

На правах рукописи

Липов Данил Сергеевич

**РОЛЬ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ -1, -9, -19 И АПОПТОЗА
В НАРУШЕНИИ РЕПРОДУКТИВНОЙ ФУНКЦИИ ПРИ
ЭКСТРАГЕНИТАЛЬНЫХ ВОСПАЛИТЕЛЬНО-ДЕСТРУКТИВНЫХ
ПРОЦЕССАХ (КЛИНИКО-ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

3.3.3. Патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Краснодар – 2023

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор
Рогова Людмила Николаевна.

Официальные оппоненты:

Афанасьева Галина Александровна – доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра патологической физиологии имени академика А.А. Богомольца, заведующая кафедрой;

Бобынцев Игорь Иванович – доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра патофизиологии, заведующий кафедрой.

Ведущая организация:

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ставропольский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится 14 февраля 2024 г. в 09.00 час. на заседании диссертационного совета 21.2.014.02 на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России) (350063, Краснодар, ул. Митрофана Седина, д. 4, тел. (861) 2625018).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на официальном сайте (<http://www.ksma.ru>) ФГБОУ ВО КубГМУ Минздрава России.

Автореферат разослан « ____ » _____ 202_ г.

Учёный секретарь
диссертационного совета 21.2.014.02
доктор медицинских наук,
профессор



Лапина Наталья Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Проблема бесплодия в настоящее время является актуальным и во многом неразрешенным вопросом, затрагивающим как мужчин, так и женщин. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, в глобальных масштабах насчитывается от 50 до 80 миллионов пар, сталкивающихся с нарушением репродуктивной функции. Касаясь нашей страны, в соответствии с оценками ученых, проблемы с фертильностью испытывают до 25% пар (Оразов М.Р., 2021; Путило А.О., 2020; Годовалов А.П., 2019).

Трудности, связанные с женской бесплодием, привлекают серьезное внимание исследователей из-за сложности анатомической структуры и физиологии женской репродуктивной системы, а также важной роли, которую она играет в фертильности (Chih H.J., 2021). Принято выделять ряд факторов, влияющих на нарушение способности женщин к зачатию. Среди них возраст, наличие хронических заболеваний, образ жизни, токсины окружающей среды и генетические особенности (Сандакова Е.А., 2017). Последние исследования активно изучают связь между хронической экстрагенитальной патологией воспалительного характера и возникновением бесплодия. Известно, что экстрагенитальные заболевания могут оказывать существенное воздействие на женскую репродуктивную систему, вызывая расстройства в сфере фертильности (Anjos JGGD, 2021). Разнообразные заболевания, такие как сахарный диабет, дисфункция иммунной системы и аутоиммунные процессы, патологии щитовидной железы, гипоталамо-гипофизарнояичниковая дисрегуляция, способны негативно повлиять на функцию матки, яичников и процесс созревания ооцитов (Heber MF, 2021).

Степень ее разработанности. Нарушение процессов созревания ооцитов большинство исследователей на современном этапе определяют как ключевую причину женского бесплодия (King ML, 2017). Одну из важных функций в созревании ооцитов играет его взаимодействие с соматическими клетками – гранулезными клетками, окружающими его (Sutton-McDowall M.L., 2010). Эти клетки, в частности, ответственны за выработку эстрогенов и участвуют в регуляции уровня фолликулостимулирующего гормона, необходимых для развития фолликула (Hsueh A.J., 2015). Последние исследования показывают, что гранулезные клетки напрямую влияют на качество яйцеклеток, так как выделяют разнообразные факторы роста и другие сигнальные молекулы, определяющие их созревание (El-Науек S., 2018).

В ряде исследований как отечественных, так и зарубежных ученых, осуществляется количественная и качественная оценка апоптоза в гранулезных клетках, а также его влияние на процессы созревания ооцитов. Одни исследователи считают, что ингибирование апоптоза в этих клетках способствует росту фолликулов и улучшению качества яйцеклеток (El-Hayek S., 2018). Другие исследования показывают, что избирательный апоптоз гранулезных клеток во время созревания ооцитов все же необходим для успешной овуляции (Li Y., 2019). Также установлено, что апоптоз регулируется сложным взаимодействием сигнальных путей, включая систему Fas/FasL и семейство белков Bcl-2 (Li Y., 2019). Многие эксперты полагают, что исследование механизмов, лежащих в основе апоптоза в гранулезных клетках, необходимы для разработки целенаправленных методов лечения бесплодия и других расстройств репродуктивной функции (Sun C., 2010). Следует отметить, что основные объекты исследований составляли клетки животных (крупный рогатый скот, свиньи), в то время как человеческие образцы использовались лишь в единичных случаях.

Другой причиной бесплодия может быть нарушение функционирования компонентов межклеточного матрикса, что может привести к нарушениям имплантации эмбриона и развитию плаценты (Pundir J et al., 2017). Особую значимость при этом приобретают матриксные металлопротеиназы – ферменты, играющие важную роль в различных биологических процессах, таких как разрушение экстрацеллюлярной матрицы, регулирование клеточной миграции и пролиферации.

Анализ доступных литературных данных показывает, что экспрессия ММП-1, -9 и -19 (внутриканевая коллагеназа, желатиназа-B и стромелизин-4) в тканях матки и яичников играет существенную роль в разнообразных физиологических и патологических процессах. Эти белки принимают участие в регуляции имплантации и развитии эмбриона, а также в ремоделировании эндометрия в менструальном цикле и фолликулогенезе. Более того, дисбаланс экспрессии и активности данных ММП может способствовать развитию эндометриоза, воспалению матки, содействовать прогрессии новообразований и повлиять на нарушения репродуктивной функции (Куама СМ, 2019). При этом, воздействие экстрагенитальной патологии воспалительного характера на показатели экспрессии матриксных металлопротеиназ в тканях матки и яичников до сих пор остается недостаточно исследованным.

Цель исследования: для установления новых патогенетических механизмов нарушения репродуктивной функции у женщин определить

активность матриксных металлопротеиназ -1, -9, -19 в матке и яичниках и интенсивность апоптоза гранулезных клеток при экстрагенитальных воспалительно-деструктивных процессах.

Задачи исследования:

1. Оценить интенсивность апоптоза гранулезных клеток у женщин, имеющих в анамнезе экстрагенитальные воспалительно-деструктивные процессы в дыхательной и пищеварительной системах.

2. Изучить изменения структурно-функциональных показателей развития фолликулов в яичниках у крыс при моделировании экстрагенитальных воспалительно-деструктивных процессов в брюшной полости и дыхательной системе.

3. Исследовать механизмы изменения маточного кровотока при моделировании экстрагенитальных воспалительно-деструктивных процессов в брюшной полости и дыхательной системе на крысах путем проведения функциональных проб с ацетилхолином и L-NAME.

4. Определить показатели активности матриксных металлопротеиназ -1, -9, -19 в тканях матки и яичников у крыс на фоне экстрагенитальных воспалительно-деструктивных процессов в брюшной полости и дыхательной системе.

Научная новизна. Впервые описаны структурно-функциональные изменения тканей яичников и матки при экспериментальном моделировании экстрагенитальных воспалительно-деструктивных процессов в брюшной полости и дыхательной системе.

Установлено, что экстрагенитальные воспалительно-деструктивные процессы, снижают число зрелых ооцитов у пациенток в яичниках и повышают интенсивность апоптоза в гранулезных клетках.

Определены механизмы нарушения маточного кровотока при экстрагенитальных воспалительно-деструктивных процессах в брюшной полости и дыхательной системе на фоне введения ацетилхолина и L-NAME.

Впервые определена активность матриксных металлопротеиназ -1, -9 и -19 в тканях матки, корковом и мозговом веществе яичников на фоне экстрагенитальных воспалительно-деструктивных процессов в брюшной полости и дыхательной системе.

Установлены предикторы нарушения репродуктивной функции у женщин с экстрагенитальной воспалительной патологией дыхательной и пищеварительной систем в анамнезе.

Теоретическая и практическая значимость работы. Установлена роль экстрагенитальных воспалительно-деструктивных процессов в брюшной полости и дыхательной системе в нарушении репродуктивной функции у женщин.

Показано, что экстрагенитальная патология воспалительного генеза дыхательной и пищеварительной систем приводит к повышению уровня апоптоза в гранулезных клетках, что влияет на процессы оогенеза и негативно сказывается на фертильности у женщин.

Установлено, что экстрагенитальные воспалительные процессы влияют на активность ММП -1, -9, 19 в различных слоях матки, при этом как увеличение, так и уменьшение активности этих ферментов может нарушать процессы ремоделирования матрикса, и в свою очередь отражаться на репродуктивной функции.

Выяснение роли матриксных металлопротеиназ и апоптоза гранулезных клеток в нарушении репродуктивной функции создает новые подходы в разработке целевых терапевтических стратегий, направленных на предотвращение или устранение этих нарушений.

Полученные результаты играют важную роль в оптимизации клинической практики, предоставляя новые знания о молекулярных механизмах, которые могут быть целевыми для диагностики и лечения пациентов с экстрагенитальными воспалительно-деструктивными процессами.

Методология и методы исследования. Диссертационное исследование проведено с соблюдением принципов доказательной медицины. Используются клинические, гистологические, иммуногистохимические, функциональные и статистические методы анализа, а также метод моделирования патологии на животных. Объект экспериментальной части исследования – крысы-самки линии Wistar на которых моделировали перитонит (Дзюбенко Н.Ю., 1999) и пневмонию (Рогова Л.Н. с соавт., 2020) с последующим гистологическим и иммуногистохимическим исследованием органов репродуктивной системы, а также оценкой гемодинамики в маточной артерии на фоне вышеописанной патологии с проведением фармакологической проб для определения роли NO-синтаз в изменении регионального кровотока. Клинический блок исследований включал оценку уровня апоптоза гранулезных клеток, полученных у женщин, проходивших лечение бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий, в анамнезе которых была хроническая экстрагенитальная патология дыхательной и пищеварительной системы воспалительной природы.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Экстрагенитальная патология воспалительного генеза дыхательной и пищеварительной систем в анамнезе пациенток приводит к повышению уровня апоптоза в гранулезных клетках, что влияет на процессы оогенеза и негативно сказывается на фертильности у женщин.

2. Экспериментальный перитонит и экспериментальная пневмония влияют на активность ММП -1, -9, 19 в различных слоях матки и яичника, при этом как увеличение, так и уменьшение активности этих ферментов может нарушать процессы ремоделирования матрикса, и в свою очередь отражаться на репродуктивной функции.

3. Экспериментальный перитонит и экспериментальная пневмония приводят к достоверному уменьшению линейной скорости маточного кровотока и компенсаторному усилению активности NO-синтаз, которой недостаточно для купирования вазоконстрикции.

Степень достоверности и апробация результатов. Степень достоверности полученных данных обусловлена корректной постановкой экспериментов с учётом наличия необходимых контрольных групп, а также использованием достаточного объема наблюдений. В ходе исследования широко применены современные методы исследований, что в совокупности с адекватными методами статистической оценки полученных данных обеспечивают высокую степень точности и доверия к результатам.

Основные положения исследования доложены и обсуждены на: конференции «Фундаментальные медицинские и биологические науки» в рамках II Дальневосточного медицинского конгресса (Хабаровск, 2021); 80-й и 81-й Международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2022, 2023); Международном медицинском форуме «Вузовская наука. Инновации» (Москва, 2022; 2023) I научно-практической конференции с международным участием «Привентивная медицина как основа качественного и здорового долголетия» (Оренбург, 2023).

Диссертационная работа апробирована на расширенном заседании кафедры патофизиологии, клинической патофизиологии, кафедры патологической анатомии, кафедры акушерства и гинекологии Института НМФО, кафедры анатомии, кафедры нормальной физиологии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России.

Внедрение результатов исследования. Результаты исследования внедрены и используются научно-исследовательской деятельности кафедры

патофизиологии, клинической патофизиологии и кафедры акушерства и гинекологии Института НМФО ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, а также в практическую работу отделения лучевой диагностики ГУЗ Клиническая поликлиника №28 г. Волгоград.

Публикации. Всего по материалам диссертационного исследования опубликовано 11 научных работ, из которых 5 – в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий или входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук и издания, приравненные к ним, в том числе получено 1 свидетельство государственной регистрации баз данных, охраняемых авторским правом.

Личный вклад автора в исследование. Автором самостоятельно проведены анализ литературных данных по теме исследование, моделирование экспериментального перитонита и экспериментальной пневмонии у крыс, забор материала, патоморфологическое исследование, эксперименты по изучению гемодинамики у крыс, статистическая обработка полученных результатов экспериментального и клинического блоков исследования. В соавторстве подготовлены публикации и заявки на государственную регистрацию баз данных, охраняемых авторским правом.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 142 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, двух глав собственных данных, обсуждение полученных результатов исследования, выводов, списка литературы и приложения. Библиографический указатель включает 201 работу (137 отечественных и 64 иностранных). Работа иллюстрирована 17 рисунками и 7 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Диссертационная работа включала в себя клиническую и экспериментальную части. Экспериментальная часть была выполнена на базе лаборатории кафедры патофизиологии, клинической патофизиологии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России и лаборатории клеточных технологий Научного центра инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России.

Клиническая часть была выполнена на базе отделения вспомогательных репродуктивных технологий Многопрофильной Клиники №1 ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России и лаборатории клеточных технологии Научного центра инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. Исследования были одобрены локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России (справка № 2021/53 от 27.05.2021).

Экспериментальная часть была выполнена на 65 самках крыс линии Вистар массой $250 \pm 15,5$ г, поделенных на 4 группы. Животные содержались в стандартных условиях вивария согласно правилам GLP при проведении доклинических исследований в РФ (Приказ Минздрава России от 01.04.2016 №199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики»), с соблюдением требований Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964 г) и этических принципов Европейского научного фонда (ESF). Дизайн экспериментальной части исследования представлен на рисунке 1.

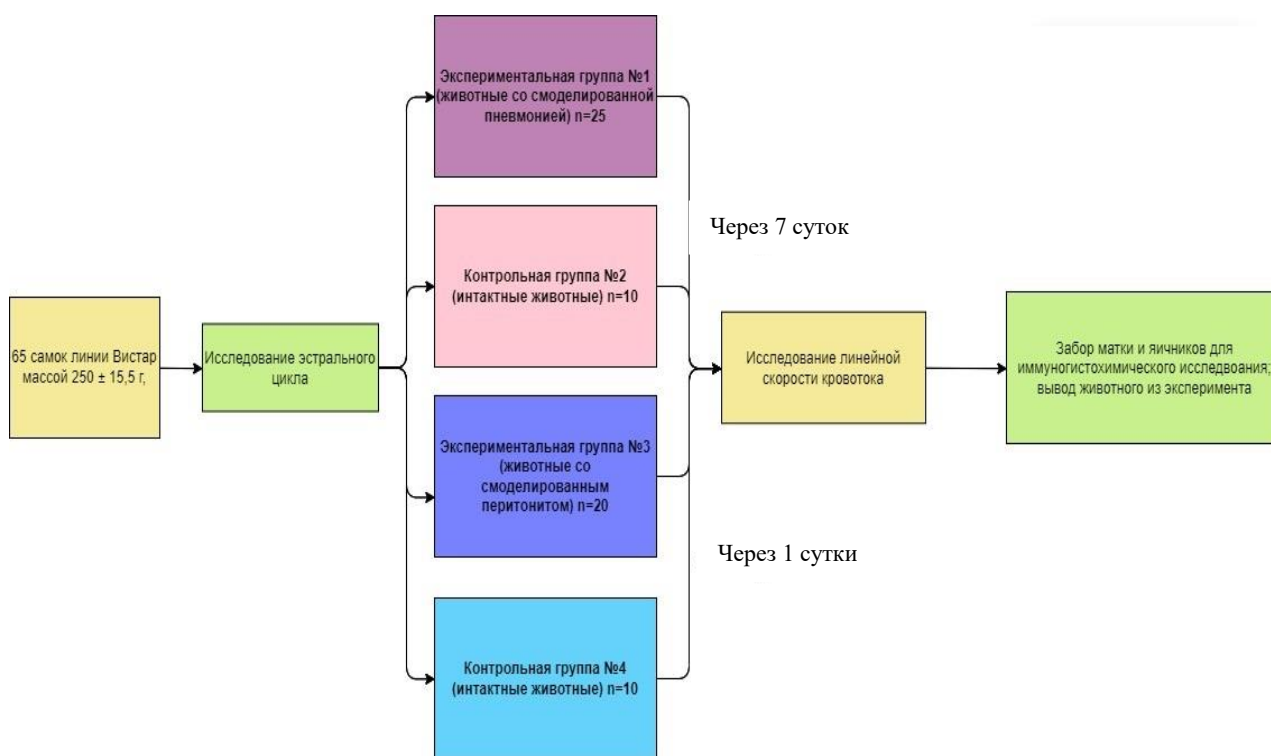


Рисунок 1 – Дизайн экспериментальной части исследования

Метод моделирования пневмонии. Животным первой экспериментальной группы моделировали пневмонию путём чрескожного введения в паренхиму лёгких 0,4 мл дважды профильтрованной через тройной слой стерильной марли взвеси аутокала в физиологическом растворе в

пропорции 1:10 (Рогова Л.Н. с соавт., 2020). Такая доза патологического материала обеспечивает через 7 суток эксперимента развитие типичной морфологической картины острой пневмонии. Моделирование проводилось в утренние часы натощак под анестезией Рометаром (2-3 мг на 1 кг массы животного).

Метод моделирования перитонита. Животным третьей экспериментальной группы перитонит моделировали путем интраперитонеального введения 1 мл 7% аутокаловой взвеси в физиологическом растворе с 1 каплей скипидара. Моделирование проводилось в утренние часы натощак под анестезией Рометаром (2-3 мг на 1 кг массы животного). Данная методика приводит к формированию типичной картины перитонита спустя 24 часа после моделирования.

Измерение скорости кровотока в маточной артерии. Через 1 сутки в 1 экспериментальной группе и 2 контрольной группе и через 7 суток в 3 экспериментальной группе и 4 контрольной группе изучали линейную скорость кровотока в маточной артерии и активность NO-синтаз, согласно схеме, указанной на рисунке 2.

Алгоритм определения скорости кровотока в маточной артерии у животных экспериментальных и контрольных групп по схеме:

1. Наркотизация животного, катетеризация яремной вены.
2. Измерение линейной скорости кровотока в маточной артерии.
3. Введение ацетилхолина через катетеризированную яремную вену.
4. Повторное измерение линейной скорости кровотока в маточной артерии.
5. Введение L-NAME через катетеризированную яремную вену.
6. Очередное измерение линейной скорости кровотока в маточной артерии.

Рисунок 2 – Схема исследования скорости кровотока в маточной артерии

Животным, предварительно наркотизированных хлоралгидратом из расчёта 400 мг/кг массы, катетеризировали яремную вену, через которую вводили фармакологически активные вещества для определения сосудорегулирующей функции эндотелия. В качестве фармакологически активных веществ использовали АХ (ацетилхолин хлорид, 0,01 мг/кг,

Acrosorganics, США), стимулирующий локальное высвобождение эндотелием NO, и L-NAME (метилловый эфир L-нитроаргинина, 10 мг/кг, Acrosorganics, США), ингибирующий активность нитрооксидсинтаз. Линейную и объемную скорость кровотока измеряли на маточной артерии у разных особей с помощью высокочастотного ультразвукового доплерографа (Минимакс-Допплер-К, Санкт-Петербург).

По результатам эксперимента оценивали реакции маточного кровотока (РМК) на вышеуказанные биологически активные вещества. С этой целью определяли максимальный прирост показателя линейной скорости при введении АХ (РМК (АХ)) и максимальное снижение показателя линейной скорости при введении L-NAME (РМК (L-NAME)) относительно исходных значений показателя гемоциркуляции. Оба показателя рассчитывали по формуле: $РМК (АХ) = ЛС_{макс} / ЛС_{исх} * 100 \%$, (где ЛС_{макс} – максимальное значение линейной скорости кровотока; ЛС_{исх} – исходное значение линейной скорости кровотока). $РМК (L-NAME) = ЛС_{мин} / ЛС_{исх} * 100 \%$, (где ЛС_{мин} – минимальное значение линейной скорости кровотока; ЛС_{исх} – исходное значение линейной скорости кровотока).

Степень прироста линейной скорости тока крови в маточной артерии при введении АХ в сравнении с последующим снижением скорости на фоне введения L-NAME отражает функциональную активность NO-синтаз (ФАЭ), которая заключается в её способности вырабатывать вазодилататор NO. Данный показатель рассчитывался по формуле: $ФАЭ = (РМК (АХ) / РМК (L-NAME)) * 100 \%$.

Гистологические методы оценки ткани матки и яичников. Для гистологического исследования производили забор матки и яичников у экспериментальных и контрольной групп животных после измерения скорости маточного кровотока, по методике, описанной выше. Ткани фиксировали в 10% забуференном формалине, проводили по батарее восходящих спиртов, заливали в парафин. Срезы тканей толщиной 5-6 мкм окрашивали гематоксилином и эозином и исследовали на микроскопе Imager. A2.AXIO (ZEISS), с последующим фотографированием фотокамерой AxioCam 305 color (ZEISS)

Методы определения ММП-1, -9, -19 в матке и яичниках. Для оценки экспрессии ММП-1, -9, -19 использовали полуколичественный иммуногистохимический метод, фиксируя число иммунопозитивных клеток и интенсивность их окрашивания в матке и яичнике по стандартной методике с использованием антител фирмы «Новокастра» ММП-1, -9, -19 (NCL-MMP-1, -

9, -19 для парафиновых блоков, рабочее разведение 1:40) у экспериментальных и контрольных групп животных.

Парафиновые срезы (толщиной 4-5 микрон) фиксировали на стеклах, предварительно обработанных поли-L-лизинном, депарафинизировали в ксилоле и проводили регидратацию в 96 ° спирте. Отмывали в дистиллированной воде. Затем проводили блокирование активности эндогенной пероксидазы, охлажденной 0,3% перекисью водорода в течение 10 минут, и промывали в дистиллированной воде. Антигенную структуру ткани восстанавливали с использованием Target Retrieval Solution (ДАКО; рН=6,0) в СВЧ – печи (мощность 130 Вт) 25 минут с остыванием в течение 20 минут при комнатной температуре. Промывали в дистиллированной воде. Наносили первичные антитела и проводили инкубацию 30 минут при комнатной температуре во влажной камере. После ополаскивания и промывания в Triss-HCL буфере (рН=7,6) 2 раза по 5 минут инкубировали с En Vision (ДАКО) 30 минут, ополаскивали и промывали в буфере аналогичным образом. Затем наносили DAB. После докраски гематоксилином и обезвоживания срезы заключали в канадский бальзам и накрывали покровным стеклом (MacCornic D. et al., 1993; Кокосадзе Н.В., Заводиленко К.В., 2006).

В срезах оценивали удельное число (в %) положительно окрашенных клеток в 5-ти случайно выбранных полях зрения (≥ 500 клеток), используя окуляр 10 и объектив 40. Интенсивность иммуногистохимической реакции оценивали по всему образцу матки с последующим усреднением, используя полуколичественную шкалу, где 0 оценивалась как негативная реакция (или отсутствие окрашивания), 1 – слабopоложительная реакция или легкое окрашивание, 2 – умеренное окрашивание (или умеренная реакция), 3 – интенсивное окрашивание или выраженная реакция. Оценку указанных показателей экспрессии металлопротеиназ проводили в эндометрии, миометрии и периметрии матки и корковом и мозговом веществе яичника соответственно.

Клиническая часть исследования представляла собой анализ образцов гранулезных клеток 60 пациенток, проходивших лечение бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий в Клинике №1 ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России в период с 2021 по 2022 год и соответствующие критериям включения: возраст пациенток 20–45 лет; наличие в анамнезе подтвержденного хронического воспалительного заболевания пищеварительной системы (гастриты, дуодениты, язвенная болезнь желудка и (или) двенадцатиперстной кишки, панкреатиты) или воспалительного заболевания дыхательной системы (хроническая патология — хронические

бронхиты или частая острая патология (более 4 раз в год) — ОРВИ, грипп, бронхит, ларингит, трахеит, пневмония), для контрольной группы отбирались пациентки без экстрагенитальной патологии в анамнезе; период предшествующего бесплодия не менее года; наличие в анамнезе подтвержденного трубного фактора бесплодия; наличие подписанного информированного добровольного согласия пациента на участие в исследовании. Критерии исключения из исследования: сочетанная патология дыхательной и пищеварительной системы в анамнезе; онкологические заболевания в анамнезе; отказ пациентки от исследования и обработки персональных данных; социально незащищенные группы населения. Дизайн клинической части исследования представлен на рисунке 3.

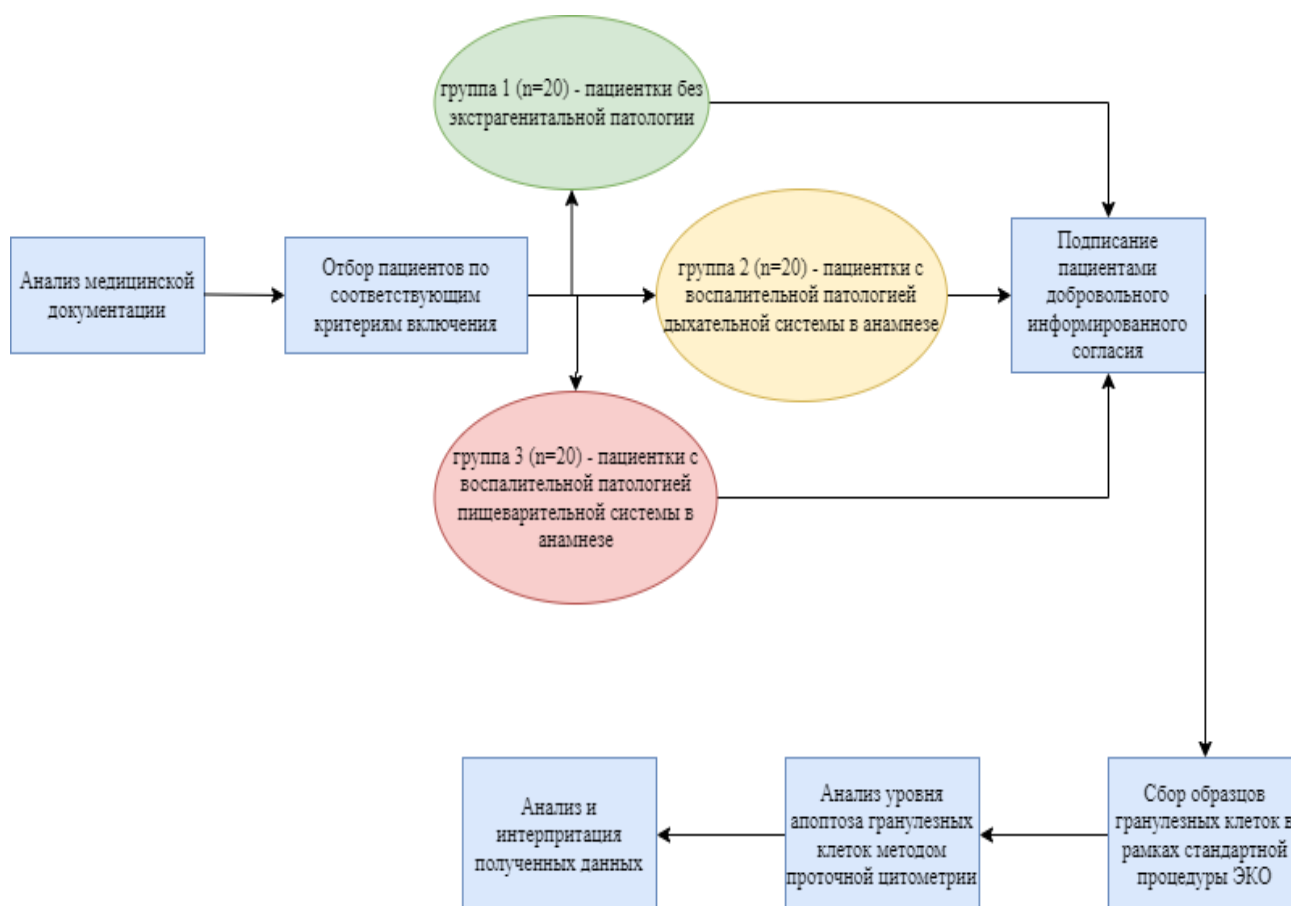


Рисунок 3 – Дизайн клинической части исследования

Изучение уровня апоптоза в гранулезных клетках. Оценку количества гранулезных клеток с признаками апоптоза проводили с использованием коммерческого набора для проточной цитометрии «Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V FITC and PI» (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc.). Суспензию клеток отмывали физиологическим

раствором. Отмытые гранулезные клетки подсчитывали, затем ресуспензировали в аннексин-связывающем буфере для получения концентрации $1 \cdot 10^6$ клеток в мл, инкубировали 15 минут при комнатной температуре с аннексином V-FITC и йодидом пропидия (PI), согласно инструкции производителя набора. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре Attune® Acoustic Focusing Cytometer (не менее 10 тыс. событий). Результаты интерпретировали следующим образом: живые клетки не проявляли флуоресценции (Annexin V-FITC-/PI-), клетки в состоянии раннего апоптоза – Annexin V-FITC+/PI-, клетки в состоянии позднего апоптоза – Annexin V-FITC+/PI+.

Методы статистической обработки данных. Статистический анализ полученных результатов в экспериментальной и клинической частях исследования проводился с использованием программы StatTech v. 2.8.8 (разработчик – ООО «Статтех», Россия). Количественные показатели оценивались на предмет соответствия нормальному распределению с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Количественные показатели, имеющие нормальное распределение, описывались с помощью средних арифметических величин (M) и стандартных отклонений (SD), границ 95 % доверительного интервала (95 % ДИ). В случае отсутствия нормального распределения количественные данные описывались с помощью медианы (Me), нижнего и верхнего квартилей (Q1-Q3). Сравнение трёх и более групп по количественному показателю, имеющему нормальное распределение, выполнялось с помощью однофакторного дисперсионного анализа, апостериорные сравнения проводились с помощью критерия Фишера (при условии равенства дисперсий), критерия Уэлча (при неравных дисперсиях). Сравнение трёх и более групп по количественному показателю, распределение которого отличалось от нормального, выполнялось с помощью критерия Краскела-Уоллиса. Направление и теснота корреляционной связи между двумя количественными показателями оценивались с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена (при распределении показателей, отличном от нормального).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

На основе анализа данных медицинской документации 184 пациенток, проходивших лечение бесплодия методами ВРТ, в Клинике №1 ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России в период с 2015 – 2020 года мы установили, что распространённость хронических экстрагенитальных воспалительных

заболеваний у женщин с нарушением репродуктивной функции довольно высока. Наиболее распространена патология дыхательной системы (хронические бронхиты или частая острая патология (более 4 раз в год) – ОРВИ, грипп, бронхиты, ларингиты, трахеиты, пневмония) и пищеварительной системы (хронические гастриты, хронические дуодениты, язвенная болезнь желудка и (или) двенадцатиперстной кишки, хронические панкреатиты) (рисунок 4). Именно поэтому для дальнейшего клинического исследования мы использовали данные разновидности экстрагенитальных заболеваний для изучения их влияния на показатели женской фертильности.

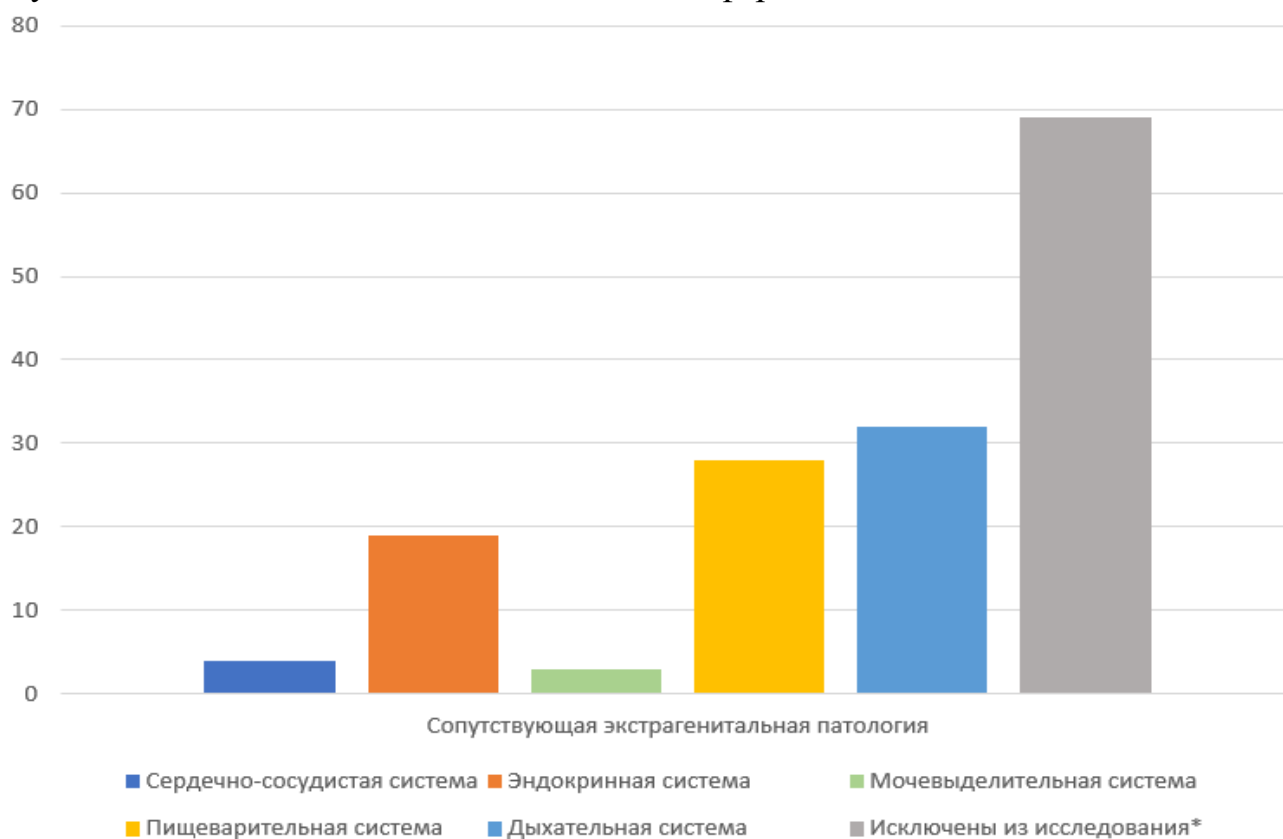


Рисунок 4 – Структура сопутствующей экстрагенитальной патологии у женщин, проходивших лечение бесплодия методами ВРТ, в Клинике №1 ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России в период с 2015 – 2020 года.

Примечание: *Из исследования исключались пациентки с отсутствием данных (или неполными данными) по изучаемым параметрам, наличием врожденных анатомических аномалий строения женской репродуктивной системы (n=69).

В ходе проведенного анализа уровня апоптоза мы установили, что экстрагенитальная воспалительная патология пищеварительной и дыхательной систем в анамнезе пациенток влияет на процесс оогенеза. Это подтверждается тем фактом, что у женщин без вышеуказанных заболеваний количество зрелых ооцитов, полученных в результате пункции фолликулов, составляло $13,44 \pm$

2,60, тогда как у женщин, имеющих патологию дыхательной системы и желудочно-кишечного тракта воспалительного генеза, количество ооцитов было достоверно ниже — $4,47 \pm 2,00$ ($p = 0,001$) и $7,10 \pm 1,85$ ($p = 0,001$) соответственно.

Помимо этого, экстрагенитальная воспалительная патология пищеварительной и дыхательной систем в анамнезе пациенток ассоциировалась с усилением апоптоза гранулезных клеток. Так, у женщин, не имеющих экстрагенитальную патологию, процент живых гранулезных клеток был статистически значимо выше ($0,2673 \pm 0,0151\%$), а показатель раннего и позднего апоптоза значимо ниже ($0,0088 \pm 0,0062\%$ и $0,0028\%$ [$0,0012-0,0046\%$]), чем у пациенток, имеющих хроническую воспалительную патологию пищеварительной системы (количество живых клеток — $0,2195 \pm 0,0154\%$ ($p = 0,001$), показатель раннего и позднего апоптоза — $0,0140 \pm 0,0099\%$ ($p = 0,015$) и $0,0132\%$ [$0,0102-0,0206\%$] ($p = 0,008$)) и у пациенток с хронической воспалительной патологией дыхательной системы (количество живых клеток — $0,1946 \pm 0,0227\%$ ($p = 0,001$), показатель раннего и позднего апоптоза — $0,0650 \pm 0,0391\%$ ($p = 0,033$) и $0,0300\%$ [$0,0161-0,0393\%$] ($p = 0,001$)). Помимо этого, была выявлена заметная обратная корреляционная зависимость между параметрами апоптоза в гранулезных клетках и числом зрелых ооцитов у пациенток.

В экспериментальной части исследования при анализе линейной скорости кровотока и функциональной активности NO-синтаз в маточной артерии у крыс на фоне экспериментального перитонита и экспериментальной пневмонии было установлено, что перед фармакологическими пробами скорость кровотока у крыс в исходном состоянии была различной в обеих экспериментальных и контрольных группах. В первой группе она была ниже на $56,81\%$ ($p=0,039$), а во второй группе – на $51,66\%$ ($p=0,021$) по сравнению с линейной скоростью у контрольных животных в обеих подгруппах. После введения ацетилхолина у всех групп животных отмечалось увеличение скорости кровотока с последующим возвращением к исходному уровню. При расчете процента прироста линейной скорости кровотока в ответ на действие препарата у контрольных групп животных этот показатель составил $+19,85\%$ ($p<0,001$) относительно исходного состояния. В первой экспериментальной группе с пневмонией – $+142,74\%$ ($p<0,05$), а во второй экспериментальной группе – $+34,86\%$ ($p<0,001$). Введение L-NAME у всех групп животных приводило через 15-20 минут к плавному снижению линейной скорости кровотока до минимальных значений. В это время мы наблюдали максимальная

вазоконстрикцию, приводившую к уменьшению линейной скорости кровотока у контрольных животных на 50,03% ($p < 0,001$), в первой экспериментальной группе – на 51,93% ($p < 0,001$), а во второй группе – на 54,04% ($p < 0,001$) по сравнению с исходными показателями в своих экспериментальных группах. Функциональная активность NO-синтаз в маточной артерии при перитоните, оцениваемой на фоне функциональных проб с АХ и L-NAME, имела тенденцию к преобладанию над показателем в контроле, но это изменение незначимо, тогда как функциональная активность NO-синтаз в маточной артерии при пневмонии была достоверно выше показателя контрольной группы.

При гистологическом исследовании репродуктивных органов было установлено, что механизмы формирования и развития экспериментального перитонита и экспериментальной пневмонии влияли на структуру яичника. Так при экспериментальном перитоните статистически достоверно снижалось количество примордиальных фолликулов по сравнению с контрольной группой (20,00 [30,50;38,25] – при перитоните и 33,50 [30,50;38,25] – в контрольной группе, $p < 0,05$). Помимо этого, в яичниках экспериментальных животных этой группы отмечалось выраженное полнокровие сосудов, очаговые эритростызы, обширные участки зрелой грануляционной ткани. При моделировании экспериментальной пневмонии отмечалось более высокое содержание атретических фолликулов по сравнению с контрольной группой (11,00 [7,00;16,00] – при пневмонии и 1,50 [1,00;2,00] – в контрольной группе, $p < 0,05$). При этом атрезии преимущественно подвергались первичные и вторичные фолликулы. Также практически во всех желтых телах выявлялись многочисленные фибробласты и выраженное полнокровие капилляров. Вышеуказанные изменения говорят в первую очередь о том, что при моделировании перитонита и пневмонии нарушаются нормальные процессы фолликулогенеза. В матке механизмы формирования и развития экспериментального перитонита и экспериментальной пневмонии способствовали инфильтрации эозинофильными лейкоцитами органа. При моделировании экспериментального перитонита также способствовало развитию полнокровия сосудов.

При иммуногистохимическом исследовании было установлено, что при перитоните через сутки с момента моделирования число клеток экспрессирующих ММП-1 в эндометрии, миометрии увеличивалось по сравнению контрольной группой: 73,70-[62,11;85,29] % и 40,40 [24,10;56,70] % $p < 0,05$ – в эндометрии; 11,10 [5,41;16,79]% и 4,20 [2,55;5,85]% $p < 0,05$ – в

миометрии. В периметрии же число клеток экспрессирующих ММП-1 было достоверно ниже, чем в контрольной группе: 22,50 [4,75;46,50] % и 42,50 [19,50;56,75] % $p < 0,05$, соответственно. На фоне экспериментальной пневмонии число клеток экспрессирующих ММП-1 достоверно снижалось в эндометрии и периметрии по сравнению с контрольной группой и группой животных с экспериментальным перитонитом и составило 24,30 [7,95;40,65]% и 6,00 [1,25;7,50]% $p < 0,05$. Также достоверно отличалась интенсивность экспрессии ММП-1 в эндометрии и периметрии по сравнению с контрольной группой и группой животных с экспериментальным перитонитом 1,00 [1,00;1,00] и 1,00 [0,00;1,00] баллов соответственно (рисунок 5). При анализе активности ММП-9 и ММП-19 при экспериментальном перитоните и экспериментальной пневмонии мы наблюдали тенденцию к снижению числа антигенпозитивных клеток в эндометрии по сравнению с контрольной группой, а ММП-19 – и в миометрии.

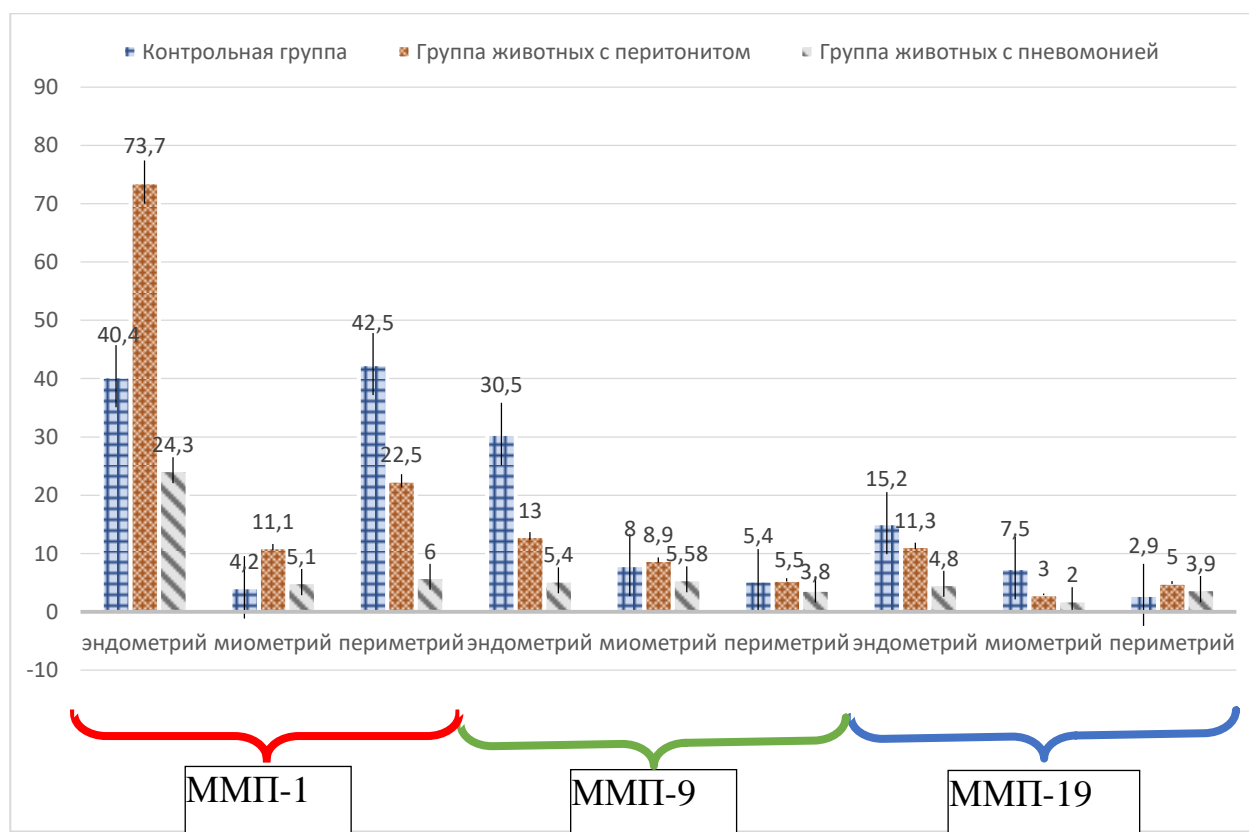


Рисунок 5 – Удельное число экспрессии иммунопозитивных клеток в тканях матки животных контрольной и экспериментальной групп

Удельное число клеток экспрессирующих ММП-1 в корковом слое яичника при перитоните увеличивалось по сравнению с контрольной группой животных (45,62 [33,16;58,09] % – контрольная группа животных, 67,25

[58,89;76,61] % $p < 0,05$ - группа животных с перитонитом), а при пневмонии число иммунопозитивных клеток статистически значимо уменьшилось (45,62 [33,16;58,09] % – контрольная группа животных, 36,00 [26,72;45,28] % $p < 0,05$ – группа животных с пневмонией) (рисунок 6). При анализе числа клеток экспрессирующих ММП-9 было установлено снижение числа иммунопозитивных клеток в мозговом веществе яичника у группы животных с перитонитом и пневмонией по сравнению с контрольной группой - 25,67 [19,24;32,09] % - контрольная группа, 12,83 [5,11;20,56] % $p < 0,05$ - группа животных с перитонитом, 16,83 [8,51;25,16] % $p < 0,05$ - группа животных с пневмонией. При анализе числа клеток экспрессирующих ММП-19 в группе животных с перитонитом установлено увеличение показателя иммунопозитивных клеток в мозговом и корковом слое яичников по сравнению с контрольной группой. В группе животных с пневмонией статистически значимых изменений по вышеуказанным параметрам по сравнению с группой контрольных животных не выявлено.

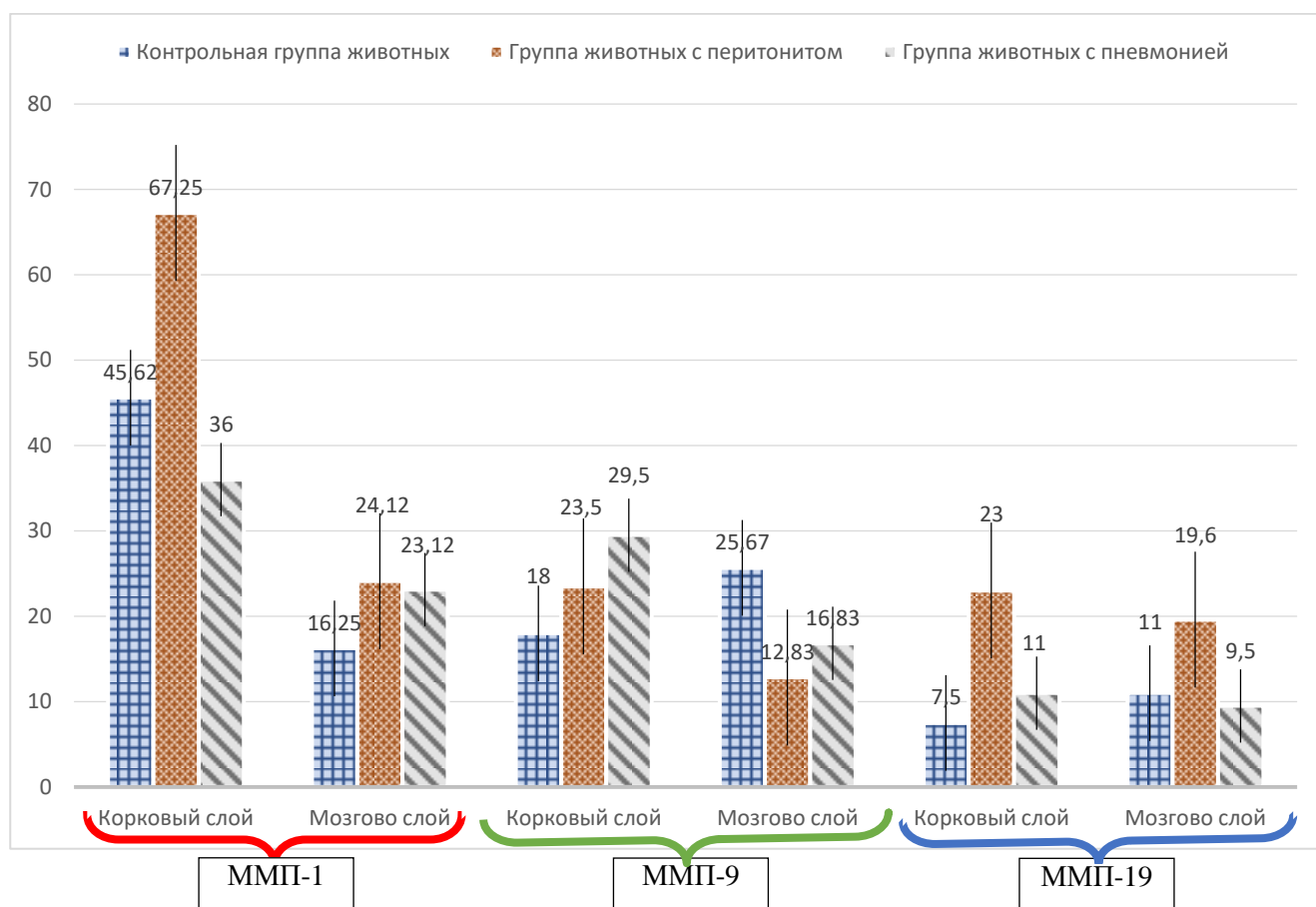


Рисунок 6 – Удельное число экспрессии иммунопозитивных клеток в тканях яичника животных контрольной и экспериментальной групп

ВЫВОДЫ

1. Определено увеличение уровня интенсивности апоптоза в гранулезных клетках и уменьшение числа зрелых ооцитов, полученных при проведении пункции фолликулов во время выполнения экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) у женщин, страдающих бесплодием, с наличием экстрагенитальной патологии дыхательной и пищеварительной систем воспалительного генеза в анамнезе. Выявлена обратная корреляционная связь между параметрами апоптоза в гранулезных клетках и числом зрелых ооцитов у пациенток на фоне воспалительно-деструктивных процессов в дыхательной и пищеварительной системах, ухудшающих шансы на успешное зачатие.

2. Выявлено значимое снижение количества примордиальных фолликулов на фоне смоделированного перитонита и экспериментальной пневмонии, а также увеличение числа первичных, вторичных и атретических фолликулов на фоне экспериментальной пневмонии, что свидетельствует о влиянии воспалительно-деструктивных процессов в брюшной полости и дыхательной системе на процессы созревания и дифференцировки фолликулов.

3. Установлен значимый прирост линейной скорости кровотока в маточной артерии после введения ацетилхолина у крыс на фоне экспериментальной пневмонии и умеренное увеличение этого показателя у крыс с экспериментальным перитонитом. После введения L-NAME в экспериментальных группах равнозначно снижается скорость кровотока, при этом функциональная активность NO-синтаз в маточной артерии увеличивается более выражено при пневмонии, по отношению к контрольной группе и группе с экспериментальным перитонитом.

4. Выявлено увеличение активности MMP-1 в эндометрии и миометрии, а MMP-19 в периметрии и одновременное уменьшение активности MMP-19 в эндометрии и миометрии, а MMP-1 в периметрии у крыс на фоне экспериментального перитонита у крыс, в то время как активность MMP-1, -9, -19 в эндометрии уменьшалась на фоне экспериментальной пневмонии, что приводит к нарушению ремоделирования тканей и имплантации.

5. В корковом слое яичника активность MMP-1, MMP-19 увеличивается на фоне экспериментального перитонита, а при экспериментальной пневмонии активность MMP-1 уменьшается, в то время как в мозговом слое яичника активность MMP-9 снижается как при экспериментальном перитоните, так и при экспериментальной пневмонии, приводя к нарушению процессов ремоделирования матрикса, необходимого для успешного фолликулогенеза и овуляции.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1) Рекомендуется использовать определение интенсивности апоптоза в гранулезных клетках для прогностической оценки качества эмбриона при экстракорпоральном оплодотворении у женщин с экстрагенитальной патологией дыхательной и пищеварительной систем воспалительного генеза в анамнезе.

2) Наряду с перечнем утвержденных клинико-лабораторных методов исследования при прегравидарной подготовке проводить дополнительные исследования маточного кровотока у женщин с экстрагенитальной патологией дыхательной и пищеварительной систем воспалительного генеза в анамнезе.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Проведенное диссертационное исследование раскрывает один из значимых механизмов нарушения репродуктивной функции, в частности, определяет роль матриксных металлопротеиназ и апоптоза гранулезных клеток при экстрагенитальных воспалительно-деструктивных процессах дыхательной и пищеварительной систем. Дальнейшее исследование показателей активаторов и ингибиторов матриксных металлопротеиназ и апоптоза позволит выявить патогенетически обоснованные способы коррекции нарушения репродуктивной функции.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. **Липов, Д.С.** Бедный ответ яичников на стимуляцию: современное состояние проблемы (по данным Волгоградской области) / **Д.С. Липов, Е.А. Савостова** // Сборник докладов VI Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов, Рязань, 2020. – С. 46-48.

2. Овариальный резерв при планировании беременности / **Е.А. Савостова, А.С. Романченко, К.Ю. Тихаева, Д.С. Липов** // Сборник докладов VI Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов, Рязань, 2020. – С. 44-45.

3. **Липов, Д.С.** Определение молекулярных маркеров апоптоза в кумулюсных клетках как один из потенциальных методов оценки нарушений процесса оогенеза / **Д.С. Липов, И.В. Скачко, Д.Р. Клименко** // Материалы 78-й международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов, Волгоград, 2020. – С. 330-331.

4. **Липов, Д.С.** Характеристика эстрального цикла у крыс при моделировании аутокалового перитонита / **Д.С. Липов** // Материалы 79-й

международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов, Волгоград, 2021. – С. 340.

5. ***Линейная скорость кровотока и функциональная активность эндотелиальной NO-синтазы в маточной артерии у крыс при экспериментальном перитоните / Л.Н. Рогова, Д.С. Липов, Н.В. Шестернина, А.А. Полякова // Дальневосточный медицинский журнал. – 2023. – № 1. – С. 48-52.**

6. ***Влияние сопутствующей экстрагенитальной патологии на успешность процедур вспомогательных репродуктивных технологий у женщин (по данным клиник Волгоградской области) / Л.Н. Рогова, Д.С. Липов, К.Ю. Тихаева [и др.] // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2023. – №1. – С. 92-96.**

7. Липов, Д.С. Определение выраженности апоптоза гранулезных клеток как прогностического метода оценки эффективности экстракорпорального оплодотворения / Д.С. Липов // Превентивная медицина как основа качественного и здорового долголетия: Сборник тезисов по материалам научно-практической конференции с международным участием, Оренбург, 27–28 апреля 2023 года. – Москва: Издательство "Знание-М", 2023. – С. 75.

8. ***Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2021622731 Российская Федерация. Допплерометрия брыжеечной артерии у крыс с экспериментальным перитонитом / Л. Н. Рогова, Н. В. Шестернина, Д. С. Липов ; заявитель федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Волгоградский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации. – № 2021622646; заявл. 23.11.2021; опубл. 01.12.2021.**

9. ***Уровень апоптоза гранулезных клеток у женщин с нарушением репродуктивной функции и экстрагенитальной патологией / Л.Н. Рогова, Д.С. Липов, В.Н. Перфилова [и др.] // Вестник РГМУ. – 2023. – №3. – С. 4–9.**

10. ***Влияние экспериментального перитонита и экспериментальной пневмонии на структурные изменения яичников самок белых крыс / Л.Н. Рогова, Н.В. Григорьева, Д.С. Липов [и др.] // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2023. – Т. 20, № 2. – С. 55-59.**

11. Липов, Д.С. Активность нитрооксидсинтаз в маточной артерии у крыс с экспериментальным перитонитом / Д.С. Липов // Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины: Сборник статей 81-й

международной научно-практической конференции молодых ученых и студентов, Волгоград, 19–21 апреля 2023 года. – Волгоград: Волгоградский государственный медицинский университет, 2023. – С. 251-252.

*** – Работа опубликована в журнале, включенном в Перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для опубликования основные научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук и приравненных к ним изданиям.**

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ММ – межклеточный матрикс

ММП – матриксные металлопротеиназы

ММП-1 – матриксная металлопротеиназа -1

ММП-9 – матриксная металлопротеиназа-9

ММП-19 – матриксная металлопротеиназа-19

РМК – реакция маточного кровотока

АХ – ацетилхолин

L-NAME – метиловый эфир L-нитроаргинина

Лсмакс – максимальное значение линейной скорости кровотока

Лсисх – исходное значение линейной скорости кровотока

Лсмин – минимальное значение линейной скорости кровотока

ФАЭ – функциональная активность NO-синтаз

ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение

ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии