

АНАЛИЗ ГОРМОНАЛЬНОЙ ФУНКЦИИ, БАЛАНСА ПРОЦЕССОВ ПРОЛИФЕРАЦИИ И АПОПТОЗА В ЯИЧНИКАХ У ЖЕНЩИН С ТРУБНО-ПЕРИТОНЕАЛЬНЫМ БЕСПЛОДИЕМ

Л.Ф. Зайнетдинова
ЧГМА, г. Челябинск

У женщин с трубно-перитонеальным бесплодием в первую фазу менструального цикла установлен дефицит продукции эстрогенов, рост числа клеток яичника, экспрессирующих маркеры пролиферации (PCNA и Ki67) без колебаний уровня экспрессии p53 в половых железах женщин.

Ключевые слова: трубно-перитонеальное бесплодие, половые гормоны, пролиферация, апоптоз.

Введение. Трубно-перитонеальное бесплодие (ТПБ) характеризуется анатомо-функциональными нарушениями маточных труб с развитием спаечного процесса в полости малого таза, в 65 % случаев развивающегося вследствие хронического воспалительного процесса в женских половых органах [1, 3]. Вовлечение в воспалительный процесс яичников, развитие фиброзных спаек на их поверхности приводят к нарушению фолликулогенеза, овуляции и секреции половых гормонов у этих пациенток [2]. Стандартным методом оценки гормональной функции яичников является определение количества вырабатываемых в них стероидных гормонов (эстрадиола, прогестерона, тестостерона) в крови для проведения последующей корригирующей гормональной терапии. Однако не всегда введение половых гормонов приводит у пациенток с ТПБ к нормализации функции яичников. Одной из причин может быть отсутствие связи между уровнем гормонов крови и реакцией на них со стороны рецепторного аппарата яичников в условиях хронического воспаления и спаечных изменений в них. При длительно текущем хроническом воспалительном процессе в половых органах женщин при ТПБ могут также происходить изменения баланса процессов апоптоза и пролиферации клеток женских гонад, зависящих от состояния эндокринной и нитроксидергической регуляции.

Цель исследования: анализ гормональной функции, баланса процессов пролиферации и апоптоза в яичниках и нитроксидергической регуляции у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием.

Материалы и методы исследования. Основную группу исследования составили 50 пациенток с ТПБ на фоне верифицированного гистологически хронического воспаления в репродуктивных органах. Все женщины находились на диспансерном наблюдении в Областном центре планирования семьи и репродукции. Длительность бесплодия до 3 лет была у 14 (28 %), до 5 лет – у 28 (56 %), более 5 лет – у 8 (16 %). Средний возраст пациенток составил $27,0 \pm 2,3$ лет. Нарушения со стороны

менструальной функции в анамнезе отметили 38 (76 %) женщин. У 13 (26 %) наблюдалась гиперполименорея, у 8 (16 %) – гипоменорея при сохранении 28-дневного цикла, у 5 (10%) гипоменструальный синдром, 17 (34 %) женщин имели место мажущие выделения от 3 до 7 дней до и после менструации, дисменорея наблюдалась у 14 (28 %) женщин, метроррагии – у 4 (8 %). В гинекологическом отделении клиники ЧГМА всем пациенткам была проведена манипуляционно-диагностическая лапароскопия с биопсией ткани яичников для иммуногистохимического исследования. В день поступления в стационар производили забор венозной крови для определения конечных стабильных метаболитов оксида азота уровня sFas. Группу контроля для анализа показателей крови составили 25 здоровых женщин (средний возраст $23,5 \pm 1,3$ лет).

Количественное содержание гормонов в сыворотке крови (общего тестостерона, прогестерона, эстрадиола) у пациенток определяли методом ИФА с помощью реактивов фирмы Immunotech (Франция). Определение эстрадиола и тестостерона проводили на 5–7 день, а прогестерона – на 20 день менструального цикла.

Определение количества клеток яичника, экспрессирующих рецепторы к эстрогенам, прогестерону и андрогенам, проводили с помощью тест-систем: «Нафтол AS-MX-фосфат Free acid (№4875 Sigma)» (USA); «RTU-ER-6F11»; «RTU-PGR-1A6». Экспрессию белков Ki67, PCNA и p53 в гистологических срезах из яичников проводили иммуногистохимическим методом с применением тест-систем: «RTU-Ki-67-MM1», «NCL-L-PCNA» (Novocastra, Великобритания); «AM256-2M (clone F39.4.1) (BioGenex, USA), и системы мечения Immune-mark (ICN) в парафиновых гистологических срезах. Результаты иммуногистохимической реакции с антителами против рецепторов к эстрогенам, прогестерону и андрогенам оценивали путем подсчета объемной плотности (об. %) ядер клеток с положительной иммуногистохимической реакцией в гистологическом препарате, а резуль-

тат реакции с антителами к Ki67, PCNA и p53 выражали количеством клеток на 1 мм².

Уровень продукции эндогенного оксида азота оценивали по концентрации конечных стабильных метаболитов оксида азота в сыворотке крови по модифицированному методу Griess (Э.Н. Коробейникова, 2002).

Растворимый Fas (sFas) определяли в сыворотке крови пациенток иммуноферментным методом с помощью тест-системы Austria. Beuder Med Systems Gimble numan sAPO 1|Fas BMS 245 LOT 335 35230, регистрация результатов – на «Multiscan Plus» (LabSystem) при длине волны 450 нм.

Статистическая обработка материала произведена с применением пакета прикладных программ STATISTICA for Windows версия 6.0 фирмы StatSoft Inc. (США). Для сравнения количественных признаков применялись параметрические и непараметрические методы.

Результаты исследования. Данные определения уровня стероидных гормонов яичников в сыворотке крови у женщин с ТПБ представлены в табл. 1.

рактик экспрессии рецепторов к ним в тканях яичника, т.к. снижение продукции гормона может сопровождаться изменением количества рецепторов к ним, способных воспринимать эндокринный сигнал, участвовать в обеспечении обратной связи между уровнем гормона в крови и функцией яичника. Результаты определения количества клеток яичника, экспрессирующих рецепторы к эстрадиолу, прогестерону и андрогенам, приведены в табл. 2.

При параллельном определении объемной плотности ядер клеток в яичнике, экспрессирующих рецепторы к эстрогенам, прогестерону и андрогенам в пролиферативную фазу менструального цикла у женщин с ТПБ, достоверных различий с показателями секреторной фазы менструального цикла по этим показателям не обнаружено, хотя в фазе секреции все приведенные в таблице показатели несколько ниже, чем в фазе пролиферации. Вместе с тем, хотя соотношение клеток яичника, экспрессирующих рецепторы к эстрогенам и прогестерону в фазе пролиферации по отношению к

Уровень половых гормонов в сыворотке крови женщин с ТПБ в разные фазы менструального цикла

Таблица 1

Показатель	Основная группа				Контроль		P
	Фаза пролиферации n = 42		Фаза секреции n = 34		Me	Q25–Q75	
	Me	Q25–Q75	Me	Q25–Q75			
Эстрадиол, пг/мл	62,1	44,6–75,9	–	–	235	198–284	0,001
Тестостерон общий, нг/дл	2,2	1,9–3,0	–	–	2,5	2,1–3,4	0,2
Прогестерон, нг/мл	–	–	6,06	4,5–9,78	10,3	6,9–12,4	0,3

Объемная плотность ядер клеток яичника, экспрессирующих рецепторы к стероидным гормонам у женщин с ТПБ, %

Таблица 2

Показатель	Фаза пролиферации n = 42	Фаза секреции n = 34		P
	M ± m	M ± m		
К эстрогенам	3,22 ± 0,90	2,50 ± 0,60	1,28	0,5
К андрогенам	2,90 ± 1,50	0,33 ± 0,10	8,78	0,1
К прогестерону	3,60 ± 0,67	2,40 ± 0,60	1,5	0,5

Как видно из табл. 1, у женщин с ТПБ имеется значительное снижение уровня эстрадиола в крови в I фазу менструального цикла в сравнении со здоровыми женщинами репродуктивного возраста (62,1 пг/мл и 235 пг/мл соответственно). По показателям прогестерона во II фазе цикла достоверных различий с контрольной группой не получено. Количество общего тестостерона фактически не отличалось от показателей контрольной группы. Полученные данные свидетельствуют о дефиците продукции эстрогенов у женщин с ТПБ.

Функцию яичника характеризует не только уровень продукции половых гормонов, но и ха-

рактик экспрессии рецепторов к ним в тканях яичника, т.к. снижение продукции гормона может сопровождаться изменением количества рецепторов к ним, способных воспринимать эндокринный сигнал, участвовать в обеспечении обратной связи между уровнем гормона в крови и функцией яичника. Результаты определения количества клеток яичника, экспрессирующих рецепторы к эстрадиолу, прогестерону и андрогенам, приведены в табл. 2.

Изменение гормональной функции гонад может определяться также балансом процессов пролиферации и апоптоза клеток яичников. Мы определяли в биоптатах яичников, полученных при манипуляционно-диагностической лапароскопии, маркеры пролиферации (PCNA, Ki67) и проапоптогенный фактор (p53), влияющие на апоптоз различных клеток. Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3

Количество клеток яичников с маркерами пролиферации, апоптоза у женщин с ТПБ в разные фазы менструального цикла на 1 мм²

Показатель	Фаза пролиферации менструального цикла n = 15	Фаза секреции менструального цикла n = 10	P
	M ± m	M ± m	
Ki67	876,9 ± 50,7	740,6 ± 32,1	0,05
PCNA	863,3 ± 28,8	666,5 ± 53,7	0,001
p53	757,2 ± 48,8	708,8 ± 43,3	0,7

Таблица 4

Уровень конечных стабильных метаболитов оксида азота у женщин с ТПБ

Показатель	Пациентки с ТПБ n = 35		Контрольная группа n = 25		P
	Me	Q25–Q75	Me	Q25–Q75	
NO ₂	5,6	3,87–12,5	4,39	3,21–6,3	0,1
NO _x	20,1	17,3–30,2	14,85	12,3–22,1	0,04
NO ₃	14,5	10,9–19,53	12,185	5,17–18,89	0,3

Число клеток фолликулов яичника, экспрессирующих маркеры PCNA и Ki67 в фазу пролиферации, оказалось достоверно выше, чем в фазу секреции. Эта закономерность особенно характерна для экспрессии ядерного белка PCNA. Существенных колебаний в течение менструального цикла уровня проапоптогенного фактора p53 не было обнаружено. По данным авторов [4, 5], с экспрессией p53 связан апоптоз клеток гранулезы, который запускается только в гранулезных клетках зрелого, преовуляторного фолликула. Апоптоз клеток яичника контролируют мембранный Fas-рецептор и его лиганд FasL, а также растворимые молекулы Fas и FasL. Fas-антиген является медиатором апоптоза при регрессии желтого тела и фолликулярной атрезии [6]. При обследовании пациенток с ТПБ достоверных различий в уровне растворимого Fas-рецептора сыворотки крови в сравнении с группой здоровых женщин репродуктивного возраста не выявлено; у пациенток количество рецептора в крови составляло 57,4 пкг/мл, а у здоровых женщин 59,1 (p = 0,8).

Исследование конечных стабильных метаболитов оксида азота, оказывающих влияние на апоптоз различных клеток, у женщин с ТПБ в сопоставлении с группой здорового контроля без учета фазы менструального цикла представлено в табл. 4.

Как видно из представленных в таблице данных, у пациенток с ТПБ в сыворотке крови достоверно повышен уровень суммарных конечных метаболитов оксида азота (NO_x). Изменение уровня NO, являющегося универсальным внутриклеточным мессенджером, может быть связано с активацией секреторной функции макрофагов и эндотелиоцитов. Общеизвестно, что накопление оксида азота оказывает, с одной стороны, провоспалительный эффект на окружающие ткани, а с другой – влияет на процессы апоптоза клеток. По данным авторов [4], оксид азота подавляет FasL-зависимый

апоптоз, вызывающий фолликулярную атрезию, а с потерей Fas накапливаются фолликулы средних размеров или развиваются кисты яичников [7].

Гормональный баланс и регуляция процессов пролиферации и апоптоза клеток зависят не только от уровня отдельных гормонов, молекулярных мессенджеров, но и от характера взаимодействия между ними. Нами проведен корреляционный анализ взаимосвязей между изучаемыми параметрами: уровнем метаболитов оксида азота и растворимого Fas-рецептора, половых гормонов в крови, числом клеток яичников, экспрессирующих рецепторы к ним, а также маркеры пролиферации, апоптоза. Достоверные корреляционные связи между изучаемыми показателями представлены в табл. 5.

При анализе данных таблицы выявлены достоверные позитивные корреляционные связи умеренной силы между уровнями тестостерона в крови пациенток с ТПБ и числом клеток яичника, экспрессирующих рецепторы к нему, свидетельствующие о взаимозависимости этих изучаемых показателей. Вполне ожидаемой является также наличие положительной корреляционной связи умеренной силы между числом клеток яичника с рецепторами для эстрадиола и прогестерона, обладающих регулирующим действием на менструальный цикл, последовательную смену его фаз.

Наибольшее число достоверных позитивных корреляционных связей умеренной силы было обнаружено у пациенток с ТПБ между уровнем экспрессии проапоптогенного белка p53 в клетках яичников, с одной стороны, и % ядер клеток яичников, экспрессирующих рецепторы к эстрадиолу, прогестерону и андрогенам, с другой. Известно, что белок p53 запускает процесс апоптоза в зрелом, преовуляторном фолликуле [8], где, вероятно, нарастает число клеток с рецепторами для половых гормонов.

Таблица 5

Достоверные корреляционные связи между изучаемыми показателями у пациенток с ТПБ

Анализируемый показатель	r	P
Уровень тестостерона в крови и % ядер клеток яичника, экспрессирующих рецепторы к андрогенам	0,76	0,03
% ядер клеток яичника, экспрессирующих рецепторы к эстрадиолу, и % ядер клеток яичника, экспрессирующих рецепторы к прогестерону	0,71	0,04
PSNA – Ki67	0,68	0,0001
P53 – % ядер клеток яичника, экспрессирующих рецепторы к эстрадиолу	0,5	0,02
P53 – % ядер клеток яичника, экспрессирующих рецепторы к прогестерону	0,5	0,03
P53 – % ядер клеток яичника, экспрессирующих рецепторы к андрогенам	0,6	0,04
NO _x – P53	-0,6	0,02
NO _x – sFas	-0,4	0,05
NO _x – NO ₃	0,8	0,0001
NO _x – NO ₂	0,4	0,0004

Помимо внутрисистемных связей между уровнями отдельных метаболитов нитрооксидергической системы, нами обнаружены также отрицательные корреляции между количеством NO_x в крови и экспрессией проапоптогенного белка p53 в клетках яичника, а также с уровнем растворимого сывороточного Fas рецептора у пациенток с ТПБ, что предположительно отражает разные стороны влияния оксида азота на отдельные молекулярные механизмы, сопряженные с инициацией апоптоза клеток.

В целом полученные результаты свидетельствуют, что у женщин с ТПБ воспалительного генеза формируется нарушение продукции эстрадиола, баланса уровня сывороточного тестостерона и числа клеток яичников, экспрессирующих ядерные рецепторы к нему, происходит изменение уровня нитрооксидергической регуляции и сопряженной с ней экспрессии проапоптогенного белка p53 в репродуктивных органах, а также уровня растворимого Fas-рецептора в циркуляции, отражающих молекулярно-клеточные механизмы дискоординации созревания и атрезии фолликулов.

Литература

1. Влияние инфекции на репродуктивную систему женщин / В.И. Краснополяский, О.Ф. Серова, В.А. Туманова и др. // *Российский вестник акушера-гинеколога*, 2004. – Т. 4, № 5. – С. 26–29.
2. Спаечная болезнь как проблема репродукции и методы ее профилактики / А.А. Попов, Т.Н. Маникова, Г.Г. Шагинян и др. // *Российский вестник акушера-гинеколога*, 2005. – Т. 5, № 4. – С. 41–45.
3. Яглов, В.В. Воспалительные заболевания органов малого таза / В.В. Яглов // *Гинекология*, 2001. – Т. 3, № 3. – С. 93–97.
4. *Endocrinology* / O. Chon, T.Yano, H. Matsumi et al. – 2005. – V. 146, № 2. – P. 808–815.
5. *Endocrinology* / K.I. Tilly, S. Banerjee, P.P. Banerjee, J.I. Tilly. – 1995. – V. 136, № 4. – P. 1394–1402.
6. *Clin. Endocrinol. Metabol* / H. Kondo, T. Maruo, X. Peng, M.J. Mochizuki. – 1996. – V. 81, № 7. – P. 2702–2710.
7. *Mol Reprod Dev* / K. Sakamaki, H. Yoshida, Y. Nishimura et al. – 1997. – V. 47. – P. 11–18.
8. *Steroids* / A. Amsterdam, A. Dantes, K. Hosokawa et al. – 1998. – V. 63. – P. 218–314.

Поступила в редакцию 10 февраля 2009 г.