

На правах рукописи

ЯМАНОВА

Марина Викторовна

**МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПАТОЛОГИИ
ИМПЛАНТАЦИИ ПРИ ЭНДОКРИННОМ БЕСПЛОДИИ**

14.00.16 – патологическая физиология

А в т о р е ф е р а т

диссертации на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Томск - 2004

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Проблема регуляции рождаемости и воспроизводства здорового потомства из года в год становится все более острой в связи с ухудшением демографической ситуации в стране. В России частота бесплодных браков составляет 12 – 15 %, при этом около 40 % случаев приходится на женское бесплодие [Кулаков В.И., 1999; Назаренко Т.А., 1999].

Среди причин женского эндокринного бесплодия лидируют гиперандрогения неопухолевого генеза и функциональная гиперпролактинемия [Овсянникова Т.В., 1998; Марова Е.И. и др., 2000]. Несмотря на существующие достижения в восстановлении репродуктивной функции женщин, страдающих эндокринным бесплодием, эффект проведенной терапии часто оказывается неполным или временным. Основной причиной этого является недостаточная изученность патогенетических механизмов, лежащих в основе нарушения фолликуло- и гаметогенеза, раннего эмбриогенеза, nidации и имплантации бластоцисты при этих патологических состояниях.

Принципиально новым этапом в решении проблемы преодоления бесплодия явилось внедрение в клиническую практику метода ЭКО [Здановский В.М. и др., 1996; Кулаков В.И., Леонов Б. В. 1999; Корсак В.С., 1999]. Применение программы ЭКО предоставило возможность прижизненного наблюдения за гаметам и предимплантационными эмбрионами человека [Воробьева О.А., 2001], что стало модельной системой для изучения ранее неизвестных аспектов патогенеза женского бесплодия.

Исследования последних лет в области молекулярно-клеточных механизмов регуляции процесса имплантации привели к пониманию того, что наступление имплантации бластоцисты определяется скоординированным взаимодействием сигнальных и эффекторных молекул, синтезируемых эмбрионом и материнским эндометрием. Дизрегуляция продукции и секреции молекулярных сигналов, инициируемых неполноценным эмбрионом или структурно и функционально неподготовленным эндометрием, приводит к невозможности наступления имплантации [Tabibzadeh S., 1994; Pellicer A. et al., 1998].

По мнению ряда авторов, получение качественных эмбрионов в циклах ЭКО является основным фактором, определяющим наступление имплантации [Plachot M. et al., 1989, Фанченко Н.Д. и др., 2000]. Однако наступление беременности возможно в результате переноса фрагментированных эмбрионов [Грищенко В.И. и др., 2000]. Общеизвестным является факт высокой распространенности морфологических нарушений у эмбрионов, получаемых в программе ЭКО [Кулаков В.И., Леонов Б.В. 1999]. Предполагают, что стимуляция овуляции способствует сохранению жизнеспособности фолликулов с уже начавшейся атрезией [Никитин А.И., 1996], что объясняет получение в циклах ЭКО функционально неполноценных гамет и низкокачественных эмбрионов [Hardy K. et al., 1993]. Вместе с тем механизмы, приводящие к элиминации женских гамет и эмбрионов на ранних этапах эмбриогенеза, не ясны.

Роль эндометрия в процессе имплантации часто недооценивается. Обсуждению этого вопроса уделяется ограниченное время даже на европейских форумах репродуктологов [Abstr. 19th A.M. ESHRE, Madrid (Spain), 2003]. Установлено, что структурная и функциональная зрелость эндометрия формируется в условиях динамических колебаний уровней эстрогенов и прогестерона [Гузов И. И., 1999], регулирующих экспрессию рецепторов стероидных гормонов [Бассалык И. В., 1987; Левченко Р.Г. и др., 1989]. Тканевые эффекты гормонов, факторов роста и цитокинов определяют восприимчивость эндометрия к имплантирующейся бластоцисте [Giudice L.C., 1999], опосредуют изменения состава субпопуляций эндометриальных лейкоцитов, формирующих локальное гуморальное микроокружение эмбриона во время "окна имплантации" [Klentzeris L.D., 1994; Гадиева Ф.Г., 2001]. Определена роль апоптоза специализированных клеток эндометрия и лейкоцитов в подготовке эндометрия к имплантации [Yamashita H. et al., 1999].

Вместе с тем, женское эндокринное бесплодие часто ассоциировано с дисрегуляцией экспрессии биологически активных веществ, формирующих предимплантационный статус эндометрия [Pellicer A. et al., 2001]. Малочисленность и неоднозначность сведений о регуляции имплантационного потенциала эндометрия, определяемой существованием эндокринного бесплодия, указывают на необходимость изучения этого аспекта проблемы.

В связи с вышеизложенным возникает необходимость комплексного изучения патогенетических механизмов, лежащих в основе нарушения имплантации при эндокринном бесплодии. Это позволит получить сведения и представления, определяющие новые подходы к решению проблемы диагностики и лечения репродуктивных расстройств.

Цель исследования: оценить состояние внутриклеточных и внеклеточных систем регуляции фолликулогенеза, оогенеза, эмбриогенеза и циклических изменений эндометрия у женщин с эндокринным бесплодием, обусловленным функциональной гиперпролактинемией или гиперандрогенией неопухолевого генеза.

Для реализации поставленной цели были определены **задачи**:

1. Охарактеризовать особенности функционального статуса гипофизарно-яичниковой системы и оценить метаболический профиль пациенток с гиперандрогенией и гиперпролактинемией.

2. Исследовать молекулярные механизмы изменений индукции и реализации апоптоза гранулезных клеток фолликулов в зависимости от параметров стероидогенеза.

3. Изучить состав фолликулярного микроокружения ооцитов и определить характер его влияния на показатели фертилизации ооцитов.

4. Проанализировать взаимосвязь изменений предимплантационного эмбриогенеза *in vitro* с патогенетическим вариантом эндокринного бесплодия, возрастом женщины и длительностью бесплодного периода.

5. Оценить состояние внутриклеточных и внеклеточных путей регуляции апоптоза в эндометрии и сопоставить их с выраженностью морфологических изменений эндометрия.

6. Изучить состояние клеточного звена локального иммунитета эндометрия при эндокринном бесплодии и выявить роль иммунной дисрегуляции в нарушении имплантации.

7. Выявить общие закономерности и механизмы нарушения имплантации эмбриона при эндокринном бесплодии.

Научная новизна. В работе впервые проведено систематическое комплексное исследование молекулярно-клеточных механизмов регуляции фолликулогенеза, гаметогенеза, эмбриогенеза и иммуноморфологических особенностей эндометрия при женском эндокринном бесплодии с использованием в качестве модели протокола ЭКО.

Доказано, что формирование патологического стероидогенеза у женщин с ановуляторным бесплодием связано с изменением метаболического статуса, нарушениями углеводного и липидного обменов, обусловленных патологической секрецией инсулина и лептина. Установлено, что основными патофизиологическими механизмами, приводящими к функциональной неполноценности женских гамет при эндокринном бесплодии, являются активация апоптоза гранулезных клеток фолликулов, изменение соотношений про- и антиапоптотических факторов в составе фолликулярной жидкости и нарушенный ангиогенез, обусловленный изменениями уровней основных ангиогенных факторов роста СЭФР и оФРФ.

Выявлено, что для гиперандрогенных состояний характерны необратимые процессы деструкции гранулезных клеток фолликулов и бластомеров эмбрионов, что приводит к снижению способности эмбрионов к формированию бластоцист в культуре.

Определено, что продолжительность бесплодного периода и возраст женщины являются дополнительными патологическими факторами, влияющими на наступление имплантации. При этом временной фактор длительности бесплодия ухудшает показатели предимплантационного эмбриогенеза, а влияние возрастного аспекта направлено на фолликулогенез и оогенез.

Обнаружено, что нарушение экспрессии рецепторов яичниковых стероидов и возникающая локальная гиперэстрогения вызывают снижение реализации апоптоза в эндометрии. Установлено, что недостаточность тканевых эффектов прогестерона определяет нарастание цитотоксического индекса эндометриальных лейкоцитов. Редукция апоптоза и количественные изменения субпопуляций цитотоксических эндометриальных лейкоцитов приводят к нарушению имплантации при эндокринном бесплодии.

Доказано, что определяющим фактором в патогенезе нарушения имплантации является состояние эндометрия, а не морфологические характеристики эмбриона.

Экспериментально обосновано, что патологический процесс в эндометрии при эндокринном бесплодии относится к дизрегуляторной патологии.

Теоретическая и практическая значимость работы заключается в выявлении ранее неизвестных закономерностей и механизмов нарушения имплантации эмбриона при эндокринном бесплодии.

Изучены факторы риска, приводящие к нарушению фертилизации ооцитов и характера предимплантационного развития человеческих эмбрионов. Показана целесообразность оценки и коррекции андрогенного статуса пациентки перед вступлением в лечебный цикл, поскольку андрогены определяют размер получаемого пула фолликулов и качество ооцитов при стимуляции овуляции в программе ЭКО. Продемонстрирована необходимость нормализации функционального состояния яичников на подготовительном этапе, что позволит улучшить исходы лечения бесплодия и оптимизировать проведение ЭКО. Патогенетически обоснованы рекомендации к более раннему направлению женщин с эндокринным бесплодием на лечение с использованием метода ЭКО с обязательным применением терапевтических мероприятий, направленных на коррекцию метаболического статуса.

Показана целесообразность оценки выраженности морфофункциональных изменений эндометрия с последующей коррекцией выявленных изменений, поскольку рутинное ультразвуковое исследование М-эха на подготовительном этапе не дает возможности оценить предимплантационный статус эндометрия и степень его готовности к имплантации бластоцисты.

Предложенные схемы патогенеза дают возможность прогнозировать исходы ЭКО в зависимости от полученных клинико-лабораторных показателей и применять патогенетически обоснованные методы коррекции. В рамках работы разработан «Способ лечения женщин с эндокринным бесплодием, обусловленным гиперандрогенией и гиперпролактинемией, препаратами α -интерферона» (Справка о приоритете 01№2003126845/14, 2003 г.)

Апробация диссертационного материала. Материалы диссертации доложены на 18-м международном конгрессе по клинической химии и лабораторной медицине (Киото, Япония, 2002 г.), 19-й ежегодной конференции европейского общества по репродукции человека и эмбриологии (Мадрид, Испания, 2003 г.), 5-й Российской конференции «Бесплодие: нерешенные проблемы» (Саратов, 2001 г.), научной конференции с международным участием «Эндокринная регуляция физиологических функций в норме и патологии» (Новосибирск, 2002 г.), Всероссийском научно-практическом семинаре «Современные подходы к лечению бесплодия» (Екатеринбург, 2002 г.), Красноярских краевых конференциях акушеров – гинекологов (1999, 2001, 2002 г.г.), Красноярской краевой конференции врачей – лаборантов (2003 г.), заседании краевого общества эндокринологов (март, 2002 г.).

Результаты проведенного исследования внедрены в практическую работу Красноярского центра Репродуктивной медицины. Результаты исследования использовались для проведения лекций и практических занятий для студентов, аспирантов и ординаторов на кафедрах патофизиологии, биохимии с курсом медицинской химии, акушерства и гинекологии лечебного факультета Красноярской государственной медицинской академии.

Работа обсуждена на заседании апробационной комиссии Сибирского государственного медицинского университета 2 марта 2004 г.

Результаты исследования обобщены в виде 31 научной работы, из них 9 - в центральной печати и 1 - в международной печати.

Положения, выносимые на защиту:

1. Формирование патологического стероидогенеза у женщин с ановуляторным бесплодием определяется измененным метаболическим статусом, развивающимся в условиях патологической секреции инсулина и лептина, менее выраженной у женщин с гиперпролактинемией.
2. Андрогенный статус женщин с эндокринным бесплодием влияет на размер когорты фолликулов, вступающих в рост при овариальной стимуляции.

Выраженность ответа яичников на стимуляцию овуляции определяет количество фолликулов, получаемых в состоянии атрезии.

3. Состояние гранулезных клеток фолликулов определяет состав фолликулярного микроокружения и функциональный статус ооцитов, которые при гиперандрогении и гиперпролактинемии развиваются в условиях «андрогенного» микроокружения и нарушенного ангиогенеза. При гиперандрогении выявлены более выраженные изменения состава фолликулярной жидкости и фертилизационной способности ооцитов.

4. Замедление темпов дробления эмбрионов характерно для обоих вариантов эндокринного бесплодия. При гиперандрогении превалирует тяжелая степень фрагментации бластомеров, определяющая снижение способности эмбрионов к формированию бластоцист в культуре. На формирование бластоцист оказывают влияние длительность бесплодия и возраст женщины.

5. Для гиперандрогении и гиперпролактинемии характерно формирование локальной гиперэстрогении и редукция процессов апоптоза в секреторном эндометрии, что определяет нарушение процесса имплантации при эндокринном бесплодии.

6. Изменение секреции овариальных стероидов является пусковым механизмом гормонально-зависимого накопления в эндометрии лимфоцитов с киллерной активностью, что препятствует наступлению имплантации.

7. Выраженность патологических изменений эндометрия при исследованных вариантах эндокринного бесплодия является решающим фактором, определяющим вероятность наступления имплантации.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования; пяти глав собственных исследований; обсуждения данных, полученных в ходе работы; выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа изложена на 268 машинописных страницах, содержит 17 таблиц, 52 рисунка. Библиография включает 438 литературных источников, в том числе 97 отечественных и 341 зарубежных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования. В работе проанализированы показатели периферической крови; 3 340 ооцитов; гранулезные клетки и фолликулярная жидкость 72 доминантных фолликулов, полученных в программе ЭКО; 2 335 эмбрионов, находящихся на предимплантационных стадиях развития; 120 биоптатов эндометрия.

Ооциты и эмбрионы были получены от 328 пациенток репродуктивного возраста с нарушениями менструальной и репродуктивной функции на фоне хронической ановуляции и ГА (n = 80) или ГП (n = 90) и женщин с регулярным двухфазным менструальным циклом и ТПФ, которые составили контрольную группу (n = 158). Образцы эндометрия были получены у пациенток с ГП (n = 18), ГА (n = 24) и женщин контрольной группы (n = 18).

Возраст женщин варьировал от 20 до 44 лет и в среднем составил $32,7 \pm 1,5$ года. Длительность предшествующего бесплодия у обследованных супружеских пар составила 3 - 18 лет и в среднем - $7,6 \pm 1,5$ года. У половых партнеров пациенток при двукратном исследовании эякулята была подтверждена нормоспермия.

Для выполнения исследований по изучению влияния продолжительности бесплодного периода и возраста женщины на характер предимплантационного эмбриогенеза были сформированы группы женщин: с продолжительностью бесплодия менее 5 лет (в среднем $3,8 \pm 0,5$ лет; n = 120); 6 – 10 лет (в среднем $7,6 \pm 0,6$ лет; n = 110) и более 10 лет (в среднем $12,3 \pm 1,2$ лет; n = 98). Выделены возрастные группы женщин: менее 30 лет (в среднем $28,1 \pm 0,6$ года; n = 92); 30 – 34 года (в среднем $32,6 \pm 0,4$ года; n = 114), 35 – 39 лет (в среднем $37,5 \pm 0,5$ года; n = 68) и 40 и более лет (в среднем $43,4 \pm 0,7$ года; n = 54). В этих разделах работы в качестве контрольных были приняты показатели пациенток с ТПФ, ГА и ГП, при длительности бесплодия в анамнезе менее 5 лет для каждой группы обследованных, соответственно.

При оценке влияния метаболических нарушений на формирование патологического стероидогенеза проводили анализ клинико-лабораторных показателей у женщин с эндокринным бесплодием в зависимости от наличия или

отсутствия у них ожирения. Для диагностики типа ожирения применяли критерии, описанные [Перова Н.В. и др., 2001]. Преобладающим типом ожирения у пациенток с ГП оказался гиноидный тип (65% случаев), у пациенток с ГА – андронидный тип ожирения (87,5% случаев). Для анализа отобрали 2 группы женщин: с андронидным ожирением ($OT/OB > 0,85$; ИМТ $34,4 \pm 1,0$ кг/м²; n = 16) и с гиноидным ожирением ($OT/OB < 0,85$; ИМТ $32,8 \pm 0,8$ кг/м²; n = 16). В качестве дополнительной контрольной группы в этом разделе работы были обследованы 20 женщин без нарушений менструальной функции (средний возраст $31,2 \pm 2,3$ года), с нормальной массой тела (ИМТ $21,6 \pm 0,34$ кг/м²; $OT/OB 0,71 \pm 0,01$).

Для выявления причины бесплодия пациентки подвергались стандартному клиничко-лабораторному обследованию, включающему общеклиническое и гинекологическое обследование, УЗИ органов малого таза, гормональные методы функциональной диагностики, эндоскопические методы (лапароскопия и гистероскопия) и посткоитальный тест.

Стимуляцию овуляции в лечебных циклах ЭКО осуществляли по стандартному длинному или короткому протоколу, в зависимости от возраста пациентки и состояния яичников, с использованием препаратов а-ГнРГ (Декапептил-дейли) в сочетании с человеческим менопаузальным гонадотропином (Хумегон). Во всех группах сравнения у пациенток одного возраста отсутствовали достоверные различия в суммарной дозе использованных для стимуляции препаратов. В качестве индуктора овуляции использовали Прегнил.

Образцы фолликулярной жидкости и гранулезные клетки получали во время пункции доминантных фолликулов (диаметр 18 – 28 мм) стимулированных яичников пациенток.

Культивирование ооцитов и эмбрионов проводили по стандартной методике с использованием сред и реактивов "Medi-Cult" (Дания). Характер оплодотворения ооцитов и морфологию полученных зигот оценивали через 16 часов от момента инсеминации. Морфологическую оценку эмбрионов с определением количества и размеров бластомеров, характера дробления, наличия фрагментации и степени ее выраженности (< 30 %, 30 – 50 %, > 50 %) выполняли через 24, 48 и 72 часа от момента забора яйцеклеток и перед ПЭ в полость матки.

Через 72 часа после аспирации ооцитов в матку переносили 2 – 4 эмбриона. Культивирование эмбрионов, оставшихся после выполненного ПЭ, продолжали еще 48 – 72 часа до формирования бластоцист. Данный показатель рассчитывали как отношение эмбрионов, сформировавших бластоцисты в культуре, к общему числу полученных в данной группе эмбрионов (%).

Частоту наступления имплантации в группе рассчитывали как отношение состоявшихся имплантаций к общему числу выполненных ПЭ (%). *Частоту наступления беременности* рассчитывали как количество случаев беременностей, подтвержденных при УЗИ, к общему числу выполненных ПЭ (%).

Для поддержки лютеиновой фазы менструального цикла, всем пациенткам, начиная со дня, предшествующего дню ПЭ, назначали натуральные или синтетические гестагены (прогестерон, дюфастон или утрожестан) в индивидуальной дозе.

Определение содержания гормонов и факторов роста проводили в сыворотке периферической крови и фолликулярной жидкости методами радиоиммунологического и иммуноферментного анализа, для чего определяли содержание ЛГ, ФСГ, пролактина, тиреотропного гормона, ДЭАС, С-пептида, тестостерона, кортизола, эстрадиола, инсулина и прогестерона наборами фирмы Immunotech (Чехия). Определение содержания ПССГ проводили при помощи наборов фирмы BSM Diagnostics (США). Оценку уровней лептина, андростендиона, ИФР-1 производили наборами фирмы “DSL” (США). Определение содержания ЭФР, СЭФР осуществляли наборами фирмы Cytimmune (США), оФРФ – наборами реагентов фирмы R&D (Великобритания), растворимой формы FasR – наборами фирмы Bender MedSystems (Австрия).

Индексы свободных андрогенов и свободных эстрогенов рассчитывали как отношение уровней тестостерона или эстрадиола к уровню ПССГ, выраженное в %. Для оценки характера фолликулярного микроокружения ооцитов рассчитывали отношения E2/T и ИФР-1/ЭФР [Weestergaad L. et al., 1990; Biling H. et al., 1996].

Функциональное состояние репродуктивной системы по уровню гормонов оценивали на 5 – 7 и 20 – 22 дни менструального цикла. За норму принимали

нормативные показатели фирм-изготовителей. У пациенток, которым проводили аспирационную биопсию ткани эндометрия, образцы венозной крови для исследования содержания гормонов забирались непосредственно перед выполнением кюретажа.

Состояние спектра липопротеидов сыворотки крови оценивали стандартными наборами реагентов на анализаторе «Hitachi» (Япония) по содержанию общего Хс; ТГ; Хс ЛПНП; Хс ЛПВП и коэффициенту атерогенности ЛПНП/ЛПВП. Кровь для исследования забирали спустя 12 и более часов после последнего приема пищи. За норму принимали нормативные показатели фирм-изготовителей.

С целью диагностики нарушений углеводного обмена проводили стандартный пероральный ГТТ. Уровни глюкозы определяли в цельной капиллярной крови натощак, через 1 и 2 часа после приема 75 г глюкозы. За нормативные показатели принимали данные ВОЗ [Комитет экспертов ВОЗ по сахарному диабету, 1981].

Вакуум-кюретаж эндометрия осуществляли в амбулаторных условиях на 6 – 9 и 20 – 22 дни менструального цикла с использованием атравматических аспирационных кюреток Pipell (С.С.Д., Франция). Из фиксированных парафинизированных образцов тканей эндометрия готовили срезы, депарафинировали, окрашивали гематоксилином-эозином или по Ван-Гизону, после чего проводили гистологическое исследование.

Иммуногистохимическое исследование с целью идентификации зрелых Т-лимфоцитов (CD3⁺), цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8⁺), БГЛ (CD56⁺) и макрофагов (CD68⁺), определения экспрессии FasL, R_{прог}, RE и рецепторов андрогенов проводили на срезах образцов эндометрия с предварительной демаскировкой антигена в ткани [Эллиниди В.Н. и др., 2002]. Иммуногистохимические исследования выполняли с применением авидин – биотин - пероксидазного метода и МКА фирмы “Novocastra” (Великобритания) (клоны RTU-CD3-PS1; RTU-CD8-295; RTU-CD56-1B6; RTU-CD68; NCL-FAS-L; RTU-PGR-312; RTU-ER-6F11 и RTU-AR-441, соответственно). Реакцию проявляли

диаминобензидином (Becton Dickinson, Pharmingen Biosciences, США). Результат реакции идентифицировали по коричневому окрашиванию продукта.

Полученные результаты оценивали как среднее количество клеток в трех полях зрения, экспрессирующих данный антиген. Для оценки содержания рецепторов стероидных гормонов в клетках стромы и железистого эпителия функционального слоя эндометрия применяли систему подсчета H score [Mertens H.J. et al., 2002].

Из анализа исключались образцы эндометрия с явлениями воспалительной реакции и в случае несоответствия клиническому диагнозу. В качестве положительного контроля в каждом случае применяли образцы тканей, рекомендованные фирмой-производителем.

Цитотоксический индекс эндометриальных лейкоцитов рассчитывали как отношение $CD3^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитов к $CD56^+$ БГЛ эндометрия [Arck P.C. et al., 2000].

Детекция апоптоза клеток эндометрия осуществлялась на предварительно обработанных протеиназой К депарафинизированных срезах эндометрия с использованием набора MEBSTAIN Apoptosis Kit Direct, (Immunotech, Франция) согласно протоколу фирмы-производителя. При микроскопии регистрировали относительное количество (на единицу площади среза) TUNEL - положительных клеток во всех слоях эндометрия.

Определение экспрессии фосфатидилсерина на поверхности клеточной мембраны гранулезных клеток фолликулов осуществлялось с использованием набора Annexin V Apoptosis Detection Kit (Caltag Laboratories, США) согласно протоколу фирмы-производителя. Для визуализации увеличения проницаемости цитоплазматической мембраны, характерного для вторичного некроза, применяли окраску гранулезных клеток фолликулов ПИ [McClosky T.W. et al., 1994].

Все исследования были выполнены в соответствии с требованиями биомедицинской этики, с уведомлением пациентов.

Для определения достоверности различий сопоставляемых величин использовали непараметрический критерий Манна – Уитни, t - критерий Стьюдента, критерий Z для анализа качественных признаков и критерий Стьюдента с поправкой Бонферони для множественных сравнений.

Корреляционный анализ проводили с вычислением коэффициента корреляции (r) Пирсона и установлением значимости различий по критерию t .

Обследование и лечение пациенток проводили в Центре по лечению бесплодия (совместно с И.И.Евдоченко) и Центре репродуктивной медицины (г. Красноярск) в 1999 – 2002 г.г. Иммуногистохимические исследования выполнялись в лаборатории иммуногистохимии ВЦЭРМ МЧС России (г. Санкт-Петербург) при непосредственном участии и консультативной помощи с.н.с. к.м.н. В. Н. Эллиниди. Иммуноцитохимическая детекция апоптоза была выполнена в Межкафедральной научно-исследовательской биохимической лаборатории КрасГМА (совместно с Е.А.Пожиленковой и С.В.Михуткиной).

Автор приносит глубокую благодарность руководству и сотрудникам отделений и лабораторий названных учреждений и лично директору Центра репродуктивной медицины г. Красноярска к.б.н. А. В. Светлакову за содействие в отборе пациентов и предоставление материала для исследования, а также проф. А.Б. Салминой за оказанную консультативную помощь.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение механизмов формирования патологического стероидогенеза

ГА и ГП относятся к разным клинико-патогенетическим вариантам синдрома хронической ановуляции. Патогенез хронической ановуляции при гиперандрогенных состояниях в настоящее время связывают с наличием метаболического синдрома [Reaven G.M., 1995]. Исходя из этого, мы исследовали роль метаболических нарушений в формировании патологического стероидогенеза, характерного для ГП (Табл.1).

Показатели пациенток группы ГА характеризовались повышением отношения ЛГ/ФСГ, средних уровней ЛГ, андростендиона, тестостерона, ДЭАС и пониженным эстрадиолом. У женщин с ГП выявлено повышенное содержание пролактина и андростендиона. При анализе параметров гормонального гомеостаза у женщин с сопутствующим ожирением обнаружены качественно однотипные нарушения, более выраженные при андроидном ожирении. Выявленные в группах

с ожирением гормональные изменения наблюдались на фоне достоверно сниженных концентраций ПССГ как относительно контрольных показателей, так и по сравнению с данными больных без ожирения. Снижение содержания ПССГ приводило к увеличению пула циркулирующих свободных стероидов, регистрируемого по нарастанию САИ и СЭИ. Уменьшение выработки ПССГ считается прямым маркером существующей ГИ и ИР [Nestler J.E., 1993, 1997; Legro R., 1997].

Наличие ГИ, о которой судили по отношению базальных уровней инсулин/глюкоза, было характерно для 62,5 % пациенток с ГА и андронидным ожирением и только для 18,7% больных с ГП и гинеонидным ожирением (Табл.2). О снижении биологического эффекта инсулина на метаболизм глюкозы, а, следовательно, о наличии ИР, свидетельствовали гликемические ответы пациенток группы ГА, но не группы ГП (Табл.3).

Помимо гипергликемии, существование ИР проявляется в нарушении способности инсулина к регуляции липидного обмена, о чем судили по липидному составу сыворотки крови у пациенток с эндокринным бесплодием и сопутствующим ожирением. У 62,5 % пациенток с ГП и гинеонидным ожирением выявлены нормальные уровни общего Хс, Хс ЛПНП и Хс ЛПВП, что в сочетании с гипертриглицеридемией соответствует IV типу гиперлипидемии по классификации ВОЗ. У 81 % пациенток с ГА и андронидным ожирением обнаружены повышенные уровни общего Хс, Хс ЛПНП и ТГ, что подразумевает наличие IIб типа гиперлипидемии.

В результате проведенных исследований установлено, что наличие ГИ и патологические изменения стероидогенеза в случае ГП не связаны с существованием ИР, более характерной для ГА и андронидного ожирения.

Гиперлептинемия, обнаруженная нами у всех пациенток с эндокринным бесплодием, была наиболее выражена при ГА и андронидном ожирении. Нами зарегистрированы достоверные отличия уровней лептина в зависимости от типа ожирения ($p < 0,05$) (Табл 2).

ГИ положительно коррелировала с содержанием тестостерона и свободных андрогенов и отрицательно – с уровнями ПССГ в сыворотке крови, что соответствует литературным данным [Чернуха Г.Е., 2001].

Особенности гормонального статуса пациенток при изучаемых клинико-патогенетических вариантах синдрома хронической ановуляции, $M \pm m$

Показатель	Контроль (n=158)	Гиперандрогения (n=80)	Гиперандрогения + андройдное ожирение (n=16)	Гиперпролактинемия (n=90)	Гиперпролактинемия + гиноидное ожирение (n=16)
1	2	3	4	5	6
ИМТ, кг/м ²	23,6 ± 0,34	26,8 ± 3,1*	34,4 ± 1,0*§	23,5 ± 2,6	32,8 ± 0,8*
ОТ/ОБ	0,71 ± 0,01	0,82 ± 0,05*	0,87 ± 0,01*#	0,79 ± 0,05	0,77 ± 0,01*
ЛГ, мМЕ/мл	3,2±0,7	11,5±1,7*	12,4 ± 1,5*#	3,8 ± 1,1	3,5 ± 0,6
ЛГ/ФСГ	0,7±0,06	2,12±0,15*	2,5 ± 0,1*§ #	0,51±0,09	1,7 ± 0,3*§
Пролактин, мМЕ/мл	305,1±18,9	332,8±33,8	318,3 ± 73,6#	747,3±61,1*	680,2 ± 133,9*
Е2, пмоль/л	163±17,9	91,7±18,5*	67,9 ± 6,8*	145,1±24,5	93,7 ± 18,2*
Т, нмоль/л	1,3±0,1	2,3 ± 0,3*	3,4 ± 0,3*§ #	1,4 ± 0,2	1,6 ± 0,3*
А, нмоль/л	2,4 ± 0,1	4,2 ± 0,2*	8,3 ± 0,4*§	3,7 ± 0,2*	9,3 ± 0,5*§
ДЭАС, мкг/100мл	172,2±18,9	337,6±22,4*	327,3 ± 36,3*	211,7±19,4	309,4 ± 37,8*§
Кортизол, нмоль/л	220 ± 25,1	325,2 ± 54,8	496,8± 72,2*	280,3 ± 38,4	466,1± 51,2*§
Прог, нмоль/л	65,0±6,4	18,4±3,5*	6,5 ± 1,5*§	20,3±4,2*	8,3 ± 2,2*§
ПССГ, нмоль/л	97,8±13,2	33,1±8,1*	17,8 ± 3,8*§#	75,6±16,2	45,8 ± 6,1*§
САИ, %	1,3±0,2	5,3±0,5*	12,6 ± 3,5*§#	1,5 ± 0,3	3,8 ± 1,1*§
СЭИ, %	0,17 ± 0,04	0,37 ± 0,1*	0,56 ± 0,2*	0,29 ± 0,1*	0,51 ± 0,2*

Примечание: Представлены данные гормонального обследования, проведенного в лютеиновую фазу менструального цикла.

Здесь и в табл.2 * - достоверные различия с контрольной группой ($p < 0,05$);

§ - достоверные различия с соответствующей группой больных без ожирения;

- достоверные различия между группами больных с ожирением

Показатели секреторной активности поджелудочной железы и уровни лептина у пациенток с эндокринным бесплодием, $M \pm m$

Показатель	Контроль (n=158)	Гиперандрогения (n=80)	Гиперандрогения + андройдное ожирение (n=16)	Гиперпролактинемия (n=90)	Гиперпролактинемия + гиноидное ожирение (n=16)
1	2	3	4	5	6
Инсулин, мкЕд/мл	$3,1 \pm 0,8$	$7,8 \pm 0,9^*$	$17,3 \pm 2,5^{* \#}$	$2,9 \pm 0,5$	$5,9 \pm 1,5^{* \#}$
С-пептид, нг/мл	$1,6 \pm 0,2$	$2,8 \pm 0,1^*$	$3,5 \pm 0,2^{* \#}$	$1,5 \pm 0,3$	$2,5 \pm 0,2^{* \#}$
Лептин, нг/мл	$8,7 \pm 0,1$	$27,4 \pm 4,6^*$	$45,9 \pm 3,8^{* \#}$	$16,9 \pm 0,1^*$	$33,1 \pm 2,5^{* \#}$
Инсулин (мкЕд/мл)/ глюкоза (ммоль/л)	$0,44 \pm 0,01$	Н.о.	$3,3 \pm 0,6^{* \#}$	Н.о.	$1,1 \pm 0,4^*$
Число пациенток с ГИ	0	Н.о.	10 (62,5 %)	Н.о.	3 (18,7 %)

Примечание: Н.о. - показатель не определялся

Гликемические ответы в ходе глюкозо-толерантного теста у обследованных пациенток с эндокринным бесплодием и сопутствующим ожирением, $M \pm m$

Показатель	Контроль (n=20)	Гиперандрогения + андройдное ожирение (n=16)	Гиперпролактинемия + гиноидное ожирение (n=16)
1	2	3	4
Гликемия, ммоль/л			
0 мин	$4,8 \pm 0,4$	$5,2 \pm 0,2$	$5,2 \pm 0,3$
60 мин	$5,4 \pm 0,1$	$8,4 \pm 1,0^{* \#}$	$5,8 \pm 0,4$
120 мин	$4,5 \pm 0,2$	$5,5 \pm 0,5^*$	$5,2 \pm 0,5$

Примечание: * - достоверные различия с контрольной группой ($p < 0,05$);
- достоверные различия между группами больных с ожирением.

Нами выявлена положительная взаимосвязь гиперлептинемии с содержанием тестостерона и С-пептида и отрицательная - с уровнями ПССГ, эстрадиола и прогестерона. Обнаруженная положительная зависимость между уровнями лептина и общего Хс, ТГ и Хс ЛПНП подтверждается данными литературы о регулирующем действии лептина на липидный обмен [Byrnes S.E., 1999] и объясняет наличие более выраженной патологии липидного обмена у больных с андронидным ожирением. В свою очередь, высокие уровни Хс, основного субстрата для яичникового стероидогенеза, положительно коррелировали с уровнями надпочечникового ДЭАС и тестостерона и отрицательно - с содержанием эстрадиола и прогестерона в сыворотке крови.

Результаты исследования взаимосвязей параметров гормонального и метаболического статусов пациенток позволяют прийти к заключению о том, что связанные с ГИ метаболические нарушения могут возникать под действием лептина. Вполне логичной представляется точка зрения о взаимосвязи манифестирующих в репродуктивном возрасте ГИ и гиперлептинемии, что, вероятно, является следствием генетически детерминированной патологии эндокринной системы.

Нами установлено, что нарушения углеводного и липидного обменов при эндокринном бесплодии тесно связаны с формированием патологического стероидогенеза. Меньшая выраженность метаболических и гормональных нарушений у женщин с ГП и андронидным ожирением может быть объяснена меньшей, по сравнению с группой женщин с ГА и андронидным ожирением, степенью выраженности патологической секреции инсулина и лептина.

Исследование особенностей фолликулогенеза и патофизиологических механизмов, приводящих к функциональной неполноценности женских гамет

Результаты исследования влияния патологического стероидогенеза на фолликулогенез и параметры фертилизации ооцитов в модельной системе ЭКО, свидетельствовали о более выраженном ответе яичников женщин с ГА на

стимуляцию овуляции. Число пунктированных фолликулов в группе женщин с ГА ($17,7 \pm 2,1$ фолликулов) превышало показатели контроля ($11,2 \pm 1,3$; $p < 0,05$). Количество полученных ооцитов в этой группе ($14,1 \pm 2,2$ ооцитов), также достоверно отличалось от показателей группы с ТПФ ($9,1 \pm 0,9$ ооцитов; $p < 0,05$). Показатели пациенток с ГП не отличались от параметров контрольной группы ($10,9 \pm 1,9$ фолликулов и $8,6 \pm 1,6$ ооцитов; $p > 0,05$ для обоих показателей).

Высокие дозы гонадотропинов, применяемые при овариальной стимуляции, позволяют получать синхронизированный пул фолликулов, во многом за счет подавления процессов физиологической атрезии [Gougeon A., 1996; Zech N., 1998]. Маркером начальных этапов развития атрезии является апоптоз гранулезных клеток фолликулов [Oosterhuis G.J., 1998]. При исследовании реализации апоптоза количество клеток, экспрессирующих фосфатидилсерин на внешней стороне плазматической мембраны, было повышено при ГП по сравнению с контролем ($p < 0,05$). При ГА было достоверно повышено количество гранулезных клеток, находящихся в состоянии вторичного некроза ($p < 0,05$) (Табл.4). При этом достаточно высокий уровень апоптоза и некроза был характерен для клеток, полученных из фолликулов женщин контрольной группы, что соответствует данным авторов, работающих с аналогичными режимами стимуляции овуляции [Homburg R., 1998].

В фолликулярной жидкости пунктированных доминантных фолликулов при обоих видах исследуемой патологии было обнаружено снижение уровня эстрадиола и отношений E2/T и ИФР-1/ЭФР по сравнению с контролем ($p < 0,01$), что характерно для «андрогенного» микроокружения развивающихся ооцитов [Enien W.M., 1998]. В этом случае закономерным является обнаружение в фолликулярной жидкости повышенных уровней растворимого FasR, лиганд которого располагается на мембране ооцита [Cataldo N.A., 2000] (Табл. 5). Снижение уровней СЭФР при обеих эндокринопатиях ($p < 0,01$) может рассматриваться в качестве маркера нарушенного ангиогенеза в развивающихся фолликулах [Бурлев В.А., 1999].

Выявленные изменения состава фолликулярной жидкости сочетались со снижением частоты нормального оплодотворения ооцитов у пациенток с ГА ($54,9 \pm 6,2$ % против $72,5 \pm 2,5$ % в контроле; $p < 0,05$) за счет отсутствия

оплодотворения ($26,9 \pm 3,1$ %) по сравнению с данными контроля ($10,8 \pm 1,2$; $p < 0,05$). Аналогичные параметры фертилизации ооцитов при ГП не отличались от контрольных показателей (частота нормального оплодотворения составила $72,2 \pm 6,8$ %; $p > 0,05$).

Таблица 4

Состояние апоптоза в гранулезных клетках пунктированных доминантных фолликулов пациенток с эндокринным бесплодием, $M \pm m$

Показатель	Контроль (n=26)	Гиперандрогения (n=23)	Гиперпролактинемия (n=23)
1	2	3	4
Количество клеток, экспрессирующих фосфатидилсерин, %	$11,7 \pm 1,8$	$5,9 \pm 1,8^*$	$17,7 \pm 1,2^*$
Количество аннексин V ⁺ и ПИ ⁺ клеток, %	$36,7 \pm 1,8$	$48,8 \pm 3,2^*$	$34,9 \pm 3,0$
Суммарное количество клеток, находящихся в состоянии апоптоза и вторичного некроза, %	$48,4 \pm 2,8$	$54,7 \pm 3,5$	$52,6 \pm 2,8$
Отношение апоптоз/некроз	0,45	0,18*	1,0*

Примечание: * - достоверные различия с контрольной группой ($p < 0,05$); аннексин V⁺ и ПИ⁺ клетки – клетки, включившие оба красителя

При использовании корреляционного анализа установлено, что наиболее сильное влияние на выраженность ответа яичников, созревание яйцеклеток и прогрессию апоптоза в гранулезных клетках фолликулов оказывало отношение базальных уровней ЛГ/ФСГ и содержание свободных андрогенов. Отмечено существование положительной взаимосвязи между уровнями растворимого FasR в фолликулярной жидкости и андростендиона в периферической крови. Количество

фолликулов, находящихся в состоянии атрезии, зависело от выраженности ответа яичников на стимуляцию овуляции.

Таблица 5

Содержание гормонов и некоторых факторов роста в фолликулярной жидкости доминантных фолликулов стимулированных яичников пациенток с эндокринным бесплодием, $M \pm m$

Показатель	Контроль (n=26)	Гиперандрогения (n=23)	Гиперпролактинемия (n=23)
1	2	3	4
ЛГ, мМЕ/мл	0,19 ± 0,04	0,23 ± 0,05	0,35 ± 0,03*
E2, нмоль/л	3636 ± 45,1	3465 ± 58,5*	3532 ± 64,7
E2/T	295,6 ± 7,5	240,6 ± 6,2*	204,1 ± 8,8*
ИФР-1, пкг/мл	138,5 ± 5,5	129,4 ± 7,4	181,5 ± 9,1*
ЭФР, пкг/мл	1,5 ± 0,3	2,5 ± 0,8	3,6 ± 0,9*
ИФР-1/ЭФР	92 ± 3,5	51,6 ± 6,5*	50,2 ± 4,8*
СЭФР, пкг/мл	1141,1 ± 126,8	628,8 ± 91,7*	854,8 ± 98,9*
оФРФ, пкг/мл	5,2 ± 0,8	8,2 ± 0,7*	14,3 ± 1,6*
sFasR, пкг/мл	20,4 ± 0,7	27,4 ± 1,5*	27,9 ± 2,1*

Примечание: * - ($p < 0,01$), обозначены достоверные отличия по сравнению с показателями контрольной группы

Полученные результаты позволяют идентифицировать активацию апоптоза гранулезных клеток фолликулов, изменение соотношений про- и антиапоптотических факторов в составе фолликулярной жидкости и нарушенный ангиогенез как патофизиологические механизмы, приводящие к функциональной неполноценности женских гамет в патогенезе эндокринного бесплодия.

Особенности предимплантационного эмбриогенеза и факторы, влияющие на формирование бластоцист в культуре

В проведенном исследовании темпы деления эмбрионов были снижены в обеих исследуемых группах женщин. Стадии 8 бластомеров через 72 часа культивирования *in vitro* достигали $61,1 \pm 2,1\%$ эмбрионов в контрольной группе по сравнению с $20,7 \pm 3,7\%$ эмбрионов в группе ГА ($p < 0,05$) и $41,6 \pm 3,7\%$ эмбрионов при ГП ($p < 0,05$). Это соответствовало тому, что значительное количество эмбрионов остановилось в развитии на стадии менее 5 бластомеров ($27,4 \pm 2,5\%$; $p < 0,05$ и $43,1 \pm 3,9\%$; $p < 0,05$ в группах с ГП и ГА, соответственно, по сравнению с контролем - $10,2 \pm 2,4\%$).

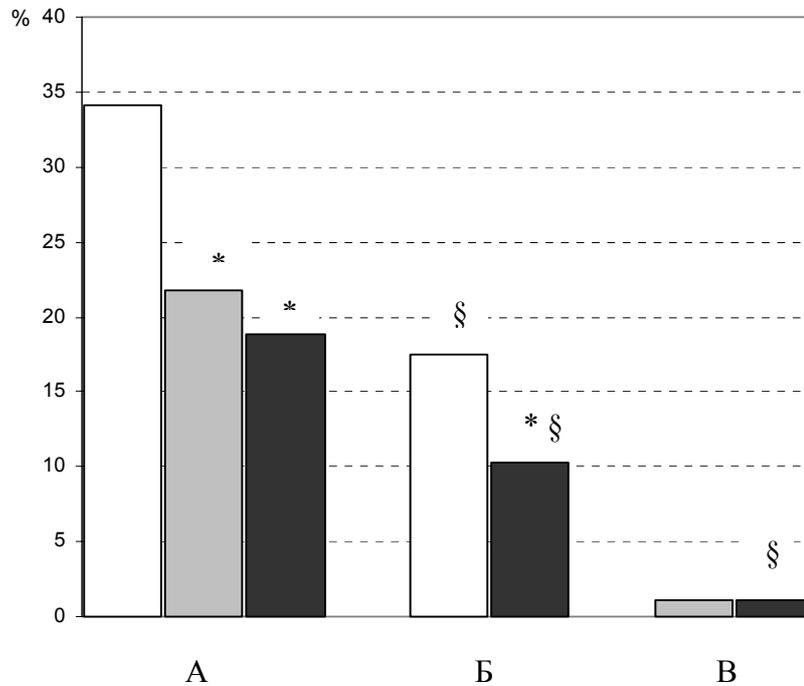
При оценке индекса фрагментации доля эмбрионов с фрагментацией более 50% составила $10,7 \pm 1,9\%$ в контрольной группе. Превышение этого уровня оказалось наиболее выраженным в группе пациенток с ГА ($27,3 \pm 6,4\%$, $p < 0,05$). Для этой же группы было наименее характерно отсутствие фрагментации. В целом, это свидетельствует о превалировании необратимых, выраженных процессов деструкции в группе женщин с ГА, ранее уже отмеченных нами при изучении апоптоза гранулезных клеток фолликулов.

Результаты сравнительного анализа частоты формирования бластоцист при изучаемых вариантах женского бесплодия позволили установить, что формирование бластоцист затруднено при ГА ($7,8 \pm 0,5\%$ против $19,7 \pm 3,5\%$ в контроле; $p < 0,05$). Формирование бластоцист при ГП не отличалось от показателей контрольной группы ($12,6 \pm 4,3\%$; $p > 0,05$).

Нами выявлена слабая степень положительной связи ($r = 0,23$; $p < 0,05$) между показателем созревания бластоцист в культуре и ЧНБ. Возможным объяснением полученного факта являются данные о том, что образование бластоцист не исключает наличия хромосомных аномалий у таких эмбрионов и наступившая беременность элиминируется в ранние сроки [Spandorfer S.D. et al., 2000].

Дальнейший анализ показал, что способность эмбрионов к формированию бластоцист зависит от продолжительности бесплодного периода (рис.1) и возраста женщины (рис.2). При проведении корреляционного анализа (группа женщин

30 – 34 лет с ТПФ) обнаружено, что продолжительность бесплодного периода влияет на ЧНИ ($r = -0,98$; $p = 0,02$); ЧНБ ($r = -0,95$; $p = 0,04$), количество эмбрионов с отсутствием фрагментации ($r = -0,88$; $p = 0,04$) и эмбрионов на стадии менее 5 бластомеров через 72 часа после пункции ($r = 0,69$; $p = 0,04$).



Обозначения: Здесь и далее - продолжительность бесплодия

□ < 5 лет ■ 6-10 лет ■ > 10 лет

* - достоверность различий по сравнению с контрольной группой;

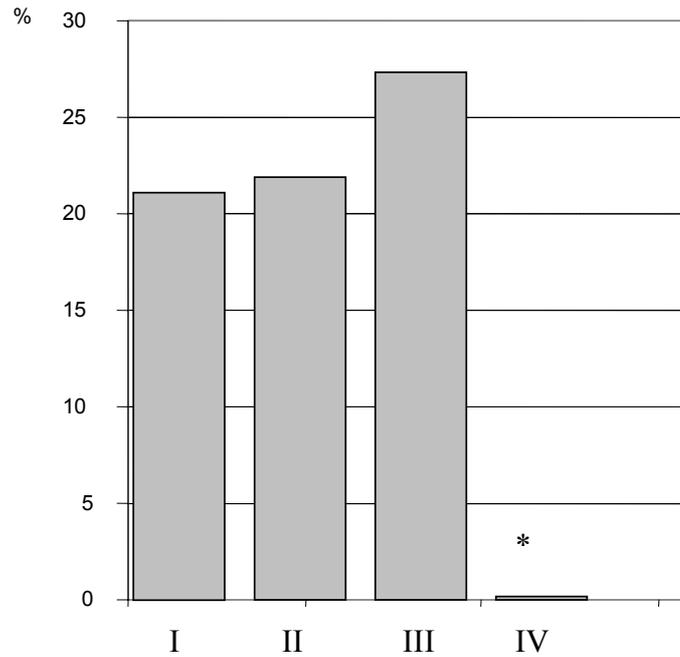
§ - достоверность различий в парах ТПФ – эндокринное бесплодие для соответствующей группы по длительности бесплодия

Для подсчета достоверности различий использовали критерий Z.

Рис. 1. Доля эмбрионов (%) от оставшихся после ПЭ, сформировавших бластоцисты в культуре у женщин в возрасте 30 - 34 года при А) ТПФ; Б) гиперпролактинемии; В) гиперандрогении

Установлено наличие зависимости между возрастом женщины и ответом яичников на стимуляцию овуляции ($r = -0,99$; $p=0,009$); частотой отсутствия оплодотворения ооцитов ($r = 0,71$; $p=0,04$), частотой аномального оплодотворения ооцитов ($r = 0,79$; $p=0,04$), ЧНИ ($r = -0,93$; $p=0,03$) и ЧНБ ($r = -0,97$; $p=0,04$).

На рис.3. приведены мишени действия патологических временных факторов в органах и тканях репродуктивной системы.



Примечание: * - достоверность различий по сравнению с контрольной группой по критерию Z;

Рис.2. Доля эмбрионов (%) от оставшихся после выполнения эмбриопереноса, сформировавших бластоцисты в культуре, у женщин с ТПФ в зависимости от возраста I) до 30 лет; II) 30-34 года; III) 35-39 лет; IV) 40 и более лет

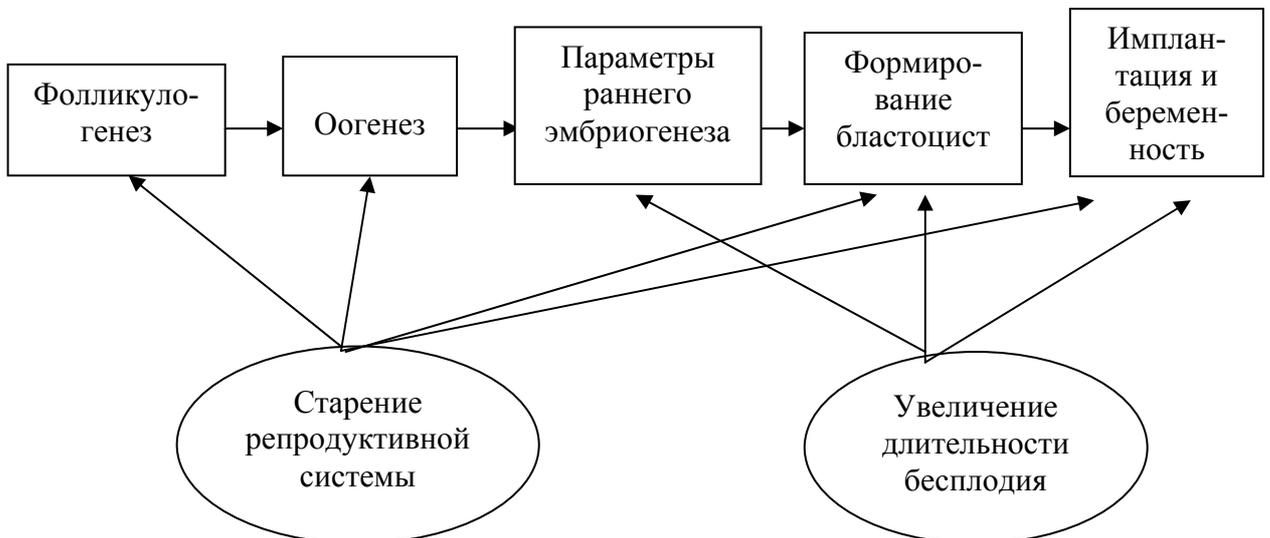


Рис.3. Мишени патогенного действия временных факторов длительности существования бесплодия и возраста женщины на разных этапах предимплантационного развития эмбриона и наступление имплантации

Исследование структурно-функциональных особенностей эндометрия у женщин с эндокринным бесплодием

Поскольку состоявшаяся имплантация характеризует не только качество эмбрионов, но и функциональную состоятельность эндометрия, нами проводилось исследование ряда факторов, регулирующих циклические изменения эндометрия и влияющих на имплантацию эмбриона.

В нашем исследовании ЧНИ составила $11,4 \pm 6,2$ % при ГА против $29,9 \pm 2,8$ % в контрольной группе ($p < 0,01$) и $16,8 \pm 2,9$ % при ГП ($p < 0,05$; по сравнению с контролем). ЧНБ составила в контроле $47,2 \pm 5,6$ %, в группе ГА $27,3 \pm 5,2$ % ($p < 0,05$; против контроля) и $40,6 \pm 7,2$ % в группе ГП ($p > 0,05$; против контроля).

При гистологическом исследовании эндометрия у 66 % больных группы ГА на 20 – 22 день менструального цикла выявлен эндометрий в разных стадиях фазы пролиферации. Морфологические изменения эндометрия, соответствующие средней стадии фазы секреции, найдены лишь у 12 % женщин, что достоверно отличалось от показателей контроля ($p < 0,001$). У 10% пациенток обнаружены гиперплазия и атрофия эндометрия. Для женщин с ГП были характерны умеренные нарушения в виде отставания секреторных преобразований: ранняя стадия фазы секреции выявлена у 50 % больных и поздний пролиферативный эндометрий – у 17 % пациенток.

В группе женщин с ГП обнаружено увеличение экспрессии RE и R_{prog} в железистых клетках в пролиферативной фазе по сравнению с контролем ($p < 0,05$) и увеличение экспрессии R_{prog} в железах эндометрия в секреторной фазе цикла ($p < 0,05$). При ГА в стромальном и железистом компонентах обнаружено повышение содержания рецепторов яичниковых стероидов в секреторном железистом эпителии ($p < 0,05$) (рис.4).

Исходя из данных о прямой паракринной и аутокринной регуляции стероидами содержания рецепторов [Clarc J.H. et. al., 1980], результаты исследования при ГА интерпретировали как проявление локальной гиперэстрогении в слизистой тела матки, проявленной в секреторной фазе цикла и развивающейся на фоне сниженного уровня периферического эстрадиола (Табл.1).

Содержание рецепторов андрогенов (R_A) в функциональном слое эндометрия женщин с эндокринным бесплодием, $M \pm m$

Группа	Показатель	Структуры эндометрия	Дни менструального цикла	
			6 – 9	20 - 22
1	2	3	4	5
Контроль (n=18)	R_A	строма	$68,1 \pm 20,5$	$45,2 \pm 18,5$
		железистый эпителий	0	$5,7 \pm 2,8$
Гиперандрогения (n=24)	R_A	строма	$94,7 \pm 18,5$	$141,1 \pm 33,6^*$
		железистый эпителий	$3,5 \pm 2,9$	$7,6 \pm 5,9$
Гиперпролактинемия (n=18)	R_A	строма	$57,2 \pm 22,1$	$61,6 \pm 27,9$
		железистый эпителий	0	$3,3 \pm 2,5$

Примечание: M – среднее значение H scores;

* - $p < 0,01$, указаны отличия по сравнению с контролем.

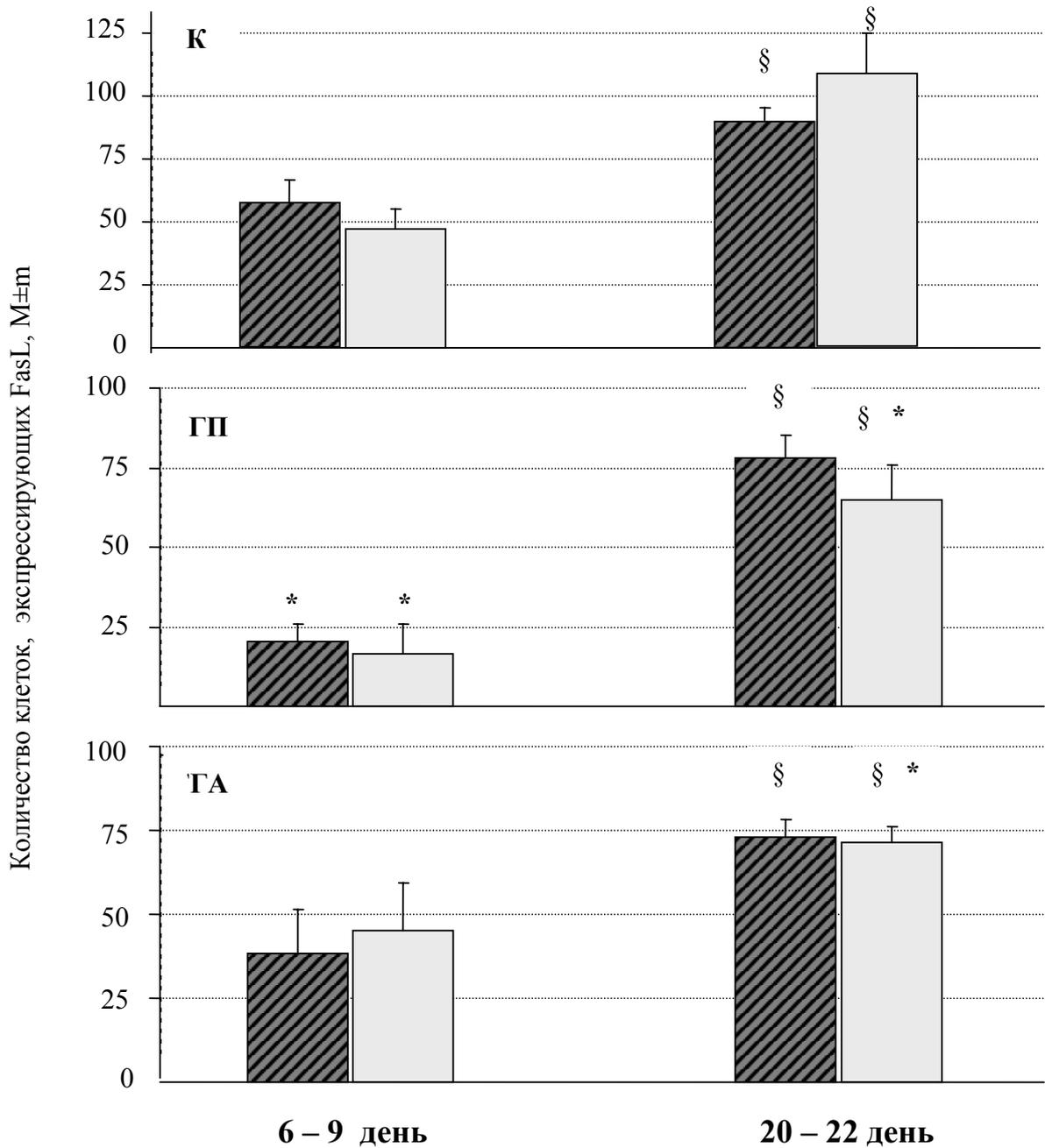
Соответственно, для женщин из группы ГП была характерна локальная гиперэстрогения, проявляющаяся в обеих фазах цикла на фоне нормального уровня периферического эстрадиола.

Состояние локальной гиперэстрогении при ГА может усугубляться наличием условий для тканевых эффектов андрогенов, что проявлялось в увеличении экспрессии рецепторов андрогенов в строме секреторного эндометрия пациенток с ГА (табл.6).

Изучение особенностей реализации запрограммированной клеточной гибели в функциональном слое эндометрия при эндокринном бесплодии

Поскольку поддержание постоянства тканей организма определяется равновесием процессов роста и запрограммированной гибели клеток, мы

оценивали уровень апоптоза в эндометрии по экспрессии маркера рецептор-опосредованного механизма апоптоза – молекулы FasL и детекции межнуклеосомной фрагментации ДНК *in situ*.



Примечание: * - $p < 0,01$, указаны отличия по сравнению с контролем;
 § - $p < 0,01$, указаны отличия по сравнению с пролиферативной фазой менструального цикла внутри одной группы женщин.

Рис.5. Экспрессия FasL в стромальном и железистом эпителии функционального слоя эндометрия женщин при гиперпролактинемии (ГП), гиперандрогении (ГА) и в контрольной группе (К) в течение менструального цикла

Циклическая экспрессия молекулы FasL обнаружена в функциональном слое эндометрия всех тестируемых групп женщин. Наибольшее содержание FasL обнаружено в железах секреторного эндометрия в контроле. В пролиферативном эндометрии пациенток контрольной группы экспрессия FasL была примерно в 2,5 раза ниже, чем в фазе секреции ($p < 0,01$) (рис.5).

Таблица 7

Уровень апоптоза *in situ* в специализированных клетках секреторного эндометрия у женщин с эндокринным бесплодием, $M \pm m$

Группа	День менструального цикла	Структуры эндометрия	Количество TUNEL ⁺ клеток, %
1	2	3	4
Контроль (n=18)	20 - 22	строма	20,1 ± 11,6
		железистый эпителий	28,8 ± 13,5
ГА I (62,5 %) (n=15)	20 - 22	строма	2,5 ± 2,5*
		железистый эпителий	12,5 ± 2,5
ГА II (37,5 %) (n=9)	20 - 22	строма	95,1 ± 15,1*
		железистый эпителий	96,5 ± 13,2*
ГП I (71,4 %) (n=13)	20 - 22	строма	3,2 ± 3,2
		железистый эпителий	3,2 ± 3,2 *
ГП II (28,6 %) (n=5)	20 - 22	строма	92,1 ± 3,7 *
		железистый эпителий	95,1 ± 5,2 *

Примечание: * - ($p < 0,05$); обозначены достоверные отличия по сравнению с соответствующими показателями контрольной группы;
ГА I, ГА II, ГП I и ГП II обозначены подгруппы при гиперандрогении и гиперпролактинемии, соответственно.

У пациенток с ГП обнаружено достоверное снижение экспрессии молекулы FasL в железах и в строме функционального слоя эндометрия ($p < 0,01$) в обеих фазах

менструального цикла, что хорошо соответствует выявленному нами ранее запаздыванию секреторной трансформации эндометрия у половины пациенток данной группы. При ГА достоверное снижение изучаемого показателя обнаружено в секреторном железистом эпителии ($p < 0,01$).

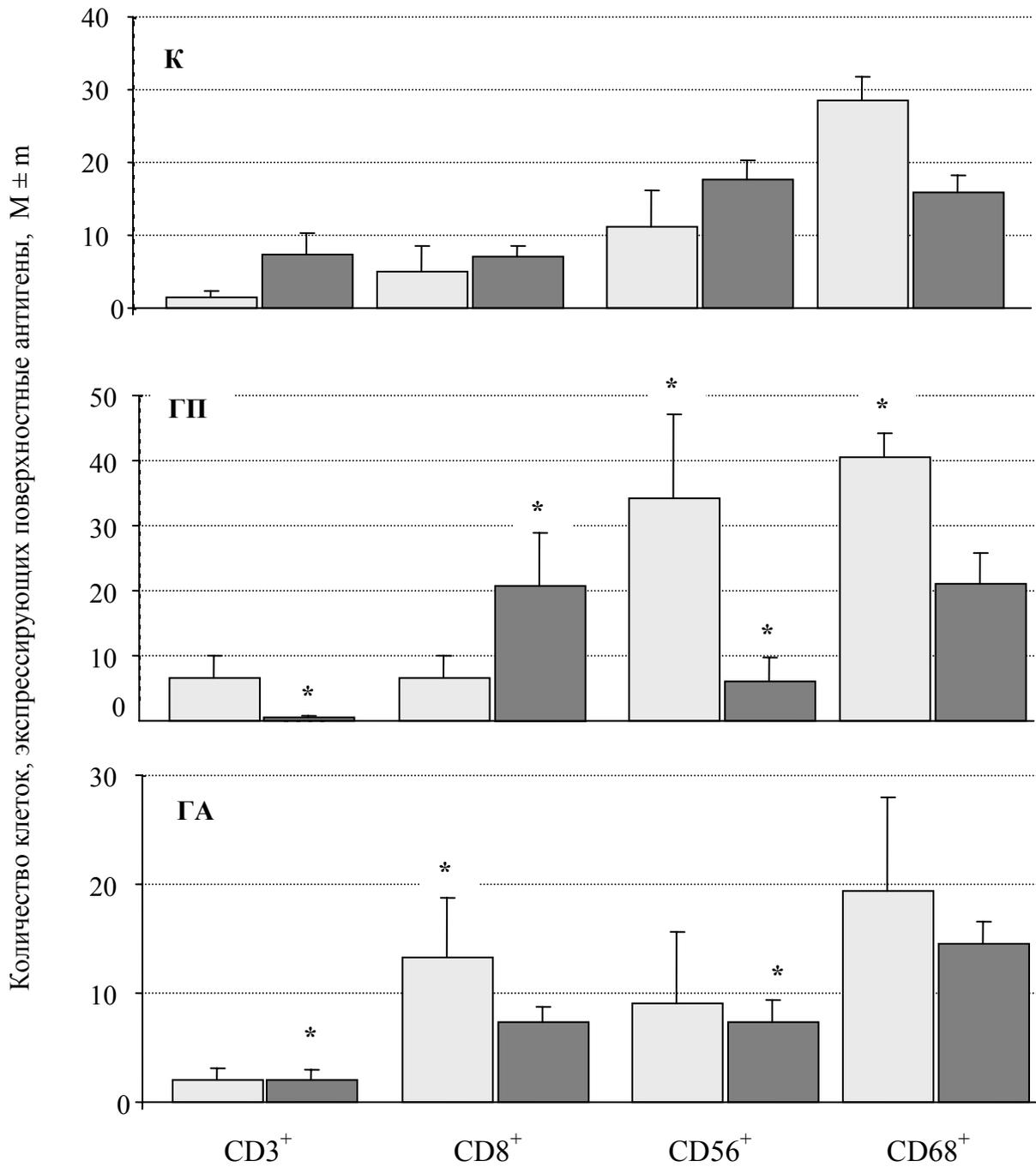
Данные проведенного исследования межнуклеосомной фрагментации ДНК в эндометрии суммированы в Табл. 7. Изученные образцы секреторного эндометрия по активности реализации процессов апоптоза разделились на подгруппы, обозначенные ГА I (62,5 % образцов группы ГА); ГА II (37,5 % группы ГА); ГП I (72,2 % образцов группы ГП) и ГП II (27,8 % группы ГП). Результаты свидетельствуют о редукции процессов апоптоза в строме и железистом эпителии эндометрия подавляющего большинства пациенток исследуемых групп (подгруппы ГА I и ГП I) по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Эти факты хорошо согласуются с данными о снижении экспрессии молекулы FasL и показателями соотношения морфотипов образцов эндометрия с измененной динамикой секреторной трансформации.

Состояние локального иммунного статуса эндометрия и динамика цитотоксического индекса эндометриальных лейкоцитов

Целью данного раздела исследования стало изучение состава субпопуляций эндометриальных лейкоцитов с преимущественной киллерной активностью ($CD3^+$; $CD8^+$; $CD56^+$) и клеток макрофагальной линии, экспрессирующих поверхностный мембранный антиген CD68 (рис.6).

Изменения в составе клеточных субпопуляций эндометриальных лимфоцитов характеризовались редукцией популяции $CD56^+$ – позитивных клеток в обеих группах сравнения, что происходило одновременно с аккумуляцией цитотоксических $CD8^+$ Т-лимфоцитов преимущественно в пролиферативном эндометрии женщин с ГА и в секреторном эндометрии женщин с ГП. Указанные отклонения нашли отражение в динамике изменения цитотоксического индекса эндометриальных лейкоцитов (рис.7).

Редукция $CD56^+$ в эндометрии коррелировала с уровнем прогестерона в периферической крови женщин ($r = 0,87$; $p = 0,03$), экспрессией $R_{\text{прог}}$ в эндометрии ($r = -0,81$; $p = 0,05$) и ЧНИ ($r = 0,89$; $p = 0,04$).



Обозначения: Здесь и на рис.7

□ Ранняя пролиферативная фаза

■ Середина секреторной фазы

* - обозначены достоверные ($p < 0,05$) отличия от соответствующих параметров контрольной группы.

Рис.6. Накопление CD3⁺, CD8⁺, CD56⁺, CD68⁺ в эндометрии женщин при гиперпролактинемии (ГП), гиперандрогении (ГА) и в контрольной группе (К) в течение менструального цикла

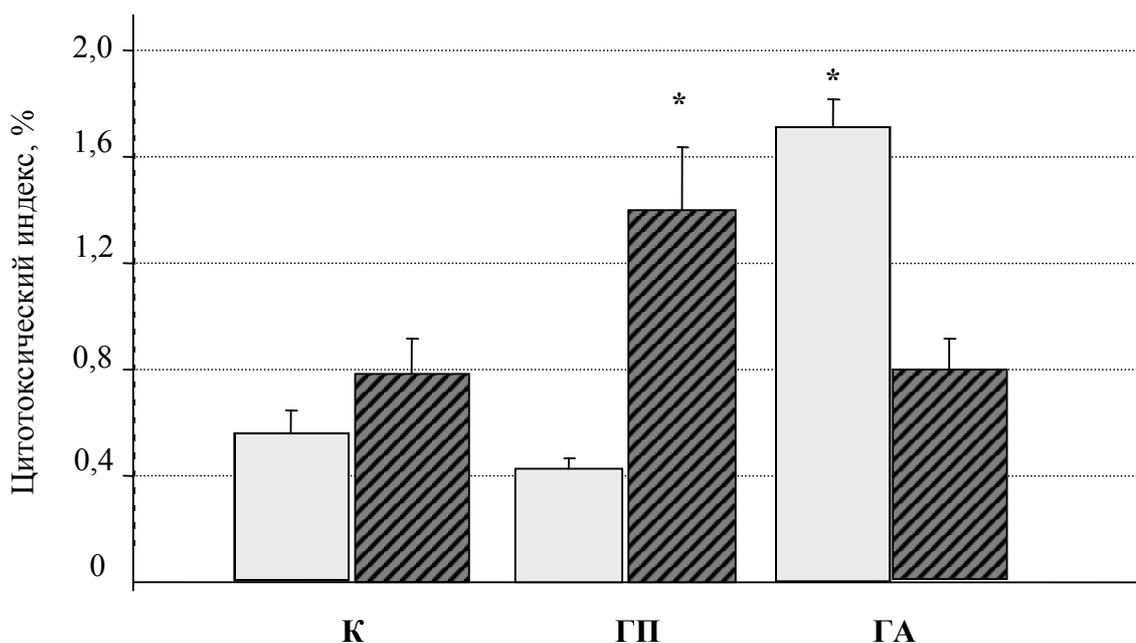


Рис. 7. Динамика индекса цитотоксичности эндометриальных лимфоцитов в течение менструального цикла при гиперпролактинемии (ГП), гиперандрогении (ГА) и в контрольной группе (К)

Экспрессия молекулы FasL зависела от уровня сывороточного эстрадиола ($r = -0,88$; $p = 0,05$) и экспрессии RE в эндометрии ($r = -0,89$; $p = 0,004$) и приводила к снижению ЧНИ ($r = 0,84$; $p = 0,05$). Рост цитотоксического индекса эндометрия отрицательно коррелировал с ЧНБ ($r = -0,98$; $p = 0,002$).

Полученные результаты позволяют прийти к заключению о наличии причинно-следственных связей между нарушениями стероидогенеза, дисрегуляцией локальных эффектов яичниковых стероидов и накоплением в эндометрии цитотоксических Т-лимфоцитов.

Возникающие как следствие патологического стероидогенеза редукция апоптоза и локальный дисбаланс в составе субпопуляций эндометриальных лимфоцитов могут быть идентифицированы как эндометриальные механизмы нарушения имплантации при эндокринном бесплодии.

В совокупности результаты нашей работы дают право обосновать следующие схемы патогенеза нарушенной имплантации эмбриона при гиперандрогении и гиперпролактинемии (рис. 8 – 11).

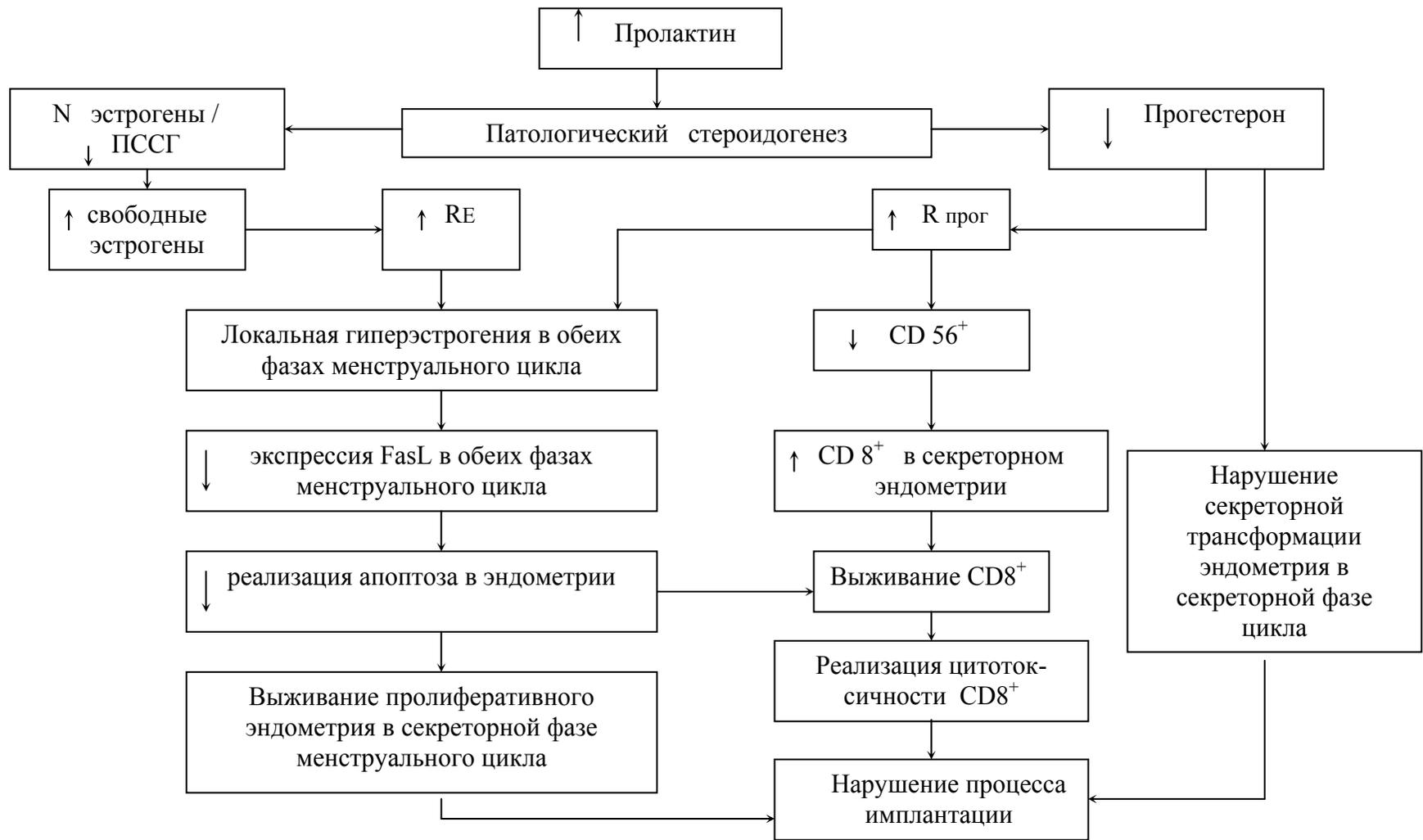


Рис. 8. Схема локальных дизрегуляторных процессов в эндометрии при эндокринном бесплодии, обусловленном функциональной гиперпролактинемией



Рис. 9. Эмбриональные факторы нарушения имплантации при эндокринном бесплодии, обусловленном функциональной гиперпролактинемией



Рис.10. Схема локальных дизрегуляторных процессов в эндометрии при эндокринном бесплодии, обусловленном овариальной гиперандрогенией неопухолевого генеза



Рис. 11. Эмбриональные факторы нарушения имплантации при эндокринном бесплодии, обусловленном овариальной гиперандрогенией неопухолового генеза

ВЫВОДЫ

1. Ожирение является фактором, отягощающим гормональный дисбаланс у женщин, страдающих гиперпролактинемией и гиперандрогенией. Андроидному и гиноидному типам ожирения свойственны качественно однотипные изменения эндокринной секреции и метаболического статуса, количественно более выраженные при андроидном ожирении. Отклонения в гормональном и метаболическом статусах, свойственные гиноидному ожирению, можно расценивать в качестве симптомов латентного метаболического синдрома.

2. Дислипидемии характерны для 94 % больных с гиперандрогенией и андроидным ожирением и 87 % пациенток с гиперпролактинемией и гиноидным ожирением. Преобладающим типом нарушений при гиноидном ожирении является гиперлипидемия IV типа. Для женщин с андроидным ожирением характерна гиперлипидемия II б типа и высокий атерогенный потенциал крови.

3. Формирование патологического стероидогенеза у женщин с ановуляторным бесплодием тесно связано с изменением метаболического статуса организма, нарушениями углеводного и липидного обменов, обусловленных патологической секрецией инсулина и лептина.

4. Размер когорты фолликулов, вступающих в рост при овариальной стимуляции, определяется отношением ЛГ/ФСГ и исходным уровнем свободных андрогенов.

5. Интенсивность процессов апоптоза и некроза гранулезных клеток фолликулов у женщин с эндокринным бесплодием прямо пропорциональна степени выраженности ответа яичников на стимуляцию овуляции. Для гранулезных клеток при гиперпролактинемии характерно развитие апоптоза, а при гиперандрогении - апоптоза с последующим вторичным некрозом.

6. Основными патофизиологическими механизмами, приводящими к элиминации 30 – 40 % яйцеклеток на этапе фертилизации, являются активация апоптоза гранулезных клеток фолликулов, нарушение ангиогенеза, изменение соотношений про- и антиапоптотических факторов и накопление цитокинов в составе фолликулярной жидкости.

7. Общей чертой для исследуемых видов патологии репродуктивной системы является замедление раннего развития эмбрионов. При изученных патогенетических вариантах эндокринного бесплодия тяжелая степень фрагментации эмбрионов и редукция способности к формированию бластоцист в культуре более характерны для гиперандрогении.

8. На формирование бластоцист в культуре оказывают влияние длительность бесплодия и возраст женщины. Продолжительность бесплодного периода является фактором, влияющим на характер, темпы дробления и выраженность фрагментации эмбрионов. Старение репродуктивной системы женщины сопровождается ухудшением параметров фолликулогенеза в стимулированных яичниках и изменением характера оплодотворения ооцитов.

9. Изменение овариального стероидогенеза вызывает локальную дизрегуляцию экспрессии рецепторов стероидных гормонов и формирование локальной гиперэстрогении, выявляемой в обеих фазах менструального цикла при гиперпролактинемии и в секреторной фазе менструального цикла при гиперандрогении. Для гиперандрогении характерно усиление экспрессии рецепторов андрогенов в секреторном эндометрии.

10. Интенсивность реализации процессов апоптоза в секреторном эндометрии редуцирована в 62 % случаев при гиперандрогении и в 72 % случаев при гиперпролактинемии, что соответствует снижению циклической экспрессии молекулы FasL в эндометрии при изученных вариантах ановуляторного бесплодия.

11. Локальная дизрегуляция эффектов стероидных гормонов приводит к изменению соотношения популяций эндометриальных лейкоцитов, что проявляется в уменьшении популяции CD56⁺ больших гранулярных лимфоцитов и накоплении в эндометрии CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов. Нарастание цитотоксического индекса эндометриальных лейкоцитов выявлено в секреторном эндометрии при гиперпролактинемии и в пролиферативном эндометрии при гиперандрогении.

12. Получение качественных эмбрионов в программе ЭКО не является определяющим фактором в наступлении имплантации, так как формирование бластоцист слабо коррелирует с последующей имплантацией и наступлением беременности. Эндометриальные факторы, а именно редукция физиологических

процессов апоптоза и накопление в секреторном эндометрии цитотоксических иммунокомпетентных клеток, являются решающими в патогенезе нарушений имплантации при изученных вариантах эндокринного бесплодия.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Клинико – лабораторное обследование больных с эндокринным бесплодием и коррекция их состояния перед включением в лечебный цикл ЭКО должны включать:

1.1. Оценку наличия и типа ожирения, что будет направлено не только на подготовку женщины к наступлению беременности, но и профилактику возможных осложнений, как во время беременности, так и после нее.

1.2. Нормализацию функционального состояния яичников, определяющего выраженность ответа на стимуляцию овуляции и готовность эндометрия к имплантации бластоцисты.

1.3. Исследование андрогенного статуса пациентки (отношения ЛГ/ФСГ, тестостерона с расчетом индекса свободных андрогенов и андростендиона), определяющего размер получаемого пула фолликулов и качество ооцитов при стимуляции овуляции в программе ЭКО.

1.4. Проведение вакуум - кюретажа эндометрия для определения экспрессии рецепторов эстрогенов и прогестерона и маркеров клеточных популяций (CD 3⁺; CD8⁺ и CD56⁺) эндометриальных лейкоцитов.

2. В связи с уменьшением эффективности программы ЭКО при увеличении длительности бесплодного периода и возраста женщины как при трубно – перитонеальном, так и при эндокринном бесплодии, необходимо как можно более раннее направление пациентки на лечение методом ЭКО.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Махалова Н.А. Дифференцированные подходы к восстановлению репродуктивной функции у женщин с разными типами ожирения / Н.А. Махалова, О.С. Филиппов, М.В. Яманова, А.В. Светлаков // Лечение бесплодия: нерешенные проблемы: Сб. науч. тр. - Саратов, 2001. - С. 92.

2. Махалова Н.А. Особенности репродуктивной и менструальной функции у пациенток с различными типами ожирения / Н.А. Махалова, О.С. Филиппов, М.В. Яманова, А.В. Светлаков // Современные направления исследований в акушерстве, гинекологии и перинатологии: Тез. докл. науч.-практ. конф. - Томск, 2001. - С. 94 - 95.

3. Светлаков А.В. Особенности гормонального статуса у женщин с абдоминально-висцеральным и глутео-фemorальным ожирением /А.В. Светлаков, М.В. Яманова, Н.А. Махалова, О.С. Филиппов // Пробл. репродукции. - 2001. - № 3. - С. 16-19.

4. Евдоченко И.И. Морфология эндометрия при эндокринном бесплодии у женщин / И.И. Евдоченко, В.Б. Цхай, М.В. Яманова, А.В. Светлаков, А.А. Барановский // Охрана здоровья матери и ребенка: Матер. IV Рос. науч. форума. - М., 2002. - С. 119-120.

5. Светлаков А.В. Клинико-лабораторная характеристика гиноидного и андроидного типов ожирения у женщин с нарушениями репродуктивной функции / А.В. Светлаков, Н.А. Махалова, М.В. Яманова, О.С. Филиппов // Охрана здоровья матери и ребенка: Матер. IV Рос. науч. форума. - М. - 2002. - С. 341.

6. Светлаков А.В. Характерные сроки прерывания беременностей, полученных у женщин с различными формами бесплодия при лечении методом ЭКО / А.В. Светлаков, М.В. Яманова, О.А. Серебренникова, А.Б. Салмина // Охрана здоровья матери и ребенка: Матер. IV Рос. науч. форума - М., 2002. - С. 342-343.

7. Серебренникова О.А. Критические сроки прерывания беременностей, полученных в программе ЭКО у женщин с эндокринным бесплодием в анамнезе и эндометриозом / О.А. Серебренникова, А.В. Светлаков, М.В. Яманова, А.Б. Салмина // Невынашивание беременности и недоношенный ребенок: Матер. науч.-практ. конф. - Петрозаводск, 2002. - С. 98-99.

8. Светлаков А.В. Лептин и липидный спектр крови у женщин с разными типами ожирения / А.В. Светлаков, М.В. Яманова, Н.А. Махалова, О.С. Филиппов // Пробл. репродукции. - 2001. - № 6. - С. 33-36.

9. Светлаков А.В. Молекулярно-биологические аспекты имплантации у человека и животных / А.В. Светлаков, М.В. Яманова, А.Б. Егорова, С.В. Михуткина // Пробл. репродукции. - 2002. - № 2. - С. 16-28.
10. Светлаков А.В. Вероятность наступления имплантации у женщин с разными формами бесплодия при лечении методом ЭКО / А.В. Светлаков, М.В. Яманова, А.Б. Салмина, О.А. Серебренникова // Пробл. репродукции. - 2002. - № 3. - С. 61-67.
11. Евдоченко И.И. Патоморфологические особенности эндометрия у женщин с эндокринным бесплодием / И.И. Евдоченко, В.Б. Цхай, А.В. Светлаков, М.В. Яманова, А.А. Барановский // Современные подходы к лечению бесплодия: Сб. науч. тр. - Екатеринбург, 2002. - С. 43.
12. Серебренникова О.А. Способность эмбрионов к формированию бластоцисты у женщин с разными формами бесплодия в программе ЭКО / О.А. Серебренникова, А.В. Светлаков, М.В. Яманова, А.Б. Салмина // Современные подходы к лечению бесплодия: Сб. науч. тр. - Екатеринбург, 2002. - С. 157-158.
13. Махалова Н.А. Сравнительная характеристика нарушений липидного обмена, уровней лептина у женщин с разными типами ожирения / Н.А. Махалова, О.С. Филиппов, М.В. Яманова, А.В. Светлаков // Современные подходы к лечению бесплодия: Сб. науч. тр. - Екатеринбург, 2002. - С. 113-114.
14. Махалова Н.А. Регулирующее воздействие инсулина и лептина на репродуктивные процессы при разных типах ожирения / Н.А. Махалова, О.С. Филиппов, М.В. Яманова, А.В. Светлаков // Эндокринная регуляция физиологических функций в норме и патологии: Тез. докл. II науч. конф. с междунар. участием. - Новосибирск, 2002. - С. 87.
15. Салмина А.Б. Влияние гуморальных изменений при некоторых формах эндокринного бесплодия женщин на апоптоз гранулезных клеток, полученных в программе ЭКО / А.Б. Салмина, М.В. Яманова, А.В. Светлаков, Е.А. Пожиленкова, С.В. Михуткина, О.А. Серебренникова // Эндокринная регуляция физиологических функций в норме и патологии: Тез. докл. II науч. конф. с междунар. участием. - Новосибирск, 2002. - С. 138.
16. Серебренникова О.А. Эмбриологические аспекты патогенеза женского бесплодия при эндокринных нарушениях репродуктивной системы /

О.А. Серебренникова, А.В. Светлаков, М.В. Яманова, А.Б. Салмина // Эндокринная регуляция физиологических функций в норме и патологии: Тез. докл. II науч. конф. с междунар. участием. - Новосибирск, 2002. - С. 144.

17. Евдоченко И.И. Роль локального иммунного статуса эндометрия в патогенезе эндокринного бесплодия / И.И. Евдоченко, В.Б. Цхай, М.В. Яманова, А.В. Светлаков // Вестник перинатологии, акушерства и гинекологии. - Красноярск, 2002. - Вып. 9. - С. 301-311.

18. Светлаков А.В. Апоптоз в преимплантационном эмбриогенезе / А.В. Светлаков, М.В. Яманова, А.Б. Салмина // Пробл. репродукции. - 2002. - № 5. - С. 15-24.

19. Svetlakov A. Clinical and laboratory characteristics of the upper and lower types of body fat distribution in obese women with menstrual irregularities and infertility / A. Svetlakov, M. Yamanova, O. Filippov, N. Machalova // Abstr. 18th Intern. Congr. Clin. Chem. Labor. Med. - Kyoto (Japan), 2002. - P. 85.

20. Svetlakov A. The infertility cause affects fertilization in vitro, early embryogenesis and outcome of IVF procedure / A. Svetlakov, M. Yamanova, A. Salmina, O. Serebrennikova // Abstr. 18th Intern. Congr. Clin. Chem. Labor. Med. - Kyoto (Japan), 2002. - P. 92.

21. Светлаков А.В. Формирование бластоцист и частота наступления имплантации у женщин разных возрастных групп в зависимости от длительности бесплодия в анамнезе / А.В. Светлаков, М.В. Яманова, А.Б. Салмина, О.А. Серебренникова // Пробл. репродукции. - 2003. - № 4. - С.59-63.

22. Яманова М.В. Особенности регуляции циклических изменений эндометрия у женщин, страдающих эндокринным бесплодием / М.В. Яманова, А.В. Светлаков, А.Б. Салмина, В.Н. Эллиниди, В.Б. Цхай, Т.В. Соколова, И.И. Евдоченко // Пробл. репродукции. - 2003. - № 4. - С.64-70.

23. Серебренникова О.А. Исходы лечения методом экстракорпорального оплодотворения при различных формах женского бесплодия / О.А. Серебренникова, А.В. Светлаков, М.В. Яманова, А.Б. Салмина // Здоровье семьи - XXI век: Матер. VII Междунар. науч. конф. - Пермь - Валетта (Мальта), 2003. - С. 176-177.

24. Цхай В.Б. Иммуный статус эндометрия и общий иммунитет у женщин с бесплодием, обусловленным гиперандрогенией / В.Б. Цхай, И.И. Евдоченко, М.В. Яманова, А.В. Светлаков // Охрана здоровья матери и ребенка: Матер. V Рос. науч. форума. - М. - 2003. -С.319-320.

25. Пожиленкова Е.А. Степень вовлечения клеток гранулезы в апоптоз при некоторых формах эндокринопатий у женщин в лечении бесплодия методом ЭКО / Е.А. Пожиленкова, С.В. Михуткина, В.Г. Артюхова, М.В. Яманова, Е.И. Таксанова, А.Д. Климова // Актуальные проблемы патофизиологии: Сб. тез. - СПб, 2003. - С.70-72.

26. Цхай В.Б. Локальный иммунный статус эндометрия у женщин с бесплодием, обусловленным гиперандрогенией / В.Б. Цхай, И.И. Евдоченко, М.В. Яманова, А.В. Светлаков // Вестник перинатологии, акушерства и гинекологии. - Красноярск, 2003. - Вып. 10. - С. 517-521.

27. Yamanova M.V. Endometrial factors of implantation failure in endocrine infertility / M.V. Yamanova, A.V. Svetlakov, A.B. Salmina, V.B. Tchay, V.N. Ellinidi, I.I. Evdochenko, T.V. Sokolova // Abstr. 19th ESHRE AM. - Madrid (Spain), 2003. - P. 94.

28. Salmina A.B. Lack of correlation between granulosa cell apoptosis and oocyte quality / A.B. Salmina, A.V. Svetlakov, E.A. Pozhilenkova, M.V. Yamanova, O.A. Serebrennikova // Abstr. 19th ESHRE AM. - Madrid (Spain), 2003. - P.22.

29. Светлаков А.В. Особенности раннего эмбриогенеза при различных патогенетических вариантах женского бесплодия / А.В. Светлаков, М.В. Яманова, А.Б. Салмина, О.А. Серебренникова // Бюлл. СО РАМН. - 2003. - № 3. - С. 64-67.

30. Svetlakov A.V. The influence of women infertility cause on fertilization in vitro, early embryogenesis and outcome of IVF procedure / A.V. Svetlakov, M.V. Yamanova, A.B. Salmina, O.A. Serebrennikova // Acta Med. Biol. - 2003. - V. 51, №3. - P. 97-102.

31. Яманова М.В. Цитотоксическая активность иммунокомпетентных клеток эндометрия определяет прогноз имплантации эмбриона / М.В. Яманова, А.Б. Салмина, А.В. Светлаков, В.Н. Эллиниди, Н.В. Аникеева, О.А. Серебренникова, И.И. Евдоченко // Бюлл. эксперим. биол. и мед. - 2004. - № 1. - С. 94-98.

Список сокращений

А	-	андростендион
аГнРГ	-	агонисты гонадотропин–рилизинг гормона
БГЛ	-	большие гранулярные лимфоциты
ГА	-	гиперандрогения
ГИ	-	гиперинсулинемия
ГП	-	гиперпролактинемия
ГТТ	-	глюкозо-толерантный тест
ДЭАС	-	дигидроэпиандростерона сульфат
Е ₂	-	эстрадиол
Ил	-	интерлейкин
ИМТ	-	индекс массы тела
ИР	-	инсулинорезистентность
ИФР	-	инсулиноподобный фактор роста
ЛГ	-	лютеинизирующий гормон
ЛП	-	липопротеиды
ЛПВП	-	ЛП высокой плотности
ЛПНП	-	ЛП низкой плотности
МКА	-	моноклональные антитела
n	-	количество объектов исследования в группе
ОБ	-	объем бедер
ОТ	-	объем талии
оФРФ	-	основной фактор роста фибробластов
ПИ	-	пропидия йодид
Прог	-	прогестерон
ПССГ	-	глобулин, связывающий половые стероиды
ПЭ	-	перенос эмбрионов
Re	-	рецепторы эстрогенов
Rпрог	-	рецепторы прогестерона
САИ	-	индекс свободных андрогенов
СЭИ	-	индекс свободных эстрогенов
СЭФР	-	сосудисто-эндотелиальный фактор роста
Т	-	тестостерон
ТГ	-	триглицериды
ТПФ	-	трубно-перитонеальный фактор бесплодия
TUNEL	-	метод детекции апоптоза, основанный на встраивании меченых нуклеотидов в концевые фрагменты ДНК
УЗИ	-	ультразвуковое исследование
FasL	-	Fas лиганд
FasR	-	Fas рецептор
ФСГ	-	фолликулостимулирующий гормон
Хс	-	холестерин
ЧНБ	-	частота наступления беременности
ЧНИ	-	частота наступления имплантации
ЭКО	-	экстракорпоральное оплодотворение
ЭФР	-	эпидермальный фактор роста

