

На правах рукописи

Лысова Анна Николаевна

НЕЙРОПЕПТИДЫ В РЕГУЛЯЦИИ ФЕРТИЛЬНОСТИ ЖЕНЩИН

14.01.01 — акушерство и гинекология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

17 ЯНВ 2018



008714056

Москва — 2017

A handwritten signature in black ink is located in the bottom right corner of the page.

Работа выполнена в Частном учреждении образовательной организации высшего образования «Медицинский университет «Реавиз», г. Самара.

Научные руководители:

заведующий кафедрой акушерства и гинекологии
с курсом эндоскопической хирургии
Медицинского университета «Реавиз»,
доктор медицинских наук, доцент

Завалко
Александр Федорович

заведующая кафедрой медико-биологических дисциплин
Медицинского университета «Реавиз»,
доктор медицинских наук, профессор

Зарубина
Елена Григорьевна

Официальные оппоненты:

руководитель отделения репродуктологии
Государственного бюджетного учреждения здравоохранения
Московской области «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии»
член-корреспондент РАН,
доктор медицинских наук, профессор

Краснопольская
Ксения Владиславовна

главный врач Базовой акушерско-гинекологической клиники
Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
доктор медицинских наук, профессор

Крутова
Виктория
Александровна

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (664003 г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16).

Защита диссертации состоится «___» 2017 года в ___ часов по адресу:
г. Москва, ул. Фотиевой, 6 на заседании Диссертационного совета Д.212.203.01 при Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов» по адресу 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Российского университета дружбы народов (117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6) и на сайте <http://dissovct.rudn.ru/>.

Автореферат размещен на сайте <http://dissovct.rudn.ru/> «___» 2017 г.

Автореферат разослан «___» 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д.212.203.01
кандидат медицинских наук

Лебедева
Марина Георгиевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Несмотря на неуклонный рост уровня оказания медицинской помощи, в последние десятилетия в России все еще сохраняются негативные демографические тенденции. В сложившейся ситуации проблема охраны репродуктивного здоровья женщин приобрела важнейшее социальное и geopolитическое значение (Радзинский В.Е., Семятов С.М., 2013). Концепцией демографического развития России до 2025 г. охрана репродуктивного здоровья населения страны объявлена приоритетной государственной задачей (Серов В.Н., Сухих Г.Т., 2014; Хамошина М.Б., 2016). Это диктует необходимость научного обоснования и внедрения в практическое здравоохранение лечебно-профилактических технологий, которые будут способствовать повышению репродуктивного потенциала женского населения (Назаренко Т.А., Краснопольская К.В., 2013; Радзинский В.Е., 2014; Круглова В.А., 2014; Сутурнина Л.В., 2014; Arce J.C., Nyboe Andersen A., Fernandez-Sanchez M., 2014).

Наряду с низким коэффициентом fertilitiности женщин и снижением доли повторных второждений, в настоящее время прослеживается и обратная сторона проблемы — увеличение числа супружеских пар, страдающих бесплодием (Краснопольский В.И., 2014). В России женским бесплодием страдает более 12 млн человек. Доля бесплодных пар достигает 15% от общего числа браков, что представляет серьезную проблему для здравоохранения, общества и государства (Сухих Г.Т., Назаренко Т.А., 2010; Лабыгина А.В., 2014; Хамошина М.Б., 2016).

Степень разработанности темы исследования. Социальная и медицинская значимость проблемы бесплодия заставляет ученых всего мира проводить все новые и новые исследования в этой области (Адамян Л.В., Андресева Е.И., Спицын В.Г., 2008; Mahon E, Cotter N., 2015). Рутинные способы его преодоления — стимуляция овуляции и ЭКО — зачастую чрезмерно затратны и не всегда эффективны (Frye C., Bo E., Calamandrei G., 2012; Keith Edmonds D., 2012). В связи с этим исследование свойств кисспептина — нейромедиатора, который оказывает непосредственное регулирующее воздействие на репродуктивную систему женщин, — открыло новые перспективы в понимании причин и поиске средств лечения бесплодия (Каверина И.В., Уласов И.В., Фаворская И.А., 2011; Dungan H.M., Clifton D.K., Steiner R.A., 2013; Kaiser U.B., Kuohung W., 2015). Обсуждаемая возможность применения кисспептина для регуляции функций гипоталамо-гипофизарно-яичниковой системы человека с диагностической и лечебной целью нуждается в дальнейших исследованиях с целью прояснения точных его механизмов действия и возможной роли агонистов и антагонистов рецептора GPR54 (Miller A., Maletic V. M., Raison C., 2014; Lattes K., Brassesco M., Gomez M., 2015).

Цель работы: улучшить эффективность ранней диагностики и преодоления женского бесплодия, связанного с отсутствием овуляции.

В связи с поставленной целью были сформулированы следующие задачи:

1. Разработать экспериментальную модель ановуляторного бесплодия женщин на половозрелых самках крыс линии Wistar с использованием блокатора кисспептинергических рецепторов;
2. Подтвердить в модельном эксперименте связь нарушения процесса овуляции у самок крыс линии Wistar с блокадой кисспептинергических рецепторов;
3. Разработать референсные значения уровня кисспептина у здоровых женщин детородного возраста в исходном состоянии и во время беременности, а также у пациенток с женским бесплодием, связанным с отсутствием овуляции;
4. Изучить взаимосвязь между уровнем кисспептина и количественным содержанием гонадотропных и половых гормонов в сыворотке крови женщин в течение менструального цикла и взаимосвязь экскреции кисспептина с количеством овуляторных циклов у здоровых женщин;
5. Разработать и внедрить методику обследования женщины для раннего выявления группы риска развития женского бесплодия, связанного с отсутствием овуляции, и вероятностного прогнозирования возможности овуляции с использованием исследования уровня кисспептина.

Научная новизна. В результате проведенного исследования расширены представления о патогенезе женского бесплодия, связанного с отсутствием овуляции. Подтверждены и дополнены существующие представления о значении кисспептина для пейроэндокринной регуляции функции репродуктивной системы. Установлено, что уровень кисспептина в сыворотке крови может служить маркером состояния здоровья женщин и оценки их репродуктивного потенциала. Выявлена взаимосвязь между степенью снижения уровня кисспептина и риском развития женского бесплодия, связанного с отсутствием овуляции. Впервые определены референсные значения уровня кисспептина у здоровых женщин. Показана взаимосвязь между уровнем кисспептина в крови и сроком наступления беременности у здоровых женщин. Экспериментально подтверждена возможность моделирования ановуляторного бесплодия на фоне блокады кисспептинергических рецепторов у ранее здоровых половозрелых самок крыс линии Wistar.

Теоретическая и практическая значимость. Разработана научная идея, обогащающая концепцию ранней диагностики и преодоления женского бесплодия, связанного с отсутствием овуляции.

Применительно к проблематике диссертации результативно использованы информативные методы исследования, экспериментальные методики, включая моделирование ановуляторного бесплодия на самках половозрелых крыс с помощью блокатора кисспептинергических рецепторов. Экспериментально подтверждена возможность коррекции

ановуляторного бесплодия, вызванного блокадой кисспекттиnergических рецепторов, введением экзогенного кисспекттина. Разработаны прогностические критерии вероятности наступления беременности при регулярной половой жизни. Модифицирована методика обследования женщин с ановуляторным бесплодием. Практическому здравоохранению предложены рекомендации по обследованию и ведению пациенток с ановуляторным бесплодием, представлены референсные значения уровня кисспекттина у здоровых женщин (Патент на изобретение №2574669 «Способ экспресс-диагностики женского эндокринного бесплодия»). Создана экспериментальная модель женского бесплодия, связанного с отсутствием овуляции (Патент на изобретение № 2571896 «Способ моделирования женского ановуляторного бесплодия на крысах»). Обоснована перспективность дальнейших исследований в области применения кисспекттина для науки и практики.

Методология и методы исследования. Настоящее исследование выполнено в 2014–2016 гг. в Экспериментальной лаборатории нормальной и патологической физиологии Медицинского университета «Реавиз», г. Самара (зав. лабораторией — д.м.н., профессор Зарубина Е.Г.); в Научно-исследовательской лаборатории по проблемам морфологии «Реавиз», г. Самара (зав. лабораторией — д.м.н., академик РАМН профессор, Марков И.И.) и в ООО «Независимая лаборатория ИНВИТРО», г. Самара (зав. лабораторией — канд. биохим. наук Желтякова О.В.).

Диссертационное исследование проводили в два этапа: экспериментальный и клинический. На первом этапе выполнено экспериментальное изучение роли кисспекттина в регуляции эстрального цикла крыс (модельный эксперимент). Первый этап состоял из 3 частей. В первой части были отобраны 36 половозрелых самок крыс линии Wistar в возрасте 6 месяцев, весом $195,0 \pm 10,0$ г, с синхронизированными эстральными циклами. Все животные были разделены на 2 группы (опыт и контроль).

Оценку фаз эстрального цикла крыс проводили, используя цитологическое исследование влагалищных мазков. Зabor влагалищного отделяемого осуществляли с помощью марлевого тампона, ежедневно, на протяжении 4-х недель. Микроскопическое исследование с целью определения индекса созревания (ИС) и карионикнотического индекса (КИ) выполняли при увеличении 10×20 с окраской материала 0,5% спиртовым раствором метиленового синего. Выбор крыс линии Wistar в качестве модели для эксперимента был определен аллометричностью функционирования репродуктивной системы крысы и человека и общими закономерностями процессов инволюции половой сферы (Salehi M.S. et al., 2013).

В ходе второй части исследования с целью изучения влияния на эстральный цикл крыс блокады кисспекттинергических рецепторов животным из опытной группы (18 особей) вводили в носовые ходы блокатор кисспекттинергических рецепторов — kisspeptin-234 trifluoroacetatesalt

(Sigma, USA), 10 мкл раствора (2×10^{-3} моль). Для чистоты моделирования эксперимента в контрольной группе (18 особей) вводили такой же объем 0,9% раствора NaCl (10 мкл). Результаты оценивали путем измерения базальной температуры и микроскопии влагалищных мазков на протяжении не менее 10 суток.

В третьей части эксперимента изучали стимулирующее влияние киссцептина на «заблокированный» эстральный цикл крыс, для чего на фоне пролонгированного в 2 раза дистресса животным из опытной подгруппы вводили 10 мкл раствора kisspeptin-234 (2×10^{-2} моль). Животным контрольной группы вводили аналогичный объем 0,9% раствора NaCl. Регистрировали базальную температуру крыс, выполняли микроскопическое исследование влагалищного отделяемого на протяжении 4 дней ежедневно (метод Стоккарда и Папаниколау). Для микроскопии использовали микроскоп «XS-910» (ОМО, Россия, 2011) с увеличением 10x20, оснащенный цифровой насадкой для компьютерной визуализации изображения DCM130 (Shangrao Tele View Optical Instruments, Китайская Народная Республика, 2011). Увеличение фазы дистресса с 2 до 5 дней расценивали как «экспериментальное нарушение эстрального цикла», то есть отсутствие овуляции.

В клиническую часть работы были включены 237 женщин в возрасте от 18 до 35 лет, распределенных по четырем группам. Исследование было выполнено на базе Самарской областной клинической больницы имени В.Д. Середавина (главный врач — Кунцов Д.Н.) и Лечебно-диагностического комплекса «МЕДГАРД» г. Самара (главный врач — Моксеев А.Г.).

I группу составили 82 женщины, не планировавшие и не имевшие беременностей, живущие регулярной половой жизнью и использовавшие с целью контрацепции презерватив.

Во II группу вошли 85 женщин, ранее не страдавших бесплодием, имевших 1–2 беременности, закончившиеся нормальными родами, и на момент обследования живущих регулярной половой жизнью с использованием презерватива с целью контрацепции.

III группу сформировали из 37 здоровых беременных женщин, имевших 1–2 беременности, включая настоящую.

IV группу составили 33 женщины, страдавшие первичным и/или вторичным бесплодием неустановленного генеза в течение 5 лет и более. Эти пациентки были обследованы в объеме, необходимом для ЭКО, в сроки не ранее чем через 1–2 месяца после отмены гормональных препаратов.

Критериями исключения служили:

- пороки развития мочеполовой системы;
- острые и обострение хронических специфических и неспецифических воспалительных заболеваний женских половых органов на момент обследования;
- болезни эндокринной системы, нарушения питания и обмена веществ;

- сниженный овариальный резерв;
- онкологические заболевания, в том числе в анамнезе;
- аутоиммунные, неврологические, психические заболевания;
- соматические заболевания тяжелой и средней степени тяжести, а также любые заболевания в стадии обострения;
- наличие зарегистрированных профессиональных вредностей, хронических стрессов, тяжелого физического труда, в том числе труда в экстремальных для организма условиях;
- перегулярия половая жизнь;
- изменения в спермограмме у супруга.

Уровень кисспептина сыворотки крови определяли методом иммуноферментного анализа с использованием спектрофотометра Sunrise-Tecan (Австрия, 2013 г.) и набора реактивов кисспептин-54 (метастин) (с экстракцией) (BCM DIAGNOSTICS, США).

Забор крови с целью определения уровня кисспептина выполняли у женщин I и II групп — вне менструации; в III группе — с 12 по 39 неделю беременности с интервалом в 12–14 недель; в IV группе — однократно.

Исследовали уровни гормонов: ФСГ ($\text{mEд}/\text{мл}=\text{Eд}/\text{л}$); ЛГ ($\text{mEд}/\text{мл}=\text{Eд}/\text{л}$); прогестерона (нмоль/л); эстрadiола (нмоль/л); пролактина ($\text{mEд}/\text{л}$) методом электрохемилюминесценции на автоматическом анализаторе Cobas c601 (Roche, Швейцария, 2013 г). За референсные значения уровня гормонов крови принимали: в фолликулярную fazу: ФСГ равен 1,37-9,90 $\text{mEд}/\text{мл}$; ЛГ =21,9-56,6 $\text{mEд}/\text{мл}$; пролактин = 79-347 $\text{mEд}/\text{мл}$; эстрadiол = 68-1269 нмоль/л; прогестерон = 0,30-2,20 нмоль/л. В лютеиновую fazу ФСГ равен 6,17-17,20 $\text{mEд}/\text{мл}$; ЛГ =1,68-15,00 $\text{mEд}/\text{мл}$; пролактин = 79-347 $\text{mEд}/\text{мл}$; эстрadiол = 131-1655 нмоль/л; прогестерон = 0,5-9,4 нмоль/л.

Положения, выносимые на защиту:

1. Блокада кисспептиnergических рецепторов в эксперименте приводит к нарушению овуляции у молодых половойозрелых самок крыс линии Wistar с устойчивым эстральным циклом. Экзогенное введение кисспептина крысам, находящимся в диэструсе, способствует восстановлению овуляции.

2. Содержание кисспептина в крови у здоровых женщин коррелирует с уровнями гонадотропинов и половых гормонов ($r=0,98$), что подтверждает его важную роль в регуляции функции женской репродуктивной системы. Референсные значения кисспептина у здоровых небеременных женщин составляют 2,5 нг/мл и более.

3. Кисспептин может использоваться в качестве маркера риска бесплодия, связанного с отсутствием овуляции. Двукратное снижение уровня кисспептина в сыворотке крови увеличивает риск ановуляторных циклов в 4 раза (с вероятностью 98%).

Степень достоверности и апробация результатов работы. Статистическая обработка данных была выполнена в автоматическом режиме с применением пакета прикладных программ Statistica for Windows 6,0. При сравнении показателей использовали критерий Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Апробация состоялась на расширенном заседании кафедры акушерства и гинекологии с курсом эндоскопической хирургии Медицинского университета «Реавиз» (г. Самара) 18 мая 2016г., протокол №7.

Основные положения диссертации доложены, обсуждены и одобрены на: VI Ежегодной научной конференции молодых ученых и специалистов «Репродуктивная медицина: взгляд молодых» (Санкт-Петербург, 2015); V Всероссийской конференции с международным участием «Медико-физиологические проблемы экологии человека» (Ульяновск, 2014); Международной конференции «Инновационные медицинские технологии» (Москва, 2015). По результатам исследования автором получены патент на изобретение №2574669 «Способ экспресс-диагностики женского эндокринного бесплодия» и патент на изобретение № 2571896 «Способ моделирования женского ановуляторного бесплодия на крысах».

Теоретические положения о роли кисспептина в регуляции функции репродуктивной системы женщины внедрены в учебный процесс кафедр медико-биологических дисциплин, акушерства и гинекологии и в работу клинико-диагностических лабораторий Медицинского университета «Реавиз» (г. Самара, г. Москва).

Разработанные прогностические критерии риска бесплодия, связанного с отсутствием овуляции, внедрены в практическую работу Лечебно-диагностического комплекса «Медгард», г. Самара; СПб ГБУЗ «Городская поликлиника № 77 Невского района», г. Санкт-Петербург; Санкт-Петербургскую Клинику имени Н. И. Пирогова, г. Санкт-Петербург.

Автор лично спланировала исследование, сформулировала его цель и задачи, выполнила обзор литературы по тематике диссертации. В ходе сбора материала участвовала в обследовании и наблюдении 237 пациенток, самостоятельно выполнила экспериментальный этап работы. Эффективно применила методы статистической обработки и анализа полученных результатов исследований, сформулировала выводы и разработала практические рекомендации, опубликовала основные положения диссертации.

По результатам работы автор имеет 13 публикаций, из них 5 — в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ и 2 патента.

Диссертация изложена на 107 страницах машинописного текста. Состоит из введения, обзора литературы, трех глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения. Работа иллюстрирована 27 таблицами и 19 рисунками. Список литературы включает 207 источников, в том числе 162 иностранных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Результаты исследования и их обсуждение. В ходе первого этапа исследования у всех 36 животных, включенных в исследование, отмечен регулярный эстральный цикл, включающий 4 фазы: диэструс (стадия покоя, или межтечки); проэструс (стадия подготовки к течке, или предтечки); эструс (течка); метэструс (стадия послетечки). Длительность эстрального цикла не превышала 5 суток (Рисунок 1).

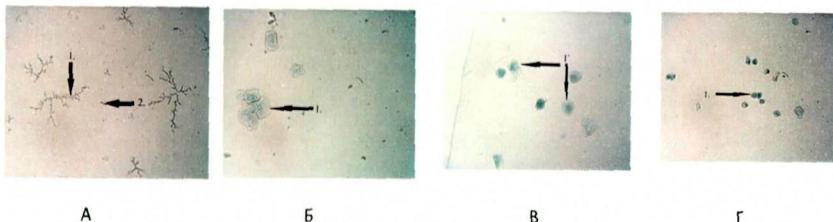


Рисунок 1 — Влагалищный мазок крысы. А- Стадия диэструса. 1-слизь; 2-лейкоциты; Б - Стадия проэструса. 1 - слущенные эпителиальные клетки; В - Стадия эструса. 1 - безъядерные, ороговевшие клетки (чешуйки); Г - Стадия метэструса. 1 - базальные эпителиальные клетки. Окраска метиленовым синим. Увеличение 10x20

Данные цитологического исследования отделяемого из влагалища здоровых самок крыс с устойчивым эстральным циклом представлены в Таблице 1.

Таблица 1 — Кольпоцитологические индексы у крыс линии Wistar до применения блокатора кисспептинергических рецепторов – kisspeptin-234 trifluoroacetatesalt (Sigma, USA)

Показатель	Диэструс	Проэструс	Эструс	Метэструс
Индекс созревания (ЕД)	0/0/0	0/24/76	0/15/85	65/25/10
Кариопикнотический индекс (%)	9,6±3,6	75,6±7,2	81,7±6,2	25,6±5,3
Эстрогенная стимуляция	↓↓ (сильно снижена)	↑↑ (высокая)	↑↑↑ (сильно повышена)	↓↓ (снижена)

Физиологическое течение эстрального цикла у животных, включенных в эксперимент, было подтверждено динамикой изменения ректальной температуры у крыс. Непосредственно перед овуляцией наблюдали всплеск эстрогенов, что обеспечивало еще большее снижение базальной температуры. Для подтверждения регулярности у каждого животного было зафиксировано не менее 3-х последовательных эстральных циклов.

После введения в носовые ходы крыс блокатора кисспептинергических рецепторов kisspeptin-234 trifluoroacetatesalt в fazu диэструса, у всех 18 животных было отмечено удлинение

диэструса в 3-4 раза по сравнению с исходными значениями. Введение физиологического раствора в аналогичный период не вызывало изменений эстрального цикла.

Измерение базальной температуры у крыс после применения блокатора кисспептинергических рецепторов kisspeptin-234 trifluoroacetatesalt показало изменение характера температурной кривой, которая стала монофазной.

Кольпоцитологические индексы крыс после блокады рецепторов к кисспептину представлены в Таблице 2.

Таблица 2 — Кольпоцитологические индексы у крыс линии Wistar после применения блокатора кисспептинергических рецепторов – kisspeptin-234 trifluoroacetatesalt (Sigma, USA)

Показатель	Диэструс (пролонгированный), дни наблюдения после введения блокатора кисспептинергических рецепторов						Смешанная цитологическая картина
	1-й	3-й	5-й	7-й	9-й	11-й	
Индекс созревания (ЕД)	0/0/0	0/0/0	0/0/0	0/0/0	30/34/36	10/23/67	
Слизь	++	+++	+++	++	++	+	
Кариопикнотический индекс (%)	-	-	-	-	15,6±3,3	55,7±3,9	
Эстрогенная стимуляция	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓	↑

Дальнейшее наблюдение за животными опытной группы на протяжении 10 дней показало постепенную нормализацию цитологической картины содержимого влагалища и восстановление обычного эстрального цикла, что, на наш взгляд, следует объяснить физиологическим ресинтезом кисспептинергических рецепторов и восстановлением регуляции эстрального цикла.

На основании полученных данных можно говорить о том, что блокада кисспептинергических рецепторов приводит к длительному нарушению эстрального цикла, ановуляции и снижению эстрогенной стимуляции у самок крыс линии Wistar.

Выявленное в ходе исследования увеличение фазы диэструса с 2 до 5 дней после введения животным обеих подгрупп 10 мкл раствора (2×10^{-3} Моль) блокатора кисспептинергических рецепторов расценивали как «экспериментальное нарушение эстрального цикла» — отсутствие овуляции.

Последующее введение на 5-е сутки кисспептина самкам крыс на фоне диэструса привело к резкой активизации функции яичников и к возникновению в цитологической картине влагалища через 16 ч ярко выраженного эструса (Рисунок 2), продолжительность которого увеличивалась почти до 2-х суток.

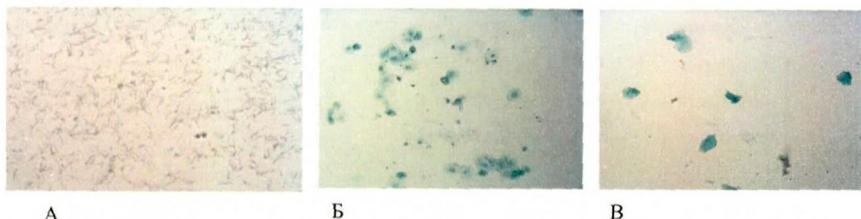


Рисунок 2 — Цитологическая картина влагалищного содержимого крыс 1-й группы, 10x20, окраска метиленовым синим: А – после введения блокатора кисспептинергических рецепторов и до введения кисспептина (диэструс); Б – через 16 ч после введения кисспептина (проэструс/эструс); В – через 24 часа после введения кисспептина (эструс)

Введение физиологического раствора крысам контрольной подгруппы не вызывало изменений эстрального цикла.

Полученные данные свидетельствуют о том, что экзогенное введение кисспептина у самок крыс с нарушением эстрального цикла восстанавливает нормальную функцию яичников.

В клинической части работы характеристика обследуемых женщин по социальному статусу представлена в Таблице 3.

Таблица 3 — Социальный статус обследованных женщин

Социальный статус	I группа, n=82		II группа, n=85		III группа, n=37		IV группа, n=33	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Состоит в браке	7	8,5	80	92,7	31	83,8	29	87,9
Не состоит в браке	69	84,2	-	-	-	-	-	-
Гражданский брак	6	7,3	5	7,3	6	16,2	4	12,1
Работающие	7	8,5	69	81,2	19	51,4	23	69,7
Домохозяйки	-	-	13	15,3	11	29,7	7	21,2
Образование:								
- высшее;	-	-	37	45,1	25	67,6	29	87,9
- среднеспециальное;	6	7,3	34	41,5	5	13,5	-	-
- среднее	1	1,2	11	13,4	-	-	-	-
Учащиеся	75	91,5	3	3,5	7	18,9	4	12,1

Все пациентки проживали в Самаре, в собственном жилье, изолированно от родителей. В I клинической группе было больше учащихся, чем во II, III группах и особенно в IV. Средний возраст женщин в сравниваемых группах составлял $20,1\pm0,7$; $25,9\pm1,6$; $25,9\pm2,2$ и $30,7\pm2,6$ года соответственно. Большинство женщин сравниваемых групп были нормовесны. Нормальный ИМТ, равный $18,5\text{--}24,9 \text{ кг}/\text{м}^2$ имели 76,8%, 74,4%, 86,5% и 84,8% женщин I-IV групп

соответственно. У 10% пациенток отмечены экстрагенитальные заболевания, протекающие в «легкой форме» и вне обострения.

Частота встречаемости гинекологических заболеваний у женщин исследуемых групп представлена в Таблице 4.

Таблица 4 — Частота гинекологических заболеваний у женщин, обследованных групп

	I группа, n=82		II группа, n=85		III группа, n=37		IV группа, n=33	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Вульвит	5	6,1	4	4,7	2	5,4	2	6,1
Бартолиит	-	-	-	-	-	-	-	-
Вагинит	3	3,7	5	5,9	3	8,1	3	9,1
Эндоцервицит	3	3,7	3	3,5	3	8,1	2	6,1
Эндометрит	-	-	-	-	-	-	-	-
Сальпингоофорит	-	-	-	-	-	-	-	-
Бактериальный вагиноз	5	6,1	4	4,7	2	5,4	3	9,1
Истинная эрозия	1	1,2	2	2,4	-	-	-	-
Эктофия	4	4,9	5	5,9	3	8,1	4	12,1
Чистота влагалища на момент включения в группы:								
1 степень	58	70,7	50	58,8	9	24,3	22	66,7
2 степень	24	29,3	35	41,2	28	75,7	11	33,3

Гинекологических операций в анамнезе, включая артifiциональные abortion и оперативное родоразрешение, у женщин зарегистрировано не было.

Принципиальных межгрупповых различий по возрасту менархе, продолжительности менструаций, их болезненности и количеству кровопотери не установлено. Средний возраст начала половой жизни женщин I-IV групп составил $18,5 \pm 1,6$; $18,9 \pm 1,4$; $18,1 \pm 1,6$ и $18,6 \pm 1,9$ года соответственно.

При изучении акушерского анамнеза обследованных установлено, что у женщин III клинической группы беременность протекала физиологично, родоразрешение произошло естественным путем на доношенных сроках. У 18,9% из них диагностировали анемию легкой степени тяжести; у 8,1% — рецидивирующие вагиниты и невоспалительные заболевания влагалища; а у 27% — хронический пислонефрит.

Характеристика акушерского анамнеза обследованных пациенток представлена в Таблице 5.

Таблица 5 – Характеристика репродуктивной функции обследованных женщин

	I группа n=82		II группа n=85		III группа n=37		IV группа n=33	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Одна нормально протекающая беременность в анамнезе	0	0	36	42,4	13	35,1	0	0
2 и более нормально протекающих беременностей в анамнезе	0	0	49	57,6	24	64,9	0	0
Роды срочные самопроизвольные	0	0	85		37	100	0	0

В ходе исследования установлено, что у женщин I и II групп уровень кисспептина колебался в пределах от 2,5 нг/мл до 9,56 нг/мл и не имел достоверных различий на протяжении фаз менструального цикла. При этом у 68,1% женщин уровень кисспептина колебался в более узких пределах — от 5,2 нг/мл до 7,7 нг/мл.

При изучении акушерского анамнеза у женщин II группы выявлено, что несмотря на наличие в анамнезе нормально протекавшей беременности, которая завершилась срочными родами здоровым ребенком, сроки наступления беременности от момента начала регулярной половой жизни без применения средств контрацепции значительно колебались — от нескольких месяцев до 1,5–2 лет. Корреляционный анализ между уровнем кисспептина в сыворотке крови и сроками наступления беременности (Рисунок 3) выявил прямую сильную корреляционную связь ($r=0,98$).

С учетом установленной взаимосвязи между уровнем кисспептина и сроками наступления беременности все женщины первой и второй групп были подразделены на несколько подгрупп: А — с уровнем кисспептина выше 9,0 нг/мл; Б — с уровнем кисспептина от 7,0 до 9,0 нг/мл; В — с уровнем кисспептина от 4,5 до 7,0 нг/мл; Г — с уровнем кисспептина от 2,5 до 4,5 нг/мл.

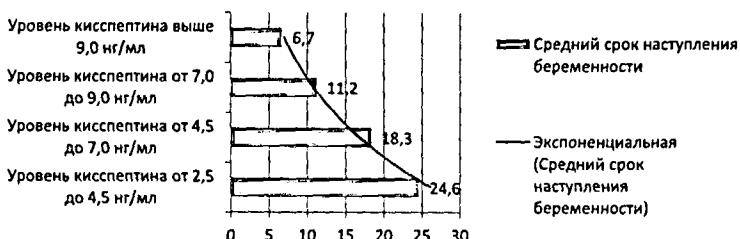


Рисунок 3 — Взаимосвязь между уровнем кисспептина и сроками наступления беременности у женщин I группы

Средние значения уровня кисспептина сыворотки крови здоровых небеременных женщин (I и II группы) представлены в Таблице 6.

Таблица 6 — Средний уровень кисспептина у женщин первой и второй групп

Группы наблюдения	Уровень кисспептина в сыворотке крови нг/мл	Доля в группе, %
I А подгруппа, n=11	9,37±0,15	16,2
II А подгруппа, n=17	9,45±0,13	17,8
II Б подгруппа, n=34	7,22±0,17 ^x	38,2
II Б подгруппа, n=28	7,43±0,28*	37,3
II В подгруппа, n=22	5,55±0,26 ^x	31,6
II В подгруппа, n=24	5,89±0,63**	30,8
II Г подгруппа, n=15	3,35±0,62 ^{xx}	14,0
II Г подгруппа, n=16	3,21±0,53***	14,1

^xp≤0,001 между показателями IА и IIБ подгрупп, IIБ и IIВ подгрупп;

^{xx}p≥0,01 между показателями IIВ и IIГ подгрупп;

*p≤0,001 между показателями IIБ и IIА подгрупп;

**p≤0,05 между показателями IIБ и IIВ подгрупп;

***p≤0,01 между показателями IIВ и IIГ подгрупп

Сравнение средних показателей по группам выявило отсутствие статистически значимых различий между уровнем кисспептина у здоровых рожавших и нерожавших женщин (Таблица 7).

Таблица 7 – Уровень кисспептина у женщин первой и второй групп

	Уровень кисспептина в сыворотке крови, нг/мл	Критерий Стьюдента
I группа, n=82	6,45±2,27	0,072
II группа, n=85	6,68±2,23*	

Примечание — *p≤0,05 между показателями первой и второй групп

Для подтверждения нормального гормонального фона у женщин первой и второй групп наблюдения слепым методом в выявленных пропорциях были сформированы две когорты по 50 человек. Первую составили 8 (16,0%) человек из IА подгруппы, 19 (38,0%) человек из IIБ подгруппы, 16 (32,0%) человек из IIВ подгруппы и 7 (14,0%) из IIГ подгруппы. Соответственно во вторую вошли 9 (18,0%) человек из IIА подгруппы, 19 (38,0%) — из IIБ подгруппы, 15 (30,0%) — из IIВ подгруппы и 7 пациенток из IIГ подгруппы (14,0%).

Уровень половых и гонадотропных гормонов сыворотки крови женщин первой когорты из I группы женщин представлен в Таблице 8.

У женщин второй когорты имели место сходные значения уровня гонадотропных и половых гормонов (Таблица 9). Таким образом, изучение уровня гонадотропных и половых гормонов у этих женщин подтвердило наличие у них на момент исследования двухфазного менструального цикла.

Таблица 8 — Уровень гормонов сыворотки крови женщин первой когорты (n=50)

	Фолликулярная фаза	Лютеновая фаза
ФСГ, мЕд/мл	5,89±1,83	12,32±1,67*
ЛГ, мЕд/мл	8,52±1,12	35,3±2,24**
Пролактин, мЕд/мл	98,77±4,69	
Эстрadiол, пмоль/л	228,92±34,69	337,43±42,34***
Прогестерон, нмоль/л	0,63±0,21	3,4±1,12***

Примечание:

* $p\leq 0,01$ по сравнению с аналогичным показателем в фолликулярную фазу;

** $p\leq 0,001$ по сравнению с аналогичным показателем в фолликулярную фазу;

*** $p\leq 0,05$ по сравнению с аналогичным показателем в фолликулярную фазу.

Таблица 9 — Уровень гормонов у женщин второй когорты (n=50)

	Фолликулярная фаза	Лютеновая фаза
ФСГ, мЕд/мл	6,23±2,14	11,87±1,92**
ЛГ, мЕд/мл	9,99±2,23	33,64±2,59*
Пролактин, мЕд/мл	108,25±6,34	
Эстрadiол, пмоль/л	232,34±45,23	359,88±46,67**
Прогестерон, нмоль/л	0,75±0,24	4,63±1,76**

Примечание:

* $p\leq 0,001$ по сравнению с аналогичным показателем в фолликулярную фазу;

** $p\leq 0,05$ по сравнению с аналогичным показателем в фолликулярную фазу.

Поскольку высокий уровень кисспептина в сыворотке крови женщины сильно коррелирует ($r=0,98$) со сроками наступления беременности, было высказано предположение о наличии взаимосвязи кисспептина с количеством овуляторных циклов у женщин, поскольку именно кисспептин участвует в регуляции процесса овуляции в норме. Для проверки этой гипотезы у здоровых небеременных женщин на протяжении 18 месяцев была изучена динамика изменения ректальной температуры. Соотношение частоты ановуляции и уровня кисспептина представлены на Рисунке 4.

Из диаграммы, представленной на Рисунке 4, видно, что при снижении уровня кисспептина в 2 раза частота ановуляторных циклов повышалась в 4 раза ($p\leq 0,001$), что, возможно, и объясняет удлинение сроков наступления зачатия. При дальнейшем снижении уровня кисспептина количество ановуляторных циклов возрастало почти до одной трети.

У пациенток I группы было получено аналогичное соотношение овуляторных и ановуляторных циклов.

Средние показатели доли ановуляторных циклов у женщин первой и второй групп составили 15,0% и 17,5% соответственно.

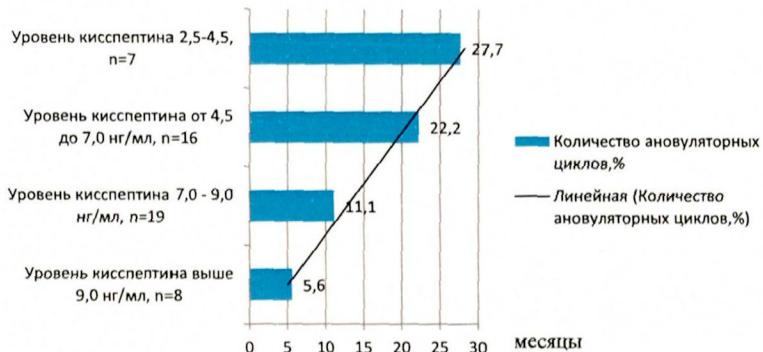


Рисунок 4 — Количество ановуляторных циклов у женщин второй группы
в зависимости от уровня кисспептина в сыворотке крови

Полученные данные свидетельствуют в пользу ранее высказанной гипотезы, что кисспептин влияет на уровни гонадотропных и половых гормонов крови и, как следствие, на регуляцию овуляции.

Данные, полученные при изучении уровня кисспептина у женщин во время беременности, представлены в Таблице 10.

Таблица 10 — Уровень кисспептина и гормонов сыворотки крови женщин, в различные сроки беременности

Показатели	12-13 недель беременности	24-25 недель беременности	38-39 недель беременности
Эстрadiол, нмоль/л	3264,3±457,3	13875,6±1236,4	34940,1±3158,7
Прогестерон, нмоль/л	245,6±27,9	291,3±34,7	455,9±44,5
Пролактин, мЕд/л	249,8±25,7	425,6±49,8	126,3±53,4
Кисспептин, нг/мл	10,88±0,45	10,08±0,37	11,22±0,31*

Примечание — *p≤0,05 по сравнению с аналогичным показателем 24–25 недель беременности

На Рисунке 5 показан уровень кисспептина сыворотки крови женщин во время беременности в сравнении с аналогичными показателями небеременных женщин I и II групп.

Полученные данные позволяют высказать предположение, что кисспептин принимает участие в регулировании механизмов полового созревания и поддержания уровня гонадотропинов у женщин в процессах сохранения и вынашивания беременности.

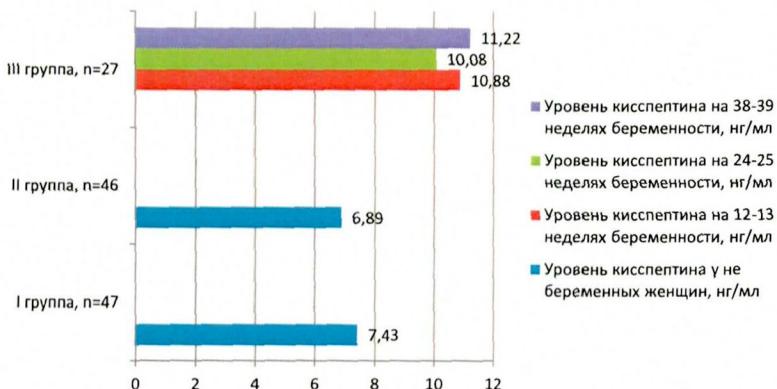


Рисунок 5 — Показатели уровня кисспептина сыворотки крови у женщин в различные сроки беременности и у небеременных женщин

Для уточнения патогенетической роли кисспептина в формировании женского бесплодия, связанного с отсутствием овуляции были изучены его количественные значения у женщин, беременность которых не наступала при регулярной половой жизни со здоровым партнером без применения средств контрацепции в течение 5 лет и более (Таблица 11).

Таблица 11 — Уровень гормонов в сыворотке крови у женщин с бесплодием

Показатель	Уровень гормонов (6-7 день цикла)
ФСГ, мЕд/мл	0,238±0,094
ЛГ, мЕд/мл	0,138±0,057
Пролактин, мЕд/мл	429,29±8,37
Эстрadiол, нмоль/мл	167,14±52,13
Прогестерон, нмоль/мл	0,215±0,024

Как видно из данных, представленных в Таблице 11, у пациенток с ановуляторным бесплодием отмечено снижение в сыворотке крови количества ФСГ и ЛГ и прогестерона по сравнению с референсными значениями. Уровень эстрадиола был ниже, чем у здоровых женщин, но не выходил за нижнюю границу. Уровень пролактина находился выше референсных значений, характерных для женщин детородного возраста.

Установлено, что снижение в сыворотке крови уровней ФСГ и ЛГ коррелирует ($r=0,97$) с низким уровнем кисспептина у женщин данной группы ($0,203\pm0,047$ нг/мл). Можно предположить, что ановуляция у обследованных женщин связана со снижением в крови уровня кисспептина, что приводит к снижению уровней ФСГ и ЛГ и к нарушению фолликулогенеза в яичниках.

В результате исследования разработаны референсные значения уровня кисспептина у здоровых небеременных женщин и критерии диагностики бесплодия, связанного с отсутствием овуляции, для экспресс-диагностики эндокринного бесплодия (Таблица 12).

Группа женщин	Уровень кисспептина	Прогноз
Здоровые женщины, имеющие детей 18-25 лет	Выше 9,0 нг/мл	возможность забеременеть в течение 6 месяцев
Здоровые женщины, имеющие детей 18-25 лет	От 7,0 нг/мл до 9,0 нг/мл	возможность забеременеть в течение 1 года
Здоровые женщины, имеющие детей 25-35 лет	от 4,5 нг/мл до 7,0 нг/мл	возможность забеременеть в течение 1,5 лет
Здоровые женщины, имеющие детей 25-35 лет	от 1,8 нг/мл до 4,5нг/мл	возможность забеременеть в течение 2 лет
Женщины с эндокринной формой	ниже 1,7 нг/мл	必不可急需进行刺激排卵治疗或试管婴儿(ЭКО)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что уровень кисспептина у здоровых женщин колеблется в широких пределах. Этот гипопептид оказывает существенное влияние на репродуктивную систему через кисспептин-опосредованное снижение уровня ФСГ и ЛГ и нарушение фолликулогенеза в яичниках. Это, в свою очередь, влияет на сроки зачатия при регулярной половой жизни со здоровым партнером. Кроме того, кисспептин, по-видимому, принимает участие в регуляции гестационных механизмов, что подтверждается увеличением его уровня на фоне беременности. Снижение уровня кисспептина ниже 1,7 нг/мл в сыворотке крови у соматически и гинекологически здоровых женщин ассоциировано с риском ановуляции.

Полученные в ходе исследования данные и разработанная на их основе методика (Патент на изобретение №2574669 «Способ экспресс-диагностики женского эндокринного бесплодия») позволяют рекомендовать кисспептин для использования в качестве маркера риска и критерия диагностики бесплодия, связанного с отсутствием овуляции, а также для прогнозирования сроков возможного наступления беременности.

Результаты исследования дают основание сделать следующие выводы:

1. Экспериментальная модель, разработанная на половозрелых самках крыс линии Wistar посредством полной блокады кисспептинергических рецепторов, воспроизводит нарушения эстрального цикла и формирование ановуляторного бесплодия (пролонгации диэструса), что подтверждается изменением кольпоцитологических индексов (КИ, ИС 0/0/0 с 1-го по 7-й день после введения блокатора) и появлением монофазной кривой ректальной температуры.

2. Восстановление овуляции и нормального эстрального цикла, подтвержденное данными кольпоскопического исследования, на фоне экспериментально воспроизведенного ановуляторного бесплодия происходит через 16 часов после введения половозрелым самкам крыс физиологических доз кисспептина.

3. Референсными значениями кисспептина для здоровых небеременных женщин следует считать показатели, превышающие 2,5 нг/мл, а диагностическим критерием ановуляторного бесплодия – снижение его концентрации ниже 1,7 нг/мл. Кисспептин участвует в обеспечении регуляции гестационных механизмов.

4. Концентрация кисспептина высоко ($r=0,98$) коррелирует с количественным содержанием ФСГ, ЛГ, эстрадиолом, прогестероном, а также частотой ановуляторных циклов у здоровых женщин. Установлено, что при снижении уровня кисспептина в 2 раза (с 9,0 до 4,5 нг/мл) риск ановуляторных циклов повышается в 4 раза (с 5,6% до 22,2%).

5. Разработана и апробирована для практического здравоохранения методика обследования женщин для выделения с вероятностью 98% группы риска развития ановуляторного бесплодия. Критерием прогноза ановуляции служит уровень кисспептина ниже 1,7 нг/мл. При уровне кисспептина больше 9,0 нг/мл беременность у здоровых женщин наступает в течение 6 месяцев; при уровне 7,0–8,9 нг/мл — в течение 1 года; при 4,5–7,6,9 нг/мл — в срок до 1,5 лет; при 2,5–4,4 нг/мл — в течение 2 лет.

Полученные данные позволяют сформулировать практические рекомендации:

1. Исследование уровня кисспептина может быть использовано для оценки репродуктивного потенциала женщины, риска ановуляции и прогнозирования вероятности наступления беременности. Преимущества данного метода: возможность диагностики в амбулаторных условиях; отсутствие привязки исследования к дням менструального цикла; невозможность получения ложноположительных или ложноотрицательных результатов на фоне влияния внешних и внутренних факторов на репродуктивную систему из-за генетической детерминированности секреции кисспептина в организме женщины; простота методики — исследование проводится на обычном лабораторном оборудовании с применением стандартных наборов реагентов. Результат выдается пациентке или врачу в день исследования.

2. Уровень кисспептина у женщин репродуктивного возраста не зависит от фазы менструального цикла. Для исследования необходимо 5–10 мл венозной крови. Уровень кисспептина определяют в сыворотке крови и сравнивают с референсными значениями (2,5–12,0 нг/мл).

3. Уровень кисспептина в сыворотке крови женщин, детородного возраста целесообразно использовать для выявления женщин группы риска развития бесплодия, связанного с отсутствием овуляции. Ановуляторное бесплодие с вероятностью 95% имеет место при уровне

кисспептина ниже 1,7 нг/мл. Указанные показатели позволяют обосновать необходимость стимуляции овуляции или направления на ЭКО.

Перспективы дальнейшей разработки темы. Полученные данные позволяют считать перспективными исследования, посвящённые роли кисспептина в регуляции процессов полового созревания и сохранения беременности, разработке инвазивных методов лечения ановуляторного бесплодия путём коррекции уровня кисспептина при его дефиците, а также значения мониторинга колебания уровня секреции кисспептина для диагностики и профилактики нарушений функции репродуктивной системы женщин.

СИСТОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Лысова, А. Н. Влияние Kiss-пептина на эстральный цикл крыс / А.Н. Лысова, Е. Г. Зарубина, В. Н. Беляков // Морфологические ведомости. – 2014. – №2. – С. 34 – 40.
2. Лысова, А. Н. Уровень кисспептина и его влияние на репродуктивную функцию здоровых небеременных женщин детородного возраста / А. Н. Лысова, Е. Г. Зарубина // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2015. – №2. – С. 5 – 11.
3. Лысова, А. Н. Роль кисспептина в нормализации эстрального цикла взрослых половозрелых самок крыс [Электронный ресурс] / А. Н. Лысова, Е. Г. Зарубина // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 2. – Режим доступа: <http://www.science-education.ru/122-18067>.
4. Лысова, А. Н. Уровень кисспептина у женщин с прерыванием беременности в различные сроки / А.Н. Лысова // Вестник медицинского института «Реавиз» (РЕАБИЛИТАЦИЯ, ВРАЧ И ЗДОРОВЬЕ). – 2015. – № 4 (20). – С. 65 – 67.
5. Лысова, А. Н. Уровень кисспептина у женщин с эндокринной формой бесплодия / А. Н. Лысова, Е. Г. Зарубина // Международный журнал экспериментального образования. – 2015. – №3. – С. 289 – 290.
6. Пат. 2571896 Рос. Федерация. Способ моделирования женского ановуляторного бесплодия на крысах / Н. А. Лысов, Е. Г. Зарубина, А. Н. Лысова. – 2015.
7. Пат. 2574669 Рос. Федерация Способ экспресс-диагностики женского эндокринного бесплодия / Н. А. Лысов, Е. Г. Зарубина, А. Ф. Завалко, А. Н. Лысова. – 2016.
8. Лысова, А. Н. Влияние кисспептина на овуляцию в эксперименте / А. Н. Лысова, Е. Г. Зарубина, О. Б. Неганова // «Репродуктивный потенциал России. Версии и контраверсии»: Матер. VII Общеросс. науч.-практич. семинара. – Сочи, – 2014. – С. 55 – 56.

9. Лысова, А. Н. Восстановление эстрального цикла у самок крыс под влиянием экзогенного кисспептина / А. Н. Лысова, Е. Г. Зарубина // «Медико-физиологические проблемы экологии человека»: Матер. V Всероссийской конференции с международным участием. – Ульяновск, – 2014. – С. 109 – 110.
10. Лысова, А. Н. Роль кисспептина в регуляции репродуктивной функции / А.Н. Лысова, Е. Г. Зарубина, О. Б. Неганова // «Мать и Дитя»: Матер. XV Всероссийского научного форума. – Москва, – 2014. – С. 472 – 473.
11. Лысова, А. Н. Влияние кисспептина на сроки наступления беременности у здоровых женщин детородного возраста / А.Н. Лысова // «Репродуктивная медицина: взгляд молодых»: Матер. VI ежегодной научной конференции молодых ученых и специалистов. – Санкт-Петербург, – 2015. – С. 30 – 32.
12. Лысова, А. Н. Кисспептин — предиктор самопроизвольного прерывания беременности на ее ранних сроках / А. Н. Лысова, А. Ф. Завалко, Е. Г. Зарубина // «Дискуссионные вопросы современного акушерства»: Матер. III Национального конгресса. – Санкт-Петербург, – 2015. – С. 46 – 50.
13. Лысова, А. Н. Кисспептин и его влияние на сроки наступления беременности у здоровых женщин детородного возраста / А. Н. Лысова, Е. Г. Зарубина, Т. А. Тезикова // Матер. X Юбилейного Международного конгресса по репродуктивной медицине. – Москва, – 2016. – С. 288 – 289.

НЕЙРОПЕНТИДЫ В РЕГУЛЯЦИИ ФЕРТИЛЬНОСТИ ЖЕНЩИНЫ

Лысова Анна Николаевна

(Россия)

Диссертационное исследование посвящено улучшению эффективности ранней диагностики и преодоления женского бесплодия, связанного с отсутствием овуляции. В результате выполнения работы установлено, что уровень кисспептина в сыворотке крови может служить маркером состояния здоровья женщины и оценки их репродуктивного потенциала, выявлена взаимосвязь между степенью снижения уровня кисспептина и риском развития женского бесплодия, связанного с отсутствием овуляции. Впервые определены референсные значения уровня кисспептина у здоровых женщин; показана взаимосвязь между уровнем кисспептина в крови и сроком наступления беременности у женщин репродуктивного возраста, создана экспериментальная модель женского бесплодия, связанного с отсутствием овуляции, что позволяет улучшить раннюю диагностику женского бесплодия и определяет новое направление в преодолении данной проблемы.

NEUROPEPTIDES IN THE REGULATION OF FEMALE FERTILITY**Lysova A.N.****(Russia)**

The dissertation research is devoted to improving the efficiency of early diagnostics and overcoming female infertility associated with the absence of ovulation. As a result of the work, has been established, that kisspeptin – level in serum can serve as a marker of women's health status and their reproductive potential, identified the correlation between the degree of decrease in the level of kisspeptin and the risk of developing female infertility, associated with the absence of ovulation. The reference values of the level of kisspeptin in healthy women were first determined; showed the correlation between the level of kisspeptin the blood and term of pregnancy in women. Created an experimental model of female infertility, associated with the lack of ovulation, which allows improving early diagnosis of female infertility and determines a new direction in overcoming this problem.

**Формат 60x84/16. Тираж 120экз. Печ. листов 2,0
Дата сдачи в печать 08.12.2017. Заказ №8121**

**Отпечатано в типографии ИП Гапонова И.А.
ОГРНИП 317631300008612
443099, г.Самара, ул.М.Горького, 117/57
тел.: (846)271-16-56**

9 12