

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ ГОРМОНАЛЬНО-ЗАВИСИМОГО ЭТАПА Фолликулогенеза при Эндокринном Бесплодии

Елена Анатольевна ТЕПЛЯШИНА, Марина Викторовна ЕКИМОВА,
Елена Анатольевна ПОЖИЛЕНКОВА, Алла Борисовна САЛМИНА

ГБОУ ВПО Красноярский государственный медицинский университет
им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России
660022, г. Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1

Проанализировано содержание маркеров пролиферации и ангиогенеза в фолликулярной жидкости на разных стадиях развития фолликулов. Фолликулярную жидкость получали от пациенток с нарушениями менструальной и репродуктивной функции на фоне хронической ановуляции и гиперандрогении ($n = 65$) или функциональной гиперпролактинемии ($n = 59$) и женщин с регулярным двухфазным менструальным циклом и трубноперитонеальной формой бесплодия, которые составили контрольную группу ($n = 45$). Результаты позволяют предположить, что развитие фолликулов при эндокринной патологии происходит в условиях нарушенного ангиогенеза и дисрегуляции механизмов клеточной пролиферации и дифференцировки.

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

Эндокринное бесплодие у женщин является важнейшей составляющей многофакторной структуры бесплодного брака. На первый план выступают такие заболевания, как гиперандрогения и гиперпролактинемия [2]. В основе патогенеза указанных форм эндокринного бесплодия лежит функционирование репродуктивной системы в условиях измененного гормонального статуса, что приводит к последовательному нарушению стероидо- и фолликулогенеза, овуляции и оплодотворения [3].

Исследование молекулярно-биологических маркеров развития фолликулов в процессе фолликулогенеза – одно из наиболее перспективных и социально значимых направлений репродуктивной биологии. В настоящее время актуальность изучения оогенеза и фолликулогенеза обусловлена высоким процентом бесплодных браков.

Факторам пролиферации отводится важная роль в процессе фолликулогенеза. Значение данных регуляторных элементов сложно переоценить, поскольку они тесным образом связаны с процессами ангиогенеза и фолликулогенеза на

гормонально-независимой стадии [5]. Контроль этих процессов осуществляют основная форма фактора роста фибробластов (oФРФ), эпидермальный фактор роста (ЭФР), инсулиноподобный фактор роста-1 (ИФР-1), трансформирующий фактор роста- β (ТФР- β).

Целью работы послужило исследование содержания маркеров пролиферации и ангиогенеза в образцах антральной жидкости фолликулов человека разной степени зрелости (III–VIII классы).

МАТЕРИАЛ 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, предъявляе-

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

Екимова М.В. – д.м.н., проф. кафедры клинко-лабораторной диагностики ИПО, e-mail: ekimovamv@mail.ru

Пожилenkova Е.А. – к.б.н., доцент кафедры биохимии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, e-mail: pozhilenkova@yandex.ru

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

мые 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 (ГА, $n = 65$) или функциональной гиперпролактинемии (ГП, $n = 59$). Контрольную группу составили образцы ФЖ от женщин с регулярным двухфазным менструальным циклом и трубно-перитонеальной формой бесплодия (ТПФ, $n = 45$).

Возраст женщин варьировал от 21 до 42 лет и в среднем составил $32,7 \pm 1,5$ года. Период предшествующего бесплодия у обследованных супружеских пар составил 3–18 лет, в среднем $7,6 \pm 1,5$ года.

Для установления причины бесплодия пациенткам проводили стандартное клинико-лабораторное обследование. Стимуляцию овуляции во всех лечебных циклах осуществляли с использованием препаратов агонистов гонадотропин рилизинг-гормона (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 0,2–0,9 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) [7, 10].

Концентрацию факторов роста определяли при помощи твердофазного иммуноферментного анализа. Для определения концентрации ИФР-1 использовали набор «Non-Extraction IGF-I ELISA DSL-10-2800» (Diagnostic Systems Laboratories, США), для определения концентрации ЭФР – «Invitrogen Immunoassay Kit KHG0062» (Invitrogen, США), для определения концентрации ТФР- β – «BMS249/3 human TGF- β 1 Platinum ELISA» (eBioscience, США), для определения концентрации оФРФ – «Invitrogen ELISA Kit HG0021».

Полученные данные сравнивали с показателями стадии раннего антрального 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 ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Развитие фолликулов со стадии антрального фолликула до преовуляторного характеризуется высокой пролиферативной способностью их соматических клеток [1]. Для созревающих фолликулов яичника характерна продукция факторов роста, оказывающих модифицирующее действие на процессы клеточной дифференцировки [3]. К их числу можно отнести ангиогенный гепаринсвязывающий оФРФ. Данный фактор широко распространен в тканях репродуктивной системы женщины. Достигая максимальной концентрации в экстрацеллюлярном матриксе, оФРФ способствует инициации процесса ремоделирования сосудов, который является одним из ключевых этапов ангиогенеза [9].

В контрольной группе пациенток концентрация оФРФ постепенно уменьшалась в зависимости от стадии развития фолликула (рисунок, а). На заключительных стадиях развития фолликулов с диаметром 10–16 мм, 16–20 мм и более концентрация оФРФ была статистически значимо снижена по сравнению с уровнем оФРФ на стадии раннего антрального фолликула.

В группе ГА содержание оФРФ на стадиях раннего антрального, антрального, преобладающего, доминантного фолликулов было снижено по сравнению соответствующими величинами пациенток с ТПФ ($p < 0,05$). В группе ГП концентрация данного фактора роста была значительно меньше, чем в группе ТПФ ($p < 0,05$), на всех стадиях развития фолликула, за исключением стадии преобладающего и доминантного фолликулов.

Сниженная ангиогенная активность соматических клеток развивающихся фолликулов при эндокринной патологии, о чем свидетельствует низкий уровень оФРФ, может вызывать замедление развития кровеносных сосудов и снижение барьерной функции сосудов микроциркуляторного русла [8], тем самым препятствуя развитию полноценного доминантного фолликула в случае эндокринного бесплодия.

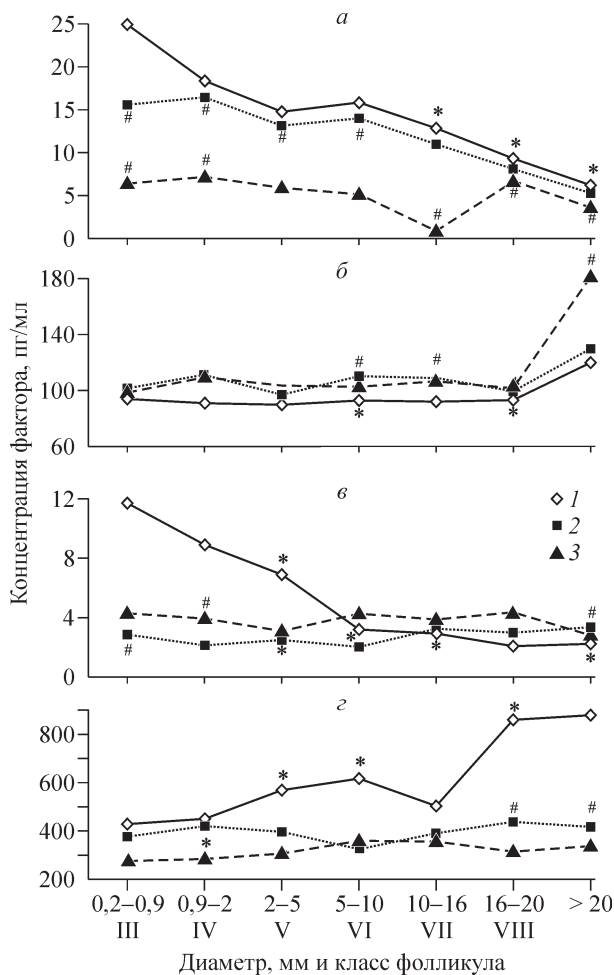


Рис. Концентрация оФРФ (а), ИФР-1 (б), ЭФР (в) и ТФР-β (з) в фолликулярной жидкости антральных фолликулов при эндокринном бесплодии и ГПФ. Звездочкой (*) обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) различия внутри группы, # – между аналогичными показателями контрольной группы и группы сравнения; 1 – гиперпролактинемия, 2 – гиперандрогения, 3 – контроль

Важная роль в осуществлении эндокринной, аутокринной и паракринной регуляции процессов клеточного роста, развития и дифференцировки клеток и тканей принадлежит ИФР-1. Следствием ослабления роли цитокина в ингибировании апоптоза и развития патологических состояний выступает нарушение механизма функционирования данного фактора [6].

В настоящей работе выявлено повышение концентрации ИФР-1 в фолликулярной жидкости пациенток с эндокринным бесплодием по сравнению с величиной показателя на гормонально-зависимом этапе фолликулогенеза (см. рисунок, б). Данное увеличение отмечено со стадии раннего антрального фолликула для пациенток как с ГА, так и с ГП по сравнению

с концентрацией ИФР-1 контрольной группы пациенток на аналогичных стадиях (у женщин с ГА на стадиях доминантного и раннего преовуляторного фолликула – статистически значимо). В контрольной группе пациенток на стадиях развития фолликулов с диаметром 5–10 мм и 16–20 мм содержание ИФР-1 было достоверно ниже, чем на стадии раннего антрального фолликула.

Согласно литературным данным, повышенная концентрация данного фактора роста приводит к снижению активности ароматазы в гранулезных клетках [4] и, следовательно, способствуя накоплению тестостерона в фолликулярной жидкости, препятствует полноценному развитию доминантного фолликула при эндокринной патологии. Факт накопления тестостерона при изучаемых вариантах эндокринного бесплодия выявлен и описан нами ранее [3].

Ключевую роль в пролиферации клеток развивающегося фолликула занимает ЭФР. Данному фактору, по характеру его влияния на гранулезные и тека-клетки фолликула, отводится ведущая роль по сравнению с другими молекулярно-биологическими маркерами. Подтверждением этому выступает эффект ингибирования эпидермальным фактором роста ароматазной активности гранулезных клеток, индуцированной фолликулостимулирующим гормоном (ФСГ) [11].

Действительно, для пациенток контрольной группы было отмечено достаточно высокое содержание ЭФР, составившее 12 пг/мл на стадии раннего антрального фолликула с постепенным снижением до 3,8 пг/мл на стадии доминантного фолликула (см. рисунок, в). При этом концентрация ЭФР на стадии преобладающего, доминантного, раннего преовуляторного и овуляторного фолликула была статистически значимо снижена по сравнению с уровнем ЭФР на стадии раннего антрального фолликула. В группах пациенток с эндокринопатиями выявлено увеличение концентрации ЭФР. У пациенток с ГП оно отмечалось со стадии доминантного фолликула, а у пациенток с ГА – со стадии раннего преовуляторного фолликула по сравнению с уровнем ЭФР у пациенток контрольной группы на аналогичных стадиях ($p < 0,05$).

Сниженная выработка ЭФР клетками гранулезы, характерная для фолликулов с диаметром от 0,2–0,9 до 5–10 мм у пациенток с ГА и ГП, может способствовать долговременному блокирующему действию данного фактора на выработку ингибина и на чувствительность клеток гранулезы к действию ФСГ [10]. Поскольку период селекции роста фолликулов зависит от

ФСГ, относительный дефицит гормона может выступать одной из причин нарушения роста и созревания доминантного фолликула до преовуляторного, а также последующей атрезии антральных фолликулов, что является характерным признаком патологического фолликулогенеза при эндокринном бесплодии.

Модифицирующим действием на процессы клеточной дифференцировки в созревающих фолликулах обладает ТФР-β – мультифункциональный пептид, обладающий как ингибирующим, так и активирующим действием на клеточную пролиферацию и дифференцировку. ТФР-Я может выступать посредником апоптотических эффектов стероидных гормонов, способствуя запуску процесса апоптоза клеток фолликула [12].

В фолликулярной жидкости пациенток с ТПФ концентрация ТФР-β возрастала с увеличением диаметра фолликула (см. рисунок, 2) и на стадиях развития фолликула с диаметром 2–5, 5–10 и 16–20 мм была статистически значимо увеличена по сравнению с уровнем ТФР-β на стадии раннего антрального фолликула. У пациенток с ГА на стадиях развития фолликула с диаметром 16–20 мм и > 20 мм, а у пациенток с ГП на стадии развития фолликула с диаметром 0,9–2 мм секреция ТФР-β была значительно ниже, чем у пациенток контрольной группы на аналогичных стадиях.

Как известно, взаимодействие между ТФР-β и ЭФР, как факторов, имеющих общий рецептор в соматических клетках фолликулов, является важным механизмом регуляции роста преантральных фолликулов [12]. Нами выявлено значительное снижение уровней обоих факторов, что, вероятно, вносит свой вклад в формирование патологического фолликулогенеза, характерного для эндокринной патологии.

При изучении силы и характера взаимосвязей между маркерами функциональной компетентности и степенью зрелости фолликулов у пациенток с ТПФ была выявлена сильная степень влияния ЭФР ($r = -0,83$; $p = 0,01$), оФРФ ($r = -0,93$; $p = 0,01$) и ТФР-β ($r = 0,89$; $p = 0,007$) на рост и развитие фолликулов. У пациенток с ГА была обнаружена сильная степень отрицательного воздействия ЭФР ($r = -0,83$; $p = 0,01$), оФРФ ($r = -0,93$; $p = 0,01$), ТФР-β ($r = -0,92$; $p = 0,03$) на развитие фолликулов. При корреляционном анализе показателей при ГП подобных зависимостей выявлено не было.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализируя полученные нами данные, мы можем утверждать, что при эндокринном бесплодии изменение концентрации ключевых маркеров пролиферации и ангиогенеза начинается с ранних стадий развития антральных фолликулов. С учетом вышесказанного уже известные механизмы патогенеза эндокринного бесплодия могут быть дополнены новыми научными данными, свидетельствующими о вкладе патологического ангиогенеза и / или дизрегуляции механизмов клеточной пролиферации и дифференцировки в нарушение развития доминантного фолликула и формирование ановуляторного бесплодия при эндокринной патологии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят коллектив Медицинского центра гинекологической эндокринологии и репродукции (г. Красноярск) (*директор – С.А. Сыромятникова*) за помощь в отборе пациентов и предоставление материала для исследования.

Исследования проведены при финансовой поддержке гранта Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности (2010 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Боярский К.Ю., Гайдуков С.Н. Молекулярные основы фолликулогенеза: от стадии больших антральных фолликулов до овуляции // Проблемы репродукции. 2010. (5). 13–23.
2. Никитин А.И. Фолликуло- и оогенез при стимуляции овуляции // Акушерство и гинекология. 1998. (1). 41–45.
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. 12. (7). 413–419.
5. Bruno J., Matos M., Chaves R. et al. Angiogenic factors and ovarian follicle development // Anim. Reprod. 2009. 6. (2). 371–379.
6. Enien W. M., Chantler E., Seif M.W. et al. Human ovarian granulosa cells and follicular fluids indices: the relationship to oocyte maturity and fertilization *in vitro* // Hum. Reprod. 1998. 13. (5). 1303–1306.

7. Erickson G., Shimasaki S. The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors // Fertil. Steril. 2001. 76. (5). 943–949.
8. Erickson G., Shimasaki S. The role of the oocyte in folliculogenesis // Trends Endocrinol. Metab. 2000. 11. (5). 193–198.
9. Geva E., Jaffe R. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology // Fertil. Steril. 2000. 74. 429–438.
10. Mao J., Smith M., Rucker E. et al. Effect of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on porcine preantral follicular growth, antrum formation, and stimulation of granulosa cell proliferation and suppression of apoptosis *in vitro* // J. Anim. Sci. 2004. 82. (7). 1967–1975.
11. Teissier M.P., Chable H., Paulhac S. et al. Comparison of follicle steroidogenesis from normal and polycystic ovaries in women undergoing IVF: relationship between steroid concentrations, follicle size, oocyte quality and fecundability // Hum. Reprod. 2000. 15. (12). 1271–1277.
12. Yang P., Roy Yang S.K. Epidermal growth factor modulates transforming growth factor receptor messenger RNA and protein levels in hamster preantral follicles *in vitro* // Biol. Reprod. 2001. 65. 847–854.

MOLECULAR MARKERS OF GONADOTROPIN-DEPENDENT PERIOD OF FOLLICULOGENESIS IN ENDOCRINE INFERTILITY

Elena Anatol'evna TEPLYASHINA, Marina Viktorovna EKIMOVA,
Elena Anatol'evna POZHILENKOVA, Alla Borisovna SALMINA

Krasnoyarsk State Medical University named after Professor V.F. Voino-Yasenetsky
660022, Krasnoyarsk, Partizan Zheleznyak str., 1

The levels of markers of proliferation and angiogenesis in follicular fluid at different stages of folliculogenesis in patients with hyperandrogenism ($n = 65$), hyperprolactinemia ($n = 59$), and in 45 women with regular two-phase menstrual cycle and tuboperitoneal infertility (a control group) have been studied. Our data allow suggesting that the development of follicles in women with endocrine infertility is affected by alterations in angiogenesis, cell proliferation and differentiation.

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

Teplyashina E.A. – postgraduate student of the chair for biochemistry with the course of medical pharmaceutical & toxicological chemistry, e-mail: elenateplyashina@mail.ru

Ekimova M.V. – doctor of medical sciences, professor of the chair for clinical diagnostics, e-mail: ekimovamv@mail.ru

Pozhilenkova E.A. – candidate of biological sciences, professor of the chair for biochemistry with the course of medical pharmaceutical & toxicological chemistry, e-mail: pozhilenkova@yandex.ru

Salmina A.B. – doctor of medical sciences, professor, head of the chair for biochemistry with the course of medical pharmaceutical & toxicological chemistry, e-mail: allasalmina@mail.ru