколько интенсивно идет в нем биосинтез эстрогенов [10]. Функциональная активность тека- и гранулезных клеток, поддерживающих продукцию эстрогенов, регулируется эндокринными, паракринными и аутокринными механизмами [4], действие которых отражается в определенных изменениях состава ФЖ. Именно поэтому большое количество исследований ФЖ [6, 17] направлено на выяснение ее гормонального состава, различий, зависящих от размеров фолликула и фазы менструального цикла [6].

Follicular fluid of woman's oocyte is known to be a complicated on biochemical content biological medium, which surrounds the oocyte during its growth and maturation [5, 10]. Selection among the pool of a single dominant follicle is closely related to the intensity rate of estrogen biosynthesis [10]. Functional activity of theca- and granular cells, supporting the estrogen production, is regulated by endocrine, paracrine and autocrine mechanisms [4], the effect of which is reflected in certain changes of FF content. This is the reason why a great number of FF investigations [6, 17] is directed to revealing its hormone composition, the differences depending upon the follicle size and menstrual cycle [6].

We have performed the investigations of FF hormonal spectrum in women treated according to IVF

Адрес для корреспонденции: Яковлева Е.А., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 772-11-19, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Yakovleva E.A., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Nat. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7721119, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Нами были проведены исследования гормонального спектра ФЖ у женщин, проходивших лечение по программе экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), и его стабильности при длительном (1 и 6 мес) хранении в жидком азоте (-196°C).

Материалы и методы

Все женщины находились в репродуктивном возрасте (25-35 лет), не имели эндокринных нарушений, предварительно были обследованы на наличие урогенитальной инфекции (СПИД, RW, хламидиоз, уреаплазмоз, гарднереллез и др.). Были выяснены данные о перенесенных заболеваниях, в частности, болезни Боткина, туберкулезе, наследственных заболеваниях. Показаниями к проведению программы ЭКО служили отсутствие (23%), полная (72%) или частичная (5%) непроходимость маточных труб у жены в сочетании с патологией сперматогенеза у мужа (15%). Стимуляцию фолликулогенеза проводили по длинным протоколам стимуляции, используя агонисты рилизинг-гормона ("Suprefact"), человеческий фолликулостимулирующий гормон ("Menogon"). Динамику роста фолликулов исследовали с помощью ультразвукового мониторинга на ультразвуковом сканирующем устройстве Bruel&Kjaer с использованием влагалищного (7,5 МГц) секторального датчика. Фолликулярную жидкость с содержащимися в ней ооцитами получали при трансвагинальной пункции пула фолликулов через 34-35 ч после инъекции 5000-10000 ед. человеческого хориогонального гонадотропина ("Profasi"). После выделения ооцитов ФЖ центрифугировали, отбирали надосадок и делили на 5 групп.

Группу I образцов исследовали на содержание половых гормонов в течение 6 ч после получения ФЖ. Данные этой группы были приняты за контроль.

Группы II и III образцов расфасовывали в пластиковые пайеты по 0,5 мл и замораживали одноэтапно прямым погружением в жидкий азот, размораживали на водяной бане при 39°C.

Фолликулярную жидкость IV и V групп замораживали в пластиковых пайетах объемом 0,5 мл по двухэтапному режиму (первый – выдерживание в течение 20 мин в парах жидкого азота на расстоянии 15 см над зеркалом азота, скорость охлаждения 3°C/мин; второй – погружение в жидкий азот) при помощи портативного устройства, состоящего из широкогорлого сосуда Дьюара, штатива сдвигающейся штангой и укрепленной на ней решеткой. В качестве чувствительного элемента использовали медь-копелевую термопару. Оттаивание проводили на водяной бане при 37°C [2].

program, and its stability during long-term storage (1 and 6 months) under liquid nitrogen conditions (-196°C).

Materials and methods

All the women were of reproductive age (25-35 years old), with no endocrine disorders, were preliminarily tested for the presence of urogenital infection (HIV, RW, chlamydia, ureaplasmosis, gardnerellessis etc.). There were revealed the data on diseases in past, in particular Botkin's disease, tuberculosis, hereditary diseases. Indication to IVF program was the absence (23%), complete (72%) or partial (5%) obstruction of oviducts in wife along with spermatogenesis pathology in husband (15%). Folliculogenesis stimulation was accomplished according to the long stimulation protocols using releasing-hormone agonists ("Superfact"), human follicle-stimulating hormone ("Menogon"). Dynamics of the follicular growth was studied by ultrasound monitoring with ultrasound scanning device Bruel & Kjaer using the vaginal sector sensor (7.5MHz). FF along with the comprised oocytes was obtained during transvaginal puncture of the follicles pool 34-35 hrs following the injection of 5000-10000 units of human chorionic gonadotropin ("Profasi"). Following the oocytes isolation FF was centrifuged, removed from supernatant and divided into 5 groups.

Group I of the samples was studied for the presence of sex hormones within 6 hours following the FF obtaining. This group data were assumed as the control.

The groups II and III were packed into 0.5 ml plastic straws and one-step frozen by direct immersion into liquid nitrogen, thawing was performed in water bath at 39°C.

FF of the groups IV and V was frozen in 0.5 ml plastic straws according to 2-step regimen (the 1st step foresees keeping within 20 min in liquid nitrogen vapors at the distance of 15 cm over a nitrogen mirror, 3°C per minute cooling rate; the 2nd one is the immersion into liquid nitrogen) using a portable device composed of a wide-neck Dewar vessel, tripod with a movable bar and grid fixed on it. As a sensor element we used copper-copal thermocouple. Thawing was performed in water bath at 37°C [2].

Hormonal spectrum of FF was investigated using Bio-Rad NovaPath Test according to a standard method, sex hormone levels (estradiol, progesterone, testosterone) were studied by the method of 3-phase immune-enzyme analysis on determination of the amount of bound conjugate of the corresponding enzyme. The amount of the hormones under study in a sample was reversibly proportional to the number of enzyme conjugate which was bound during the reaction, where the stained product formed. Standard curve showed the dependence of staining intensity upon the concentration of the hormone studied in a sample.

Гормональный спектр ФЖ исследовали с помощью Bio-Rad NovaPath Test по стандартной методике, уровни половых гормонов (эстрадиола, прогестерона, тестостерона) – методом трехфазного иммуноферментного анализа по определению количества связанного конъюгата соответствующего фермента. Количество исследуемого гормона в пробе было обратно пропорционально количеству конъюгата фермента, связавшегося в процессе реакции, в результате которой образовывался окрашенный продукт. Стандартная кривая показывала зависимость интенсивности окрашивания от концентрации исследуемого гормона в пробе.

Результаты и обсуждение

Нами были проведены исследования гормонального спектра ФЖ в образцах, содержащих зрелые ооциты. Частота оплодотворения ооцитов составила более 75 %. При исследовании гормонального спектра ФЖ стероидные гормоны в жидкости преовулярных фолликулов яичника человека содержали: прогестерона $135,6 \pm 1,97$ мкг/мл, эстрадиола $405,1 \pm 38,4$ пг/мл, тестостерона $125,0 \pm 26,1$ пг/мл. Более наглядно соотношение уровней половых гормонов ФЖ зрелых ооцитов выражалось в отношениях прогестерона к тестостерону (1085,2), прогестерона к эстрадиолу (334,94) и эстрадиола к тестостерону (3,24).

Полученные нами данные наглядно демонстрируют обратную зависимость концентраций эстрадиола и прогестерона по отношению к содержанию андрогенов в зрелой ФЖ. В нормальных фолликулах созревание ооцита связано с изменением продуцирования гранулезными клетками эстрадиола и прогестерона, которое отражается в соотношении этих гормонов. Концентрация прогестерона от средней до поздней фолликулярной фазы нарастает быстрее, чем концентрация эстрадиола. Это проявляется в увеличении соотношения прогестерон/эстрадиол у зрелых преовуляторных фолликулов. Более высокие уровни эстрадиола и более низкие тестостерона в ФЖ женщин, у которых была диагностирована беременность после проведения программы ЭКО, в значительной степени определяют качество ооцитов и их способность к дальнейшему развитию [10].

Есть сообщения о том, что ФЖ влияет на такие фундаментальные функции спермы, как подвижность [5, 12] и акросомная реакция [3, 11, 13, 16]. Поэтому ее используют как добавку к средам выделения подвижной фракции спермиев и культивирования гамет в программах вспомогательных репродуктивных технологий [1]. Для этого разрабатываются и совершенствуются

Results and discussion

We investigated the hormonal spectrum of FF in the samples containing mature oocytes. The rate of oocytes fertilization made more than 75%. When studying the FF hormonal spectrum, steroid hormones in the fluid of preovulatory follicles of human oocytes contained: 135.6 ± 1.97 mg/ml of progesterone, 405.1 ± 38.4 mg/ml of estradiol, 125.0 ± 26.1 mg/ml of testosterone. More visibly the ratio of sex hormone levels in FF of mature oocytes was manifested in progesterone ratio to testosterone (1085.2), progesterone to estradiol (334.94) and estradiol to testosterone (3.24).

The data obtained clearly demonstrate the reversible dependence of estradiol and progesterone concentrations in respect of androgens content in mature FF. In normal follicles the oocyte maturation is connected with the estradiol and progesterone production change by granulous cells, which is reflected in these hormones ratio. Progesterone concentration increases more rapidly in mean to late follicular phase, if compared with estradiol concentration. This is manifested in the increase of P/E ratio in mature preovulatory follicles. Higher estradiol levels and lower ones of testosterone in FF of those women, who were diagnosed pregnant following the IVF program, significantly determine the oocytes quality and their capability to further development [10].

There are the data that FF influences also such fundamental sperm functions as motility [5, 12] and acrosomal reaction [3, 11, 13, 16]. It is used therefore as an additive to the media of motile spermatozoa fraction isolation and gametes culturing within the programs for complementary reproductive techniques [1]. In terms of this there have been elaborated and improved the methods for a short- and long-term FF storage [8], using liquid nitrogen (-196°C), in particular. The data on steroid hormones content in the FF being frozen according to one-step cryopreservation method (groups II, III) and two-step one (groups IV, V), are presented in the table.

Steroid hormone content in FF did not significantly change in the samples, being frozen by the 1st and 2nd cryopreservation methods both in 1 month and following the long-term storage (6 months) under liquid nitrogen conditions (-196°C). This allows to consider the 1st cryopreservation method (direct immersion into liquid nitrogen) to be beneficial for FF as the simplest and quickest one.

For the FF obtained from preovulatory follicles the major characteristics are: a high concentration of estradiol and progesterone, low concentration of androgens, and for hormonal profile of the liquid from small and atretic follicles the most characteristic are noted to be a higher androgen content and lower amount of estradiol and progesterone [6], which are known to stimulate the follicles growth, while high

методы краткосрочного и длительного хранения ФЖ [8], в частности с использованием жидкого азота. Данные о содержании стероидных гормонов в ФЖ, замороженной по одноэтапному (II и III группы) и двухэтапному (IV и V группы) способам криоконсервирования, представлены в таблице.

Содержание стероидных гормонов в ФЖ достоверно не изменилось в образцах, замороженных по первому и второму способам криоконсервирования через 1 мес и после длительного (6 мес) хранения в условиях жидкого азота (-196°C). Это позволяет использовать первый способ криоконсервирования ФЖ (прямое погружение в жидкий азот) как более простой и быстрый.

Для ФЖ, полученной из преовуляторных фолликулов, характерны высокая концентрация эстрогенов и прогестерона и низкая концентрация андрогенов, а для гормонального профиля жидкости малых и атретических фолликулов – более высокое содержание андрогенов и низкое – эстрадиола и прогестерона [6], которые стимулируют рост фолликулов, в то время как высокие концентрации андрогенов ведут к атрезии и дегенерации последних [6]. В преовуляторной фазе нормального цикла ФЖ содержит большее количество эстрадиола и прогестерона по отношению к тестостерону в нормальных условиях [9]. Кроме того, она входит в состав среды, в которой происходит оплодотворение яйцеклетки спермием [7,15,18], поэтому оправдано ее применение в средах для выделения подвижной фракции спермиев в программах ВРТ, а также для культивирования гамет [1,2]. Наиболее оптимальным для этих целей является низкотемпературное хранение ФЖ [2].

Широкое применение низких температур для консервирования биологических объектов обуславливает необходимость глубокого изучения механизма, с одной стороны, их защитного и, с другой – повреждающего действия, изучения степени обратимости процессов, изыскания способов криозащиты. Глубокое охлаждение, вплоть до полного замерзания, часто не приводит к денатурации и значительно меньше нарушает конфигурацию системы биомолекул. Это происходит при идеальном соответствии структур макромолекул и кристаллической решетки льда, в результате чего эти лабильные цепи остаются как бы зафиксированными без существенных повреж-

Содержание стероидных гормонов в криоконсервированной ФЖ в зависимости от сроков хранения
Steroid hormones content in cryopreserved FF depending upon the storage terms

Параметры Parameters	I группа (натив) Group I (native)	II группа (1 мес) Group II (1 month)	III группа (6 мес) Group III (6 months)	IV группа (1 мес) Group IV (1 month)	V группа (6 мес) Group V (6 months)
Э,пг/мл E,pg/ml	405,1 ± 38,4	409 ± 51,2	408,2 ± 35,6	406,9 ± 23,1	404 ± 40,7
Т,пг/мл T,pg/ml	125 ± 26,1	124,7 ± 17,9	123,3 ± 21,3	125,2 ± 15,2	125,0 ± 18,7
П,пг/мл P,pg/ml	135650 ± 19,7	123745 ± 21,4	129102 ± 43,2	134097 ± 39,97	131085 ± 34,4
Э/Т E/T	3,24	3,28	3,31	3,25	3,23
П/Т P/T	1085,2	992,34	1047,06	1071,92	1048,68
П/Э P/E	334,94	302,56	316,27	329,48	324,47

concentrations of androgens cause the atresia and degeneration of the latter [6]. In preovulatory phase of normal cycle FF contains a large amount of estradiol and progesterone in respect of testosterone under normal conditions [9]. In addition, it is comprised by the medium where the oocyte fertilization by spermatozoa occurs [7, 15, 18], therefore its application was shown to be justified in the media for motile spermatozoa fraction isolation in ART (assisting reproductive technologies) programs, as well as for gametes culturing [1, 2]. Low temperature storage of FF was proved optimum for these aims [2].

Wide application of low temperatures for biological objects cryopreservation proves the need for profound studying the mechanism, on one hand, of their protective effect, and on another hand, of the damaging effect, studying the degree of the processes reversibility, finding out the cryoprotection ways. Deep cooling, up to the entire freezing often does not lead to denaturation and impaire the configuration of biomacromolecules system in a significantly lesser extent. This occurs at ideal matching of macromolecules structures and ice crystal grid, as a result of which these labile bonds remain likely to be fixed with no considerable damages. Native macromolecules (complex proteins, nucleoproteids) included in an ice crystal grid, are found to be undamaged as a result of their colloid state, which permits significant spatial translocations and deformations in an ice structure. Investigations directed to working-out the methods of biological objects storage under low temperatures, unfold the new perspectives in the development of biology and medicine.

Conclusions

As a result, mature FF of human oocyte is characterized by a low androgen level and high

дений. Нативные макромолекулы (сложные белки, нуклеопротеиды), включенные в кристаллическую решетку льда, не повреждаются в результате их коллоидного состояния, которое допускает значительные пространственные транслокации и деформации в ледяной структуре. Исследования, направленные на разработку методов хранения биологических образцов при низких температурах, открывают новые перспективы в развитии биологии и медицины.

Выводы

Таким образом, зрелая ФЖ фолликулов яичника человека характеризуется низким уровнем андрогенов и высокой концентрацией прогестерона и эстрадиола. Криоконсервирование ФЖ по одно- и двухэтапному режимам замораживания не влияет на содержание в ней стероидных гормонов. Концентрация стероидных гормонов остается стабильной в криоконсервированной ФЖ в течение 6 мес хранения.

Литература

1. Геродес А.Г., Петрушко М.П., Пиняев В.И. Использование нативной и криоконсервированной фолликулярной жидкости человека в методиках выделения активно-подвижной фракции спермиев *in vitro* // Актуальные вопросы репродуктологии и криомедицины: Сб. научных трудов.– Харьков, 1998.– С. 138-141.
2. Геродес Г.Г. Підвищення фертильності сперми з використанням нативної та збереженої при низьких температурах фолікулярної рідини людини // Автореф...дис. канд.мед.наук.– Харків, 1999.– 19 с.
3. Briggiler C.I., Calvo L., Lancuba S., et al. The acrosome reaction response assay: a new way to identify patients in whom pentoxifylline would improve the human follicular fluid-induced acrosome reaction // *Int. J. Androl.*– 1997.– Vol.2.– P. 96-103.
4. Erickson G.V., Malmstrom A., Caristedt I., Ulbjerg N. Human follicular fluid contains two large proteoglycans // *The extracellular matrix of the uterus, cervix and fetal membranes: synthesis, degradation and hormonal regulation.*– Ithaca (NY): Perinatology Press, 1991.– P. 274-278.
5. Falcone L., Gianni S., Piffaretti-Yanez A., et al. Follicular fluid enhances sperm motility and velocity *in vitro* // *Fertil. Steril.*– 1991.– Vol.55, N3.– P. 619-623.
6. Fucuda M., Fucuda K., Andersen C.Y., Byskov A.G. Healthy and atretic follicles: vaginosonographic detection and follicular fluid hormone profiles // *Hum. Reprod.*– 1995.– Vol.10.– N7.– P. 1633-1637.
7. Hong C.Y., Chao H.T., Lee S.L., Wei Y.H. Modification of human sperm function by human follicular fluid: a review // *Int. J. Androl.*– 1993.– Vol.16, N2.– P. 93-96.
8. Huyser C., Fourie F.R., Levay P. Freeze-thaw of human follicular fluid: influence on the biochemical profile // *J. Assist. Reprod. Genet.*– 1993.– Vol.7.– P. 482-485.
9. Klein N.A., Battaglia D.E., Woodruff T.K., et al. Ovarian follicular concentrations of activin, follistatin, inhibin, insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II, IGF-binding protein-2 (IGFBP-2), IGFBP-3, and vascular endothelial growth factor in spontaneous menstrual cycles of normal women of advanced reproductive age // *J. Clin. Endocrinol. Metab.*– 2000.– Vol.85.– P. 4520-4525.

concentration of progesterone and estradiol. FF cryopreservation according to one- and two-step freezing regimens does not affect the content of steroid hormones in it. Steroid hormones concentration remains stable in cryopreserved FF for 6 months of storage.

References

1. Gerodes A.G., Petrushko M.P., Pinyayev V.I. Use of native and cryopreserved human follicular tissue in the methods for isolation of actively motile spermatozoa fraction *in vitro* // *Actual questions of reproductology and cryomedicine: Collection of Scientific papers.*– Kharkov, 1998.– P. 138-141.
2. Gerodes A.G. Increasing sperm fertility using native and stored under low temperatures human follicular fluid // Author's abstract for obtaining the candidate's degree (medicine).– Kharkiv, 1999.– 19 p.
3. Briggiler C.I., Calvo L., Lancuba S., et al. The acrosome reaction response assay: a new way to identify patients in whom pentoxifylline would improve the human follicular fluid-induced acrosome reaction // *Int. J. Androl.*– 1997.– Vol.2.– P. 96-103.
4. Erickson G.V., Malmstrom A., Caristedt I., Ulbjerg N. Human follicular fluid contains two large proteoglycans // *The extracellular matrix of the uterus, cervix and fetal membranes: synthesis, degradation and hormonal regulation.*– Ithaca (NY): Perinatology Press, 1991.– P. 274-278.
5. Falcone L., Gianni S., Piffaretti-Yanez A., et al. Follicular fluid enhances sperm motility and velocity *in vitro* // *Fertil. Steril.*– 1991.– Vol.55, N3.– P. 619-623.
6. Fucuda M., Fucuda K., Andersen C.Y., Byskov A.G. Healthy and atretic follicles: vaginosonographic detection and follicular fluid hormone profiles // *Hum. Reprod.*– 1995.– Vol.10.– N7.– P. 1633-1637.
7. Hong C.Y., Chao H.T., Lee S.L., Wei Y.H. Modification of human sperm function by human follicular fluid: a review // *Int. J. Androl.*– 1993.– Vol.16, N2.– P. 93-96.
8. Huyser C., Fourie F.R., Levay P. Freeze-thaw of human follicular fluid: influence on the biochemical profile // *J. Assist. Reprod. Genet.*– 1993.– Vol.7.– P. 482-485.
9. Klein N.A., Battaglia D.E., Woodruff T.K., et al. Ovarian follicular concentrations of activin, follistatin, inhibin, insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II, IGF-binding protein-2 (IGFBP-2), IGFBP-3, and vascular endothelial growth factor in spontaneous menstrual cycles of normal women of advanced reproductive age // *J. Clin. Endocrinol. Metab.*– 2000.– Vol.85.– P. 4520-4525.
10. Kreiner D., Liu H.-C., Veeck L., Rosenwaks Z. Follicular fluid estradiol and progesterone are markers of preovulatory oocyte quality // *Fertil. Steril.*– 1987.– Vol.48.– N6.– P. 991-994.
11. Kulin S., Bastiaans B.A., Hollanders H.M., et al. Human serum and follicular fluid stimulate hyperactivation of human spermatozoa after preincubation // *Fertil. Steril.*– 1994.– Vol.62.– N6.– P. 1234-1237.
12. Mbizvo M.T., Burkman L.J., Alexander N.J. Human follicular fluid stimulates hyperactivated motility in human sperm // *Fertil. Steril.*– 1990.– Vol.54, N4.– P. 708-712
13. Mortimer D., Camenzing A.R. The role of follicular fluid in inducing the acrosome reaction of human spermatozoa incubated *in vitro* // *Hum. Reprod.*– 1989.– Vol.4.– P. 169-173.
14. Nandedkar T.D., Parkar S.G., Iyer K.S., et al. Regulation of follicular maturation by human ovarian follicular fluid peptide // *Reprod. Fertil. Suppl.*– 1996.– Vol.50.– P. 95-104.
15. Revelli A., Soldati G., Stamm J. et al. Effect of volumetric mixtures of peritoneal and follicular fluid from the same woman on sperm motility and acrosomal reactivity *in vitro* // *Fertil. Steril.*– 1992.– Vol.57, N3.– P. 654-660.

10. Kreiner D., Liu H.-C., Veeck L., Rosenwaks Z. Follicular fluid estradiol and progesterone are markers of preovulatory oocyte quality // *Fertil. Steril.*– 1987.– Vol.48.– N6.– P. 991-994.
11. Kulin S., Bastiaans B.A., Hollanders H.M., et al. Human serum and follicular fluid stimulate hyperactivation of human spermatozoa after preincubation // *Fertil. Steril.*– 1994.– Vol.62.– N6.– P. 1234-1237.
12. Mbizvo M.T., Burkman L.J., Alexander N.J. Human follicular fluid stimulates hyperactivated motility in human sperm // *Fertil. Steril.*– 1990.– Vol.54, N4.– P. 708-712
13. Mortimer D., Camenzing A.R. The role of follicular fluid in inducing the acrosome reaction of human spermatozoa incubated in vitro // *Hum. Reprod.*– 1989.– Vol.4.– P. 169-173.
14. Nandedkar T.D., Parkar S.G., Iyer K.S., et al. Regulation of follicular maturation by human ovarian follicular fluid peptide // *Reprod. Fertil. Suppl.*– 1996.– Vol.50.– P. 95-104.
15. Revelli A., Soldati G., Stamm J. et al. Effect of volumetric mixtures of peritoneal and follicular fluid from the same woman on sperm motility and acrosomal reactivity *in vitro* // *Fertil. Steril.*– 1992.– Vol.57, N3.– P. 654–660.
16. Rufas O., Gilman A., Fisch B., Shalgi R. Spontaneous and follicular fluid-induced acrosome reaction in sperm samples from in vitro fertilizing and nonfertilizing normozoospermic patients // *J. Assist. Reprod. Genet.*– 1998.– Vol.15, N2.– P. 84-89.
17. Van Dessel H.J., Schipper I., Pache T.D., et al. Normal human follicle development: an evaluation of correlations with oestradiol, androstenedione and progesterone levels in individual follicles // *Clin. Endocrinol.*– 1996.– Vol.44, N2.– P. 191-198.
18. Yao Y., Ho P., Yeung W.S. Effects of human follicular fluid on the capacitation and motility of human spermatozoa // *Fertil. Steril.*– 2000.– Vol.73, N4.– P. 680-686.

Accepted in 20.01.2004

Поступила 20.01.2004