

На правах рукописи

Волченко Дарья Александровна

**МЕЖКЛЕТОЧНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
В ОВОСОМАТИЧЕСКОМ ГИСТИОНЕ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ
ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ КИСТ ЯИЧНИКОВ
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-КЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

14.01.01 – акушерство и гинекология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Томск – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор
доктор медицинских наук, профессор

Логвинов Сергей Валентинович
Тихоновская Ольга Анатольевна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор,
Федеральное государственное
бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт
фармакологии и регенеративной
медицины им. Е.Д. Гольдберга»
Томского национального
исследовательского медицинского центра,
заведующая лабораторией фармакологии
репродуктивной системы
доктор медицинских наук, доцент,
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования «Красноярский
государственный медицинский
университет им. проф. В.Ф. Войно-
Ясенецкого» Министерства
здравоохранения Российской Федерации,
заведующая кафедрой оперативной
гинекологии института последипломного
образования

Боровская Татьяна Геннадьевна

Макаренко Татьяна Александровна

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «__» _____ 2019 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.03 при ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (634050, г. Томск, пр. Ленина, 107) и на сайте www.ssmu.ru.

Автореферат разослан «__» _____ 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Мустафина Лилия Рамильевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Функциональные кисты яичников (ФКЯ) занимают одно из ведущих мест в структуре гинекологических заболеваний (45–55%) у женщин репродуктивного возраста [Меджидова К.К. и др., 2014; Сорокина И.В. и др., 2015; Гасымова Д.М., Рухляда Н.Н., 2017]. Формирование кист обусловлено циклическими изменениями в яичниках, что объясняет транзиторный характер их существования [Боровая Т.Г. и др., 2010; Антропова Н.В., Богатова И.К., 2014; Сорокина И.В. и др., 2015]. Изменения в структуре яичников приводят к ановуляторным циклам и бесплодию [Кадесникова Ю.А. и др., 2010; Рыбалка А.Н., Егорова Я.А., 2011; Сафронова Д.А., 2011; Coric M. et al., 2013; Li C.Z. et al., 2013; Рудакова Е.Б. и др., 2014; Макарчук О.М., Матвийкив Н.И., 2015; Шаповал О.С., Резниченко Г.И., 2015]. Патогенез кистообразования изучается с позиции изменения экспрессии факторов местной паракринной регуляции. Внутрияичниковые регуляторные механизмы играют ключевую роль в течении фолликулогенеза, так как они опосредуют и модулируют действие центральных и многих других механизмов регуляции [Erickson G. et al., 2000; Wissing M.L. et al., 2004; Боярский К.Ю., Гайдуков С.Н., 2010; Зенкина В.Г. и др., 2012].

Представители семейства трансформирующего фактора роста (ингибины, активины, антимюллеров гормон (АМГ), костный морфогенетический белок) играют центральную роль во многих процессах, регулирующих развитие фолликулов и созревание овоцитов [Diaz F.J. et al., 2007; Richard S., Baltz J.M., 2014]. На начальных этапах формирования ФКЯ возникает патологическая пролиферация фолликулярного эпителия, что закономерно вызывает повышение экспрессии сосудисто-эндотелиального фактора роста. Данный фактор формирует стабильный кровоток в сосудах яичника [Зенкина В.Г. и др., 2012], повышает проницаемость стенки микрососудов антрального фолликула [Tamanini C., De Ambrogio M., 2004; Боярский К.Ю., Гайдуков С.Н., 2010] с последующей аккумуляцией фолликулярной жидкости [Lam P.M., Haines C., 2005; Тепляшина Е.А., 2011; Masoumi-Moghaddam S. et al., 2012], ингибированием апоптоза [Chen H. et al., 2004; Greenaway J., Gentry P.A., 2005; Тепляшина Е.А., 2011].

В настоящее время остается актуальным поиск новых патогенетически обоснованных способов коррекции ФКЯ [Киргизова О.Ю., Москалева А.Ю., 2009; Зенкина В.Г. и др., 2012]. Существующие методы лечения, как медикаментозные, так и хирургические, часто оказываются неэффективными, сопровождаются высоким риском рецидивирования. Оперативное лечение является фактором, снижающим овариальный резерв и фертильность [Hatchisuga T., Kawarabayashi T., 2002; Somigliana E. et al., 2006; Зулумян Т.Н. и др., 2010; Гаспаров А.С., 2011; Coric M. et al., 2013; Гасимова Д.М., Рухляда Н.Н., 2014]. В последние годы активно изучается роль фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в фолликулогенезе. Экспериментально установлено, что введение ингибитора VEGF в начале фолликулярной фазы подавляет васкуляризацию текальных клеток и рост фолликулов [Wulff C. et al., 2002; Zimmermann R.C. et al., 2003; Fraser H.M. et al., 2005; Taylor P.D. et al., 2007].

Степень разработанности проблемы

С. Wulff и соавт. (2002), С. Tamanini и М. De Ambrogi (2004), P.D. Taylor и соавт. (2007) изучали влияние введения ингибитора VEGF на яичники у самок интактных экспериментальных животных. В литературе описана экспрессия паракринных факторов овосоматического взаимодействия в процессе фолликулогенеза [Weestergaad L. et al. 2004; Diaz F.J. et al. 2007; Erickson G. et al. 2000; Боярский К.Ю., Гайдуков С.Н., 2010; Зенкина В.Г. и др., 2012; Richard S., Baltz J.M., 2014].

Однако до сих пор не исследованы эффекты ингибитора VEGF при моделировании экспериментальных функциональных кист. Отсутствуют в литературе данные об изменении экспрессии факторов фолликулогенеза при моделировании ФКЯ и их коррекции.

Овариальный резерв у женщин, перенесших операции на яичниках, изучали Т. Hatchisuga и Т. Kawarabayashi (2002), Е. Somigliana и соавт. (2003, 2006). До сих пор не изучена экспрессия факторов паракринной регуляции, в частности VEGF, при различном клиническом течении функциональных кист яичников.

Цель исследования: установить структурно-функциональные изменения в овосоматическом гистионе и роль факторов паракринной регуляции

межклеточных взаимодействий при формировании функциональных кист яичников и при их коррекции.

Задачи исследования:

1. Изучить морфологические изменения яичников при формировании функциональных кист яичников и при лечении ингибитором эндотелиального фактора роста сосудов на экспериментальной модели.

2. Иммуногистохимически изучить факторы взаимодействия овоцита и клеток гранулезы (костный морфогенетический белок 15, белок щелевого контакта коннексина-37), фактор ангиогенеза (фактор роста эндотелия сосудов) на модели функциональных кист яичников и при их коррекции.

3. Изучить экспрессию фактора роста эндотелия сосудов при различном клиническом течении функциональных кист яичников.

4. Провести ретроспективный анализ клинических, сывороточных и ультразвуковых показателей овариального резерва, протоколов вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток с бесплодием и различным клиническим течением функциональных кист яичников после оперативного лечения.

Научная новизна

Впервые в эксперименте с помощью иммуногистохимической методики изучена экспрессия факторов паракринной регуляции при формировании и коррекции функциональных кист яичников (BMP15, Cx37, VEGF), установлено снижение экспрессии факторов овосоматического взаимодействия и усиление экспрессии VEGF при формировании функциональных кист яичников. Получены новые экспериментальные данные о динамике морфоколичественных изменений структурных элементов яичников при коррекции экспериментальных функциональных кист яичников ингибитором VEGF. Выявлено усиление экспрессии VEGF у пациенток при наличии разрыва и кровоизлияния в стенку функциональной кисты.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные результаты расширяют фундаментальные знания о патогенезе функциональных кист яичников и роли фактора роста эндотелия сосудов в хронической ановуляции. Полученные данные о влиянии оперативного лечения функциональных кист яичников на функцию яичников

позволяют детализировать группы риска по снижению овариального резерва и фертильности.

Методология и методы исследования

В экспериментальной части работы проведено моделирование функциональных кист яичников на крысах. Для оценки состояния яичников использовались общегистологические, морфоколичественные и иммуногистохимические методы исследования.

В клинической части работы проведено ретроспективное и проспективное исследование. Анализ результатов проводили на персональном компьютере с использованием программы IBM SPSS Statistics, v.22.0 (США).

Положения, выносимые на защиту

1. Введение бевацизумаба в дозе 0,25 мг/кг массы тела снижает экспрессию фактора роста эндотелия сосудов и ускоряет регресс функциональных кист яичников на экспериментальной модели. При этом уменьшение количества растущих фолликулов, усиление процессов атрезии и снижение экспрессии факторов овосоматического взаимодействия (BMP 15, Cx-37) в фолликулах обратимы и носят кратковременный характер.

2. Усиление экспрессии VEGF является патогенетическим фактором формирования осложненного течения функциональных кист яичников, сопровождающегося выраженным снижением показателей овариального резерва, степень которого коррелирует с количеством инвазивных вмешательств на яичниках и наличием сопутствующих воспалительных процессов в органах малого таза.

Внедрение

Результаты исследования используются в учебном процессе лечебного и педиатрического факультетов Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России, г. Томск) на кафедре гистологии, эмбриологии и цитологии в разделе «Женская половая система», на кафедре акушерства и гинекологии в разделах «Нейроэндокринные синдромы в гинекологии» и «Репродуктология».

Степень достоверности и апробация

Достоверность результатов диссертационного исследования подтверждается достаточным количеством наблюдений, современными методами исследования, которые соответствуют поставленным в работе цели и задачам. Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, подкреплены фактическими данными, наглядно представленными в приведенных таблицах и рисунках. Статистический анализ и интерпретация полученных результатов проведены с использованием современных методов обработки информации и статистического анализа.

Материалы диссертации представлены на XIV Международной научно-практической конференции European Research (Пенза, 2018), VIII съезде Научного Медицинского общества анатомов, гистологов и эмбриологов (Воронеж, 2019).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, из них 7 – в рецензируемых журналах, включенных ВАК в перечень периодических изданий, рекомендуемых к публикации основных результатов диссертационных исследований на соискание ученой степени кандидата медицинских наук.

Объем и структура диссертации

Материалы диссертации изложены на 130 страницах машинописного текста, содержат 15 таблиц, 25 рисунков. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, результатов собственных исследований (экспериментальной и клинической части), обсуждения результатов, заключения, выводов и практических рекомендаций. Список литературы включает 225 источников, в том числе 105 работ отечественных авторов и 120 – зарубежных.

Личное участие автора

Автор самостоятельно проанализировала данные литературы по теме диссертации, участвовала в сборе и обработке экспериментального и клинического материала, представленного в диссертационном исследовании, а также в статистической обработке полученных данных и подготовке научных публикаций.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальная часть

Эксперимент выполнен на кафедре гистологии, эмбриологии и цитологии (заведующий – д-р мед. наук, профессор С.В. Логвинов), на базе лаборатории биологических моделей (заведующий – доцент В.В. Иванов) ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России.

Проведены две серии экспериментов на 60 половозрелых беспородных белых крысах-самках массой тела 180–220 г. Основная группа (n = 25) – животные с моделью функциональных кист яичников и последующим введением бевацизумаба. Группа сравнения (n = 35) – животные с моделью функциональных кист яичников. Группа контроля (n=20) – интактные животные. Моделирование фолликулярных кист яичников заключалось в подкожном введении суперовуляторной дозы фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) (1,5 МЕ) (производитель - «Индустрия Фармасьютика Сероно С.п.А.», Индустриальная зона Модugno, 1-70123 Бари, Италия) в течение 7 суток 1 раз в сутки. Животным основной группы на 8-е сутки эксперимента однократно внутривенно вводили бевацизумаб (ингибитор сосудисто-эндотелиального фактора роста) в дозе 0,25 мг/кг массы тела.

Животных выводили из эксперимента на 7, 15, 30, 60-е сутки. Исследование осуществляли в соответствии с принципами Хельсинкской декларации (9-й пересмотр, Бразилия, 2013). На проведение исследования получено разрешение этического комитета ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России №4356 от 30.11.2015.

Для оценки морфологических изменений аутопсийного экспериментального материала (объект исследования – яичники крыс) был использован комплекс гистологических и гистохимических методик. Яичники фиксировали в жидкости Карнуа и 10%-м нейтральном формалине с последующей проводкой и заливкой в парафин. Депарафинизированные срезы толщиной 5–6 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, гематоксилином-пикрофуксином по Ван Гизону для выявления соединительной ткани. Для оценки морфологических изменений в яичниках проводили морфометрию в соответствии с рекомендациями Г.Г. Автандилова (1990).

Для иммуногистохимического исследования материал фиксировали в 10%-м нейтральном забуференном формалине (рН 7,4–7,6) в течение 24 ч при

комнатной температуре, затем заливали в парафин. На депарафинизированные срезы наносили блокирующий реагент (Peroxidase-Blocking Solution, Dako, Дания), после чего проводили высокотемпературную обработку срезов в СВЧ в соответствующем буферном растворе (в зависимости от протокола окрашивания к каждому конкретному антителу). На остывшие срезы раскапывали следующие антитела: VEGF, Cx-37, BMP15. Инкубацию проводили в течение ночи при температуре +4°C. Для выявления окрашивания на срезы наносили раствор диаминобензида (DAKO REAL tm EnVision™ Detection System, Дания), ядра докрасивали гематоксилином Майера.

Клиническая часть

Проведено ретроспективное изучение историй болезней 137 женщин репродуктивного возраста, находившихся на лечении в отделении репродуктивных технологий (заведующая – канд. мед. наук, доцент Ж.Ф. Гайфулина) гинекологической клиники (заведующий – канд. мед. наук, доцент В.Н. Ткачёв) ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России в 2012–2016 гг. На проведение исследования получено разрешение этического комитета ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России №4357 от 30.11.2015.

Критерии включения в исследование: 1) наличие кистозных образований яичников в анамнезе; 2) хирургическая агрессия на яичники в анамнезе: резекция, цистэктомия, электрокоагуляция, термокаутеризация, параовариоцистэктомия, овариолизис, дреллинг, пункция кист при кульдоцентезе; 3) бесплодие (комбинированное, сочетанное); 4) репродуктивный возраст (18–45 лет); 5) наличие информированного согласия пациентки на участие в исследовании.

Критерии исключения из исследования: 1) несоответствие критериям включения; 2) истинные доброкачественные опухоли яичников; 3) врожденная гиперплазия коры надпочечников (ВГКН); 4) прием глюкокортикоидов; 5) предраковые и злокачественные заболевания органов репродуктивной системы; 6) наружный генитальный эндометриоз; 7) соматическая патология в стадии субкомпенсации и декомпенсации; 8) заболевания щитовидной железы, не скорректированные медикаментозно; 9) системные и аутоиммунные заболевания; 10) отказ пациентки от участия в исследовании.

Основную группу составили 53 пациентки, у которых, согласно мнения экспертов ESHRE, имелись, как минимум, два из трех критериев потенциально

бедного ответа: 1) возраст 40 лет и старше либо любой другой фактор риска бедного ответа (резецированные яичники и т.д.); 2) бедный ответ на стандартную (обычную) стимуляцию яичников в анамнезе (не более трех овоцитов при использовании стандартного протокола стимуляции); 3) снижение показателей маркеров овариального резерва, таких как АФК 5–7 фолликулов и (или) антимюллеров гормон 0,5–1,1 нг/мл.

Группа сравнения была сформирована из 84 женщин, не отвечающих вышеперечисленным критериям.

Исследуемые группы были разделены на подгруппы согласно возрастному критерию: А – раннего репродуктивного возраста (18–34 года), Б – позднего репродуктивного возраста (35–45 лет).

Контрольная группа состояла из 15 условно здоровых женщин, обратившихся на консультацию по поводу планирования беременности и не имеющих в анамнезе операций на органах малого таза.

С целью оценки гормонального статуса и анализа овариального резерва у пациенток учитывали содержание в крови концентраций гормонов на 2–3-й день менструального цикла за месяц до проведения контролируемой индукции овуляции. Также оценивались показатели ультразвукового исследования (УЗИ) органов малого таза.

Клиническое исследование проведено в соответствии с национальным стандартом ГОСТ Р 52379-2005 «Надлежащая клиническая практика», идентичным ICH GCP (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use; Good Clinical Practice).

Статистическая обработка и анализ данных

Статистическую обработку полученных результатов выполняли на персональном компьютере с использованием программы SPSS Statistics v.22.0. Данные анализировали методами дескриптивной статистики. В случае нормального распределения данные оценивали с помощью параметрического метода (t-критерий Стьюдента). При распределении значений показателей, не соответствующих нормальному, применяли непараметрический метод (U-критерий Манна-Уитни). Анализ качественных независимых данных проводили с использованием χ^2 Пирсона или точного критерия Фишера (при ожидаемой частоте значения меньше 5).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологические изменения яичников крыс при введении фолликулостимулирующего гормона

При гистологическом исследовании яичников на 7-е сутки введения ФСГ выявлялись однокамерные кисты диаметром 0,7–2,5 мм, с гладкой блестящей поверхностью, тонкими стенками. Количество кист в срезе составляло 6,0 (4,0–8,0). Стенка кист на этой стадии развития была выстлана уплощенными гранулезными клетками. Наблюдались признаки атрофии, дегенерации или распада гранулезы. Обнаруживались вторичные фолликулы с очаговым отеком цитоплазмы овоцита, явлениями дисконфлексии фолликулярного эпителия.

На 15-е сутки визуализировались ретенционные полости диаметром 1,1–2,5 мм. В полостях определялось гомогенное эозинофильное содержимое. Овоциты в кистозных полостях не обнаруживались. В большей части кист наблюдались дисконфлексия, кариопикноз и кариорексис в клетках фолликулярного эпителия. Стенки кистозных полостей истончались, замещались соединительно-тканными прослойками. Встречались разрывы ретенционных полостей. Увеличивалось количество атретических фолликулов и тел. Обнаруживались неизменные фолликулы, вступающие в стадию роста, примордиальные фолликулы. Встречались единичные желтые тела.

К 30-м суткам яичники уменьшались в размере до 6–7 мм, размеры ретенционных образований не превышали 1 мм. По мере увеличения срока эксперимента уменьшалось количество кистозных образований, однако они обнаруживались вплоть до 60-х суток эксперимента.

Во все сроки эксперимента определялись фолликулы с признаками атрезии, овоциты в которых были дегенеративно изменены в виде отека цитоплазмы. Фолликулярные эпителиоциты имели признаки деструкции в виде дисконфлексии, изменения формы, кариопикноза и кариорексиса. После введения ФСГ на 7-е и 15-е сутки выявлялись нарушения гемодинамики в виде гиперемии и полнокровия сосудов мозгового вещества и в стенках кист.

Удельный объем и количество желтых тел снижалось, начиная с 7-х суток эксперимента. Это связано с нарушением процессов фолликулогенеза и отсутствием лютеинизации фолликулов, большая часть которых превращалась в фолликулярные кисты. Восстановление количества желтых тел не

происходило до 60-х суток эксперимента, однако отмечалась тенденция к увеличению их количества на 30-е сутки.

Таким образом, ФСГ действует на фолликулоциты растущих фолликулов, способствуя их пролиферации. Стенка фолликулярной кисты на раннем этапе формирования состоит из 5–10 слоев гранулезных гормонопродуцирующих клеток. В дальнейшем дегенеративные процессы в стенке прогрессируют, внутренняя эпителиальная выстилка капсулы кисты истончается и замещается соединительной тканью.

Морфоколичественные изменения яичников крыс с экспериментальными функциональными кистами при введении бевацизумаба

Гистологическая картина срезов яичников крыс основной группы отличалась от таковой в группе сравнения. Введение бевацизумаба животным с экспериментальными функциональными кистами вызывало уменьшение количества и удельного объема кист.

На 15-е сутки эксперимента при аутопсии обнаруживались уменьшение размеров яичников, исчезновение характерной бугристости, белесоватый оттенок поверхности. Иногда отмечалось локальное истончение белочной оболочки. Выявлялись однокамерные кисты диаметром 0,6–1,5 мм, с тонкими стенками, содержащие прозрачный секрет. Количество кист в срезе составляло 2,0 (1,0–3,0). Стенка функциональных кист была выстлана уплощенными гранулезными клетками, в которых наблюдались признаки атрофии и дегенерации. В яичниках животных наблюдались единичные желтые тела. Редко обнаруживались фолликулы, овоциты в которых были дегенеративно изменены в виде отека цитоплазмы, снижения ее сродства к красителю. Фолликулярные эпителиоциты в таких фолликулах имели признаки деструкции в виде дисконфлексии, изменения формы, кариопикноза и кариорексиса.

На 30-е сутки эксперимента в яичниках животных основной группы больших кистозных полостей не отмечалось. Выявлялись единичные ретенционные образования на стадии регресса, размер которых, как правило, не превышал 1 мм. Стенка кист была представлена соединительной тканью. Реже встречались атретические фолликулы. Обнаруживались неизмененные растущие фолликулы и желтые тела.

На 60-е сутки эксперимента функциональные кисты в яичниках животных основной группы не обнаруживались.

Количество и удельный объем кист в яичниках крыс основной группы во все сроки эксперимента были меньше, чем в группе сравнения. Введение бевацизумаба вызывало снижение васкуляризации теки фолликулов и желтых тел и приближение удельного объема сосудов к значениям контрольной группы на 15-е сутки.

Таким образом, введение бевацизумаба животным с экспериментальными функциональными кистами вызывало уменьшение количества и удельного объема кист. Количество и удельный объем растущих и атретических фолликулов, а также желтых тел, не отличались от таковых у животных группы сравнения в аналогичные сроки эксперимента, а к 60-м суткам были сопоставимы с таковыми у интактных животных.

Результаты иммуногистохимического исследования экспрессии BMP15, Cx-37, VEGF при формировании экспериментальных функциональных кист яичников и при их лечении

С применением методики иммуногистохимического анализа в яичниках дифференцированы маркеры взаимодействия овоцита и клеток гранулезы (BMP 15, Cx-37), а также фактор ангиогенеза VEGF. Экспрессия изучаемых факторов при моделировании ФКЯ оказывалась типичной. Для оценки степени экспрессии и ее изменения у животных сравниваемых групп применялась методика H-score. Экспрессия BMP 15 выявлялась в овоцитах, фолликулоцитах яйценосного бугорка, тека-клетках, стромальных клетках коркового вещества, лютеоцитах желтого тела, поверхностных эпителиоцитах.

Экспрессия BMP 15 в овоцитах примордиальных (ПФ) и первичных фолликулов (ПРФ), а также в овоцитах растущих фолликулов с начальными признаками атрезии, в которых половая клетка была сохранна, была наиболее выраженной, в овоцитах вторичных (ВРФ) и третичных фолликулов (ТРФ) – наименее выраженной. Фолликулярный эпителий окрашивался менее интенсивно, экспрессия усиливалась соответственно стадии развития фолликулов.

На 7-е сутки введения ФСТ увеличивалась интенсивность иммуноокраски овоцитов всех типов фолликулов. В ПФ повышалась интенсивность окраски эпителиоцитов гранулезы, в ВРФ и ТРФ изменений не обнаруживалось.

К 15-м суткам эксперимента экспрессия BMP 15 снижалась во всех типах фолликулов, а к 30-м соответствовала таковой в контроле.

В основной группе на 15-е сутки эксперимента экспрессия BMP 15 в овоцитах всех типов растущих фолликулов снижалась, не демонстрируя отличий от группы контроля. К 30-м суткам усиление экспрессии сохранялось только в ПФ и ПРФ, в то время как в ВРФ и ТРФ значения соответствовали таковым в группе контроля.

Экспрессия Cx-37 была выявлена в овоцитах, *zona pellucida*, висцеральных фолликулоцитах, клетках кумулюса, отдельных лютеоцитах и эндотелиоцитах сосудов яичников крыс. Овоциты окрашивались более интенсивно, чем фолликулоциты. Динамика изменения интенсивности экспрессии Cx-37 в овоцитах и фолликулоцитах соответствовала стадии развития фолликулов. Овоциты окрашивались более интенсивно, чем фолликулоциты. Экспрессия Cx-37 усиливалась в конце преантральной стадии. Фолликулы антральной и преовуляторной стадий (ВРФ и ТРФ) окрашивались диффузно, что связано с неравномерной иммулокализацией маркера в фолликулоцитах, снижением экспрессии фактора в овоците. При моделировании ФКЯ с помощью введения ФСГ отмечалась волнообразная динамика окрашивания овоцитов, аналогичная таковой в контроле, более выраженная в овоцитах ВРФ и ТРФ на 7-е сутки эксперимента. Фолликулярный эпителий ПРФ окрашивался слабее контроля. В срок с 15-х по 30-е сутки экспрессия белка щелевого взаимодействия в овоцитах не отличалась от таковой в контроле, однако снижение иммунной окраски в фолликулоцитах отмечалось до 30-х суток эксперимента. В яичниках животных основной группы экспрессия Cx-37 не отличалась от таковой в контрольной группе. К 15-м суткам эксперимента интенсивность иммуноокраски в овоцитах усиливалась, демонстрируя значимые отличия от группы сравнения. В фолликулоцитах наблюдалось усиление экспрессии маркера, эффект прослеживался также на 30-е сутки эксперимента.

Экспрессия VEGF проявлялась в виде коричневого окрашивания мембраны и цитоплазмы фолликулоцитов и клеток эндотелия. Выявлена высокая частота положительной экспрессии VEGF в эндокриноцитах функциональных кист яичника. Иммунопозитивное окрашивание слабой и умеренной интенсивности наблюдалось на поверхности овоцитов (мембранное)

и лютеоцитах желтого тела. На 7-е сутки моделирования ФКЯ экспрессия фактора была максимально выраженной в фолликулоцитах растущих фолликулов, с 15-х суток экспрессия VEGF не отличалась от таковой в контроле. Экспрессия маркера в эндотелиоцитах на 30-е сутки также не отличалась от контроля.

Таким образом, при моделировании ФКЯ на 7-е сутки введения рекомбинантного ФСГ выявлено повышение экспрессии BMP 15 в овоцитах во всех типах растущих фолликулов и Cx-37 в антральных фолликулах. К 15-м суткам эксперимента экспрессия BMP 15 была наиболее выражена в овоцитах растущих фолликулов, появлялась в примордиальных, снижалась в фолликулах с признаками атрезии, в которых половая клетка была сохранна. В фолликулоцитах первичных фолликулов наблюдалось снижение экспрессии Cx-37, усиление экспрессии BMP 15. Фолликулярные эпителиоциты практически всех типов фолликулов демонстрировали снижение иммунной окраски BMP 15. На 30-е сутки эксперимента высокая экспрессия BMP 15 сохранялась в овоцитах первичных фолликулов. Введение ингибитора сосудисто-эндотелиального фактора роста вызывало уменьшение количества и удельного объема кист, снижение экспрессии VEGF и приближение удельного объема сосудов и экспрессии VEGF к значениям контрольной группы на 15-е сутки. В эндотелиоцитах отличия от группы сравнения фиксировались на 15-е и 30-е сутки эксперимента. Экспрессия BMP 15 в основной группе на 15-е сутки эксперимента в овоцитах всех типов растущих фолликулов снижалась, не демонстрируя отличий от таковой в группе сравнения. К 30-м суткам экспрессия BMP 15 и Cx-37 не отличалась от показателей группы интактного контроля.

Клинико-лабораторная характеристика пациенток с бесплодием и оперативным лечением функциональных кист яичников в анамнезе

Пациентки с потенциально бедным ответом составили основную группу исследования (53 женщины, 38,7%). Группу сравнения составили 84 женщины (61,3%) с хорошим ответом на контролируруемую индукцию овуляции.

Средний возраст пациенток раннего репродуктивного возраста составил ($30,2 \pm 3,0$) года, пациенток позднего репродуктивного возраста – ($37,0 \pm 2,5$) года. Статистический анализ не выявил различий между пациентками основной группы и группы сравнения в каждой возрастной категории.

Обильные маточные кровотечения (МК) и межменструальные МК наблюдались у каждой третьей пациентки. Аномальные МК в виде межменструальных МК, а также олигоменорея чаще встречались у пациенток основной группы.

У женщин основной группы в анамнезе было меньше беременностей и родов. Артифициальный аборт в анамнезе отмечен у 27 (19,7%) пациенток. Спонтанные аборты отмечены у 31 женщины (22,6%), чаще в основной группе позднего репродуктивного возраста. Внематочную беременность имели в анамнезе 26 женщин (18,9%).

Пациентки основной группы и группы сравнения в анамнезе имели операции на яичниках. Осложненное течение ФКЯ наблюдалось у 44 (32,1%) женщин, чаще в основной группе (IA–IIA $p < 0,001$; IB–IIB $p = 0,003$).

Операции лапароскопическим доступом выполнены у 132 (96,4%) пациенток, лапаротомическим – у 5 (3,6%). Параовариальные кисты были обнаружены у 6 (4,4%) пациенток.

Цистэктомия была выполнена 90 пациенткам (65,7%), адгезиолизис – 75 (54,7%), резекция яичника – 41 (29,9%), сальпингоовариолизис – 39 (28,5%), электрокоагуляция – 22 (16,1%), биопсия яичника – 14 (10,2%), пункция кисты – 13 (9,5%), эндотермокаутеризация – 8 (5,8%), параовариоцистэктомия – 8 (5,8%), дреллинг – 6 пациенткам (4,4%). Операции на маточных трубах в анамнезе были проведены у 61 женщины (44,5%), миомэктомия – у 16 (11,7%). Восемь пациенток (5,8%) перенесли аппендэктомию. В основной группе пациенткам чаще выполнялись повторные операции на органах малого таза. Девять женщин перенесли два оперативных вмешательства по поводу рецидивирующих кист яичников, шесть пациенток – три операции. С момента вмешательства прошло в среднем 4,5 (1,0–13,5) года.

Частота сопутствующей гинекологической патологии, выявленной при УЗИ, лапароскопии и гистероскопии, составила 60,6% (83 случая). При проведении лечебно-диагностической лапароскопии у 92 (67,1%) пациенток был установлен хронический сальпингит, у 6 (4,4%) – диагностирована параовариальная киста. Миома матки обнаружена при УЗИ и лечебно-диагностической лапароскопии у 20 (14,6%) женщин. Хронический эндометрит был гистологически подтвержден в 57 случаях (41,6%). Спаечный процесс в малом тазу и хронический сальпингит чаще диагностировались у пациенток

основной группы. По результатам хромогидротубации, нарушение проходимости маточных труб в виде полной либо частичной облитерации установлено у 20 (14,6%) пациенток.

В сравнении с контрольной группой отмечались следующие статистически значимые различия: повышение концентрации ФСГ, снижение концентраций прогестерона и тестостерона, как в основной, так и в группе сравнения. Отношение показателей ЛГ/ФСГ более 1,5 было выявлено у 11 пациенток, статистический анализ не выявил значимых различий между группами ($p > 0,05$).

У пациенток основной группы было выявлено статистически значимое повышение концентраций ФСГ и снижение АМГ ($p < 0,001$ во всех сравниваемых группах). Концентрация ингибина В статистически значимо отличалась в исследуемых группах только у пациенток раннего репродуктивного возраста ($p = 0,04$).

При анализе не выявлено статистически значимых различий в суммарном объеме яичников в исследуемых группах. У пациенток основной группы значения фолликулярного антрального счета (ФАС) были статистически значимо ниже, чем в группе сравнения ($p < 0,001$).

Было определено количество пациенток с экстремальными значениями гормональных и ультразвуковых маркеров овариального резерва в исследуемых группах. В основной группе количество женщин с концентрацией ФСГ >10 мМЕ/мл, АМГ $<1,1$ нг/мл, ФАС <7 было статистически значимо выше, чем в группе сравнения ($p < 0,001$). Количество пациенток с объемом яичников менее 8 см^3 было больше в основной группе раннего репродуктивного возраста. Статистический анализ не выявил статистически значимых изменений в количестве пациенток с концентрацией ингибина В менее 45 пг/мл в исследуемых группах ($p > 0,05$).

У пациенток основной группы наблюдалось снижение количества пунктированных фолликулов и полученных ооцитов, в отличие от таковых в группе сравнения. Статистический анализ продемонстрировал, что пациентки основной группы имели сниженную чувствительность яичников. Бедный ответ яичников на стимуляцию статистически значимо чаще наблюдался у пациенток основной группы, что обусловлено дизайном исследования.

В основной группе пациенток доля перенесенных эмбрионов ($\chi^2 = 8,7$; $p = 0,009$ IA–IB) и доля беременностей ($\chi^2 = 15$; $p = 0,003$ IA–IB) в программах вспомогательных репродуктивных технологий была статистически значимо ниже у женщин основной группы в возрасте старше 35 лет. Доля беременностей на начатый цикл в позднем репродуктивном возрасте составила в основной группе 50%, в группе сравнения – 73% ($p = 0,002$). В позднем репродуктивном возрасте в основной группе доля переноса эмбрионов была статистически значимо ниже, чем в группе сравнения ($p = 0,002$). Перенос эмбрионов был отменен в связи с отсутствием оплодотворения у 10 (18,9%) пациенток основной группы и у 13 (15,5%) пациенток группы сравнения.

Таким образом, для формирования потенциально бедного ответа на стимуляцию с характерными показателями сниженного овариального резерва (повышение концентрации ФСГ, снижение концентрации АМГ и ФАС) значимыми факторами являются: операции на яичниках, повторные хирургические вмешательства не только на яичниках, но и на других органах малого таза (матка, маточные трубы), воспалительные процессы (спаечный процесс, сальпингит). Установлено, что выраженность снижения овариального резерва выше при осложненном клиническом течении ФКЯ.

Морфологическое и иммуногистохимическое исследование операционного материала, полученного при цистэктомии

В исследование вошли 25 пациенток, перенесших оперативное лечение по поводу функциональных кист яичников. Во всех случаях была проведена лапароскопия, цистэктомия.

При гистологическом исследовании операционного материала были выявлены кистозные образования яичников, представленные опухолеподобными процессами. Так, в 12 случаях определялась фолликулярная киста, в 8 случаях – киста желтого тела, в 5 случаях – простая киста. В большинстве случаев были отмечены кровоизлияния в стенку фолликулярной кисты и кисты желтого тела.

Иммуногистохимическое исследование проводилось на операционном материале ткани яичников пациенток, перенесших оперативное вмешательство в объеме цистэктомии по поводу функциональных кист. Белок VEGF – один из основных стимуляторов ангиогенеза – определялся в 17 случаях у пациенток основной группы (94,4%). Активность сосудистого фактора роста VEGF

проявлялась в виде коричневого окрашивания мембраны и цитоплазмы фолликулоцитов и эндотелиальных клеток. Выявлена высокая частота положительной экспрессии VEGF в гранулезных, тека- и лютеиновых клетках функциональных кист яичника: фолликулярных – 83,3%, кист желтого тела – 100%.

Экспрессия VEGF в цитоплазме эндотелиальных клеток в 60,7% случаев в основной группе была высокой и составляла 80–100%. Иммуногистохимическая реактивность VEGF в эпителиальных клетках была ограничена мембраной и цитоплазмой. Степень экспрессии белка VEGF статистически значимо повышалась при наличии разрыва и кровоизлиянии в стенку кисты ($p = 0,001$).

Представленные результаты показали, что у пациенток основной группы экспрессия VEGF отмечена в клетках фолликулярных кист и кист желтого тела яичника, при этом частота экспрессии этого маркера была высокой. Выраженность экспрессии белка VEGF заметно повышалась при наличии разрыва и кровоизлиянии в стенку кисты.

ВЫВОДЫ

1. Моделирование экспериментальных функциональных кист яичников у белых крыс путем введения ФСГ в дозе 1,5 МЕ в течение 7 суток вызывает увеличение содержания растущих фолликулов и сопровождается усилением экспрессии костного морфогенетического протеина-15 и коннексина-37, активацией процессов ангиогенеза с усилением экспрессии фактора роста эндотелия сосудов в стенке кисты.

2. Введение бевацизумаба приводит к снижению экспрессии фактора роста эндотелия сосудов в стенке кисты и ускоряет регресс функциональных кист яичников в эксперименте.

3. Выявленное снижение количества растущих фолликулов, усиление процессов атрезии в фолликулах и снижение экспрессии факторов овосоматического взаимодействия при введении бевацизумаба крысам с экспериментальными функциональными кистами имеют кратковременный характер.

4. Степень выраженности снижения овариального резерва у женщин коррелирует с количеством инвазивных вмешательств на яичниках, а также с

сопутствующими воспалительными процессами органов малого таза в виде спаечного процесса 3-й и 4-й степени, хронического сальпингита.

5. Гиперэкспрессия белка VEGF наблюдается при наличии разрыва и кровоизлияния в стенку функциональной кисты. Наиболее выраженное снижение овариального резерва наблюдается при осложненном клиническом течении функциональных кист яичников (разрыв, кровоизлияние).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Пациенткам с функциональными кистами яичников, особенно при рецидивирующем течении, нереализованными репродуктивными планами, инвазивными вмешательствами на органах малого таза в анамнезе, целесообразно проводить иммуногистохимическое исследование операционного материала (определение экспрессии VEGF) с целью прогнозирования риска снижения овариального резерва и нарушения фертильности.

2. Пациенткам с рецидивирующими клинически осложненными функциональными кистами яичников показано догравидарное применение гормональной контрацепции.

3. Пациенткам с бесплодием и наличием операций по поводу кист яичников в анамнезе показаны сегментированные циклы ЭКО.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Трус, Д.А. Моделирование функциональных кист яичников путем введения фолликулостимулирующего гормона / Д.А. Трус, О.А. Тихоновская, А.О. Огороков, Л.Р. Мустафина, О.С. Тимофеева, С.В. Логвинов, А.В. Герасимов, Е.Ю. Варакута, А.В. Потапов, Г.А. Суханова // Бюллетень сибирской медицины. – 2017. – Т. 16, №3. – С. 137–144.

2. Волченков, Д.А. Влияние бевацизумаба на регресс экспериментальных функциональных кист / Д.А. Волченков, О.А. Тихоновская, А.О. Огороков, Л.Р. Мустафина, О.С. Тимофеева, С.В. Логвинов // Сибирское медицинское обозрение. – 2018. – №3. – С. 88–92.

3. Волченков, Д.А. Изменения паракринной регуляции межклеточных взаимодействий в патогенезе функциональных кист яичников / Д.А. Волченков, О.А. Тихоновская, Л.Р. Мустафина, С.В. Логвинов // Врач – аспирант. – 2018. – №5. – С. 90–94.

4. Волченоч, Д.А. Состояние овариального резерва у пациенток с функциональными кистами яичников / Д.А. Волченоч, О.А. Тихоновская, И.А. Петров, С.В. Логвинов, А.Д. Мунгалова // Journal of Siberian Medical Sciences. – 2019. – №1. – С. 18–27.
5. Волченоч, Д.А. Экспрессия факторов паракринной регуляции в яичниках крыс при коррекции экспериментальных функциональных кист яичников / Д.А. Волченоч, О.А. Тихоновская, Л.Р. Мустафина, С.В. Логвинов // Journal of Siberian Medical Sciences. – 2019. – №1. – С. 67–77.
6. Волченоч, Д.А. Влияние ингибитора сосудисто-эндотелиального фактора роста на регресс экспериментальных функциональных кист / Д.А. Волченоч, О.А. Тихоновская, Л.Р. Мустафина, С.В. Логвинов // Морфология. Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 2019. – Т. 155, №2. – С. 64.
7. Волченоч, Д.А. Экспрессия сосудисто-эндотелиального фактора роста при формировании функциональных кист яичников у женщин / Д.А. Волченоч, О.А. Тихоновская, С.В. Логвинов // Морфология. Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 2019. – Т. 155, №2. – С. 64.
8. Волченоч, Д.А. Роль факторов паракринной регуляции в патогенезе функциональных кист яичников / Д.А. Волченоч, Л.Р. Мустафина // Морфология. Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 2019. – Т. 155, №2. – С. 64.
9. Волченоч, Д.А. Роль фолликулостимулирующего гормона в нарушениях фолликулогенеза при формировании функциональных кист яичников / Д.А. Волченоч, О.А. Тихоновская, С.В. Логвинов // EUROPEAN RESEARCH: сборник статей XIV Международной научно-практической конференции. В 2 ч. Ч. 1. – Пенза: МЦНС «Наука и Просвещение». – 2018. – С. 148–150.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АМГ – антимюллеров гормон

ВГКН – врожденная гиперплазия коры надпочечников

ВРФ – вторичные фолликулы

ЛГ – лютеинизирующий гормон

ПФ – примордиальные фолликулы

ПРФ – первичные фолликулы

ТРФ – третичные фолликулы

УЗИ – ультразвуковое исследование

ФАС – фолликулярный антральный счет

ФКЯ – Функциональные кисты яичников

ФСГ – фолликулостимулирующий гормон

ВМР 15 – костный морфогенетический белок 15

Сх-37 – коннексин 37

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов