© ТЕПЛЯШИНА Е.А., ПОЖИЛЕНКОВА Е.А., ЕКИМОВА М.В., САЛМИНА А.Б.

УДК 611.651.15:618.177:616.43

ФАКТОРЫ РОСТА, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ ОСОБЕННОСТИ ФОЛЛИКУЛОГЕНЕЗА ПРИ ЭНДОКРИННОМ БЕСПЛОДИИ

Е.А. Тепляшина, Е.А. Пожиленкова, М.В. Екимова, А.Б. Салмина

ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, ректор – д.м.н., проф. И.П. Артюхов; НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, руководитель – д.м.н., проф. А.Б. Салмина.

Резюме. *Целью исследования явилось выявление взаимосвязей между факторами роста и стероидными гормонами и особенностями фолликулогенеза при эндокринном бесплодии. Авторами обосновывается, что созревание ооцитов при эндокринопатиях происходит в условиях дизрегуляции фундаментальных процессов стероидо- и ангиогенеза, апоптоза и пролиферации.*

Ключевые слова: *эндокринное бесплодие, фолликулогенез, факторы роста, ангиогенез, пролиферация.*

Состояние репродуктивной системы при эндокринном бесплодии характеризуется повышенной секрецией стероидных гормонов, измененным кровотоком и нарушением механизма селекции и доминации лидирующего фолликула, что определяется тесным взаимодействием местных (тканевых и клеточных) и системных (в первую очередь, эндокринных) механизмов регуляции [2].

Одним из современных подходов к пониманию патогенеза различных заболеваний является изучение процессов регуляции клеточной гибели. Вместе с тем в основе физиологического обеспечения функционирования репродуктив-

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ной системы женщины лежат процессы циклического ангиогенеза [1,4]. Изучение взаимозависимости данных процессов позволяет раскрыть ранее неизвестные аспекты этиологии и патогенеза эндокринного бесплодия.

Методы молекулярной и клеточной биологии позволяют идентифицировать биологические маркеры развития фолликулов. Применение данных маркеров позволяет оценить различные аспекты функционирования яичников и получить объективную информацию о процессах роста и созревания фолликула.

Целью работы явилось выявление корреляционных взаимосвязей между содержанием факторов роста и стероидных гормонов и особенностями развития фолликулов человека разной степени зрелости (III–VIII классы) при эндокринном бесплодии.

Материалы и методы

В работе проанализированы образцы фолликулярной жидкости (ФЖ) 169 полостных фолликулов на разных стадиях развития, полученных от пациенток, проходивших лечение в циклах экстракорпорального оплодотворения.

Выполнение работы одобрено локальным этическим комитетом Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (выписка из протокола № 19 от 25 ноября 2009 года). В исследовании соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki, 2000).

Образцы ФЖ получали от пациенток репродуктивного возраста с нарушениями менструальной и репродуктивной функции на фоне хронической ановуляции и гиперандрогении (n = 65) или функциональной гиперпролактинемии (n = 59). Контрольную группу составили образцы ФЖ от женщин с регулярным двухфазным менструальным циклом и трубно-перитонеальной формой бесплодия (n = 45).

Возраст женщин варьировал от 21 года до 42 лет и в среднем составил 32,7 ± 1,5 года. Период предшествующего бесплодия у обследованных супру-

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

жеских пар составил 3–18 лет, в среднем 7,6 ± 1,5 года.

Для установления причины бесплодия пациенткам проводили стандартное клинико-лабораторное обследование. Стимуляцию овуляции во всех лечебных циклах осуществляли с использованием препаратов а-ГнРГ (декапептил-дейли) в сочетании с пурегоном. В качестве индуктора овуляции использовали овитрель.

Образцы ФЖ для исследования получали во время проведения трансвагинальной пункции фолликулов разной степени зрелости (объем полученной ФЖ варьировал от 0,1 до 8 мл для диаметра фолликула от 0,2-,9 до 16-20 мм соответственно), помещали в стерильные пластиковые пробирки и использовали для анализа. Образцы анализировали по принципу: «одна пациентка – один доминантный фолликул» или «одна пациентка – 2-3 фолликула разной степени зрелости».

Стадию развития фолликула определяли в зависимости от его диаметра. Таким образом, в исследование включены фолликулы от ранних антральных до преовуляторных (III–VIII классы) [9].

Концентрацию факторов роста и стероидных гормонов определяли при помощи иммуноферментного и иммунолюминесцентного анализа. Для определения концентрации эпидермального фактора роста (ЭФР) использовали набор «Invitrogen Immunoassay Kit KHG0062»; для определения концентрации трансформирующего фактора роста-ß (ТФР-ß) – «BMS249/3 human TGF-ß1 Platinum ELISA»; для определения основной формы фактора роста фибробластов (оФРФ) – «Invitrogen ELISA Kit HG0021»; для определения эстрадиола (E_2) – «Immulite 1000 Estradiol (PILKE2-14)»; для определения эндотелина-1 – «Bl-20052 Endotelin (1-21)»; для определения сосудисто-эндотелиального фактора роста (СЭФР) «BMS277/2 human VEGF-A Platinum ELISA»; для определения растворимой формы Fas-рецептора (sFasR) – «BMS245 human sAPO-1/Fas Platinum ELISA»; для определения растворимой формы Fas-лиганда (sFasL) – «BMS260/2 human sFas-L ELISA».

Полученные данные сравнивали с показателями стадии раннего антрального

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

фолликула при помощи критерия Вилкоксона и с показателями соответствующей стадии развития фолликула в контрольной группе при помощи критерия Манна-Уитни.

При анализе связи признаков рассчитывали коэффициент корреляции по методу Спирмена. Результаты оценивали с учетом следующих величин r: $|r| \leq 0{,}25$ – корреляция слабой силы; $0{,}25 < |r| \leq 0{,}75$ – корреляция умеренной силы; $|r| > 0{,}75$ – тесная корреляция. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в исследовании принимали равным 0,05.

Результаты и обсуждение

Формирование полноценного доминантного фолликула в процессе фолликулогенеза определяется характерными морфологическими изменениями, обусловленными совокупностью пролиферативных процессов и степенью развития сосудов фолликула [1,5].

Ангиогенез является одним из важнейших физиологических процессов, необходимых для формирования и развития полноценного доминантного фолликула. Оценка кровотока в органах женской репродуктивной системы в настоящее время рассматривается как важный диагностический параметр для целого ряда патологических состояний [9].

Факторы ангиогенного потенциала выступают как важные молекулярно-биологические единицы, характеризующие в целом процесс сосудистой пролиферации и неоангиогенеза [10]. Хорошо известно, что регуляция ангиогенеза обеспечивается такими факторами роста как эндотелин-1, СЭФР, оФРФ, обеспечивающими формирование стабильного кровотока в сосудах репродуктивной системы [6,8].

Вместе с тем механизм ангиогенеза в процессе роста и созревания фолликулов реализуется в условиях тесного взаимодействия с процессами апоптоза и пролиферации, а все рассматриваемые процессы вместе обеспечивают адекватный рост и развитие фолликулов.

Хотя о существовании данных взаимосвязей известно, в доступной литерату-

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ре мы не обнаружили их количественной оценки, тем более – при исследовании хронологически пролонгированного процесса фолликулогенеза.

В связи с этим наша работа была направлена на изучение силы и характера взаимосвязей между маркерами функциональной компетентности и степенью зрелости фолликулов, что позволяет выявить ключевые мишени патологического стероидогенеза, а, соответственно, и значимые маркеры функциональной компетентности ооцитов.

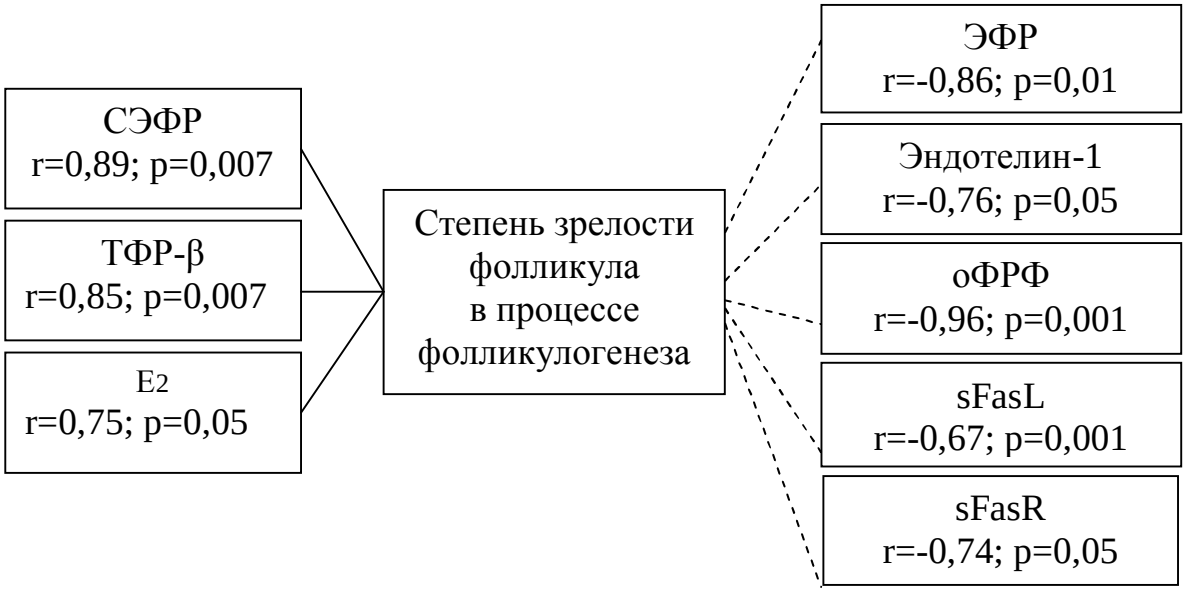

Рис. 1. Корреляционные взаимосвязи стероидных гормонов и факторов роста со степенью зрелости фолликула в контрольной группе пациенток.

Обозначения: здесь и на рис. 2-3:

—— связь положительная;

------ связь отрицательная.

В ходе исследования у пациенток с трубно-перитонеальной формой бесплодия была выявлена сильная степень влияния ЭФР (r = –0,86; p = 0,01), оФРФ (r = –0,96; p = 0,001), эндотелина-1 (r = –0,76; p = 0,05), СЭФР (r = 0,89; p = 0,007), ТФР-β (r = 0,85; p = 0,007) и E2 (r = 0,75; p = 0,05) на рост и развитие фолликулов. Средняя степень влияния была выявлена для sFasR (r = –0,74; p = 0,05) и sFasL (r = –0,67; p = 0,01) (рис.1).

Судя по полученным данным, для оценки физиологического фолликулогене-

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

за наиболее показательными являются маркеры пролиферации и ангиогенеза и, в несколько меньшей степени, апоптоза.

Идентичные зависимости между степенью зрелости фолликулов и факторами роста были обнаружены у пациенток с гиперандрогенией (ЭФР /r = –0,82; p = 0,014/, эндотелина-1 /r = –0,89; p = 0,007/, оФРФ /r = –0,93; p = 0,001/, ТФР-β /r = –0,92; p = 0,03/), СЭФР /r = 0,96; p = 0,001/, E_2 (r = 0,72; p = 0,05) (рис.2).

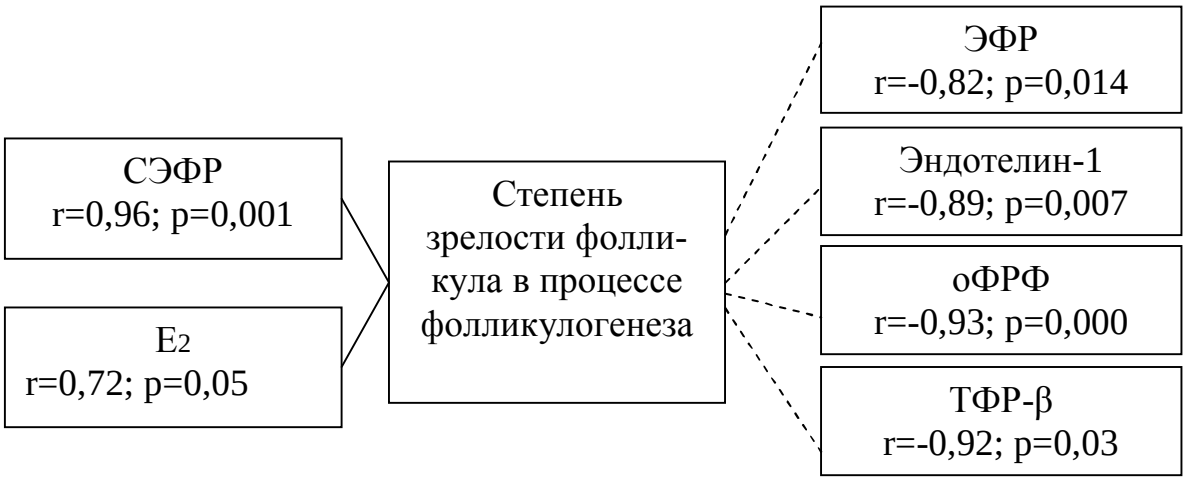

Рис. 2. Корреляционные взаимосвязи стероидных гормонов и факторов роста со степенью зрелости фолликула у пациенток с гиперандрогенией.

Достаточно интересным является обнаруженный нами факт сильной положительной взаимосвязи развития фолликулов с динамикой ТФР-β при трубно-перитонеальной форме бесплодия, в то время как в группе пациенток с гиперандрогенией выявлена инверсия данной взаимосвязи (рис.1,2).

В настоящее время считается доказанным, что ТФР-β во многом определяет успех имплантации и дальнейшее развитие беременности, поскольку обеспечивает развитие эмбриона до стадии бластоцисты [10]. Ранее в наших работах было показано, что при гиперандрогении нарушено формирование бластоцисты [3].

Кроме того, у пациенток с гиперандрогенией обнаружены высокие значения маркеров апоптоза, не коррелирующие со стадиями развития фолликулов, что, вероятно, свидетельствует о дискоординации процессов апоптоза и пролифера-

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ции при данной форме эндокринного бесплодия.

При изучении силы и характера взаимосвязей между маркерами функциональной компетентности и степенью зрелости фолликулов у пациенток с гиперпролактинемией была выявлена сильная степень влияния СЭФР (r = 0,92; p = 0,003) и E_2 (r = 0,94; p = 0,003) на формирование фолликула в процессе фолликулогенеза (рис. 3).

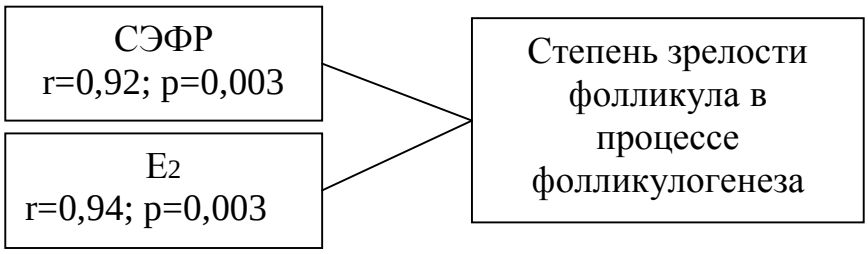

Рис. 3. Корреляционные взаимосвязи стероидных гормонов и факторов роста со степенью зрелости фолликула у пациенток с гиперпролактинемией.

В данном случае нами выявлена более сильная связь E_2 с динамикой роста фолликулов, чем в группах с трубно-перитонеальной формой бесплодия и гиперандрогенией, что может рассматриваться как своего рода механизм адаптации в условиях гиперпролактинемии, поскольку хорошо известна ключевая роль E_2, с одной стороны, как антиапоптотического фактора, а с другой стороны, как пускового агента для запуска неоангиогенеза [5,7].

Вышеизложенные результаты нашего исследования показывают, что механизмы пролиферации, ангиогенеза и апоптоза определяют рост и созревание фолликулов. Дискоординация этих процессов характеризует патологический фолликулогенез при эндокринном бесплодии.

Таким образом, нами определены значимые маркеры функциональной компетентности ооцитов. Выявление силы и направленности корреляционных взаимосвязей со стадиями роста и развития фолликулов позволяет заключить, что патологический фолликулогенез при эндокринном бесплодии является следствием существующей дизрегуляции взаимосвязанных процессов пролиферации,

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

ангиогенеза и апоптоза, характерных для патологического стероидогенеза.

THE FACTORS OF GROWTH WHICH DEFINE THE FEATURES OF FOLLICULOGENESIS AT ENDOCRINE INFERTILITY

E. A.Teplyashina, E.A. Pozhilenkova, M. V. Ekimova, A.B. Salmina

Krasnoyarsk State Medical University named after prof. V.F. Voino-Yasenetsky

Abstract. The aim of the study was to determine the relationship between growth factors and steroid hormones and the features of folliculogenesis at endocrine infertility. The authors proved that oocyte maturation at the endocrinopathy is in the conditions of dysregulation of the fundamental processes of steroid and angiogenesis, apoptosis and proliferation.

Key words: endocrine infertility, folliculogenesis, growth factors, angiogenesis, proliferation.

Литература

1. Боярский К.Ю., Гайдуков С.Н. Молекулярные основы фолликулогенеза: от стадии больших антральных фолликулов до овуляции // Пробл. репродукции. – 2010. – №5. – С. 13-23.

2. Бурлев В.А., Гаспаров А.С., Аванесян Н.С. Факторы роста и их роль в регуляции репродуктивной функции у больных с синдромом поликистозных яичников (обзор литературы) // Пробл. репродукции. – 1998. – №3. – С. 17-25.

3. Яманова М.В., Салмина А.Б. Эндокринное бесплодие: клеточная и молекулярная патология имплантации. – М., 2009. – 209 с.

4. Ben-Ami I., Freimann S., Armon L. et al. Novel function of ovarian growth factors: combined studies by DNA microarray, biochemical and physiological approaches // Mol. Hum. Reprod. – 2006. – Vol. 12. – P. 413-419.

5. Bruno J., Matos M., Chaves R. et al. Angiogenic factors and ovarian follicle development // Anim. Reprod. – 2009. – Vol. 6. – P. 371-379.

6. Abramovich D., Parborell F., Tesone M. Effect of a Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Inhibitory Treatment on the Folliculogenesis and Ovarian

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com

Apoptosis in Gonadotropin-Treated Prepubertal Rats // Biol. Reprod. – 2006. – Vol. 75 – P. 434–441.

7. Erickson G., Shimasaki S. The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors // Fertil. Steril. – 2001. – Vol. 76. – P. 943-949.

8. Geva E., Jaffe R. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology // Fertil. Steril. – 2000. – Vol. 74. – P. 429–438.

9. Lam P. Vascular endothelial growth factor plays more than an angiogenic role in the female reproductive system // Fertil. Steril. – 2005. – Vol. 84 – P. 1775-1778.

10. Losordo D., Isner J. Estrogen and Angiogenesis // Arterioscler Thromb. Vasc. Biol. – 2001. – Vol. 21. – P. 6–12.

Сведения об авторах

Тепляшина Елена Анатольевна – аспирант кафедры биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии КрасГМУ, e-mail: elenateplyashina@mail.ru.

Екимова Марина Викторовна – д.м.н., проф. кафедры клинико-лабораторной диагностики ИПО КрасГМУ, e-mail: ekimovamv@mail.ru.

Пожиленкова Елена Анатольевна – к.б.н., доцент кафедры биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии КрасГМУ, e-mail: pozhilenkova@yandex.ru.

Салмина Алла Борисовна – д.м.н., проф., зав. кафедрой биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии КрасГМУ, руководитель НИИ молекулярной медицины и патобиохими, e-mail: allasalmina@mail.ru.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www.pdffactory.com