

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и  
младенчества»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Волкова Екатерина Вадимовна

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ  
ГОРМОНАЛЬНОГО ГОМЕОСТАЗА И ФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ ПРИ  
АНОМАЛЬНЫХ МАТОЧНЫХ КРОВОТЕЧЕНИЯХ  
ПУБЕРТАТНОГО ПЕРИОДА**

14.01.01 - Акушерство и гинекология

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

кандидат медицинских наук

Мелкозерова Оксана Александровна

Научный консультант:

Доктор медицинских наук, профессор

Чистякова Гузель Нуховна

**Екатеринбург - 2016**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ .....</b>	<b>5</b>
<b>ГЛАВА 1. АНОМАЛЬНЫЕ МАТОЧНЫЕ КРОВОТЕЧЕНИЯ ПУБЕРТАТНОГО ПЕРИОДА У ДЕВОЧЕК, РОЖДЕННЫХ С ЗАБЕРЖКОЙ ВНУТРИУТРОБНОГО РОСТА. СОВРЕМЕННЫЙ ВЗГЛЯД НА ПРОБЛЕМУ.....</b>	<b>16</b>
1.1. Определение аномальных маточных кровотечений пубертатного периода.....	16
1.2. Роль нарушения экспрессии стероидных рецепторов в развитии аномальных маточных кровотечений пубертатного периода.....	19
1.3. Перинатальный след внутриутробной задержки роста в становлении репродуктивной функции девочек.....	22
1.4. Роль эндотелиальной дисфункции в развитии хронической плацентарной недостаточности и синдрома задержки роста плода.....	27
1.5. Роль эндотелиальной дисфункции в нарушении процессов внутриматочного гемостаза во время менструации.....	30
<b>ГЛАВА 2. КРАТКАЯ КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НАБЛЮДЕНИЙ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....</b>	<b>36</b>
2.1. Объем исследований, характеристика групп.....	36
2.2. Дизайн исследования.....	39
2.3. Методы исследования.....	40
2.3.1. Общеклиническое обследование.....	40
2.3.2. Лабораторно-инструментальные методы.....	42
2.3.3. Статистические методы исследования.....	46
<b>ГЛАВА 3. КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГРУПП НАБЛЮДЕНИЯ.....</b>	<b>49</b>

## **ГЛАВА 4. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ И ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ В ГЕНЕЗЕ АНОМАЛЬНЫХ МАТОЧНЫХ КРОВОТЕЧЕНИЙ ПУБЕРТАТНОГО ПЕРИОДА.....64**

4.1. Роль полиморфизма генов эндотелиальной NO-синтазы (NOS3 786T>C, 894G>T) и генов эстрогеновых рецепторов альфа ESR1 (ESR1 351A>G, 397T>C) в развитии аномальных маточных кровотечений пубертатного периода.....64

4.2. Результаты исследования межгенных взаимодействий генов эндотелиальной NO-синтазы (NOS3 786T>C, 894G>T) и генов эстрогеновых рецепторов альфа ESR1 (ESR1 351A>G, 397T>C) у девочек с аномальными маточными кровотечениями пубертатного периода.....68

4.3. Функциональное состояние эндотелиальной системы и регуляции ангиогенеза у девочек-подростков с аномальными маточными кровотечениями пубертатного периода.....72

4.4. Состояние гормональной функции и рецепторного аппарата половых органов у девочек с аномальными маточными кровотечениями пубертатного периода.....75

4.5. Алгоритм прогнозирования аномальных маточных кровотечений у девочек, рожденных с синдромом задержки роста плода.....76

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....83**

**ВЫВОДЫ.....93**

**ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....94**

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....**

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....95**

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность темы исследования и степень ее разработанности**

В последние годы все больше внимания уделяют медицинским аспектам формирования репродуктивного здоровья и репродуктивного потенциала девочек, как будущих матерей. Под репродуктивным потенциалом понимают возможность девочки при вступлении в детородный возраст воспроизвести здоровое потомство [13,86]. Количественная характеристика популяции девушек будет определять рост рождаемости, а состояние здоровья этих девушек - качество здоровья новорожденных.

Течение периода полового созревания у девочек служит показателем готовности организма к реализации репродуктивной функции [3,14]. Аномальные маточные кровотечения пубертатного периода (АМК ПП) являются распространенной гинекологической патологией девочек-подростков, их частота колеблется от 22 до 37,3% в структуре гинекологических заболеваний пубертатного периода [6, 87].

Актуальность исследования АМК ПП обусловлена не только тяжестью клинических проявлений, но частым рецидивирующим характером и затяжным течением заболевания, что значительно снижает качество жизни девочек и отрицательно сказывается на формировании их репродуктивного потенциала [4, 79]. Так, 62 % пациенток с АМК ПП в анамнезе страдают первичным бесплодием, 28 % – невынашиванием беременности и лишь каждая десятая имеет ребёнка [6, 21].

Возможной причиной рецидивов и осложнений АМК ПП является недостаточная оценка иницирующего и основного факторов патогенеза заболевания, так как нередко при ведении девочек клиницисты останавливаются на этапе достижения гемостаза, тем самым подменяют заболевание всей репродуктивной системы одним из симптомов - маточным кровотечением. Более чем в 50% случаев патогенез заболевания остается невыясненным, что обуславливает невозможность использования персонифицированного подхода к лечению девочек-подростков [137].

Течение беременности и родов у матери определяет состояние репродуктивного здоровья девочки (Ткаченко Л.В., Яхонтова М.А. 2012; Данькова И.В., Башмакова Н.В., 2013). Известно, что АМК ПП чаще формируются у девочек, рожденных от матерей, беременность которых протекала на фоне привычного невынашивания, преэклампсии и хронической фетоплацентарной недостаточности с исходом в синдром задержки внутриутробного роста плода (Сибирская Е.В., 2011; Гончарова С.В., 2012). Пусковым механизмом патогенеза этих акушерских осложнений является синдром эндотелиальной дисфункции (Шифман Е.М., 2014; Бицадзе В.О., 2014; Каде А.Х., Занин С.А., 2011).

Большую роль в регуляции сосудистого тонуса играет оксид азота (NO). Он препятствует агрегации тромбоцитов, лейкоцитов и моноцитов к эндотелию, защищает сосудистую стенку при различных патологических состояниях, активирует фибринолиз и препятствует образованию тромбов. NO образуется в результате окисления аминокислоты L-аргинина с одновременным синтезом другой аминокислоты- L-цитруллина. Реакция контролируется ферментом эндотелиальной NO-синтазой (NOS3), ингибирование которой приводит к сосудистым органным поражениям (Киреева О.В., Сутулина И.М., 2013; Doshi A.A., Ziolo M.T., Wang H., 2012).

Доказана роль генетического полиморфизма NOS3 в развитии плацентарной недостаточности и преэклампсии (Sandrim V.C., Palei A.C., Sertorio J.T., 2011; Nakayama T., Yamamoto T., 2009; Заварин В.В., Калинин М.Н., Радьков О.В., 2011). Таким образом, у матерей, родивших девочек с СЗРП на фоне ХФПН, определяется высокая частота неблагоприятных мутаций в генах, отвечающих за функционирование эндотелиальной системы (Галина Т.В., 2011; Poggi C., Giusti B., Gozzini E., 2015). Это, в свою очередь, дает возможность предположить наличие генетических полиморфизмов, реализующихся фенотипически в синдром эндотелиальной дисфункции, у девочек, рожденных с задержкой развития плода. Подобных работ в отечественной и зарубежной литературе встречается немного, и проблема требует дальнейшего изучения.

Внутриматочный гемостаз в период менструации достигается не только путем образования мелких тромбов в спиральных артериолах, но и за счет их сокращения. Мощными вазоконстрикторами являются эндометриальные эндотелиальные факторы – эндотелины, трансформирующий фактор роста, факторы некроза опухоли. Недостаточная продукция этих биологически активных веществ может увеличить продолжительность кровотечения и, таким образом способствовать возникновению меноррагий (Рудакова Е.Б., 2012; Lockwood С. J., 2013). Кроме изменения сосудистой стенки, возникновению кровотечения способствуют повышение чувствительности эндометрия к эстрогенам, что в конечном итоге приводит к гиперпластическим процессам матки (Гоготадзе И.Н., Кутушева Г.Ф. 2015).

Установлено, что влияние эстрогенов на эндометрий осуществляется через взаимодействие со специфическими внутриядерными эстрогеновыми рецепторами (ЭР). В настоящее время широко известно два типа ядерных ЭР:  $\alpha$  и  $\beta$ . Важная клиническая иллюстрация различия между двумя изоформами ЭР состоит в регуляции клеточной пролиферации, при которой ЭР- $\alpha$  наиболее часто проявляет пролиферативное действие (Arnal J.F., Fontaine C., Billon-Galés A., Favre J., Laurell H., 2014; Чернуха Г.Е., Шигорева Т.В., Могиревская О.А., 2012; Кумыкова З.Х., 2011). Синтез специфических белков рецепторов эстрогенов, от которого в определенной степени зависит выраженность действия эстрогенов, находится под генетическим контролем гена рецепторов эстрогенов (ER).

Установлено, что эстрогены, несмотря на наличие стероидной структуры, служат модуляторами мембранных функций многих клеток. Так в эндотелиальных клетках обнаружены  $\alpha$ - и  $\beta$ -эстрогеновые рецепторы, что подтверждает идею о том, что сердечно-сосудистая система является органом-мишенью для действия эстрогенов. Предполагают, что женские половые гормоны играют важную роль в защите эндотелия. Доказаны положительные эффекты эстрогенов на эндотелиальную функцию, реализующиеся посредством улучшения ацетилхолиновой сосудистой реактивности, стимуляции активности

NO синтазы и увеличения базального уровня NO (Адашева Т.В., 2015; Сметник В.П., 2012).

Изменение уровня эстрогенов оказывает значительное влияние не только на состояние эндотелиальной дисфункции, но и на активность процессов ангиогенеза (Занкина О.В., Никитина В.В., Царева О.Е., 2013). В экспериментальных исследованиях на животных было показано, что эстрогены индуцируют экспрессию фактора роста эндотелия сосудов и способствуют активации ангиогенеза (Saleh A., Stathopoulou M.G., Dadé S., 2015).

Относительная гиперэстрогения в пубертатном периоде, обусловленная недостаточностью лютеиновой фазы цикла, приводит к отсутствию адекватной секреторной трансформации и к развитию гиперплазии эндометрия (Nowak D., Amin E., Rennel E., 2010). В ряде исследований показано, что повышение системной продукции сосудисто-эндотелиального фактора роста у пациенток с маточными кровотечениями может приводить к дизрегуляции циклического ангиогенеза, что, в свою очередь, проявляется неполноценной секреторной трансформацией эндометрия, нарушением процессов фолликулогенеза в яичниках и взаимосвязано с ановуляцией и относительной гиперэстрогенией (Андреева В.О., Машталова А.А. 2012).

В настоящее время существует мнение, что сложные нейрофизиологические процессы в определенной степени генетически детерминированы (Баранов В.С., 2010; Tong Y., Yin X., Wang Z., 2013). Известно, что наличие полиморфных вариантов генов ассоциировано с различными заболеваниями (Аганезова Н.В., 2011; Адамян Л.В., 2013). Возможно, наличие определенных полиморфизмов гена рецепторов-альфа к эстрадиолу (ESR-1) и гена эндотелиальной NO-синтазы (NOS3), может в определенной степени обуславливать изменение клинику эндотелиальной дисфункции при маточных кровотечениях пубертатного периода. Исследование генетических предикторов нарушения менструальной функции у девочек-подростков ранее не проводилось.

Высокая частота рецидивов маточного кровотечения пубертатного периода свидетельствует о несовершенстве предлагаемых методов лечения или об

отсутствии дифференцированных показаний к их применению. Отечественные и зарубежные ученые подчеркивают целесообразность поиска новых методов профилактики и лечения маточного кровотечения пубертатного периода, предполагающих строго индивидуализированный подход к терапии (Уварова Е.В., 2013; Богданова Е.А., 2011; Merckx. M., Weyers S., Santegoeds R., De Schepper J., 2011; Gillani S., Mohammad S., 2013). Данные обстоятельства определили цель нашего исследования.

**Цель исследования** оптимизация диагностики и прогнозирования аномальных маточных кровотечений пубертатного периода с учетом роли генетической регуляции гормонального гомеостаза и функции эндотелия.

### **Задачи исследования**

1. Провести клинический анализ состояния здоровья, физического развития и становления репродуктивной функции девочек-подростков с аномальными маточными кровотечениями.

2. Изучить полиморфизм генов эстрогеновых рецепторов альфа и фенотипические особенности экспрессии рецепторов половых стероидов у девочек с аномальными маточными кровотечениями пубертатного периода.

3. Оценить роль полиморфизма генов эндотелиальной NO-синтазы, экспрессию факторов ангиогенеза и эндотелиальной функции у девочек с аномальными маточными кровотечениями пубертатного периода.

4. На основании полученных результатов оптимизировать алгоритм обследования и прогнозирования аномальных маточных кровотечений пубертатного периода.

### **Методология и методы исследования**

Для решения поставленных задач проведено проспективное сравнительное контролируемое исследование с участием девочек-подростков крупного города (г. Екатеринбург).

Работа проводилась в два этапа. Первый этап проводился с целью выявления наиболее значимых предикторов развития АМК ПП. Изучались



анамнез матерей и особенности течения беременности, завершившейся рождением девочек групп наблюдения, анализировалось течение пубертатного периода девочек-подростков, оценивался уровень их физического и полового развития. В раннюю фолликулярную фазу цикла всем девочкам-подросткам проводилось ультразвуковое исследование органов малого таза с доплерометрией, определение уровней гонадотропных гормонов гипофиза и эстрадиола в плазме крови, маркеров функционального состояния эндотелия и регуляторов ангиогенеза в сыворотке крови, исследование полиморфизма генов ESR1: T(-397)C, A(-351)G и NOS3: T(-786)C, G(-894)T в ДНК, которую выделяли из свежей цельной крови, а так же исследования уровня экспрессии рецепторов к эстрадиолу-альфа и прогестерону в слизистой оболочке влагалища девочек-подростков иммуноцитохимическим методом.

На втором этапе проводился математический анализ полученных методом распознавания образов, разработка решающего правила прогноза развития АМК ПП и формирования алгоритма обследования и профилактики АМК ПП.

В работе использованы клинико-лабораторные, инструментальные, статистические методы исследования. Выбор использованных в работе методов исследования определялся в соответствии с отраслевыми стандартами обследования в детской гинекологии, рекомендациями по лабораторной диагностике и статистическим исследованиям.

### **Степень достоверности и апробация результатов исследования, личное участие автора**

О достоверности результатов исследования свидетельствуют большая выборка клинического материала, широкий спектр методов исследования, логически выстроенный дизайн исследования, применение современных методов статистической обработки материала и аргументированный анализ полученных результатов.

Материалы диссертационной работы были представлены и обсуждены на следующих научных конгрессах и конференциях: Научно-практической конференции с международным участием «Нерешенные вопросы

акушерства и гинекологии» (Екатеринбург, октябрь 2014); II Общероссийском научно-практическом семинаре «Репродуктивный потенциал России: уральские чтения» (Екатеринбург, апрель 2015); Международном конгрессе «Репродуктивный потенциал семьи – гарантия безопасности государства» IV Конгресса акушеров-гинекологов Уральского Федерального округа (Екатеринбург, октябрь 2015); II Научно-практической конференции с международным участием «Национальный и международный опыт охраны репродуктивного здоровья детей и подростков» (Москва, апрель 2016); II Малышевские чтения, посвященные 100-летию присвоения статуса "Повивально-гинекологического института" (Екатеринбург, май 2016).

Диссертационная работа обсуждена на заседании Ученого Совета ФГБУ «Уральского НИИ Охраны материнства и младенчества» МЗ РФ 7 июня 2016 года.

**Личный вклад** соискателя состоит в выборе направления исследования, постановке задач, непосредственном участии на всех этапах исследования, анализе и обобщении полученных результатов.

Основная идея, планирование научной работы, включая формулировку рабочей гипотезы, методологии, дизайна и общей концепции диссертационного исследования проводились автором лично. Этому предшествовал литературный поиск в базах отечественных и зарубежных источников литературы, осуществленный автором лично. Автором проведено общеклиническое обследование девочек-подростков групп наблюдения и их матерей, забор материала для иммуноцитохимического исследований у всех обследованных девочек, вульвовагиноскопия. Формирование базы данных, статистическая обработка и анализ полученных результатов исследования, написание и оформление рукописи диссертации проводилось лично соискателем.

**Личный вклад** соискателя состоит в непосредственном участии на всех этапах диссертационного исследования.

Основная идея, планирование научной работы, включая формулировку рабочей гипотезы, определение методологии и общей концепции диссертационного исследования проводились совместно с научным руководителем, к.м.н. Мелкозеровой О.А., руководителем научного отдела сохранения репродуктивной функции женщин ФГБУ «Уральский НИИ ОММ» МЗ РФ. Цель и задачи сформулированы совместно с научным руководителем, к.м.н. Мелкозеровой О.А. **при непосредственном участии научного консультанта, д.м.н., профессора Чистяковой Г.Н.** Дизайн исследования разработан лично диссертантом. Анализ современной отечественной и зарубежной литературы по изучаемой проблеме проведен лично диссертантом. Автором лично проведено общеклиническое обследование девочек-подростков групп наблюдения и их матерей, забор материала для иммуноцитохимического исследований у всех обследованных девочек, вальвовагиноскопия. Получение и интерпретация клинико-anamнестических данных осуществлялись совместно с научным руководителем, к.м.н., Мелкозеровой О.А. и заведующим гинекологическим отделением ФГБУ «Уральский НИИ ОММ» МЗ РФ, к.м.н. Пацюком О.В.

Инструментальные исследования проводились совместно с отделением биофизических и лучевых методов исследования ФГБУ «Уральский НИИ ОММ» МЗ РФ, зав. отделением к.м.н. Косовцова Н.В.

Лабораторные исследования осуществлялись совместно с лабораторией генетики ФГБУ «Уральский НИИ ОММ» МЗ РФ, зав. отделением к.м.н. Третьякова Т.Б., лабораторией иммунологии и клинической микробиологии ФГБУ «Уральский НИИ ОММ» МЗ РФ, зав. отделением д.м.н., проф. Чистякова Г.Н., отделением лабораторной диагностики ГБУЗ СО "Свердловское областное патологоанатомическое бюро", руководитель отделения к.м.н. Чистяков М.А.

Статистическая обработка первичных данных, интерпретация и анализ полученных результатов, написание и оформление рукописи диссертации,

представление результатов работы в научных публикациях и в виде докладов на конференциях осуществлялись соискателем лично.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Девочки, рожденные доношенными с задержкой внутриутробного роста, к моменту пубертатного периода отличаются от своих сверстниц, высоким индексом массы тела, ранним наступлением менархе, опережением темпов и дисгармоничным характером полового развития.

2. Дисбаланс эндотелиальных факторов роста на фоне активации ангиогенеза способствует развитию и рецидивированию аномальных маточных кровотечений пубертатного периода. Наличие аллеля 786С в гене NOS3 786Т>С потенцирует проявления эндотелиальной дисфункции у девочек с аномальными маточными кровотечениями пубертатного периода, рожденных с задержкой внутриутробного роста.

3. Высокий уровень экспрессии эстрогеновых рецепторов в половых органах девочек с маточными кровотечениями пубертатного периода, в особенности рожденных с задержкой роста плода, носит компенсаторный проангиогенный характер при дисфункции эндотелия. Носительство полиморфного аллеля 397С в гене ESR1 397Т>С повышает риск развития аномальных маточных кровотечений пубертатного периода.

### **Научная новизна**

Продемонстрировано, что девочки, рожденные с внутриутробной задержкой роста плода, к возрасту пубертатного периода имеют более высокие темпы и дисгармоничный характер физического и полового развития по сравнению со сверстницами, рожденными с нормальной массой тела.

Доказана роль полиморфизма генов эндотелиальной NO-синтазы (NOS3 786Т>С) и генов рецепторов-альфа к эстрадиолу ESR1 (ESR1 397Т>С) в развитии аномальных маточных кровотечений пубертатного периода.

Впервые определена роль синдрома эндотелиальной дисфункции в патогенезе аномальных маточных кровотечений пубертатного периода у девочек, рожденных с задержкой внутриутробного роста.

Выявлено, что межгенные взаимодействия генов эндотелиальной NO-синтазы (NOS3 786T>C, 894G>T) и генов рецепторов-альфа к эстрадиолу ESR1 (ESR1 351A>G, 397T>C) у девочек с аномальными маточными кровотечениями носят сильный синергический характер.

Проведена оценка состояния рецепторного аппарата половых органов у девочек с маточным кровотечением пубертатного периода, рожденных с задержкой внутриутробного роста.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Расширены представления о роли полиморфизма генов эндотелиальной NO-синтазы и генов эстрогеновых рецепторов, а так же фенотипических особенностей функции эндотелиальной системы и экспрессии рецепторов половых стероидов в развитии аномальных маточных кровотечений пубертатного периода.

На основании уточненных патогенетических аспектов усовершенствован алгоритм обследования, прогнозирования и профилактики аномальных маточных кровотечений пубертатного периода.

Теоретическим вкладом в оптимизацию наблюдения пациенток с аномальными маточными кровотечениями пубертатного периода является изучение полиморфных вариантов генов эндотелиальной NO-синтазы и генов рецепторов к эстрадиолу, экспрессии рецепторов к половым стероидам, факторов ангиогенеза и эндотелиальной функции у девочек-подростков для профилактики рецидивов аномальных маточных

кровотечений для сохранения их репродуктивного потенциала.

**Переформулировать.**

### **Внедрение результатов исследования в практику**

Результаты проведенной работы внедрены в клиническую практику при ведении девочек-подростков с аномальными маточными кровотечениями в консультативно-диагностическом отделении и гинекологическом отделении ФГБУ «Уральского НИИ Охраны материнства и младенчества» МЗ РФ, консультативно-диагностическом отделении ГБУЗ Свердловской области «Областная детская клиническая больница №1», консультативно-диагностическом отделении МАУ «Детская городская клиническая больница №9».

Материалы диссертации используются в программах постдипломного образования центра образовательных технологий ФГБУ «НИИ ОММ» Минздрава России, а также в педагогической практике кафедры акушерства и гинекологии ГБОУ ВПО «Уральского государственного медицинского университета» и кафедры акушерства и гинекологии факультета повышения квалификации и профессиональной подготовки ГБОУ ВПО «Уральского государственного медицинского университета».

Получена приоритетная справка № 2016105138 от 16.02.2016. на изобретение «Прогнозирование и профилактика аномальных маточных кровотечений пубертатного периода у девочек, рожденных с задержкой внутриутробного роста». Издано учебно-методическое пособие «Прогнозирование и профилактика аномальных маточных кровотечений пубертатного периода у девочек, рожденных с задержкой внутриутробного роста». Екатеринбург: Изд-во ФГБУ «НИИ ОММ» МЗ РФ, 2016. – 44 с.

### **ПУБЛИКАЦИИ**

**Объем и структура диссертации.**

Диссертация построена по традиционному плану, включает в себя введение, четыре главы собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации, список сокращений, список литературы. Работа изложена на 113 страницах, иллюстрирована 10 рисунками и 29 таблицами. Список литературы содержит 163 источников, из них 97 отечественных и 66 зарубежных.

По теме работы опубликовано 9 научных работ, в том числе 6 статей в научных журналах и изданиях, которые включены в перечень российских рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертаций, рекомендуемых ВАК.

### **Апробация диссертационной работы**

Материалы диссертационной работы были представлены и обсуждены на следующих научных конгрессах и конференциях: Научно-практической конференции с международным участием «Нерешенные вопросы акушерства и гинекологии» (Екатеринбург, октябрь 2014); II Общероссийском научно-практическом семинаре «Репродуктивный потенциал России: уральские чтения» (Екатеринбург, апрель 2015); Международном конгрессе «Репродуктивный потенциал семьи – гарантия безопасности государства» IV Конгресса акушеров-гинекологов Уральского Федерального округа (Екатеринбург, октябрь 2015); II Научно-практической конференции с международным участием «Национальный и международный опыт охраны репродуктивного здоровья детей и подростков» (Москва, апрель 2016), призер конкурса молодых ученых; II Малышевские чтения, посвященные 100-летию присвоения статуса "Повивально-гинекологического института" (Екатеринбург, май 2016), II место в конкурсе молодых ученых.

Диссертационная работа обсуждена на заседании Ученого Совета  
ФГБУ «Уральского НИИ Охраны материнства и младенчества» МЗ РФ 7  
июня 2016 года.



## ГЛАВА I

### АНОМАЛЬНЫЕ МАТОЧНЫЕ КРОВОТЕЧЕНИЯ ПУБЕРТАТНОГО ПЕРИОДА. СОВРЕМЕННЫЙ ВЗГЛЯД НА ПРОБЛЕМУ.

#### (Обзор литературы)

#### 1.1. Определение аномальных маточных кровотечений пубертатного периода

Аномальные маточные кровотечения пубертатного периода (АМК ПП) - патологические кровотечения, обусловленные отклонениями нормального процесса отторжения эндометрия у девушек в течение первых трех лет после менархе, возникающие с частотой более, чем 1 раз в 21 день, продолжительностью более 7 дней и общей кровопотерей более 80 мл [21]. Пациентки, имеющие в анамнезе АМК ПП, в дальнейшем в 62 % страдают первичным бесплодием, 28 % – невынашиванием беременности и лишь каждая десятая из них не имеет нарушений репродуктивной функции [9]. Значимой медицинской и социально-экономической проблемой являются рецидивы аномальных маточных кровотечений, возникающие у 85% женщин в последующие годы их жизни. Возможной причиной рецидивов АМК ПП является недоучет иницирующего и основного факторов патогенеза заболевания, так как нередко при ведении девочек клиницисты останавливаются на этапе достижения гемостаза, тем самым подменяют заболевание всей репродуктивной системы одним из симптомов - маточным кровотечением [87].

В 2009 г. в Кейптауне на XIX Конгрессе FIGO было решено отказаться от использования в диагнозах греческих и латинских слов (меноррагия, метроррагия), а также от термина "Дисфункциональные маточные кровотечения" [87, 141]. В настоящее время используется новое определение - "Аномальные маточные кровотечения" (АМК). В группу АМК включают такие понятия, как тяжелые, нерегулярные и длительные менструальные кровотечения.

В июне 2011 г. была принята новая классификация АМК у небеременных женщин репродуктивного возраста [141], название которой PALM-COEIN является акронимом, образованным от первых букв состояний, лежащих в основе

патогенеза АМК. Современная классификация предусматривает 9 категорий причин, 4 из которых подлежат визуализации - полипы (Р), аденомиоз (А), лейомиома (L), малигнизация - гиперплазия опухоли (М). Остальные 5 - коагулопатия (С), овуляторные нарушения (О), эндометриозные нарушения (Е), ятрогении (I) и неуточненные (N) - могут быть выявлены путем дополнительных исследований [39, 162].

По мнению многих отечественных и зарубежных специалистов на сегодняшний день, этиологическая структура АМК в пубертатном периоде во многом сходна с таковой у женщин репродуктивного возраста. Причинами АМК у девочек-подростков также могут быть органические заболевания тела матки (субмукозные миомы, полипы), эндометриоз, злокачественные опухоли и все остальные из перечисленных [3, 51, 56].

Однако, более чем в 50% случаев патогенез заболевания остается невыясненным, что обуславливает невозможность использования унифицированной схемы лечения [48]. Известные механизмы маточных кровотечений включают нарушение контрактильной активности матки, снижение тонуса маточных артерий вследствие нарушения баланса вазоконстрикторных и вазодилататорных простагландинов, нарушение регенерации эндометрия и патологию тромбообразования, особенно в тромбоцитарно-сосудистом звене, а также в результате активации фибринолитической системы [117]. Вне зависимости от механизмов, инициирующих аномальное кровотечение, значимость гемостатических реакций, обеспечивающих тромбообразование на уровне эндометрия, признается единодушно, поскольку их адекватность предотвращает патологические последствия кровопотери и вторичные органические изменения в эндометрии [39, 80, 90].

Принято считать, что в основе патогенеза АМК ПП лежат нарушения нормального ритма секреции гипоталамических, гипофизарных и яичниковых гормонов на фоне несостоятельности нервно-рецепторного аппарата различных звеньев репродуктивной системы в период ее возрастной функциональной незрелости [66].

По данным многочисленных исследований, гормональный гомеостаз при АМК ПП не имеет четко специфических особенностей, может иметь различные варианты, зависит от менструального возраста и длительности заболевания [27]. Уровни фолликулостимулирующего (ФСГ) и лютеинизирующего (ЛГ) гормонов чаще находятся в нормативном коридоре, но имеются нарушения соотношения ЛГ/ФСГ: на первом этапе заболевания может быть тенденция к активации гонадотропной функции гипофиза; при рецидивирующих кровотечениях – тенденция к снижению гонадотропной функции [11, 40]. Уровень пролактина чаще соответствует норме. В 15 % случаев могут быть транзиторные гиперпролактинемии (не требующие специфической терапии агонистами дофамина) [28].

В 83–85 % у девочек с АМК ПП определяются изменения в структуре эндометрия, которые характеризуются как гиперпластический процесс [27]. Однако, появление гиперпластических изменений в эндометрии в основном не связано с истинной, абсолютной гиперэстрогенией (уровень эстрогенов в плазме крови обычно соответствует средним нормативным показателям или даже понижен) [79, 87, 89]. Гиперплазия эндометрия у пациенток с АМК ПП определяется феноменом относительной гиперэстрогении. А именно, при невысоком уровне эстрогенов в плазме крови и при относительном дефиците прогестерона, обусловленном ановуляцией, в структуре эндометрия нарушается соотношение эпителиальных и мезенхимальных элементов, что гистологически характеризуется как гиперплазия. Эти изменения связаны с нарушениями гормонального гомеостаза и усугубляются неадекватной реакцией матки, как органа-мишени, на стимуляцию половыми стероидами.

## **1.2. Роль нарушения экспрессии стероидных рецепторов в развитии аномальных маточных кровотечений пубертатного периода**

Известно, что половые гормоны, как и все стероиды, реализуют свое действие на органы-мишени путем избирательного взаимодействия с внутриклеточными рецепторами, расположенными в цитоплазме клеток, или специфическими ядерными рецепторами [29]. Гормональное влияние на орган-

мишень не реализуется в том случае, если в клетке нет рецептора, рецепторов недостаточное количество или их функция в силу каких-либо патологических процессов нарушена. Экспрессия каждого рецептора регулируется другим посредством перекрестного взаимодействия между эпителиальными и стромальными составляющими [153]. Исходя из сказанного, рецептор является необходимым периферическим звеном эндокринной системы, обеспечивающим возможность и интенсивность приема, проведения и реализации гормональных сигналов.

Активное изучение и открытие рецепторного аппарата репродуктивных органов женщины приходится на конец XX-го столетия. В настоящее время выделяют два типа эстрогеновых рецепторов – ER- $\alpha$  и ER- $\beta$ , и 2 изоформы рецепторов к прогестерону – PR-A и PR-B. Важная клиническая иллюстрация различия между двумя изоформами эстрогеновых рецепторов состоит в регуляции клеточной пролиферации, при которой ER- $\alpha$  наиболее часто проявляет пролиферативное действие [12,126]. В эпителии и стромальных клетках эндометрия, шейки матки и влагалища обнаружены ER $\alpha$  (уровень ER $\beta$  чрезвычайно низок) и PR [24, 84]. В свою очередь, уровень этих рецепторов подчинен сложному гормональному контролю и может меняться в различных физиологических и патологических ситуациях.

Изменение концентрации эстрогеновых рецепторов и рецепторов прогестерона в эндометрии в течение цикла связано, прежде всего, с регуляторным влиянием самих половых гормонов [38, 94].

В течение нормального менструального цикла содержание рецепторов претерпевает закономерные колебания: уровень ER значительно повышается в позднюю фазу пролиферации, достигает пика в середине цикла и постепенно снижается на протяжении секреторной фазы. Уровень PR постепенно возрастает в течение фолликулярной фазы цикла и становится максимальным в раннюю фазу секреции, где определяется его плато, после чего уровень PR постепенно снижается [12].

Концентрация ER и PR варьирует не только в зависимости от фазы менструального цикла, но и от наличия патологического процесса в эндометрии. Данные литературы о содержании рецепторов к половым стероидным гормонам у девочек при АМК ПП малочисленны ввиду трудности исследования несовершеннолетних девочек-подростков. Имеются данные об изменении уровня экспрессии рецепторов стероидных гормонов при АМК, сопровождающихся гиперпластическими процессами эндометрия у женщин репродуктивного и пременопаузального возраста. Многие авторы отмечают высокий уровень экспрессии ER при простой гиперплазии эндометрия и снижение уровня экспрессии ER по мере роста пролиферативной активности в строме и железах эндометрия [16, 94]. Это может свидетельствовать об автономном характере регуляции опухолевых пролиферативных процессов эндометрия. Подобная закономерность прослеживается и в отношении PR [84]. Наряду с этим в ряде других исследований не выявлено значительных изменений рецепторного фенотипа эндометрия при различных типах его гиперплазии [134, 148].

При оценке уровня ER и PR в эпителии желез и строме, как в ткани полипа, так и в биоптатах окружающего эндометрия было установлено, что среднее значение уровня ER в эпителии желез было снижено, а экспрессия PR не имела статистически значимых различий. Оценка экспрессии рецепторов в строме полипов показала ту же динамику изменений ER, уровень PR не имел статистически значимых различий с нормальными значениями [52].

Таким образом, данные литературы относительно экспрессии рецепторов стероидных гормонов при аномальных маточных кровотечениях немногочисленны и разноречивы, и во многом определяются характером патологических процессов в эндометрии. Трудности исследования рецепторного аппарата половых органов у девочек усложняют понимание патогенетических механизмов нарушения стероидной рецепции при АМК в возрасте пубертата, а в особенности, у девочек, рожденных с задержкой внутриутробного роста.

В настоящее время существует мнение, что сложные нейрофизиологические процессы в определенной степени генетически детерминированы [25]. Известно,

что наличие «гиперактивных» вариантов генов ассоциировано с различными заболеваниями [2, 4, 109, 125].

Синтез специфических белков рецепторов эстрогенов, от которого в определенной степени зависит выраженность действия эстрогенов, находится под генетическим контролем гена рецепторов эстрогенов. Ген ER $\alpha$  (ESR1) расположен на хромосоме 6q25. Он состоит из 8 экзонов, 7 интронов и занимает более чем 140 килобаз. В этом гене были обнаружены несколько полиморфизмов. Наиболее широко изученными являются PvuII (T397C), XbaI (C351G) (RFLPs - restriction fragment length polymorphisms) в первом интроне и переменное число тандемных повторов (VNTR) (TA) *n* в промоторе [1].

Молекулярные механизмы, благодаря которым эти полиморфизмы влияют на активность рецепторов, остаются малопонятными. RFLP обнаруживаются в интроне, т.е. практически нефункциональной области гена, и так как они разделены 50 парами оснований, предположительно находятся в сильном линейном сцеплении [100, 111]. Полиморфизм PvuII может влиять на экспрессию гена ESR1, изменяя связывания транскрипционных факторов и модифицировать сплайсинг гена ESR1. Предыдущие исследования показали, что с полиморфизмом PvuII связаны многие заболевания, такие как первичная дисменорея, артериальная гипертензия, изменения липидов в крови и коронарный атеросклероз [1, 32, 49, 147].

В работах, посвященных изучению влияния полиморфизма PvuII ESR1 на дисфункцию эндотелия при сердечно-сосудистых заболеваниях, подчеркивается, что генотип ESR1 PvuII-CC несет повышенный риск формирования эндотелиальной дисфункции и клинически чаще проявляется увеличением систолического артериального давления, толщины интимы и частоты ишемической болезни сердца у женщин [32, 115]. В работах других авторов подчеркивается, что генотип ESR1 PvuII-CC значительно уменьшает NO-зависимое увеличение скорости кровотока и биодоступность NO [103, 107].

Не менее интересным является исследование роли полиморфизма PvuII гена ESR1 в развитии преэклампсии и задержки роста плода [138]. Авторами показано,

что носители полиморфизма PvuII гена ESR1 имеют достоверно более высокий риск развития преэклампсии и фетоплацентарной недостаточности, особенно при первой беременности.

### **1.3. Перинатальный след внутриутробной задержки роста в становлении репродуктивной функции девочек**

В антенатальный период формирование репродуктивной системы происходит под действием как генетических, так и эпигенетических факторов [37]. Определяющее значение в формировании пола играют генетические факторы, действующие с момента зачатия. Эпигенетические факторы подразделяются на внутренние (ферментные системы, индукторы генома, гормоны) и внешние (воздействие окружающей среды, физические, химические, инфекционные и др.) [59].

Фетоплацентарную недостаточность с исходом в СЗРП можно отнести к эпигенетическим факторам, действующим на более поздних этапах эмбриогенеза и влияющим на формирование женской репродуктивной системы во внутриутробном периоде.

Доказано, что при нарушениях ангиогенеза и васкуляризации в системе маточно-плацентарного кровообращения происходит уменьшение активности мембранных транспортных систем, в особенности отвечающих за трансплацентарный транспорт аминокислот и глюкозы [59, 113]. При умеренной гипоксии плаценты первыми страдают именно системы активного транспорта аминокислот. Диффузия же других классов нутриентов некоторое время продолжает оставаться неизменной. При их дефиците происходит изменение метаболизма с развитием тяжелой гипоксии и метаболического ацидоза [83].

На фоне метаболических изменений развивается дисфункция поджелудочной железы и, как следствие, снижение толерантности к глюкозе. Уменьшение концентрации глюкозы в крови плода воспринимается его организмом как стрессовый сигнал, что вызывает активацию синтеза гормонов коры надпочечников, глюкагона, релизинг гормонов (АКТГ). А это, в свою очередь, вызывает подавление активности инсулиноподобных факторов роста,

что дополнительно тормозит рост плода [82, 83]. При гипоксии, снижении питания в крови плода отмечается повышение уровня глюкокортикоидов, сигнализирующих плоду о стрессовом неблагополучии, готовя его организм к возможному преждевременному рождению и обеспечивая его максимальные шансы на выживание даже ценой наступления патологии после рождения. Глюкокортикоиды в полной мере способны осуществлять внутриутробное программирование [111]. Их воздействие меняет экспрессию генов, определяющих рецептивность клеток, функцию внутриклеточных энзимов, влияет на развитие нейронных структур гипоталамуса. В результате меняется цитоархитектоника клеток, чувствительность их к гормонам и биологически активным веществам и параметры межклеточного взаимодействия. Таким образом, можно считать, что нейроэндокринная система плода непосредственно вовлечена в адаптационные изменения органов и тканей при ограничении трансплацентарного транспорта кислорода и питательных веществ, программирует развитие определенной патологии после рождения [58, 83, 91]. Эти изменения затрагивают и репродуктивную систему.

Внутриутробное отставание в развитии оказывает отрицательное влияние на становление репродуктивного потенциала девочек, снижая овариальный резерв и нарушая становление менструальной функции в период полового созревания [30, 36]. Неблагоприятные условия внутриутробного развития могут нарушить динамику формообразования гениталий, что сказывается в последующем на состоянии репродуктивной системы взрослой женщины, причем степень выраженности патологического процесса находится в прямой зависимости от длительности воздействия повреждающего фактора и времени этого воздействия по отношению к срокам органогенеза [35].

Многочисленными экспериментальными и клиническими исследованиями было продемонстрировано, что основные звенья эндокринной системы, в том числе и элементы репродуктивной системы, начинают функционировать еще в антенатальном периоде онтогенеза [36, 158]. Таким образом, можно



предположить, что внутриутробная гипоксия при ХФПН и СЗРП может нарушать формирование репродуктивной системы уже в антенатальном периоде.

Гормональная активность фетальных яичников начинается с 18-ой недели внутриутробного развития [34]. Гистохимическое исследование яичников у плода 18-28 недель показали, что их эндокринная активность обусловлена преимущественно голокриновым типом секреции, связанным с массовой гибелью в это время герминативных элементов гонады: оогоний, прегранулезных клеток и примордиальных фолликулов. В дальнейшие сроки развития плода прогрессирует созревание фолликулов. Активность фетальных яичников возрастает в сроки 32-34 недели и не снижается до родов. Показана синхронность функциональных преобразований в яичниках и матке, что свидетельствует о начале формирования овариально-эндометриальной связи, характерной для взрослой женщины, еще в антенатальном периоде [31]. Однако, при недостаточности питательных веществ и гипоксии вследствие ХФПН организм плода «экономит» энергетический расход на репродуктивные органы. Следовательно, уже внутриутробно нарушен баланс регуляции менструальной функции.

Высказываются предположения, что при фетоплацентарной недостаточности с исходом в СЗРП уже внутриутробно происходит программирование истощения резервных адаптационных возможностей в становлении гипоталамо-гипофизарно-яичниковой системы, ввиду высокого уровня защитно-приспособительных реакций и адаптации организма плода в процессе родового акта и сразу после рождения [30, 36].

Проявление неполноценности репродуктивной системы редко наблюдается сразу после рождения. Чаще всего патология проявляется в период полового созревания, когда происходит активизация функции репродуктивной системы [35, 43, 73, 96]. Исследования в этой области показывают ранний скачок роста и полового созревания в пубертате у девушек, родившихся с признаками СЗРП. Так, обнаружено повышение активности гормонального профиля у девочек с антенатальной гипотрофией, обуславливающее у них более раннее менархе [41]. Причем отмечается отставание темпов роста и развития внутренних половых

органов - пропорциональное недоразвитие матки, как в длину, так и в поперечно-заднем направлении, в фазу секреции характерен более медленный темп роста эндометрия, отсутствие процесса созревания антральных фолликулов. Эти изменения сказываются на становлении менструальной функции, как одной из важных функций женского организма. Среди девочек, рожденных с СЗРП, достоверно чаще регистрируются нарушения менструального цикла [5, 8, 70].

Что же касается репродуктивной функции у женщин, рожденных с СЗРП, следует отметить, что такой контингент представляет группу особого риска по развитию метаболического синдрома, поскольку имеют внутриутробно запрограммированную предрасположенность к ожирению. В условиях недостаточного питания в антенатальном периоде, обусловленном ХФПН, метаболизм плода антенатально запрограммирован на формирование запасов гликогена и депонирование жиров в печени. Рождение и переход от плацентарного на парентеральное питание устраняет ограничение поступления нутриентов в организм, но не отменяет экспрессии генов, ответственных за преимущественный перевод энергетических субстратов в жир. Как следствие, формируется метаболический синдром и ожирение у женщин, рожденных с СЗРП [111]. Установлено, что при увеличении ИМТ у женщин имеется повышенный риск гестационной гипертензии, гестационного сахарного диабета, часто приводящие к рождению ребенка с СЗРП. Женщины, страдающие ожирением, родившиеся с СЗРП, в 25% случаев сами рожают младенцев с СЗРП [63, 75].

Поскольку ведущим звеном патогенеза преэклампсии и ХФПН является расстройство микроциркуляции и гемодинамики, нарушение сосудистого тонуса интранатально ведет к уменьшению перфузии репродуктивных органов и их ишемии, что крайне неблагоприятно в период закладки и развития [22, 46].

Таким образом, внутриутробный период развития репродуктивной системы является не только сложным, но и весьма важным в отношении возможного формирования различной патологии в постнатальном периоде жизни женщины. В фетальном периоде особо уязвимыми являются как период эмбриогенеза (имплантация, плацентация), так и периоды дальнейших морфологических и

функциональных преобразований гениталий. Характер возможных отклонений во внутриутробном развитии определяется не столько типом повреждающего фактора, сколько продолжительностью его воздействия и сроком беременности, в котором действует этот фактор. Эти аспекты определяют необходимость изучения вопросов оптимизации профилактики, ранней диагностики и коррекции нарушения становления репродуктивной функции у девочек, рожденных с синдромом задержки развития плода.

#### **1.4. Роль эндотелиальной дисфункции в развитии хронической плацентарной недостаточности и синдрома задержки роста плода**

Течение беременности и родов у матери определяет состояние репродуктивного здоровья девочки [54]. Известно, что нарушение менструальной функции чаще формируются у девочек, рожденных от матерей, беременность которых протекала на фоне привычного невынашивания, преэклампсии и ХФПН с исходом в СЗРП [15, 36].

Синдром задержки роста плода - это совокупность нарушений морфологического и функционального состояния плода, развивающихся вследствие изменений обменных процессов в фетоплацентарной системе [64]. СЗРП диагностируют у детей, имеющих недостаточную массу тела и/или длину тела ниже 10% перцентилия при данном сроке беременности, и (или) если морфологический индекс зрелости отстает на две и более недель от истинного гестационного возраста [82].

Частота СЗРП при доношенной беременности составляет от 9,3 % до 13,2% всех родов, причем 7,6 % приходится на врожденную гипотрофию (недостаточность питания плода по МКБ-Х) и только 1,7 % - на маловесность детей к сроку гестации [42, 75].

В последние годы отмечается тенденция к увеличению частоты СЗРП как типичного проявления выраженных нарушений в системе мать-плацента-плод, а качество здоровья детей с СЗРП в настоящее время является существенной проблемой [14, 30, 42].

Плацентарная гипоперфузия при развитии плацентарной недостаточности имеет двойной генез – недостаточность второй волны инвазии цитотрофобласта в устья спиральных артерий (14–17 неделя беременности) и неполноценная морфофункциональная перестройка спиральных артерий. Часть спиральных артерий при ХФПН сохраняет свой мышечный слой и способность к спазму в ответ на эндогенные и экзогенные стимулы (нервные сигналы, вазоконстрикторы эндотелиального происхождения), что ведет к плацентарной ишемии в результате плацентарной гипоперфузии с нарушением темпов роста плода [58].

Доказана роль дисфункции эндотелия в патогенезе плацентарной недостаточности и развитии СЗРП [61, 121]. Идея о том, что в основе патогенеза осложнений гестации лежит патология эндотелия, принадлежит Roberts и соавторам. (1989). Они обнаружили гломерулоэндотелиоз у беременных с преэклампсией — морфологическое изменение, не встречающееся ни при какой другой форме гипертензии и представляющее собой увеличение гломерулы вследствие гипертрофии эндотелия [19]. Дефекты плацентации на этапе имплантации и формирования плаценты приводят в дальнейшем к нарушению маточно-плацентарного кровотока и к развитию ишемии плаценты. С. Becker (1948) показал, что нарушение гемодинамического равновесия плацентарного кровотока вызывает повышение сопротивления децидуальных артериальных сосудов. Теория недостаточности плацентарного кровотока, как причины преэклампсии, получила подтверждение и в экспериментах на животных. Так, O. Savangh в 1977 году обнаружил повышение системного артериального давления у животных с компрессией маточной артерии и плацентарной ишемией, а Eder и Mc. Donald (1987), искусственно создавая недостаточность маточно-плацентарного кровотока путем пережатия маточной артерии у крыс на 3-й неделе гестации, наблюдали значительное повышение АД, протеинурию, а также гистоморфологические изменения в области клубочков, аналогичные обнаруживаемым у женщин с преэклампсией [152].

Активация эндотелия и лейкоцитов является неразрывно связанным процессом. В условиях хронического патологического процесса, каковыми

являются преэклампсия и плацентарная недостаточность, эндотелиально-лейкоцитарные взаимодействия могут замыкать порочный круг, в результате которого развивается системный воспалительный ответ, тотальное повреждение эндотелия и нарушение функции всех органов и тканей организма [23].

Основным маркером дисфункции эндотелия служит снижение продукции оксида азота, а так же снижение синтеза простациклина и относительное увеличение тромбксана. Фетоплацентарная циркуляция происходит преимущественно под контролем вазоактивных соединений, синтезируемых локально эндотелиальными клетками и регулирующих гемодинамические показатели фетоплацентарного кровотока. Так, в первом и втором триместрах беременности, осложненной плацентарной недостаточностью, коэффициент простациклин/тромбксан снижен в 2,5–3 раза, к концу беременности он компенсаторно повышается, что создает условия для донашивания беременности [57].

Во втором триместре беременности при развитии ХФПН с исходом в СЗРП происходит снижение уровней оксида азота (NO) и E-селектина – важнейших вазодилататоров в плацентарной системе и повышение эндотелина-1 – вазоконстриктора эндотелиального происхождения, что приводит к нарушению фетоплацентарного кровотока в результате констрикторной составляющей в нарушенном балансе вазоактивных субстанций [119, 161]. Стимулятором их повышенной экспрессии во время беременности является низкое парциальное давление кислорода в межворсинчатом пространстве.

Нарушение ангиогенеза в системе маточно-плацентарного кровообращения играет ключевую роль в развитии СЗРП [68, 82]. Плацентарный ангиогенез определяют продуцируемые эндотелием вазоактивные факторы и медиаторы: VEGF, HIF-1 $\alpha$ , NO [62, 102]. Имеются данные, что именно с изменением их продукции связано развитие плацентарной недостаточности, СЗРП и преэклампсии [116, 136, 149].

С другой стороны, доказана роль генетического полиморфизма NOS3 в развитии плацентарной недостаточности и преэклампсии [121, 123].

Таким образом, у матерей, родивших девочек с СЗРП на фоне ХФПН, определяется высокая частота неблагоприятных мутаций в генах, отвечающих за функционирование эндотелиальной системы с фенотипическими проявлениями в виде осложнений гестации [23, 121, 123].

Это, в свою очередь, дает возможность предположить наличие определенного полиморфизма генов, реализующихся фенотипически в синдром эндотелиальной дисфункции, у девочек, рожденных с СЗРП. В то же время, остаются малоизученными вопросы межгенных взаимодействий полиморфных вариантов генов эндотелиальной NO-синтазы и генов эстрогеновых рецепторов при целом ряде заболеваний, в том числе репродуктивной системы. Подобных работ в отечественной и зарубежной литературе встречается не много, и проблема требует дальнейшего изучения.

### **1.5. Роль эндотелиальной дисфункции в нарушении процессов внутриматочного гемостаза во время менструации**

Эндотелий - монослой пограничных клеток между кровью и мышечным слоем сосудов. Эндотелий — активный эндокринный орган, который синтезирует вещества, участвующие в свертывании крови, фибринолизе, регуляции тонуса сосудов и их проницаемости, ангиогенезе и пролиферации миоцитов сосудистой стенки. Эндотелий выполняет, в том числе, и важнейшую барьерную иммунную функцию [99].

Основными факторами, активизирующими эндотелиальные клетки, являются: изменение скорости кровотока, тромбоцитарные факторы, циркулирующие нейrogормоны и гипоксия [47, 65].

При повреждении эндотелиальные клетки продуцируют прокоагулянты, вазоконстрикторы и факторы роста, которые изменяют баланс тромбогенных и тромборезистентных свойств сосудистой стенки в сторону увеличения ее тромбодинамического потенциала [50, 62].

Одно из важнейших мест в регуляции сосудистого тонуса играет NO. Он участвует в вазодилатации, нейротрансмиссии, агрегации тромбоцитов, реакции иммунной системы, регуляции тонуса гладких мышц [131, 142].

NO образуется в результате реакции окисления аминокислоты L-аргинина с одновременным синтезом другой аминокислоты – L-цитруллина. Реакция контролируется ферментом NO-синтазой. В настоящее время идентифицированы три изоформы NO-синтазы: NOS1 – нейрональная, NOS2 – индуцибельная NO-синтаза макрофагов, NOS3 – эндотелиальная. Каждая из этих форм имеет свои особенности как в отношении механизма действия, его локализации, так и биологического значения. Наибольший интерес для изучения представляет NOS3, которая стабильно экспрессируется в клетках эндотелия сосудов [110].

Эндотелиальная изоформа NO-синтазы кодируется геном NOS3 (NOS33), расположенным на 7-й хромосоме. Имеются данные о взаимосвязи полиморфизмов NOS33 с изменением уровня метаболитов NO, как фактора вазодилатации, в периферической крови. Под влиянием определенных стимулов ионы  $Ca^{2+}$  входят в клетку, где в цитозоле образуется единый комплекс с белком кальмодулином. Комплекс в качестве кофактора активирует экспрессию гена NOS33, который стимулирует образование оксида азота – NO. Последний, обладая липофильными свойствами, легко диффундирует через плазматические мембраны в межклеточное пространство и проникает в клетки-мишени. Через цепь метаболических реакций NO приводит к выходу ионов  $Ca^{2+}$  из гладкомышечных клеток сосудов, следствием чего является их релаксация и вазодилатация. Кроме того, NO препятствует агрегации тромбоцитов, лейкоцитов и моноцитов к эндотелию, защищает сосудистую стенку при различных патологических состояниях, препятствует развитию фибринолиза и образованию тромбов [131, 140, 154].

Уровень экспрессии NO-синтазы ассоциируется с различными заболеваниями, такими как артериальная гипертензия, ишемическая болезнь сердца, приэклампсия, атеросклероз, диабетическая нефропатия при сахарном диабете, заболевания печени [18, 95, 118, 163]. В то же время ген NOS3, обладает аллельным полиморфизмом, который ассоциирован с различной активностью выработки NO [139, 155, 159].

В гене NOS3 выявлено несколько полиморфных сайтов. Интерес представляют полиморфизм 4a/4b в 5-ом интроне, полиморфизм промоторной области гена - 786Т>С и структурная замена в 7 экзоне 894G>Т. Многочисленные исследования посвящены полиморфизму 894G>Т (rs1799983): выявлена ассоциация минорного аллеля Т894 с инфарктом миокарда и гипертонией [118, 155, 157]. Таким образом, при патологии значимыми являются частоты протективного аллеля G и минорного аллеля риска Т. Распространенность аллеля Т894 в смешанной североамериканской популяции составляет 24 % [100]. В отношении полиморфизма гена NOS3 выявлены гендерные различия в распространенности аллелей: риск возникновения патологического процесса у женщин выше в 4 раза [110]. Изменения в аминокислотной последовательности фермента NOS3 могут приводить к снижению его каталитической активности и, как итог, низкой продукции NO в тех ситуациях, когда локально необходимо его участие в реализации защитных или регуляторных механизмов. Напротив, другие аллельные варианты гена могут приводить к развитию патологических процессов в других ситуациях, когда высокая каталитическая активность обуславливает высокую концентрацию NO и проявление его неблагоприятных эффектов, в частности, мутагенного и цитотоксического [143, 146].

Одними из важнейших регуляторов эндотелиальной функции являются эстрогены. Они оказывают влияние на сосудистую систему и микроциркуляцию, активируя высвобождение NO, простациклина, гиперполяризационного фактора эндотелия, а так же уменьшая высвобождение сосудосуживающих субстанций, таких как эндотелин I и ангиотензин II [98, 120, 135]. Биологический эффект эстрогенов реализуется через специфические ядерные и мембранные негеномные рецепторы, локализованные в эндотелии и гладкомышечных клетках сосудов. Стало известно, что некоторые из протективных эффектов эстрогенов на сосуды реализуются через негеномный механизм, включая пути активации: ras, raf, MEK (mitogen-activated protein kinase kinase), MAPK (mitogen-activated protein kinase), и phosphatidylinositol-3-kinase/Akt. Таким образом, активируется синтаза эндотелиального NO (NOS3) в совокупности с геномным эффектом эстрадиола на



синтез NO [99, 106]. Остаются малоизученными вопросы межгенных взаимодействий полиморфных вариантов генов эндотелиальной NO-синтазы и генов эстрогеновых рецепторов при целом ряде заболеваний, в том числе репродуктивной системы. Подобных работ в отечественной и зарубежной литературе встречается не много, и проблема требует дальнейшего изучения.

Эндотелиальная система, осуществляя синтез локально действующих медиаторов, ориентирована на оптимальное регулирование органного кровотока [47]. Вместе с тем, в обеспечении процессов полноценного развития матки и функционирования яичников важную роль играет постоянство и адекватность их кровоснабжения [33]. Богатое кровоснабжение матки необходимо для возобновления регенерации эндометрия после менструации, имплантации оплодотворенной яйцеклетки и развития плаценты в репродуктивном возрасте. Яичники имеют обильную васкуляризацию, что необходимо для выполнения их многочисленных функций, основными из которых является сохранение первичных ооцитов и создание условий для их созревания до стадии зрелого фолликула, а также синтез половых гормонов [24, 53].

Внутриматочный гемостаз в период менструации достигается не только путем образования мелких тромбов в спиральных артериолах, но и за счет их сокращения [101, 160]. Известные механизмы маточных кровотечений включают нарушение сократительной активности матки, снижение тонуса маточных артерий вследствие нарушения баланса вазоконстрикторных и вазодилататорных простагландинов, нарушение регенерации эндометрия и патологию тромбообразования, особенно в тромбоцитарно-сосудистом звене, а также в результате активации фибринолитической системы [129, 149]. Мощными вазоконстрикторами являются эндометриальные эндотелиальные факторы – эндотелины, трансформирующий фактор роста, факторы некроза опухоли. Недостаток этих биологически активных веществ может увеличить продолжительность кровотечения и, таким образом, способствовать возникновению меноррагий [130].

Кроме изменения сосудистой стенки, возникновению кровотечения предшествует изменение локального гемостаза в эндометрии. Фактор VII крови трансмембранно связывает тканевой фактор эндометрия с целью гемостаза путем образования тромбина. Экспрессия тканевого фактора TF усиливается в стромальных клетках секреторного эндометрия человека во время лютеиновой фазы цикла. Ряд исследователей полагают, что синдром эндотелиальной дисфункции вызывает снижение кровотока в строме эндометрия и формирование тканевой гипоксии [105, 133]. Отмечается снижение экспрессии ангиопоэтина-1 и увеличение экспрессии ангиопоэтина-2 на эндотелиальных клетках. Аберрантно высокая локальная проницаемость сосудов улучшает циркуляцию VII фактора в секреторные стромальные клетки, где под воздействием тканевого фактора происходит образование избыточного тромбина. Гипоксия действует посредством HIF-1 $\alpha$  на генную экспрессию промотора VEGF, что увеличивает транскрипцию мРНК VEGF и стабильности в нескольких типах клеток. Гипоксия способствует увеличению экспрессии VEGF и интерлейкина-8 на стромальных клетках [114, 124]. Тромбин, VEGF и интерлейкина-8 синергически увеличивают ангиогенез в окисленной среде, что приводит к индуцированной активации эндотелиальных клеток. В результате усиливается хрупкость сосудов, что способствует нарушению отторжения эндометрия и развитию патологических маточных кровотечений [108, 130].

Основными модуляторами клеточного роста, обладающими выраженными митогенными свойствами в тканях матки и яичников, являются VEGF, ангиогенин и основной фактор роста фибробластов [71, 104]. Ангиогенез рассматривается как ключевой фактор в развитии опухолевых процессов. В норме циклический ангиогенез происходит только в эндометрии и яичниках, в других неповрежденных тканях взрослого человека ангиогенез не выявляется [10, 61].

Экспрессия VEGF выявляется только в хорошо васкуляризированных тканях – в полостных фолликулах 6-7 класса, желтых телах в фазе васкуляризации, в кистах и воротах яичника, а также в эпителии маточных труб и гладкомышечных клетках. В ряде исследований показано, что уменьшение

системной продукции VEGF у пациенток с маточными кровотечениями свидетельствует о снижении ангиогенного потенциала и может приводить к дисрегуляции циклического ангиогенеза, что в свою очередь проявляется неполноценной пролиферацией и секреторной трансформацией эндометрия, нарушением процессов фолликулогенеза в яичниках и взаимосвязано с ановуляцией и относительной гиперэстрогенией [38, 61].

Таким образом, маточные кровотечения пубертатного периода у девочек, рожденных от матерей с осложненным течением гестации в виде преэклампсии, ХФПН с исходом в СЗРП, могут иметь в основе патогенеза синдром эндотелиальной дисфункции. Изучение молекулярно-генетических механизмов наследования данной патологии расширит возможности прогнозирования и профилактики аномальных маточных кровотечений у девочек-подростков, рожденных с задержкой внутриутробного роста. Данная гипотеза послужила поводом к проведению настоящего исследования.

Материалы данной главы представлены в следующих работах:

1. Башмакова, Н.В. Синдром эндотелиальной дисфункции в генезе маточных кровотечений пубертатного периода у девочек, рожденных с внутриутробной задержкой роста / Н.В.Башмакова, О.А.Мелкозерова, Е.В. Волкова // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2014. – № 5. – С. 48-52.

## ГЛАВА II

### КРАТКАЯ КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НАБЛЮДЕНИЙ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### 2.1. Объем исследований, характеристика групп

В соответствии с целью и задачами исследования в работу были включены 96 девочек пубертатного возраста, которые составили 3 группы наблюдения. Все девочки проходили обследование в консультативно-диагностическом отделении и лечение на базе гинекологического отделения ФГБУ «Уральского НИИ Охраны материнства и младенчества» Минздрава России с 2013 по 2015 г. Проведение исследования было одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «Уральского НИИ Охраны материнства и младенчества» Минздрава России. В соответствии с положениями Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации последнего пересмотра, у всех пациенток и их законных представителей до момента включения в исследование было получено информированное согласие на участие в исследовании и использование биологического материала. Исследование проводилось с согласия девочек-подростков и их родителей, в присутствии родителей по желанию девочек.

Первую основную группу составили 32 девочки пубертатного возраста, рожденные в доношенном сроке с СЗРП, страдающие АМК ПП. Критерием включения пациенток в первую основную группу являлась оценка физического развития при рождении менее 10 перцентили по росто-весовым показателям.

Вторую основную группу составили 37 девочек пубертатного возраста, рожденных в доношенном сроке с нормальной массой тела при рождении (более 10 перцентили по росто-весовым показателям), также страдающие АМК ПП.

Контрольную группу составили 27 девочек пубертатного возраста, рожденных в доношенном сроке с нормальной массой тела (более 10 перцентили по росто-весовым показателям) с правильным ритмом менструации с менархе, гармоничным физическим и половым развитием, обратившиеся в консультативно-диагностическое отделение института для профилактического осмотра.

Таблица 2.1.1 Распределение обследованных девочек по группам.

№ группы	Название группы	Количество девочек
1	Основная группа №1: девочки пубертатного возраста, рожденные в доношенном сроке с синдромом задержки роста плода (менее 10 перцентили по росто-весовым показателям), страдающие АМК ПП	32
2	Основная группа №2: девочки пубертатного возраста, рожденные в доношенном сроке с нормальной массой тела при рождении (более 10 перцентили по росто-весовым показателям), страдающие АМК ПП	37
3	Контрольная группа: девочек пубертатного возраста, рожденных в доношенном сроке с нормальной массой тела с правильным ритмом менструации с менархе, гармоничным физическим и половым развитием	27
	Всего	96

Критерии включения в исследование:

1. Возраст 12-16 лет.
2. Отсутствие опыта сексуальных контактов.
3. Наличие аномальных маточных кровотечений пубертатного периода в анамнезе для пациенток основных групп исследования.
4. Девочки, рожденные в доношенном сроке.
5. Стратифицированная рандомизация в основных группах наблюдения осуществлялась по фактору росто-весовых показателей девочки при рождении. Для пациенток первой основной группы критерием включения являлась оценка физического развития при рождении менее 10 перцентили.

6. Информационное добровольное согласие пациентки и ее законного представителя на участие в исследовании.

Критерии исключения из исследования:

1. Наличие заболевания крови с нарушением гемостаза.
2. Наличие тяжелых экстрагенитальных заболеваний.
3. Наличие органической патологии половых органов (аденомиоз, врожденные пороки развития, опухоли и опухолевидные образования половых органов).
4. Наличие специфических воспалительных заболеваний и травм половых органов.
5. Наличие кровянистых выделений из половых путей неясного генеза в момент обращения.
6. Прием лекарственных препаратов, влияющих на свертывающую систему крови.

Фактором стратификации основных групп наблюдения являлся уровень физического развития девочек при рождении.

Возраст пациенток в группах наблюдения колебался от 12 до 16 лет и составил в первой основной группе  $13,50 \pm 0,24$  лет, во второй группе  $14,18 \pm 0,31$  лет, в контрольной группе  $14,61 \pm 0,41$  лет,  $p > 0,05$ . Группы сопоставимы по возрасту (Табл. 2.1.2).

Таблица 2.1.2 Средний возраст девочек в группах наблюдения,  $M \pm m$

Показатели	Основная №1 (n=32)	Основная №2 (n=37)	Контроль (n=27)	Уровень значимости различий, p
Возраст, лет	$13,50 \pm 0,24$	$14,18 \pm 0,31$	$14,61 \pm 0,41$	$p_{1-3} = 0,1$ $p_{2-3} = 0,7$ $p_{1-2} = 0,06$

Средний возраст матерей девочек к моменту родоразрешения в группах наблюдения достоверно не отличался и составил  $27,3 \pm 1,51$  лет в первой основной группе,  $24,74 \pm 1,81$  лет во второй основной группе и  $25,3 \pm 1,32$  лет в контрольной группе,  $p > 0,05$  (УБРАТЬ?) (Таблица 2.1.3).

Таблица 2.1.3 Средний возраст матерей девочек групп наблюдения к моменту родоразрешения,  $M \pm m$

Показатели	Основная №1 (n=32)	Основная №2 (n=37)	Контроль (n=27)	Уровень значимости различий, p
Возраст, лет	$27,3 \pm 1,51$	$24,74 \pm 1,81$	$25,3 \pm 1,32$	$p_{1-3} = 0,4$ $p_{2-3} = 0,2$ $p_{1-2} = 0,08$

Средний срок родоразрешения матерей девочек составил в первой основной группе  $38,6 \pm 0,7$  нед, во второй основной группе  $39,3 \pm 0,6$  нед, в контрольной группе  $39,6 \pm 1,2$  нед. Все роды были срочными в соответствии с критериями включения в исследование (Таблица 2.1.4).

Таблица 2.1.4 Средний срок родоразрешения матерей девочек групп наблюдения,  $M \pm m$

Показатели	Основная №1 (n=32)	Основная №2 (n=37)	Контроль (n=27)	Уровень значимости различий, p
Возраст, лет	$38,6 \pm 0,7$	$39,3 \pm 0,6$	$39,6 \pm 1,2$	$p_{1-3} = 0,08$ $p_{2-3} = 0,6$ $p_{1-2} = 0,1$

Группы сопоставимы по сроку родоразрешения.

Подробная клиническая характеристика девочек групп наблюдения представлена в главе 3.

## 2.2. Дизайн исследования

Проведено проспективное простое слепое стратификационное рандомизированное контролируемое исследование.

Схема дизайна исследования представлена на рисунке 2.1.

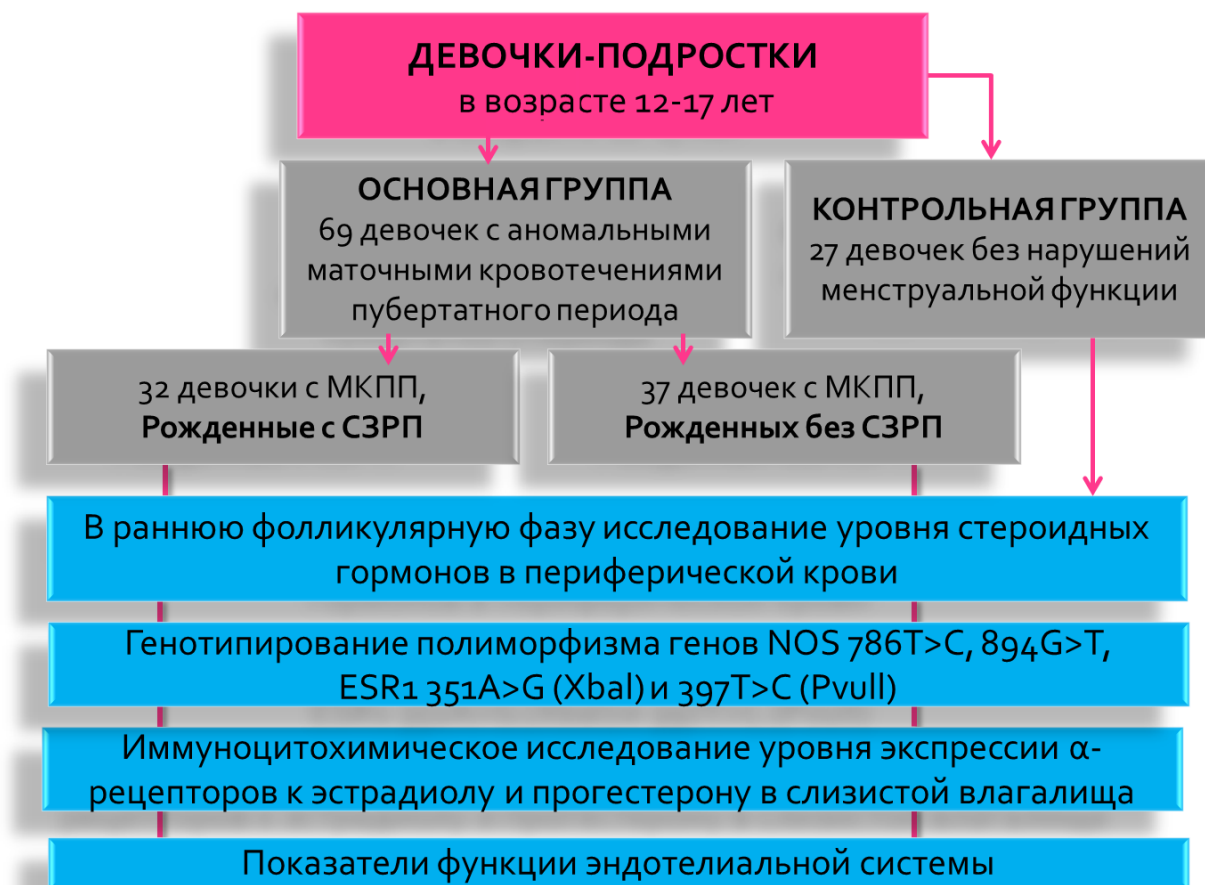


Рисунок 2.2.1 Дизайн исследования.

## 2.3. Методы исследования

### 2.3.1. Общеклиническое обследование

Включало анализ данных амбулаторных карт наблюдения ребенка (форма №112) и карт наблюдения в женской консультации. Проводилось изучение анамнестических данных, уточнение наследственных заболеваний, состояния здоровья родителей и ближайших родственников, возраст менархе, характер менструальной и генеративной функции, а также наличие гинекологических заболеваний у матери пациентки. Оценивался возраст родителей, акушерский



анамнез и паритет матери к моменту рождения пациентки, особенности течения беременности, наличие осложнений в родах. При изучении состояния здоровья новорожденных исследовали росто-весовые показатели девочек, особенности состояния органов и систем организма в перинатальном и раннем неонатальном периоде, перенесенные инфекционные и соматические заболевания, травмы, наличие оперативных вмешательств, воспалительных заболеваний половых органов, причины, способствующие нарушению ритма менструации.

Особое внимание уделяли оценке возраста менархе, темпов и характера становления ритма менструаций, продолжительность менструального цикла, интенсивности и длительности кровяных выделений, наличие болевых ощущений и вегетососудистых расстройств. Уточнялось наличие у пациентки опыта сексуальных контактов.

Подробно выяснялись жалобы девочки. Уточнялись давность, длительность и провоцирующие факторы аномальных маточных кровотечений, при рецидивах – способ остановки предыдущего кровотечения и проведенное после него реабилитация, длительность ремиссии.

Подробно изучался образ жизни пациенток: характер и режим питания, психологическая обстановка в семье и на работе, двигательный режим, занятия спортом и вредные привычки.

**Физическое развитие** пациенток оценивали по результатам соматоскопии и антропометрии. Изучались тип и пропорциональность телосложения, наличия стигм генетической патологии и дисэмбриогенеза, показатели массы и длины тела. Определяли индекс массы тела, рассчитывая его по методу Брея как соотношение массы в килограммах к длине тела в метрах, возведенных в квадрат [13, 81]. Индивидуальная оценка основных антропометрических показателей физического развития пациенток проводилась с использованием таблиц центильного типа, составленных для здоровой популяции девочек аналогичного возраста, проживающих в средней полосе России [81, 86]. Если разность между любыми показателями не превышала 1 центильный коридор, физическое развитие оценивалось как гармоничное, если 2 коридора – дисгармоничное, если 3 и более

– резко дисгармоничное. Результаты измерения ИМТ сравнивали с возрастными нормативами ВОЗ.

Для комплексной оценки уровня *полового развития* пациенток использовали методику, предложенную Таннером (1969), с современными поправками. Вторичные половые признаки выражались общепринятой аббревиатурой Ма, Р, Ах, Ме, составляющей половую формулу. Где Ма обозначало молочные железы, Р – оволосение лобка, Ах – оволосение подмышечных впадин, Ме – особенности менструаций. В каждом показателе формулы полового развития выделялось несколько стадий [44, 86].

При специальном *гинекологическом исследовании*, дополненном по показаниям вульвоскопией и вагиноскопией, оценивали особенности строения и степень развития наружных половых органов, характер полового оволосения, величину клитора, состояние гимена, слизистой вульвы, влагалища, шейки матки, характер и количество выделений из влагалища. Производился забор материала на иммуноцитохимическое исследование мазков-отпечатков со слизистой влагалища.

При ректоабдоминальном исследовании определяли размер, форму и положение матки, ее подвижность, болезненность, состояние придатков, спаечного процесса в малом тазу, состояния крестцово-маточных связок.

### **2.3.2. Лабораторно-инструментальные методы**

1. Для оценки эндокринной функции гипофиза и яичников проводилось *исследование уровней гормонов* в плазме крови. Гормональное обследование проводилось в соответствии с фазами менструального цикла: ЛГ, ФСГ, эстрадиол исследовали на 3-5 день цикла. Уровень гормонов в сыворотке крови определяли на иммуноферментном анализаторе закрытого типа «Access 2» (Франция) методом иммуноферментного анализа на микрочастицах (МИФА). Полученные данные сопоставляли с возрастными нормативными показателями, предложенными Н.Д. Фанченко и соавторами (1986) [86].

2. *Ультразвуковое сканирование органов малого таза* проводилось на аппарате Hawk 2102 EXL Ultrasound Scanner (Denmark) с использованием

мультичастичного абдоминального датчика с частотой 3,5-5 МГц. При трансабдоминальной эхографии органов малого таза определяли размеры матки и величину эндометрия на 5-11 день менструального цикла, вычисляли объем яичников и производили подсчет антральных фолликулов в них. При проведении ультразвукового исследования органов малого таза оценивались размеры тела и шейки матки, структура миометрия, толщина, эхоморфология и эхогенность эндометрия. При исследовании яичников оценивали их размеры, измеряли диаметр и число фолликулов. Энергетическая доплерометрия проводилась в режиме ЦДК с оценкой систолодиастолических индексов, индексов резистентности и пульсационных индексов маточного и овариального кровотока. Результаты УЗИ органов малого таза сопоставляли с возрастными нормативными показателями размеров матки и яичников девочек, предложенными Н.С. Мартыш (1985) [86].

**3. Молекулярно-генетическое исследование** полиморфных вариантов генов эстрогеновых рецепторов альфа - ESR1: T(-397)C, A (-351)G и генов, кодирующего белок - эндотелиальную NOS3: T(-786)C, G(-894)T. Образцы ДНК выделяли из свежей цельной крови, взятой в количестве 2 мл в одноразовую пробирку с 0,1 мл 6%-ного ЭДТА, используя комплект для выделения ДНК лейкоцитов цельной крови «Цитолизин» производства ФГУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Россия), паспорт качества ТУ 9398-108-01897593-10. Затем проводили ПЦР в режиме «реального времени» с использованием комплекта реагентов и протоколов фирмы ООО «ТестГен» (Россия). Детекция и интерпретация результатов исследования осуществлялась программным обеспечением прибора ДТ-96 производства НПО «ДНК-Технология».

**4. Исследование уровня стабильных метаболитов оксида азота (NO) (эндогенного нитрата, общего нитрата и нитрата)** определяли спектрофотометрическим методом, основанном на ферментном превращении нитрата в нитрит с участием нитрат-редуктазы в реакции Грисса, с помощью тест-

систем «R&D Systems» (США). Детекцию проводили на спектрофотометре «Multiskan MCC/340» фирмы «Labsystems» (Финляндия). **Результаты оценивались..**

**5. Содержание маркеров функционального состояния эндотелия и регуляторов ангиогенеза в сыворотке крови оценивали методом иммуноферментного анализа (ИФА) в соответствии с рекомендациями производителей наборов реагентов. Уровень трансформирующего фактора роста  $1\beta$  (TGF- $1\beta$ ), васкуло-эндотелиального фактора роста (VEGF-A) определяли с помощью коммерческих тест-систем «Bender Medsystems» (Австрия), эндотелина-1 - с помощью наборов «Biomedica» (Австрия). Детекцию проводили на иммуноферментных анализаторах «Wallac 1420 (Victor<sup>2</sup>)» фирмы «PerkinElmer» (Финляндия) и «Multiskan MCC/340» фирмы Labsystems (Финляндия). **Результаты оценивались по величине отклонения исследуемого образца от стандартного значения в мкмоль/л.****

**6. Иммуноцитохимическое исследование мазков-отпечатков со слизистой влагалища**, производилось после тщательного их микроскопирования для исключения артефактов, дефектов забора материала и воспалительных изменений. Стекла дважды обрабатывались 95% раствором этилового спирта по 5 минут, затем подвергались 30-минутной инкубации в цитратном буфере (pH 6,0) в водяной бане Bio-Optika при температуре 90°C. После остывания при комнатной температуре в течение 20 минут стекла инкубировали 30 минут с 3% раствором перекиси водорода во влажных камерах (для предотвращения высыхания срезов), затем ополоснув в фосфатном буфере (pH 7,0-7,6) их вновь инкубировали с 1% раствором альбумина во влажных камерах в течение 30 минут. По окончании инкубации излишки альбумина аккуратно стряхивали и на стекло капали первичные моноклональные антитела:

1. Рецепторы к эстрогенам типа  $\alpha$  («Lab Vision», ready-to-use).
2. Рецепторы к прогестерону типа А и В («Lab Vision», ready-to-use).

Мазки инкубировали с первичными антителами от 30 минут до 1 часа в зависимости от времени воздействия, предусмотренного в спецификации к антителу от фирмы производителя. Далее мазки отмывали в фосфатном буфере (pH 7,0-7,6) от первичных антител, не связавшихся с эпитопами, и стекла обрабатывали вторичными антителами. Мазки инкубировали со вторичными антителами во влажных камерах в течение 1 часа, затем ополаскивали в фосфатном буфере (pH 7,0-7,6). Для метки вторичных антител использовался авидин-биотиновый комплекс (Ultra V HRP polymer KIT Lab Vision). Для визуализации места связывания антитела с антигеном использовали метку-фермент (пероксидазу хрена) в присутствии перекиси водорода и колориметрического реактива с 3,3-диаминобензидином (DAB substrate+chromogen Lab Vision). В результате взаимодействия реагентов образовывался нерастворимый в органических растворителях конечный продукт реакции, который визуализировался в виде коричневого окрашивания структур клеток. Далее стекла ополаскивали в дистиллированной воде и подкрашивали ядра гематоксилином. Затем стекла последовательно обрабатывали дистиллированной водой, 70% и 80% раствором этилового спирта, дважды 95% и дважды абсолютным спиртом и в заключение – трехкратно ксилолом. После чего мазки заключали в синтетическую среду, используя покровные стекла.

Для исключения ложноположительных иммуноцитохимических реакций основное исследование сопоставляли с параллельно созданными положительными и отрицательными контрольными образцами. В качестве отрицательных контролей брали образцы исследуемых мазков, которые подвергались стандартной процедуре иммуноцитохимии, но без добавления первичных антител.

Для анализа результатов ИГХ реакций использовали метод гистологического счета H-score по формуле:  $HS = 1a + 2b + 3c$ , где  $a$  – % слабо окрашенных клеток,  $b$  – % умеренно окрашенных клеток,  $c$  – % сильно окрашенных клеток, 1, 2, 3 – интенсивность окрашивания, выраженная в баллах.

Иммуноцитохимическое исследование эпителия слизистой влагалища проводилось в отделении лабораторной диагностики ГБУЗ СО «Свердловское областное патологоанатомическое бюро».

### 2.3.3. Статистические методы исследования

Статистическую обработку результатов исследований проводили с использованием пакетов прикладных программ «Microsoft Excel» (2007) и «Statistica for Windows 6.0» (StatSoft, США). В случае подчинения распределения признака закону нормального распределения данные представляли в виде средней величины ( $M$ ) и стандартной ошибки средней ( $m$ ). Проверку статистических гипотез об отсутствии межгрупповых различий количественных признаков в независимых группах осуществляли с использованием процедуры однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). При отклонении распределения признака от закона нормального распределения, данные представляли в виде медианы ( $Me$ ) и нижнего и верхнего квартилей (25-го и 75-го перцентилей,  $P_{25}$ - $P_{75}$ ). Проверку статистических гипотез об отсутствии межгрупповых различий количественных признаков осуществляли с помощью непараметрического критерия Краскела-Уоллиса (Kruskal-Wallis), при отклонении нулевой гипотезы в ходе анализа проводили попарное сравнение групп. Проверку статистических гипотез об отсутствии межгрупповых различий количественных признаков в зависимых группах (до и после лечения) осуществляли с помощью непараметрического критерия Вилкоксона.

Для показателей, характеризующих качественные признаки, указывали абсолютное значение и относительную величину в процентах, проверку статистических гипотез осуществляли с использованием критерия хи-квадрат ( $\chi^2$ ). Критический уровень значимости различий ( $p$ ), при котором нулевая гипотеза об отсутствии различий отвергалась и принималась альтернативная, устанавливали равным 0,025 (критерий Краскела-Уоллиса) и  $p < 0,05$  (критерий Вилкоксона).

Направление признаков определяли методом корреляционного анализа с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена ( $r$ ).

Распределение генотипов проверяли на соответствие равновесию Харди-Вайнберга с помощью критерия  $\chi^2$ , а также при сравнении с параболой DeFinetti. Различия по частоте аллелей и генотипов между группами оценены критерием  $\chi^2$  Пирсона. Для оценки ассоциации генотипов и аллелей с преэклампсией рассчитаны отношения шансов (odds ratio, OR) с 95 % доверительным интервалом (confidence interval, CI).

Анализ межгенных взаимодействий проведен методом сокращения многофакторной размерности (Multifactor Dimensionality Reduction, MDR) в среде открытой программы MDR v.2.0 beta8 (<http://www.multifactor dimensionality reduction.org>). Метод MDR был разработан для моделирования межгенных взаимодействий высокого порядка, которые невозможно оценить с помощью традиционно используемых в генетической эпидемиологии параметрических методов.

Разработка прогностической модели проводилась с использованием пакета прикладных программ «Квазар». При помощи общего дискриминантного анализа, который дает возможность по имеющейся (обучающей) выборке объектов, характеризующихся совокупностью показателей с наибольшим относительным информационным весом, строить дискриминантные функции (решающие правила), наилучшим образом разделяющие объекты обучающей выборки и позволяющие относить каждый новый объект к тому или иному классу (метод распознавания образов).

Для определения эффективности прогностических критериев рассчитывали показатели чувствительности (процентное выражение частоты истинноположительных (ИП) результатов у больных) и специфичности (процентное выражение частоты истинноотрицательных (ИО) результатов у здоровых) разработанных способов:

$$\text{чувствительность} = (\text{ИП}/\text{больные}) \times 100\%;$$

$$\text{специфичность} = (\text{ИО}/\text{здоровые}) \times 100\%.$$

Эффективность разработанных способов прогнозирования выражали отношением истинных (соответствующих состоянию обследуемых пациентов) результатов тестов к общему числу полученных результатов:

$$\text{Эффективность} = (\text{ИП} + \text{ИО}) / (\text{ИП} + \text{ЛП} + \text{ИО} + \text{ЛО}) \times 100\%,$$

где ЛП – ложноположительные результаты (количество здоровых, имеющих положительный результат);

ЛО – ложноотрицательные результаты (количество больных, имеющих отрицательный результат).

Проверку устойчивости и работоспособности математических моделей осуществляли на независимой экзаменационной выборке, состоявшей из 30 девочек-подростков с аномальными маточными кровотечениями, наблюдавшихся в ФГБУ «Уральском НИИ ОММ» Минздрава России.



## ГЛАВА III

### КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГРУПП НАБЛЮДЕНИЯ

При изучении анамнеза обследованных групп девочек были выявлены следующие особенности.

Возраст пациенток в группах наблюдения колебался от 12 до 16 лет и составил в первой основной группе  $13,50 \pm 0,24$  лет, во второй группе  $14,18 \pm 0,31$  лет, в контрольной группе  $14,61 \pm 0,41$  лет,  $p > 0,05$ . Группы сопоставимы по возрасту.

Возраст матерей девочек к моменту родоразрешения в группах наблюдения достоверно не отличался и составил  $27,3 \pm 1,51$  лет в первой основной группе,  $24,74 \pm 1,81$  лет во второй основной группе и  $25,3 \pm 1,32$  лет в контрольной группе,  $p > 0,05$ .

При изучении перинатального анамнеза девочек были выявлены следующие особенности.

Акушерский анамнез и течение настоящей беременности у матерей девочек подростков страдающих АМКПП распределился следующим образом.

У каждой четвертой матери, дочери которых страдали АМКПП, в анамнезе отмечалась неразвивающаяся беременность, что свидетельствует о наличии у них хронического эндометрита. В такой исходно скомпрометированной внутриматочными вмешательствами матке, где вероятно как поражение рецепторного аппарата эндометрия, так и развитие хронического эндометрита с нарушением механизмов полноценной имплантации, инвазии трофобласта, и происходило внутриутробное развитие девочек основных групп наблюдения, страдающих в подростковом возрасте АМКПП (Табл. 3.1).

Таблица 3.1 Акушерский анамнез матерей девочек, страдающих АМК ПП

Показатели	Основная №1 (n=32)		Основная №2 (n=37)		Контроль (n=2 7)		Уровень значимости различий, p
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	
Медицинский аборт	15	6,8	22	9,5	16	59,2	
Неразвивающаяся беременность	8	25,0	10	27,0	2	7,4	
Аntenатальная гибель плода	4	12,5	2	5,4	0	0,0	
Отслойка плаценты	14	43,8	5	13,5	0	0,0	$p_{1-2} = 0,04$
Угроза прерывания беременности	22	68,8	30	81,1	6	22,2	
Преэклампсия легкой степени	14	43,8	25	67,6	6	22,2	
Преэклампсия умеренной и тяжелой степени	18	56,3	6	16,2	0	0,0	$p_{1-2} = 0,008$
Плацентарная недостаточность без СЗРП	0	0,0	24	64,9	0	0,0	$p_{1-2} = 0,0001$
Плацентарная недостаточность с НМПК без СЗРП	0	0,0	4	10,8	0	0,0	$p_{1-2} = 0,0001$
Плацентарная недостаточность с СЗРП и НМПК	32	100,0	0	0	0	0,0	$p_{1-2} = 0,003$

Данная ситуация реализовалась в осложнения гестации не у всех мам. У матерей, родивших девочек с СЗРП, течение беременности в 3,5 раза чаще осложнялось развитием умеренной преэклампсии и в 3,6 раз чаще развитием ХФПН, чем у матерей девочек, рожденных с нормальной массой тела. Декомпенсированная плацентарная недостаточность с исходом в отслойку плаценты в анамнезе отмечалась почти у половины женщин, родивших в дальнейшем девочек с СЗРП. Антенатальная гибель плода в анамнезе отмечалась у каждой четвертой женщины данной группы. Тем не менее, следует отметить, что компенсированная ХФПН отмечалась более чем у половины девочек, рожденных с нормальной массой тела, но имеющих нарушение становления менструальной функции.

Все девочки были рождены доношенными, роды были срочными в соответствии с критериями включения в исследование. Группы сопоставимы по сроку родоразрешения (Табл. 3.2).

Таблица 3.2 Средний срок родоразрешения матерей девочек групп наблюдения,  $M \pm m$

Показатели	Основная №1 (n=32)	Основная №2 (n=37)	Контроль (n=27)	Уровень значимости различий, p
Срок родоразре- шения, нед.	38,6±0,7	39,3±0,6	39,6±1,2	p <sub>1-3</sub> =0,02 p <sub>2-3</sub> =0,6 p <sub>1-2</sub> =0,1

Течение родов и способ родоразрешения в группах наблюдения достоверно не отличались (Табл. 3.3).

Таблица 3.3 Течение родов у матерей девочек исследуемых групп, %

Показатели	Основная №1 (n=32)		Основная №2 (n=37)		Контроль (n=27)		Уровень значимости различий, p
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	
Слабость родовой деятельности	12	37,5	10	27,0	11	40,7	
Преждевременная отслойка нормально расположенной плаценты	4	12,5	2	5,4	3	11,1	
Послеродовое кровотечение у матери	6	18,8	3	8,1	1	3,7	

Девочки, рожденные с СЗРП, очевидно, имели достоверно более низкую массу тела и рост при рождении, но так же и достоверно более низкую оценку по шкале Апгар (Табл. 3.4).

Таблица 3.4 Антропометрические показатели девочек исследуемых групп при рождении,  $M \pm m$

Показатели	Основная №1 (n=32)	Основная №2 (n=37)	Контроль (n=27)	Уровень значимости различий, p
Масса тела, г	2367,3±34,69	3436,46±54,36	3416,0 ±177,21	p <sub>1-3</sub> =0,0001 p <sub>1-2</sub> =0,0001
Длина тела, см	49,95±0,30	51,05±0,27	51,8±0,58	p <sub>1-3</sub> =0,0001 p <sub>1-2</sub> =0,005
Оценка по шкале Апгар на 1й минуте, баллы	6,75±0,25	7,38±0,16	7,7±0,12	p <sub>1-2</sub> =0,017

В структуре интранатальных осложнений в группе с СЗРП достоверно чаще зафиксирована сочетанная гипоксия, что свидетельствует о хроническом внутриутробном течении гипоксии, которая усугубляется в родах - 21(60%) в основной группе с СЗРП и 4 девочки основной группы без СЗРП (10%), p=0,016.

Антропометрические показатели девочек-подростков, страдающих аномальными маточными кровотечениями, распределились следующим образом: к моменту пубертатного периода девочки, рожденные с синдромом задержки роста плода, имели достоверно более высокий индекс массы тела, граничащий с нормой, но при этом наименьший рост по сравнению с девочками, рожденными с нормальной массой тела (табл. 3.5). Это подтверждает теорию о внутриутробном программировании некоторых заболеваний у людей, рожденных с низкой массой тела, и в первую очередь ожирения.

Таблица 3.5 Антропометрические показатели девочек-подростков, страдающих маточными кровотечениями пубертатного периода,  $M \pm m$

Показатели	Основная №1 (n=32)	Основная №2 (n=37)	Контроль (n=27)	Уровень значимости различий, p
Вес, кг	63,03±2,91	57,81±1,34	55,2±1,83	p <sub>1-3</sub> =0,01 p <sub>1-2</sub> =0,03
Рост, см	161,06±1,85	161,41±0,66	164,0±2,1	p <sub>2-3</sub> =0,02
ИМТ кг/см <sup>2</sup>	24,3±1,89	22,19±1,32	20,05±1,71	p <sub>1-3</sub> =0,008 p <sub>1-2</sub> =0,04

Наследственность девочек, страдающих АМК ПП, наиболее часто была отягощена сахарным диабетом - у 31,3 % девочек основной группы с СЗРП, у 18,3% - основной группы без СЗРП, в контроле - 3,7%; и артериальной гипертензией – у 64,9% девочек основной группы с СЗРП и у 56,3 % в основной группе без СЗРП соответственно, против 22,2% в контроле.

Соматически девочки, страдающие АМК ПП, имели акцентуированный инфекционный фон (частые респираторные инфекции, ангины, воспаления среднего уха и гайморовых пазух носа) – в 46,2% случаев, против 14,3 % в контроле (табл. 3.6).

Таблица 3.6 Структура наследственности и соматической патологии у девочек обследованных групп, %

Показатели	Основная №1 (n=32)		Основная №2 (n=37)		Контроль (n=27)		Уровень значимости, p
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	
Наследственность по СД	10	31,3	7	18,9	1	3,7	p <sub>1-3</sub> =
Наследственность по АГ	18	56,3	24	64,9	2	7,4	p <sub>1-3</sub> =0,0001 p <sub>2-3</sub> =0,0001
ВСД по гипертоническому типу	10	31,3	2	5,4	8	29,6	p <sub>1-2</sub> =0,035 p <sub>2-3</sub> =0,013
ВСД по гипотоническому типу	8	25	15	40,5	1	3,7	p <sub>1-2</sub> =0,03 p <sub>2-3</sub> =0,001
ВСД по смешанному типу	14	43,8	19	51,4	6	6	p <sub>2-3</sub> =0,022
СДСТ	8	25	19	51,4	1	3,7	p <sub>1-3</sub> =0,03 p <sub>2-3</sub> =0,0001 p <sub>1-2</sub> =0,03
Эндокринная патология щитовидной железы	0	0	1	2,7	0	0,0	
Сахарный диабет	0	0	0	0,0	0	0,0	
Патология МВС	12	37,5	4	10,8	0	0,0	
Патология ЖКТ	26	81,3	22	59,5	3	11,1	p <sub>1-2</sub> =0,05 p <sub>1-3</sub> =0,0001 p <sub>2-3</sub> =0,0001

Анемия	11	68,8	26	70,3	0	0,0	$p_{1-3}=0,0001$ $p_{2-3}=0,0001$
--------	----	------	----	------	---	-----	--------------------------------------

Все девочки основных групп страдали ВСД, в контроле –55,6% пациенток, синдром дисплазии соединительной ткани определялся у 39,1% девочек основных групп и у 3,7% контрольной. Патологией щитовидной железы страдали 1,4% девочек с АМК ПП, в контрольной группе патология не определялась. К распространенной соматической патологии у девочек, страдающих АМК ПП, относят заболевания ЖКТ. Ими страдали 69,6% девочек основных групп. В группе контроля патология ЖКТ выявлена у 11,1% девочек. Следует отметить, что больше половины девочек с АМК ПП страдали различной степенью тяжести железодефицитной анемии – 53,6% пациенток основных групп. В контроле показатели красной крови были в пределах нормальных значений (табл. 3.6).

У девочек, страдающих АМК ПП, отмечалось раннее менархе - в  $10,88 \pm 0,31$  лет в основной группе №1 и в  $11,73 \pm 0,20$  лет в основной группе №2, против  $12,4 \pm 0,51$  лет в группе контроля,  $p < 0,01$ . У 85,5% девочек основной группы №1 менархе дебютировало с развития аномальных маточных кровотечений, и в 57,4% случаев эта патология носила рецидивирующий характер (табл. 3.7).



Таблица 3.7 Характеристика менструальной функции и полового развития девочек обследованных групп,  $M \pm m$

Показатели	Основная №1 (n=32)	Основная №2 (n=37)	Контроль (n=27)	Уровень значимости различий, p
Возраст менархе, лет	10,88±0,31	11,73±0,20	12,4±0,51	p <sub>1-3</sub> =0,001 p <sub>2-3</sub> =0,04 p <sub>1-2</sub> =0,013
Длительность менструации, сутки	16,06±1,31	12,94±0,58	6,0±0,45	p <sub>1-3</sub> =0,0001 p <sub>2-3</sub> =0,0001 p <sub>1-2</sub> =0,007
Цикл менструальны й, сутки	30,13±1,15	34,43±0,93	30,2±2,03	p <sub>2-3</sub> =0,01 p <sub>1-2</sub> =0,005
Ma	4,28±0,16	3,38±0,09	3,6±0,24	p <sub>1-3</sub> =0,005 p <sub>1-2</sub> =0,0001
Ax	4,02±0,16	3,32±0,10	3,6±0,24	p <sub>1-3</sub> =0,004 p <sub>1-2</sub> =0,0001
Pb	3,96 ±0,21	3,38±0,09	3,6±0,24	p <sub>1-3</sub> =0,004 p <sub>1-2</sub> =0,001
Дебют АМК с менархе, % девочек	85,5%	22,1%	0	p <sub>1-2</sub> =0,0001 p <sub>1-3</sub> =0,0001 p <sub>2-3</sub> =0,017
Рецидив АМК, %	57,4%	11,2%	0	p=0,0001

Средняя продолжительность менструального цикла у девочек в группах наблюдения достоверно не отличалась. Однако, длительность менструации была дольше в основных группах (Табл. 3.7).

Девочки, рожденные с СЗРП, имели более развитые вторичные половые признаки: более развитые молочные железы - 4/5 балла, что соотносится у этих девочек с более высоким индексом массы тела. Они чаще имели дебют АМК ПП с менархе, и характер менструальной функции достоверно чаще у них носил рецидивирующий характер.

При сопоставлении уровня полового развития календарному возрасту выявлено, что нормальные темпы полового развития были характерны для всех девочек. При этом обращает на себя внимание незначительное опережение темпов полового развития девочек основной группы №1 по сравнению с контролем – раннее менархе, более развитые вторичные половые признаки.

Таблица 3.8 Данные ультразвукового обследования матки у девочек-подростков,  $M \pm m$

Показатели	Основная №1 (n=32)	Основная №2 (n=37)	Контроль (n=27)	Уровень значимости различий, p
Длина тела матки, мм	43,61±1,02	43,17±1,21	38,61±1,54	p <sub>1-3</sub> =0,007 p <sub>2-3</sub> =0,021
Ширина тела матки, мм	35,37±0,94	35,49±0,82	33,59±1,2	
Переднезадний размер тела матки, мм	32,76±0,85	32,35±0,94	29,45±1,01	p <sub>1-3</sub> =0,014 p <sub>2-3</sub> =0,04
Длина шейки матки, мм	25,34±0,81	24,48±0,92	24,46±1,02	

При проведении ультразвукового исследования органов малого таза (УЗИ) девочкам-подросткам в раннюю фолликулярную фазу цикла (5-11 день цикла) были выявлены следующие особенности.

У девочек и девушек с маточным кровотечением пубертатного периода влагалище и матка не отличались по форме и эхоструктуре, а также расположению в полости малого таза от здоровых девушек соответствующих возрастных групп.

Что касается размеров половых органов, обращает на себя внимание некоторое увеличение длины и переднезаднего размеров матки у девочек-подростков основных групп с аномальными маточными кровотечениями по сравнению с контрольной группой (табл. 3.8).

При энергетическом доплеровском исследовании кровоснабжения матки у девочек обследованных групп достоверных отличий индекса резистентности в маточных артериях не выявлено, но при этом отмечалась тенденция к снижению его в основной группе №1 по сравнению с контрольной группой (табл. 3.9).

Табл. 3.9 Данные доплерометрии кровоснабжения матки у девочек-подростков,  $M \pm m$

Показатели	Основная №1 (n=32)	Основная №2 (n=37)	Контроль (n=27)	Уровень значимости различий, p
IR правая маточная артерия	0,72±0,47	0,73 ±0,13	0,75±0,02	
IR левая маточная артерия	0,73±0,01	0,74±0,32	0,74±0,17	

При проведении ультразвукового исследования оценивались размеры яичников, количество фолликулов в срезе и их диаметр, а также индекс резистентности в яичниковых артериях. Эти показатели в группах исследования не имели достоверных отличий и соответствовали возрастным нормам. Структура ультразвуковых характеристик правого и левого яичников обследованных девочек представлена в таблицах 3.10 и 3.11.

Таблица 3.10 Данные ультразвукового обследования правого яичника у девочек-подростков,  $M \pm m$

Показатели	Основная №1 (n=32)	Основная №2 (n=37)	Контроль (n=27)	Уровень значимости различий, p
Длина, мм	34,86±1,01	34,96±0,87	35,39±1,02	
Ширина, мм	21,80±0,78	21,92±0,54	21,52±0,62	
Толщина, мм	25,90±1,05	26,36±0,81	26,42±0,87	
Количество фолликулов в срезе яичника	8,03±0,24	7,83±0,35	7,08±0,46	$p_{1-3}=0,046$
Диаметр фолликулов, мм	7,87±0,32	8,82±0,78	8,68±0,46	
IR правой яичниковой артерии	0,68±1,02	0,69±0,92	0,69±0,59	

Таблица 3.11 Данные ультразвукового обследования левого яичника у девочек-подростков,  $M \pm m$

Показатели	Основная №1 (n=32)	Основная №2 (n=37)	Контроль (n=27)
Длина, мм	34,86±0,96	34,96±0,87	35,09±1,05
Ширина, мм	21,80±0,85	21,92±1,01	21,52±0,23
Толщина, мм	25,90±0,57	26,36±0,98	26,42±0,19
Количество фолликулов в срезе яичника	7,35±0,53	7,68±0,35	7,89±0,34
Диаметр фолликулов, мм	7,91±0,32	8,04±0,43	7,72±0,37
IR левой яичниковой артерии	0,68±1,02	0,69±0,96	0,69±0,82

**Примечание:** статистически значимых различий между группами не выявлено

У 13 (17,8%) пациенток с АМК ПП, при УЗИ органов малого таза определялось эконегативное образование в одном из яичников диаметром от 4 до 6 см., с четкими контурами, с высоким уровнем звукопроводимости. Объем выявленных образований составил от 6,2 см<sup>3</sup> до 9,1 см<sup>3</sup> (норма объема нормальных яичников - до 3,9 см<sup>3</sup>). Данные образования были расценены как фолликулярные кисты.

В 19,09% случаев у девочек и девушек основной группы №2 на момент обследования или в анамнезе при УЗИ органов малого таза в яичниках проецировались округлой формы эконегативные образования от 1,5 до 2,5 см. в диаметре, с четкими контурами - персистирующие фолликулы.

У 30 (94%) пациенток с аномальными маточным кровотечением пубертатного периода и СЗРП (основная группа №1) при ультразвуковом сканировании определялась увеличение в переднезаднем размере срединного

М-эха с повышенной акустической плотностью (структура гиперплазированного эндометрия гомогенная, неровная, без каких-либо включений) и составляла  $13,16 \pm 0,56$  мм. Когда как толщина М-ЭХО в основной группе №2 составила  $10,3 \pm 0,36$  мм. А в группе контроля этот показатель не превышал нормативных значений. Причем, при проведении энергетической доплерометрии у девочек, рожденных с СЗРП (основная группа №1), в спиральных артериях матки индекс резистентности был достоверно выше по сравнению с группой контроля -  $0,86 \pm 0,07$  и  $0,52 \pm 0,04$  соответственно (табл. 3.12).

Таблица 3.12 Показатели толщины М-ЭХО и IR в спиральных артериях у девочек-подростков,  $M \pm m$

Показатели	Основная №1 (n=32)	Основная №2 (n=37)	Контроль (n=27)	Уровень значимости различий, p
М-ЭХО, мм	$13,16 \pm 0,56$	$10,3 \pm 0,36$	$6,75 \pm 0,44$	$p_{1-2}=0,0001$ $p_{2-3}=0,0001$ $p_{1-3}=0,0001$
IR в спиральных артериях	$0,86 \pm 0,07$	$0,62 \pm 0,06$	$0,52 \pm 0,04$	$p_{1-3}=0,0001$ $p_{1-2}=0,011$

При проведении ультразвукового исследования внутренних половых органов девочек и девушек без АМК ПП в анамнезе - размеры матки соответствовали общепринятым возрастным нормам, объем яичников не превышал  $9 \text{ см}^3$ , а разница между объемами правого и левого яичников не была больше 9,5%. Индекс резистентности в маточных артериях и спиральных артериях матки не отклонялся от нормативных значений.

Таким образом, анализируя данные анамнестической характеристики обследованных девочек-подростков можно сказать, что женщины, родившие дочерей с СЗРП и АМК ПП, имеют более отягощенный акушерский анамнез и

осложненное течение беременности. Наследственность таких девочек достоверно чаще отягощена по сахарному диабету и артериальной гипертензии. Клиническая характеристика здоровья девочек с АМК ПП, указывает, что у них наиболее значимы следующие показатели: сочетанная гипоксия в родах, частые инфекционные заболевания, ВСД по гипотоническому и смешанному типу, синдром дисплазии соединительной ткани, патология щитовидной железы и ЖКТ, а также, что очевидно, анемия. Девочки, рожденные с СЗРП, имели достоверно более высокий ИМТ, раннее менархе с некоторым опережением темпов полового развития и более выраженные вторичные половые признаки по сравнению со сверстницами контрольной группы. Это говорит о гиперэстрогеновом фенотипе пациенток с АМК ПП.

По данным УЗИ малого таза обращало на себя внимание некоторое увеличение размеров матки, граничащее с нормой у девочек с АМК ПП. Но особенный интерес представляет изучение толщины М-ЭХО и субэндометриального кровотока у девочек обследованных групп в раннюю пролиферативную фазу: достоверно чаще в основной группе №1 регистрировался высокий индекс резистентности в спиральных артериях матки. Данная ситуация реализуется в гипоксические изменения эндо-и-миометрия (Рис. 3.3.).

Клинический пример: Пациентка П., 14 лет. Девочка родилась в доношенном сроке с СЗРП, вес при рождении 2100 гр., длина 42 см., гестационный возраст 38-39 недель. Менархе с 10 лет, в анамнезе АМК ПП с 11 лет. Девочка госпитализирована в гинекологическое отделение ФГБУ «Уральский НИИ ОММ» МЗ РФ с диагнозом: Параовариальная киста слева. Аномальные маточные кровотечения пубертатного периода, ремиссия.

По данным УЗИ в раннюю фолликулярную фазу цикла (8 день цикла) выявлено некоторое увеличение размеров матки относительно возрастной нормы: длина 46,5 мм, ширина 41,7 мм, переднезадний размер 38,8 мм, ЭХО-структура миометрия однородная. Шейка матки 38 мм, однородной эхоструктуры. М-ЭХО на 8 день цикла составило 8,6 мм, эндометрий однородный. Правый яичник 26x30x32 мм,  $V=24.96 \text{ см}^3$ , фолликулы 6 и 8 мм в диаметре. Левый яичник

24x26x31 мм,  $V=19,34\text{ см}^3$ , мелкие фолликулы до 5 мм по периферии яичника. Слева ниже яичника параовариально определяется тонкостенное гипоэхогенное образование, размером 58x64x60 мм. Отмечается повышение индекса резистентности в маточных артериях: IR в правой маточной артерии 0,84, IR в левой маточной артерии 0,79. В энергетическом доплере определяется субэндометральный кровоток, IR в спиральных артериях повышен – 0,84 (рис. 3.2).

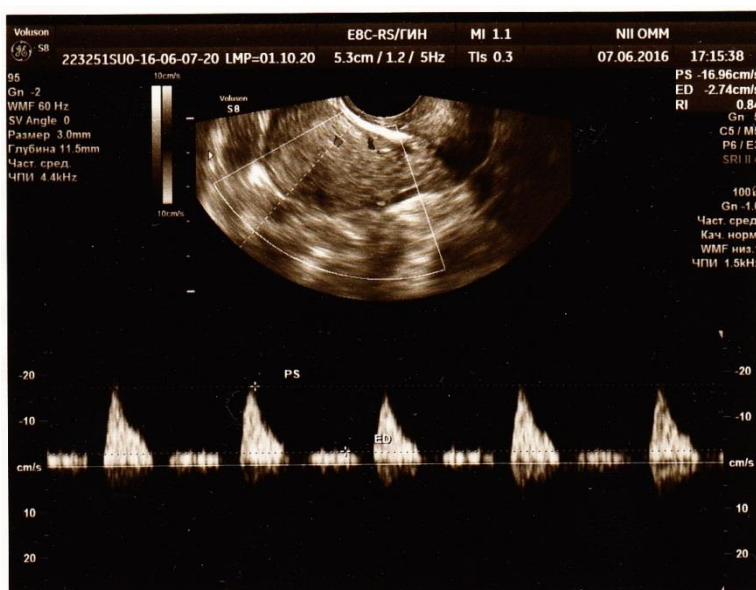


Рисунок 3.2 Исследование IR в спиральных артериях матки

Пациентка была прооперирована по поводу серозной параовариальной кисты слева в объеме лапароскопии, кистэктомия слева (гистология №319/2015 – простая серозная киста).

В ходе операции обращала на себя внимание резкая бледность серозного покрова матки после наложения пневмоперитонеума. На рисунке 3.3. представлена фотография матки девочки на второй минуте после наложения пневмоперитонеума во время лапароскопии.





Рисунок 3.3. Матка девочки 14 лет, рожденной с СЗРП и страдающей в анамнезе АМК ПП, на второй минуте после наложения пневмоперитонеума.



Рисунок 3.4. Та же матка, спустя 7 минут после начала операции.

На рисунке 3.4 представлено изменившееся состояние матки спустя 5-7 минут от начала операции. Данная ситуация может рассматриваться как проявление дисрегуляции тонуса маточных сосудов у девочки, рожденной с синдромом задержки внутриутробного роста плода и страдающей АМК ПП.

Материалы данной главы представлены в следующих работах:

1. Башмакова, Н.В. Маркеры эндотелиальной дисфункции при аномальных маточных кровотечениях пубертатного периода у девочек, рожденных с внутриутробной задержкой роста / Н.В.Башмакова, О.А.Мелкозерова,

И.В.Данькова, Е.В.Волкова, Г.Н.Чистякова //Российский вестник акушера-гинеколога.-2015.- № 2.-С.19-24.

2. Волкова, Е.В. Влияние дисфункции эндотелия на становление репродуктивного потенциала девочек, рожденных с задержкой внутриутробного роста / Е.В.Волкова, О.А.Мелкозерова, Н.В.Башмакова, Г.Н.Чистякова, И.В.Данькова // Репродуктивное здоровье детей и подростков. - 2016.- № 2.- С.67-77.

3. Мелкозерова, О.А. Внутриутробно программируемая эндотелиальная дисфункция в генезе аномальных маточных кровотечений у девочек, рожденных с синдромом задержки роста плода / О.А.Мелкозерова, Н.В.Башмакова, Е.В.Волкова, Г.Н.Чистякова, И.В.Данькова // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии.- 2016.- № 3.- С. 17-23.

## ГЛАВА IV.

### МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ И ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ В ГЕНЕЗЕ АНОМАЛЬНЫХ МАТОЧНЫХ КРОВОТЕЧЕНИЙ ПУБЕРТАТНОГО ПЕРИОДА

#### 4.1. Роль полиморфизма генов эндотелиальной NO-синтазы (NOS3 786T>C, 894G>T) и генов эстрогеновых рецепторов альфа ESR1 (ESR1 351A>G, 397T>C) в развитии аномальных маточных кровотечений пубертатного периода

На сегодняшний день среди полиморфизмов гена эндотелиальной NO-синтазы наиболее изученными являются функционально связанные полиморфизмы: 894 G/T (rs1799983), 786 T/C (rs2070744), определяемые изменением числа tandemных повторов в интроне-7.

Наиболее широко изученными полиморфизмами гена рецептора альфа к эстрадиолу (ESR1) являются полиморфизмы PvuII (397T>C) и XbaI (ESR1 351A>G) полиморфизмы, относящиеся к категории RFLPs - restriction fragment length polymorfisms в первом интроне и VNTR - переменное число tandemных повторов в промоторе.

Полученные при анализе результаты независимого распределения аллелей полиморфизмов генов NOS3 и ESR1 свидетельствуют, что характер распределения аллелей и генотипов по полиморфным вариантам гена NOS3 и гена ESR1 одинаков в обеих группах и соответствует равновесию Харди-Вайнберга.

Возможное влияние особенностей генотипа на функциональное состояние эндотелия оценивалось по общей, мультипликативной и доминантной моделям.

Анализ распределения генотипов по полиморфным вариантам генов NOS3 и ESR1 (табл. 4.1.1) показал достоверное увеличение частоты встречаемости генотипов, содержащих полиморфную аллель 786C гена NOS3 786T>C в гомо- и гетерозиготном состоянии у девочек с маточными кровотечениями, рожденных с

СЗРП (для гомозигот OR=2,03; 95%CI 1,12-3,68; p=0,046; для гетерозигот OR=1,68; 95%CI 1,09-2,60; p=0,046; табл. 4).

Таблица 4.1.1. Распределение частот генотипов генов NOS3 и ESR1 у девочек основных групп, и девочек контрольной группы (общая модель).

Генотип	частоты		хи- квадрат	p	OR	95% CI	
	Основная n=69	Контроль n=27					
ESR1 351 AA	0,556	0,500	0,75	0,69	1,25	0,74	2,10
ESR1 351 AG	0,407	0,500			0,69	1,65	0,29
ESR1 351 GG	0,037	0,000			-	-	-
ESR1 397 TT	0,462	0,286	1,97	0,37	2,14	0,71	6,44
ESR1 397 TG	0,500	0,714			0,40	1,50	0,11
ESR1 397 GG	0,038	0,000			-	-	-
NOS3 786 TT	0,069	0,357	5,78	<b>0,046</b>	0,13	0,72	0,02
NOS3 786 TC	0,483	0,357			1,68	1,09	2,60
NOS3 786 CC	0,448	0,286			2,03	1,12	3,68
NOS3 894 GG	0,517	0,571	0,52	0,77	0,80	1,49	0,43
NOS3 894 GT	0,448	0,357			1,46	0,50	4,26
NOS3 894 e TT	0,034	0,071			0,46	4,01	0,05

На рисунке 4.1. представлена общая модель распределения частот генотипов NOS3 786T>C в группах наблюдения, где видно, что рецессивная гомозигота NOS3 786CC достоверно чаще встречается в основной группе девочек.

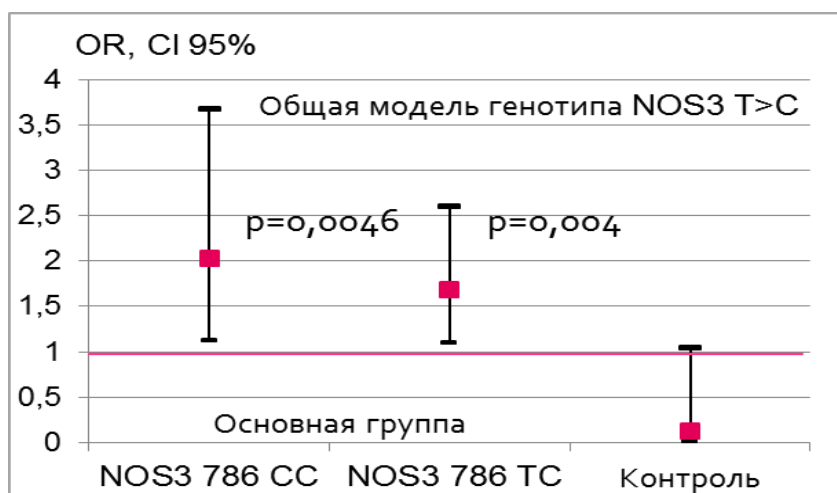


Рис. 4.1. Общая модель распределения частот генотипов NOS3 786T>C, OR (CI95%)

Анализ распределения частот аллелей генов NOS3 и ESR1 также показал, что частота встречаемости аллеля 786C гена NOS3 достоверно выше у девочек, страдающих АМК ПП (OR=2,56; 95%CI 1,01-6,50; p=0,04; табл. 4.1.2).

Таблица 4.1.2. Распределение частот аллелей генов NOS3 и ESR1 у девочек с АМК ПП (рецессивная модель)

Группы сравнения	Ген	частоты		хи-квадрат	p	OR	95% CI	
		основная	контроль					
Основная группа №1, в сравнении с контролем n=32	ESR1 351 A	0,759	0,750	0,01	0,93	1,05	0,36	3,08
	ESR1 351 G	0,241	0,250			0,95	2,79	0,32
	ESR1 397 T	0,712	0,643	0,40	0,53	1,37	0,51	3,70
	ESR1 397 G	0,288	0,357			0,73	1,97	0,27
	NOS3 786 T	0,310	0,536	4,06	<b>0,04</b>	0,39	0,99	0,15
	NOS3 786 C	0,690	0,464			2,56	1,01	6,50
	NOS3 894 G	0,741	0,750	0,01	0,93	0,96	2,74	0,33
	NOS3 894 T	0,259	0,250			1,05	0,37	3,00
Основная группа №2, в сравнении с контролем n=37	ESR1 351 A	0,844	0,750	0,82	0,37	1,80	0,49	6,60
	ESR1 351 G	0,156	0,250			0,56	2,04	0,15
	ESR1 397 T	0,781	0,600	2,39	0,12	2,38	0,78	7,31
	ESR1 397 G	0,219	0,400			0,42	1,29	0,14
	NOS3 786 T	0,250	0,536	5,16	<b>0,02</b>	0,29	0,86	0,10
	NOS3 786 C	0,750	0,464			3,46	1,16	10,34
	NOS3 894 G	0,813	0,750	0,34	0,56	1,44	0,41	5,07
	NOS3 894 T	0,188	0,250			0,69	2,43	0,20

При анализе результатов генотипирования по исследуемым аллельным полиморфизмам генов NOS3 и ESR1 девочек основной группы, рожденных с нормальной массой тела, и группой контроля также было выявлено статистически значимое повышение частоты встречаемости полиморфного аллеля 786С в гене NOS3:786Т>С: (OR=3,46; 95%CI 1,16-10,34; p=0,02; рис. 4.2).

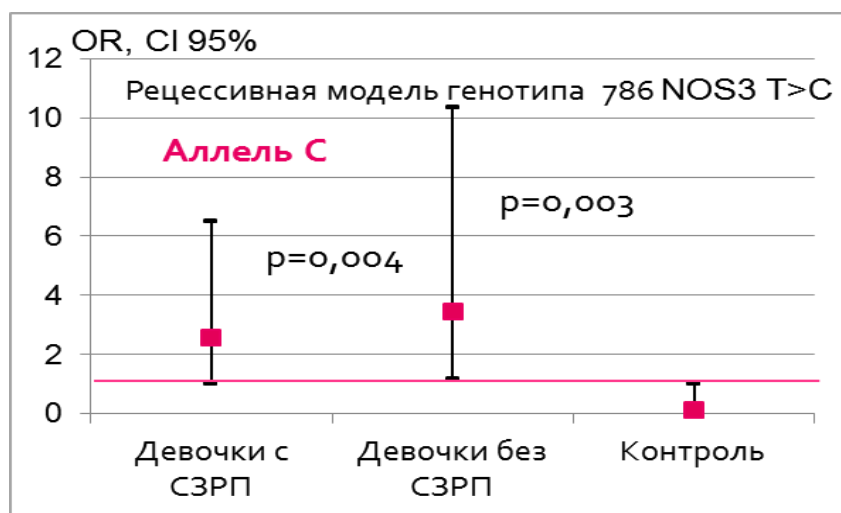


Рис.4.2. Распределение частот полиморфных аллелей гена NOS3:786T>C, OR (CI95%).

Использование рецессивной модели наследования позволило выявить различия в частоте встречаемости генотипов по полиморфным локусам генов NOS3 и ESR1 в обследуемых группах девочек. Наличие в генотипе аллеля 786C гена NOS3 в гетеро- и гомозиготном состоянии чаще определяется у девочек, страдающих аномальными маточными кровотечениями, рожденными как с СЗРП (OR=2,56; 95%CI: 1,01-6,5;  $p=0,04$ ; табл.4.1.2), так и с нормальной массой тела (OR=3,46; 95%CI: 1,16-10,34;  $p=0,02$ ; табл.4.1.2), а носительство генотипа NOS3:786TT достоверно чаще встречается у девочек в контрольной группе (OR=0,12, 95%CI: 1,04-0,01;  $p=0,04$ ; табл. 4.1.1).

Таким образом, можно утверждать, что полиморфный аллель С в локусе 786 гена эндотелиальной NO-синтазы (NOS3) связан с повышенным риском развития у девочек аномальных маточных кровотечений пубертатного периода.



Кроме того, при изучении доминантной модели генотипов NOS3 и ESR1 было выявлено, что у девочек, страдающих маточными кровотечениями пубертатного периода, достоверно чаще определяется генотип ESR1: 397 CC с полиморфным локусом 397C в гене эстрогеновых рецепторов альфа (OR=4,58; 95%CI; 0,97-21,68; p=0,04; табл.4.1.3).

Таблица 4.1.3. Распределение частот генотипов генов NOS3 и ESR1 в основной и контрольной группах (доминантная модель).

Генотип	частоты		хи- квадрат	p	OR	95% CI	
	Основная n=69	Контроль n=27					
ESR1 351 AA	0,688	0,500	1,09	0,30	2,20	0,47	10,31
ESR1 351 AG+GG	0,313	0,500			0,45	2,13	0,10
ESR1 397 CC	0,625	0,267	4,01	<b>0,04</b>	4,58	0,97	21,68
ESR1 397 TC+TT	0,375	0,733			0,22	1,03	0,05
NOS3 786 TT	0,063	0,357	4,05	<b>0,04</b>	0,12	1,04	0,01
NOS3 786 TC+CC	0,938	0,643			8,33	0,96	72,10
NOS3 894 GG	0,625	0,571	0,09	0,77	1,25	0,27	5,77
NOS3 894 GT+GG	0,375	0,429			0,80	3,69	0,17

Таким образом, полиморфный аллель 397С в гене ESR1 имеет негативный эффект в отношении дополнительного риска развития аномальных маточных кровотечений у девочек-подростков.

#### **4.2. Результаты исследования межгенных взаимодействий генов эндотелиальной NO-синтазы (NOS3 786T>C, 894G>T) и генов эстрогеновых рецепторов альфа ESR1 (ESR1 351A>G, 397T>C) у девочек с аномальными маточными кровотечениями пубертатного периода**

Проведено моделирование межгенных взаимодействий полиморфизмов генов эндотелиальной NO-синтазы (NOS3 786T>C, 894G>T) и генов эстрогеновых рецепторов альфа ESR1 (ESR1 351A>G, 397T>C) у девочек с АМК ПП, позволившее выбрать комбинации полиморфных локусов, которые имеют наибольшую патогенетическую значимость для развития этого заболевания. С целью изучения межгенных взаимодействий генов эндотелиальной NO-синтазы (NOS3 786T>C, 894G>T) и генов эстрогеновых рецепторов альфа ESR1 (ESR1 351A>G, 397T>C) в группах наблюдения были выделены четырехлокусные модели гаплотипов, каждый из которых включал в себя четыре варианта генотипов (NOS3 786T>C, NOS3 894G>T, ESR1 351A>G и ESR1 397T>C) в соответствии с четырьмя локусами полиморфных генов. Изучение гаплотипов строилось по доминантной модели: в делении на генотипы использовался принцип доминирования генов. Таким образом, каждый локус генотипа был разделен на два варианта: доминантная гомозигота и гетерозигота учитывались как наличие признака, рецессивная гомозигота – как его отсутствие. В соответствии с законом комбинаторики, вариантное число возможных сочетаний признака рассчитывается по формуле:  $v=n!$ , где

v – число возможных вариантов сочетания признака,

n – число признаков,  $v=4!$   $v= 16$ .

Выделено 16 групп гаплотипов (Табл. 4.2.1.)

Таблица 4.2.1. Группы гаплотипов генов NOS3 786Т>С, NOS3 894G>Т, ESR1 351А>G и ESR1 397Т>С. Доминантная модель.

№	NOS3786Т>С	NOS3 894G>Т	ESR1 351А>G	ESR1 397Т>С
1	NOS3786ТТ/ТС	NOS3894GG/GT	ESR1351AA/AG	ESR1397ТТ/ТС
2	NOS3 786CC	NOS3 894ТТ	ESR1 351GG	ESR1 397CC
3	NOS3 786CC	NOS3 894GG/GT	ESR1351AA/AG	ESR1397ТТ/ТС
4	NOS3786ТТ/ТС	NOS3 894ТТ	ESR1351AA/AG	ESR1397ТТ/ТС
5	NOS3 786ТТ/ТС	NOS3 894GG/GT	ESR1 351GG	ESR1397ТТ/ТС
6	NOS3 786ТТ/ТС	NOS3 894GG/GT	ESR1351AA/AG	ESR1 397CC
7	NOS3 786ТТ/ТС	NOS3 894GG/GT	ESR1 351GG	ESR1 397CC
8	NOS3 786CC	NOS3 894ТТ	ESR1351AA/AG	ESR1397ТТ/ТС
9	NOS3 786ТТ/ТС	NOS3 894ТТ	ESR1 351GG	ESR1 397CC
10	NOS3 786CC	NOS3 894GG/GT	ESR1 351GG	ESR1 397CC
11	NOS3 786CC	NOS3 894ТТ	ESR1351AA/AG	ESR1 397CC
12	NOS3 786CC	NOS3 894ТТ	ESR1 351GG	ESR1397ТТ/ТС
13	NOS3 786ТТ/ТС	NOS3 894ТТ	ESR1351AA/AG	ESR1 397CC
14	NOS3 786CC	NOS3 894GG/GT	ESR1 351GG	ESR1 397ТТ/ТС
15	NOS3 786ТТ/ТС	NOS3 894ТТ	ESR1 351GG	ESR1397ТТ/ТС
16	NOS3 786CC	NOS3 894GG/GT	ESR1351AA/AG	ESR1 397CC

Проведен анализ распределения частот гаплотипов в группах наблюдения (табл. 4.2.2.). В таблице представлены гаплотипы, встречающиеся у девочек групп наблюдения. Методом MDR установлено, что среди здоровых девочек контрольной группы наибольшая доля энтропии связана с сочетанием доминантных гомозиготных или гетерозиготных генотипов во всех четырех локусах исследуемых генов: NOS3 786ТТ/ТС NOS3 894GG/GT ESR1 351AA/AG ESR1 397ТТ/ТС. Такой гаплотип встречается у 70,73% здоровых девочек.

В основных группах девочек с аномальными маточными кровотечениями данный гаплотип (NOS3 786TT/TC NOS3 894GG/GT ESR1 351AA/AG ESR1 397TT/TC) встречается на треть реже и составляет в первой основной группе девочек, рожденных с СЗРП 43,75%, а во второй основной группе девочек, рожденных с нормальной массой тела, 45,95%. Следует отметить, что распространенность данного гаплотипа в группах наблюдения статистически значимо не отличалась, но была достоверно ниже контрольных значений.

Таблица 4.2.2. Распределение частот гаплотипов генов NOS3 786T>C, NOS3 894G>T, ESR1 351A>G и ESR1 397T>C в группах наблюдения,%

Гаплотипы	Группы наблюдения					
	Основная №1 n=32		Основная №2 n=37		Контроль n=27	
	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.
NOS3 786TT/TC NOS3 894GG/G ESR1 351AA/AG ESR1 397TT/TC	43,75%	14	45,95%	17	70,37%	19
NOS3 786CC NOS3 894GG/GT ESR1 351AA/AG ESR1 397TT/TC	37,5%	12	37,84%	14	25,91%	7
NOS3 786TT/TC NOS3 894TT ESR1 351AA/AG ESR1 397TT/TC	3,12%	1	2,7%	1	3,72%	1
NOS3 786CC NOS3 894TT ESR1 351AA/AG ESR1 397TT/TC	0	0	2,7%	1	0	0

NOS3 786TT/TC NOS3 894GG/GT ESR1 351GG ESR1 397TT/TC	6,25%	2	2,7%	1	0	0
NOS3 786TT/TC NOS3 894GG/GT ESR1 351AA/AG ESR1 397CC	3,12%	1	0	0	0	0
NOS3 786CC NOS3 894GG/GT ESR1 351AA/AG ESR1 397CC	3,12%	1	5,4%	2	0	0
NOS3 786CC NOS3 894GG/GT ESR1 351GG ESR1 397CC	3,12%	1	0	0	0	0
Всего	100%	32	100%	36	100%	7

На втором месте по частоте встречаемости находился гаплотип, в котором locus 786 гена эндотелиальной NO-синтазы был представлен рецессивной гомозиготой, а в остальных локусах определялись доминантные генотипы: NOS3 786CC NOS3 894GG/GT ESR1 351AA/AG ESR1 397TT/TC.

На долю комбинации локусов (NOS3 786CC NOS3 894GG/GT ESR1 351AA/AG ESR1 397TT/TC) приходится 37,5% фенотипической энтропии, в первой основной группе девочек, рожденных с СЗРП, и 37,84% во второй основной группе девочек, рожденных с нормальной массой тела, что демонстрирует выраженный синергический эффект обоих полиморфизмов. В контрольной группе данный гаплотип встречался с частотой 25,9%.

Таблица 4.2.3. Распределение частот значимых гаплотипов генов NOS3 786T>C, NOS3 894G>T, ESR1 351A>G и ESR1 397T>C в группах наблюдения, OR (95% CI).

Гаплотип	Группы наблюдения	частоты		хи- квадрат	p	OR	95% CI	
		основная	контроль					
NOS3 786TT/TC	Основная №1 n=32	0,438	0,707	4,210	0,55	0,327	0,1	0,9
NOS3 894GG/G ESR1 351AA/AG ESR1 397TT/TC	Контроль n=27	0,707	0,438				1,03	9,01
NOS3 786CC NOS3 894GG/GT	Основная №1 n=32	0,375	0,254	0,899	0,57	1,714	0,5	5,2
ESR1 351AA/AG ESR1 397TT/TC	Контроль n=27	0,254	0,375				0,19	1,79
NOS3 786TT/TC	Основная №2 n=37	0,459	0,707	3,376	0,54	0,377	0,1	1,0
NOS3 894GG/G ESR1 351AA/AG ESR1 397TT/TC	Контроль n=27	0,707	0,459				0,93	7,61

NOS3 786CC	Основная №2 n=37	0,384	0,254	1,167	0,5	1,82	0,6	5,4
NOS3 894GG/GT							1	1
ESR1 351AA/AG	Контроль n=27	0,254	0,384	1,167	0,6	0,55	0,1	1,6
ESR1 397TT/TC с							9	4

В то же время межгенные взаимодействия остальных пар локусов являются довольно слабыми и носят спорадический характер.

Данный факт может свидетельствовать о наличии определенных межгенных взаимодействий генов между генами эндотелиальной NO-синтазы NOS3 786T>C, NOS3 894G>T и генами эстрогеновых рецепторов альфа (ESR1 351A>G и ESR1 397T>C), имеющих наиболее частое сочетание в виде двух гаплотипов: NOS3 786TT/TC NOS3 894GG/GT ESR1 351AA/AG ESR1 397TT/TC или NOS3 786CC NOS3 894GG/GT ESR1 351AA/AG ESR1 397TT/TC. Наличие аллеля С в гене NOS3 786T>C потенцирует проявления эндотелиальной дисфункции и является наиболее распространенным в гаплотипе девочек с АМК ПП.

#### **4.3. Функциональное состояние эндотелиальной системы и регуляции ангиогенеза у девочек с аномальными маточными кровотечениями пубертатного периода**

Эндотелий синтезирует вещества, участвующие в свертывании крови, фибринолизе, регуляции тонуса сосудов и их проницаемости, ангиогенезе и пролиферации миоцитов сосудистой стенки. При повреждении эндотелиальные клетки продуцируют прокоагулянты, вазоконстрикторы и факторы роста, происходит изменение баланса тромбогенных и тромборезистентных свойств сосудистой стенки в сторону увеличения тромбогенного потенциала.

При исследовании функции эндотелиальной системы у девочек выявлено достоверное повышение уровня сосудистого эндотелиального фактора роста

(VEGF-A) в сыворотке крови в основной группе №1 в сравнении с основной группой №2 и с контролем: в основной группе №1 VGEF-A составил 371,75 (219,9-565,7) нг/мл, в основной группе №2 - 240,55 (134,3-431,3) нг/мл, в контроле - 195,05 (78,21-301,85) нг/мл,  $p=0,0017$ .

Достоверных отличий в показателях VEGF-r у девочек в группах наблюдения не выявлено (Рис.4.3).

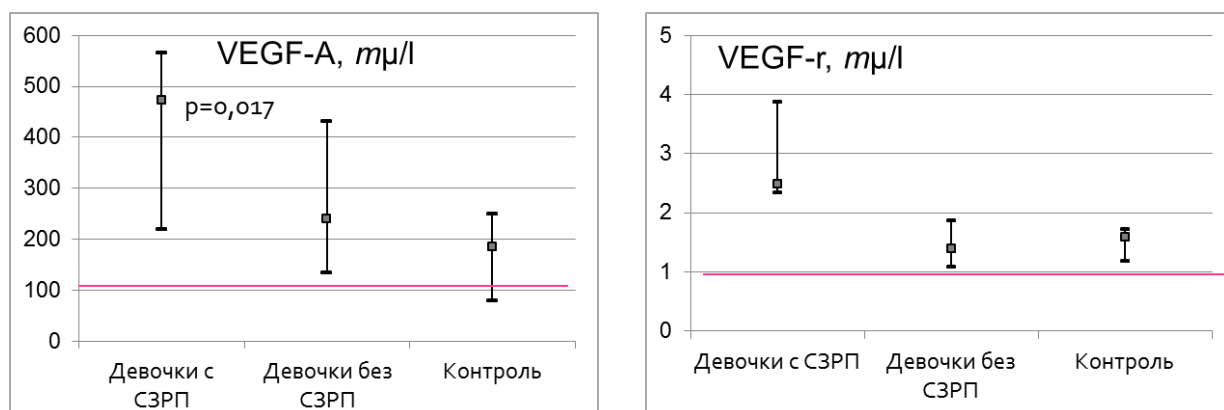


Рис. 4.3. Уровень VGEF-A и его рецептора VEGF-r у девочек обследованных групп, OR, (95% CI)

У девочек с АМК ПП отмечались достоверно более низкие значения фактора вазоконстрикции эндотелина-1 – 0,47 (0,42-4,80) фмоль/мл, против 1,34 (0,45-4,74) фмоль/мл в контрольной группе;  $p=0,015$ . Отмечалось снижение концентрации общего оксида азота (II) в периферической крови в основной группе №1 – 10,71 (6,89-17,29) мкмоль/мл, в основной группе №2 - 11,72 (7,98-19,49) мкмоль/мл, в контроле – 18,39 (14,58-23,62) мкмоль/мл,  $p_{1-3}=0,003$ ;  $p_{2-3}=0,02$  (табл.4.3.1).



Таблица 4.3.1. Показатели функционального состояния эндотелия у девочек исследуемых групп, МЕ (P25-P75).

Показатели	Основная №1(n=32)	Основная №2(n=37)	Контроль (n=27)	Уровень значимости различий, p
Эндотелин-1, фмоль/мл	0,47 (0,42-4,80)	0,57 (0,28-0,73)	1,34 (0,45-4,74)	$P_{1-3}=0,015$
VEGF-r, мкмоль/л	2,48 (2,34-3,87)	1,39 (1,08-1,87)	1,58 (1,48-1,71)	$P_{1-3}=?$
VEGF-A, пг/мл	371,75 (219,9-565,7)	240,55 (134,3-431,3)	195,05 (78,21-301,85)	$p_{1-3}=0,017$
NO общий, мкмоль/л	10,71 (6,89-17,29)	11,72 (7,98-19,49)	18,39 (14,58-23,62)	$P_{1-3}=0,003$ $P_{2-3}=0,02$
NO эндогенный, мкмоль/л	0,40 (0,20-0,73)	0,71 (0,43-1,36)	0,61 (0,24-0,80)	
NO <sub>2</sub> , мкмоль/л	9,47 (5,72-14,56)	11,44 (7,64-18,65)	17,25 (12,88-22,19)	$P_{1-3}=0,004$ $P_{2-3}=0,02$

По результатам исследования уровня эндогенного NO в периферической крови у девочек исследуемых групп достоверных отличий не выявлено. Однако, отмечена тенденция к снижению его в основной группе №1 по сравнению с контролем и основной группой №2 (рисунок 4.4).

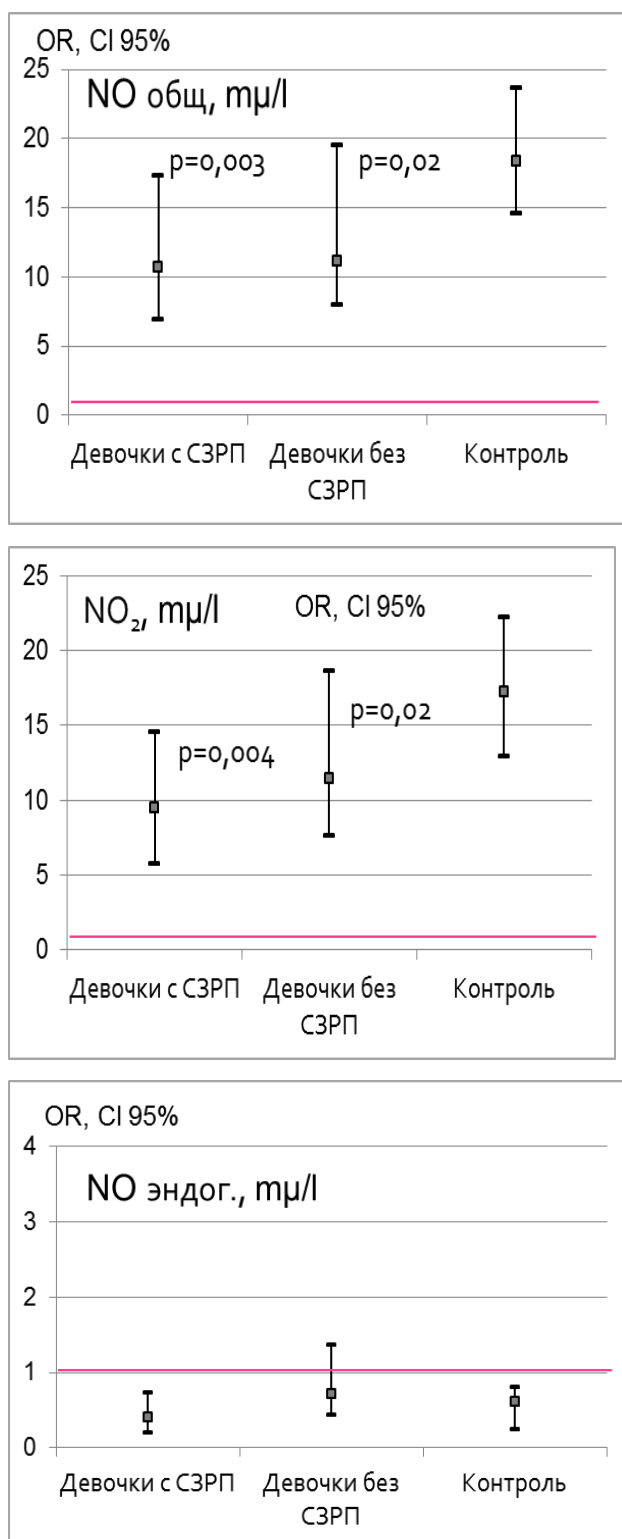


Рис. 4.4. Уровень метаболитов оксида азота NO в группах наблюдения, OR, (95% CI).

#### 4.4. Состояние гормональной функции и рецепторного аппарата половых органов у девочек с аномальными маточными кровотечениями пубертатного периода

При исследовании уровня гонадотропных гормонов гипофиза в периферической крови у девочек в раннюю фолликулярную фазу менструального цикла в группах наблюдения достоверных отличий не выявлено. В основной группе девочек с АМК ПП отмечался более высокий уровень эстрадиола в периферической крови (табл. 4.4.1). Морфологически это подтверждалось у них наличием персистирующего фолликула по данным УЗИ в 19,09% случаев.

Таблица 4.4.1. Показатели гормонов крови у девочек-подростков исследуемых групп, МЕ (P25-P75).

Показатели	Основная №1 (n=32)	Основная №2 (n=37)	Контроль (n=27)	Уровень значимости различий, p
ЛГ, мМЕ/л	4,45 (3,76-6,0)	4,0 (1,56-9,04)	4,64 (3,58-9,57)	p>0,05
ФСГ, мМЕ/л	5,83 (4,89-6,69)	6,47 (4,61-7,53)	6,29 (5,7-6,96)	p>0,05
E2, пг/мл	54,4 (41,6-98,5)	45,96 (29,52-70,69)	40,2 (43,3-61,8)	p<0,05

Известно, что влияние эстрогенов на эндометрий осуществляется через взаимодействие со специфическими внутриядерными эстрогеновыми рецепторами. У девочек основной группы №1 по данным иммуноцитохимического исследования определялся достоверно более высокий локальный уровень экспрессии рецепторов ER $\alpha$  в слизистой влагалища. Экспрессия эстрогеновых рецепторов альфа в слизистой влагалища у этих девочек в 12 раз выше, чем у девочек основной группы №2 и в 24 раза выше

контрольной группы (табл. 4.4.2). Уровень рецепторов к прогестерону в слизистой влагалища достоверно не отличался в группах сравнения. Показатель соотношения ER $\alpha$ /PR был достоверно выше в основной группе №1: 5,86 $\pm$ 0,8 против 1,88 $\pm$ 0,17 в основной группе №2 и 1,05 $\pm$ 0,12 в контрольной группе.

Таким образом, подтверждено значение относительной гиперэстрогении у девочек с АМК ПП. Морфологически это реализуется в отсутствии полноценной секреторной трансформации эндометрия, в том числе и по данным УЗИ, а так же гораздо более высоким уровнем экспрессии эстрогеновых рецепторов альфа в половых органах девочек, рожденных с СЗРП, страдающих АМК ПП.

Таблица 4.4.2. Уровень экспрессии рецепторов к половым гормонам в слизистой влагалища у девочек-подростков обследованных групп (M $\pm$ M)

Показатели	Основная №1 (n=32)	Основная №2 (n=37)	Контроль (n=27)	Уровень значимости различий, p
ER $\alpha$ , %	24,52 $\pm$ 4,86	2,04 $\pm$ 0,56	1,06 $\pm$ 0,28	p <sub>1-3</sub> =0,0001 p <sub>2-3</sub> =0,0001
PR, %	4,18 $\pm$ 1,56	1,072 $\pm$ 0,24	0,73 $\pm$ 0,13	
ER/PR	5,86 $\pm$ 0,88	1,88 $\pm$ 0,17	1,05 $\pm$ 0,12	p <sub>1-3</sub> =0,0001 p <sub>2-3</sub> =0,0001

#### **4.5. Алгоритм прогнозирования аномальных маточных кровотечений у девочек-подростков**

Для определения прогностических маркеров риска развития аномальных маточных кровотечений с периода менархе изучен анамнез девочек, их антропометрические данные, анамнез матери девочки, гормональный фон, экспрессия рецепторов половых стероидов в слизистой влагалища, данные молекулярно-генетического тестирования аллельных полиморфизмов генов ESR1 и NOS3. Методом пошагового дискриминантного анализа массива данных с

учетом значимости выбраны следующие предикторы формирования АМК ПП (табл. 4.5.1):

Таблица 4.5.1. Предикторы формирования АМК ПП.

Предиктор развития АМК ПП	теп	F to	f 1	f 2	p -value	N o. of	L ambda	F -value	f 1	f 2	p -value
Ме		24,05647	1	60	0,000007	1,00000	0,713806	24,05647	1	60	0,000007
Индекс массы тела, кг/м <sup>2</sup>		6,21230	1	59	0,015514	2,00000	0,645807	16,17930	2	59	0,000003
ТТ (NOS3 (-786) Т>С)		4,75433	1	58	0,033295	3,00000	0,596880	13,05733	3	58	0,000001
СС (Eга (-397) Т>G)		5,68296	1	57	0,020483	4,00000	0,542766	12,00443	4	57	0,000000
Послеродовое кровоотечение у матери		2,94194	1	56	0,091836	5,00000	0,515675	0,519111	5	56	0,000000
Отслойка плаценты у матери		2,42635	1	55	0,125047	6,00000	0,493887	0,393599	6	55	0,000000
VEGF-A		3,04739	1	4	0,086555	7,00000	0,467504	8,78672	7	4	0,000000
Ах		4,75003		53	0,033763	8,00000	0,429051	8,81605	8	53	0,000000
Слабость родовой деятельности		2,92189		52	0,093348	9,00000	0,406225	8,44531	9	2	0,000000
NO - общ. -(E)	0	3,05799		51	0,086358	10,00000	0,383246	8,20739	10	1	0,000000

GG (NOS3 (-894) G>T)	1	2,51219	50	0,119274	11,00000	0,364911	7,91088	11	0	0,00000
----------------------	---	---------	----	----------	----------	----------	---------	----	---	---------

В результате работы алгоритма пошагового отбора были отобраны наиболее значимые предикторы развития аномальных маточных кровотечений пубертатного периода и построено следующее прогностическое правило:

$$d = 1,16 x_1 - 0,373x_2 + 2,99x_3 - 3,95x_4 - 7,50 \quad (1)$$

Где:

$x_1$  - возраст менархе (лет),

$x_2$  - индекс массы тела ( $\text{кг}/\text{см}^2$ ),

$x_3$  - гомозигота CC в гене NOS3 (-786) T>C (0/1),

$x_4$  - гомозигота CC в гене ESR1 (-397) T>C (0/1).

При  $d > 0$  прогноз благоприятный, характеризующийся низким риском развития АМК ПП;

при  $d \leq 0$  прогноз неблагоприятный, характеризующийся высоким риском развития АМК ПП.

Проверку устойчивости и работоспособности математической модели осуществляли методом скользящей экзаменационной выборки на 100 пациентках. Результаты экзамена представлены в таблице 4.5.2.

Таблица 4.5.2. Результаты экзаменационной выборки.

	Состояние	Прогноз норма	Прогноз нарушение	Итоги по строке
Нормальный цикл	0	23	5	28
		82,1%	17,9%	
АМК ПП	1	6	66	72
		8,3%	91,7%	
Итоги по столбцу		23	77	100

Предлагаемый способ дает вероятность правильного прогнозирования развития аномальных маточных кровотечений пубертатного периода в 91,7% случаев.

Чувствительность метода составляет 91,7%, специфичность 82,1%.

Эффективность метода составляет 86,9%.

Для уменьшения процента пропущенной патологии приоритет при принятии прогностического решения отдается в пользу патологии.

С целью профилактики развития аномальных маточных кровотечений пубертатного периода разработан следующий алгоритм обследования (рис.4.5):

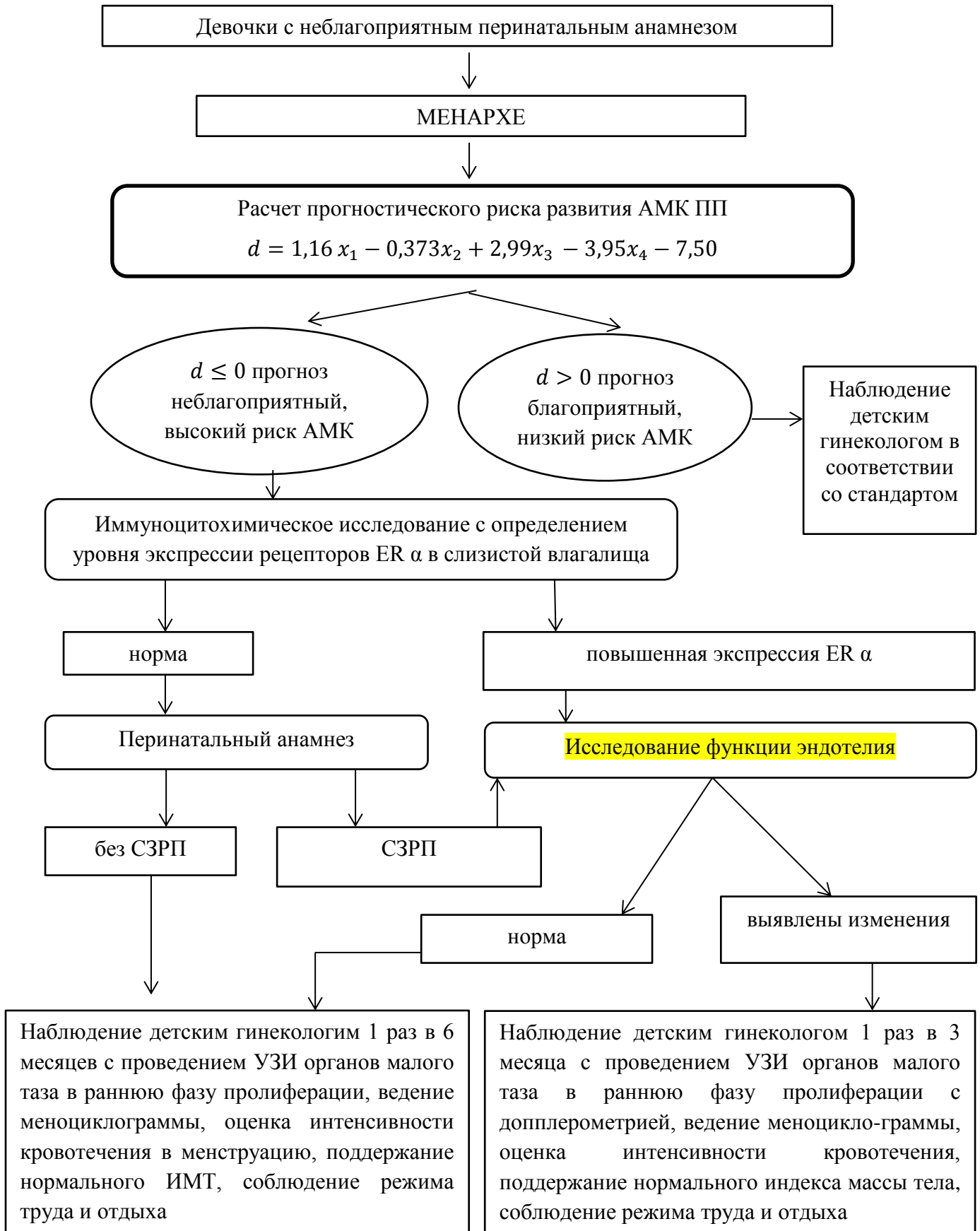


Рисунок 4.5. Алгоритм прогнозирования и профилактики аномальных маточных кровотечений пубертатного периода



Таким образом, при генотипировании девочек, страдающих АМК ПП, выявлено, что у девочек, рожденных с задержкой внутриутробного роста, достоверно чаще в генотипе определялось наличие полиморфного аллеля С в гене NOS3 786 T>C в гетеро или гомозиготном состоянии. Кроме того, у них чаще типировали генотип ESR1 Rvull-CC в гене эстрогеновых рецепторов альфа.

У девочек с АМК ПП выявлено носительство определенных гаплотипов, что свидетельствует о межгенном взаимодействии генов NOS3 и ESR1, причем у девочек, рожденных с СЗРП, в гаплотипах чаще определяются полиморфные рецессивные аллели в гомозиготном генотипе в локусе 786 гена NOS3. У девочек, страдающих АМК ПП, рожденных с СЗРП, выявлено нарушение соотношения модуляторов сосудистого тонуса и регуляции ангиогенеза, что приводит к изменению синтеза и биодоступности тканевых факторов вазоконстрикции и вазодилатации. Продемонстрировано снижение уровня эндотелина-1 более чем в 5 раз и значительное повышение уровня сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF-A) у пациенток с АМК ПП, особенно рожденных с СЗРП. Отсутствие полноценной вазоконстрикции на фоне неконтролируемого ангиогенеза в эндометрии является важным механизмом развития аномального маточного кровотечения. Прогнозирование АМК ПП с периода менархе на основании изучения генотипов девочек и их физических показателей развития поможет профилактировать развитие тяжелых осложненных форм заболевания и формирование рецидивов данной патологии.

Материалы данной главы представлены в следующих работах:

1. Волкова, Е.В. Состояние рецепторного аппарата слизистой влагалища у девочек с маточными кровотечениями пубертатного периода / Е.В.Волкова, О.А. Мелкозерова, И.В.Данькова, С.В.Гончарова, Г.Н.Чистякова, М.А.Чистяков // Нерешенные вопросы акушерства, гинекологии и перинатологии : материалы

научно-практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию со дня рождения Р.А. Малышевой. – Екатеринбург, 2014. – С. 11-12.

2. Башмакова, Н.В. Маркеры дисфункции эндотелия при аномальных маточных кровотечениях пубертатного периода у девочек, рожденных с задержкой внутриутробного роста / Н.В. Башмакова, О.А.Мелкозерова, И.В. Данькова, Е.В.Волкова, Г.Н.Чистякова // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2015. – № 2. – С. 19-24.

2. Волкова, Е.В. Влияние дисфункции эндотелия на становление репродуктивного потенциала девочек, рожденных с задержкой внутриутробного роста / О.А.Мелкозерова, Н.В.Башмакова, Г.Н.Чистякова, И.В.Данькова // Репродуктивное здоровье детей и подростков. -2016.- № 2.- С. 67-77.

3. Волкова, Е.В. Роль состояния рецепторного аппарата половых органов и полиморфизмов генов ESR-1 и NOS-3 в генезе аномальных маточных кровотечений пубертатного периода / Е.В.Волкова, О.А.Мелкозерова, Т.Б. Третьякова, Н.Е.Рукосуев, М.А.Чистяков // Репродуктивный потенциал семьи – гарантия безопасности государства : материалы международного конгресса. – Екатеринбург, 2015. – С. 17-18.

4. Волкова, Е.В. Как влияет дисфункция эндотелия на становление репродуктивного потенциала девочек, рожденных с задержкой внутриутробного роста / Е.В.Волкова, О.А.Мелкозерова, Н.В.Башмакова, Г.Н.Чистякова, И.В.Данькова // Репродуктивное здоровье детей и подростков. - 2016.- № 2.- С.60-61.

5. Мелкозерова, О.А. Молекулярно-генетические аспекты фетального программирования аномальных маточных кровотечений пубертатного периода: роль синдрома эндотелиальной дисфункции / О.А.Мелкозерова, Н.В.Башмакова, Е.В.Волкова, Т.Б.Третьякова, Г.Н.Чистякова // Проблемы репродукции. – 2016. - № 3. – С. 28-37.

6. Прогнозирование и профилактика аномальных маточных кровотечений пубертатного периода у девочек, рожденных с задержкой внутриутробного роста :

учебно-методическое пособие / О.А.Мелкозерова, Н.В.Башмакова, Е.В. Волкова, Г.Н.Чистякова, Т.Б.Третьякова, М.А.Чистяков. - Екатеринбург, 2016. - 44 с.

7. Мелкозерова, О.А. Внутриутробно программируемая эндотелиальная дисфункция в генезе аномальных маточных кровотечений у девочек, рожденных с синдромом задержки роста плода / О.А.Мелкозерова, Н.В.Башмакова, Е.В.Волкова, Г.Н.Чистякова, И.В.Данькова // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии.-2016. - №3. – С. 17-23.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние годы научный интерес представляют молекулярно-генетические и иммунологические исследования, посвященные изучению локальных процессов ангиогенеза и гемостаза в эндометрии при аномальных маточных кровотечениях [6, 20, 67]. Большое внимание уделяется роли эндотелиальной дисфункции в развитии неконтролируемого ангиогенеза в эндометрии с последующим нарушением экспрессии тканевых факторов гемостаза и вазоконстрикции [45, 55, 56].

Течение беременности и родов у матери оказывает определяющее влияние на становление репродуктивного здоровья девочки [7, 44, 60]. Известно, что нарушение менструальной функции, в частности АМК ПП, чаще формируются у девочек, рожденных от матерей, беременность которых протекала на фоне привычного невынашивания, преэклампсии и хронической фетоплацентарной недостаточности с исходом в синдром задержки внутриутробного роста плода [17, 20, 69]. Пусковым механизмом патогенеза этих акушерских осложнений является синдром эндотелиальной дисфункции [72, 93, 112, 122].

Доказана роль генетического полиморфизма эндотелиальной NO-синтазы (NOS3) в развитии преэклампсии и плацентарной недостаточности [23, 26, 74]. Поэтому логично предположить, что девочки, рожденные с синдромом задержки роста плода от матерей, чья беременность протекала на фоне синдрома эндотелиальной дисфункции с исходом в преэклампсию и фетоплацентарную недостаточность, унаследовали определенный полиморфизм генов, регулирующих функцию эндотелиальной системы. Фенотипически эндотелиальная дисфункция у этих девочек может реализоваться в развитие аномальных маточных кровотечений пубертатного периода, связанных с нарушением баланса тканевых эндотелиальных факторов, сосудистого тонуса, ангиогенеза и локального гемостаза в эндометрии [77, 127, 137].

Важное место в патогенезе АМК ПП принадлежит изменениям в нейроэндокринном звене репродуктивной системы «гипоталамус-гипофиз-

яичники», однако уровень стероидных гормонов крови, как правило, редко нарушен [78, 85, 88, 97]. Можно предположить, что у девочек с АМК ПП нарушен механизм цитоплазматического связывания стероидных гормонов, приводящий к изменению их биологического действия.

Кроме того, эстрогены являются одними из важнейших регуляторов эндотелиальной функции. Они оказывают влияние на сосудистую систему и микроциркуляцию, активируя высвобождение оксида азота, простациклина, гиперполяризационного фактора эндотелия, а так же уменьшая высвобождение сосудосуживающих субстанций, таких как эндотелин I и ангиотензин II [76]. Для эндотелиальной ткани наибольшее значение имеет передача сигнала через рецептор ER $\alpha$  [12, 66].

Остаются малоизученными вопросы межгенных взаимодействий полиморфных вариантов генов эндотелиальной NO-синтазы и генов эстрогеновых рецепторов при целом ряде заболеваний, в том числе репродуктивной системы. Подобных работ в отечественной и зарубежной литературе встречается не много, и проблема требует дальнейшего изучения. Изложенные обстоятельства послужили основанием к выполнению данной работы.

Цель исследования - оптимизация диагностики и прогнозирования аномальных маточных кровотечений у девочек, рожденных с синдромом задержки роста плода, с учетом роли генетической регуляции гормонального гомеостаза и функции эндотелия.

Для выполнения задач, поставленных в работе, проведен анализ результатов клинического и лабораторного обследования 96 девочек пубертатного возраста, которые были разделены на три группы: 32 девочки, рожденные в доношенном сроке с синдромом задержки внутриутробного роста, страдающие аномальными маточными кровотечениями пубертатного периода, 36 девочек, рожденных в доношенном сроке с нормальной массой тела, страдающих аномальными маточными кровотечениями пубертатного периода, и 27 девочек, рожденных в доношенном сроке с нормальным ритмом и объемом менструации.

Разрешение поставленных в работе задач осуществлялось с помощью комплекса современных клинических, инструментальных и лабораторных методов исследования, подробно описанных во второй главе диссертации.

При изучении анамнеза девочек были выявлены следующие особенности.

Девочки, рожденные с синдромом задержки роста плода, к моменту пубертатного возраста имели достоверно более высокий индекс массы тела, граничащий с нормой, и при этом наименьший рост по сравнению с девочками, рожденными с нормальной массой тела. Это подтверждает теорию David Backer о внутриутробном программировании некоторых заболеваний у людей, рожденных с низкой массой тела, и в первую очередь ожирения [63, 143]. Смысл этой теории заключается в том, что если плод, развиваясь, сталкивается с неблагоприятными факторами (ограничение питания, гипоксия), то под их влиянием меняется экспрессия генов растущего организма и реализуется «программа выживания». Происходит либо ускорение созревания плода, либо уменьшение скорости роста плода и потребления им питательных веществ, либо завершение беременности спонтанным выкидышем или абортом.

Ученые заметили, что чем меньше был вес ребенка при рождении, тем выше становился риск артериальной гипертензии, инсульта, сахарного диабета [82, 91]. Так, по данным наших исследований, наследственность девочек, страдающих АМК ПП, наиболее часто была отягощена сахарным диабетом и артериальной гипертензией.

В структуре интранатальных осложнений в группе с СЗРП достоверно чаще зафиксирована сочетанная гипоксия, что говорит о хроническом внутриутробном течении гипоксии, которая усугубляется в родах.

Течение беременности и родов у матери определяет состояние репродуктивного здоровья девочки [35, 128].

У каждой четвертой матери, дочери которых страдали АМК ПП, в анамнезе отмечалась неразвивающаяся беременность, что свидетельствует о наличии у них хронического эндометрита [16, 55]. В такой исходно скомпрометированной внутриматочными вмешательствами матке, где вероятно как поражение

рецепторного аппарата эндометрия, так и развитие хронического эндометрита с нарушением механизмов полноценной имплантации, инвазии трофобласта, и происходило внутриутробное развитие девочек основных групп наблюдения, страдающих в подростковом возрасте аномальными маточными кровотечениями.

Данная ситуация реализовалась в осложнения гестации не у всех мам. У матерей, родивших девочек с СЗРП, течение беременности в 3,5 раза чаще осложнялось развитием умеренной преэклампсии и в 3,6 раз чаще развитием плацентарной недостаточности, чем у матерей девочек, рожденных с нормальной массой тела. Декомпенсированная плацентарная недостаточность с исходом в отслойку плаценты отмечалась в анамнезе почти у половины женщин, родивших в дальнейшем девочек с СЗРП. Антенатальная гибель плода в анамнезе отмечалась у четверти всех женщин данной группы. Это свидетельствует о наличии нарушений плацентации на этапе первой и второй волны инвазии трофобласта у таких женщин. Ведущую роль в этих процессах может играть наследственно детерминированный синдром эндотелиальной дисфункции [22, 23, 106]. А дальнейшее течение беременности в условиях хронической гипоксии и нарушения маточно-плацентарного кровообращения формирует у девочек в дальнейшем определенные нарушения становления репродуктивной функции и овариального резерва [127, 128].

Соматически девочки, страдающие АМК ПП, имели акцентуированный инфекционный фон, чаще болели ВСД по гипотоническому и смешанному типу, чаще имели синдром дисплазии соединительной ткани, страдали патологией щитовидной железы и ЖКТ, а также, что очевидно, железодефицитной анемией. При этом достоверных отличий между девочками, рожденными с нормальной или низкой массой тела, относительно частоты распространенности соматической патологии, не выявлено.

Девочки, рожденные с СЗРП, имели достоверно более высокий индекс массы тела, более раннее менархе с некоторым опережением темпов полового развития и более выраженные вторичные половые признаки по сравнению со сверстницами контрольной группы. Это говорит о гиперэстрогеновом фенотипе

пациенток с АМК ПП, а в особенности тех, кто родился с СЗРП, что соотносится с данными других исследователей о фенотипическом портрете девочек с АМК ПП [92, 127].

По данным УЗИ малого таза обращало на себя внимание некоторое увеличение размеров матки, граничащее с нормой у девочек с АМК ПП.

Достоверно чаще в основной группе с СЗРП регистрировался высокий индекс резистентности в спиральных артериях матки. Данная ситуация реализуется в гипоксические изменения эндо-и-миометрия.

Рождение девочки с синдромом внутриутробной гипотрофии, развивающейся на фоне эндотелиопатии матери при вынашивании беременности, определяет внутриутробно программируемые особенности функционирования эндотелиальной системы девочки [67, 150].

В подростковом периоде на этапе становления менструальной функции данные нарушения функции эндотелия и регуляции ангиогенеза реализуются в развитии с менархе аномальных маточных кровотечений пубертатного периода.

Внутриматочный гемостаз в период менструации достигается не только путем образования мелких тромбов в спиральных артериолах, но и за счет их сокращения [128]. Мощными вазоконстрикторами являются эндометриальные эндотелиальные факторы – эндотелины, трансформирующий фактор роста, факторы некроза опухоли. Во время маточного кровотечения происходит активация секреции провоспалительных цитокинов натуральными киллерами (NK), что приводит к запуску механизмов эндотелий-зависимой вазоконстрикции под влиянием семейства эндотелинов. Нарушение соотношения модуляторов сосудистого тонуса при синдроме эндотелиальной дисфункции приводит к изменению синтеза и биодоступности тканевых факторов вазоконстрикции и вазодилатации. Так в исследовании южно-корейских ученых было показано, что уровень экспрессии эндотелиальной NO-синтазы (NOS3) в ткани эндометрия у пациенток с меноррагиями и миомой матки значительно выше по сравнению с нормальным эндометрием. Было установлено, что меноррагии и дисменорея имеют тесную связь с продукцией эндотелиальной NO-синтазы [156, 159].



Нарушение соотношения модуляторов сосудистого тонуса при синдроме эндотелиальной дисфункции приводит к изменению синтеза и биодоступности тканевых факторов вазоконстрикции и вазодилатации. В нашем исследовании продемонстрировано снижение уровня эндотелина-1 более чем в 5 раз у пациенток с АМК ПП, рожденных СЗРП.

Отсутствие полноценной вазоконстрикции на фоне неконтролируемого ангиогенеза в эндометрии является важным механизмом развития аномального маточного кровотечения [127, 137]. Кроме того, у девочек, рожденных с задержкой внутриутробного роста, отмечалось снижение синтеза эндотелием сосудов эндогенного оксида азота (NO), что может расцениваться как одно из проявлений синдрома эндотелиальной дисфункции. Дефицит или уменьшение биодоступности NO, и связанное с этим нарушение соотношения модуляторов сосудистого тонуса приводит к снижению релаксации сосудов и вазоспазму, увеличению периферического сопротивления кровотоку, гипоперфузии тканей. Тканевая гипоксия является эпигенетическим механизмом, индуцирующим экспрессию ряда факторов, ведущих к эндотелиальной дисфункции (IL 6, TNF $\alpha$ , Flt-1 и др.) [32, 87, 68]. Реализация этих эффектов происходит у пациенток с определенными особенностями генотипа, заключающимися в ассоциации полиморфных генов, регулирующих функцию эндотелия [144, 161].

Среди многих патогенетических механизмов нарушения менструального цикла обсуждают роль эстрогенов, обладающих самыми разнообразными эффектами. Репродуктивные эффекты эстрогенов, в том числе их влияние на эндометрий, хорошо изучены. В контексте аномальных маточных кровотечений интерес представляют внегонадные эффекты эстрогенов. К одной из внегонадных локализаций ESR1 относится эндотелий сосудов [49]. В эндотелии сосудов расположены как ядерные ESR1, отвечающие за геномный ответ эстроген-опосредованного синтеза NO, так и мембранные ESR1, участвующие в быстрой трансдукции сигнала посредством активации киназного пути [62]. Им отводится роль в регуляции сосудистого тонуса посредством модуляции синтеза

эндотелиальной NO-синтазы. Согласно последним отчетам, биодоступность NOS3 так же регулируется посредством эстрогенов [132, 145].

Данные о межгенном взаимодействии генов NOS3 и ESR1 представлены в литературе недостаточно. Британские исследователи выяснили, что приблизительно на 1500 пар оснований выше гена NOS3 в 7 хромосоме расположены сайты транскрипции, которые регулируются, в том числе, уровнем экспрессии эстрогенов [159]. Таким образом, эстроген-зависимый эффект биосинтеза эндотелиальной NO-синтазы, биодоступности эндогенного NO, и вазоактивные эффекты эндотелиальной системы могут зависеть от полиморфизмов генов ESR1 и взаимодействия с генами NOS3.

Нами проведено исследование полиморфизмов генов 786 T>C, 894G>T и полиморфизмы гена ESR1 351A>G (XbaI) и 397T>C (PvuII) и некоторых маркеров эндотелиальной дисфункции и ангиогенеза у девочек, рожденных с задержкой внутриутробного роста. Анализ распределения частот аллелей генов NOS3 и ESR1 показал, что частота встречаемости аллеля С гена NOS3 786T>C достоверно выше у девочек, страдающих аномальными маточными кровотечениями, которые родились с синдромом задержки внутриутробного роста плода. В последних работах показано, что наличие аллеля С в промоторе гена 786 T>C NOS3 приводит к снижению активности NOS3 и уменьшает ее экспрессию в тканях, в результате чего снижается синтез и высвобождение оксида азота, что и определяет синдром эндотелиальной дисфункции [85, 100]. Сообщается, что носители аллеля С гена 786 T>C NOS3 имеют более низкие уровни нитритов в крови, у них снижена реакция компенсаторной активации кровотока в плечевой артерии на введение ацетилхолина и эстрогенов [140]. Метаанализ из 20 исследований, включающий 11236 пациенток, продемонстрировал связь полиморфного аллеля С в гене 786 T>C NOS3 с наличием повышенного тонуса коронарных артерий, склонностью к коронарному спазму и извращенной реакцией на введение ацетилхолина, что может служить основой развития ИБС и острого коронарного синдрома (OR 1.32, CI 95% 1.07-1.28, p=0.001) [159]. Таким образом, наличие в генотипе полиморфного аллеля С гена 786 T>C NOS3 в гетеро или

гомозиготном состоянии, ассоциированного с риском синдрома эндотелиальной дисфункции, достоверно чаще определяется у девочек, страдающих аномальными маточными кровотечениями, рожденных с внутриутробной задержкой роста плода.

Кроме того, в нашем исследовании у девочек, страдающих маточными кровотечениями пубертатного периода, рожденных с синдромом задержки роста плода, чаще определялся генотип ESR1 Rvull-CC в гене эстрогеновых рецепторов альфа. В работах, посвященных изучению влияния полиморфизма rVull ESR1 на дисфункцию эндотелия при сердечно-сосудистых заболеваниях, подчеркивается, что генотип ESR1 Rvull-CC несет повышенный риск формирования эндотелиальной дисфункции и клинически чаще проявляется увеличением систолического артериального давления, толщины интимы и частоты ИБС у женщин [147, 156]. В работах других авторов подчеркивается, что генотип ESR1 Rvull-CC значительно уменьшает NO-зависимое увеличение скорости кровотока и биодоступность NO [160].

Ряд исследователей полагают, что синдром эндотелиальной дисфункции вызывает снижение кровотока в строме эндометрия и формирование тканевой гипоксии [51, 127]. В нашем исследовании показано достоверное снижение кровотока в субэндометральной области, сопровождающееся повышением индексов резистентности в спиральных артериях матки у девочек с АМК ПП, рожденных с СЗРП, в сравнении с контрольными значениями у девочек пубертатного возраста. Тканевая гипоксия в этом случае запускает развитие аномального ангиогенеза, за счет образования клеток, интенсивно экспрессирующих сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF). Loswood С. J. и соавт. показали, что тканевая гипоксия, связанная с ингибированием активности кровотока в эндометрии и гиперпродукцией активных форм кислорода при синдроме эндотелиальной дисфункции, увеличивает синтез ангиогенных факторов роста, таких как VEGF-A в HESC и ангиопоэтина -2 (Ang-2) в эндотелиальных клетках эндометрия, в то время как синтез ангиопоэтина -1 в HESC клетках уменьшается [129]. В результате возрастает хрупкость сосудистой

стенки, происходит активация неконтролируемого ангиогенеза в эндометрии, что влечет за собой развитие аномальных маточных кровотечений.

В нашем исследовании определялось повышение уровня VEGF-A у девочек с аномальными маточными кровотечениями более чем в три раза по сравнению с контрольными значениями. Увеличение продукции проангиогенных факторов роста на фоне снижения выработки ингибиторов ангиогенеза свидетельствует о стремлении организма нивелировать нарушения васкуляризации эндометрия, обусловленные эндотелиальной дисфункцией.

Проангиогенный статус компенсаторно поддерживается высокой экспрессией ESR1 в тканях половых органов у девочек с АМК ПП, рожденных с СЗРП. В нашем исследовании у них определялся достоверно гораздо более высокий локальный уровень экспрессии рецепторов ESR1 в слизистой влагалища. Экспрессия эстрогеновых рецепторов в слизистой влагалища у девочек с АМК ПП, рожденных с СЗРП, в 12 раз выше, чем у тех, кто родился с нормальной массой тела и в 24 раза выше контрольной группы. Показатель соотношения ER $\alpha$ /PR был достоверно выше в группе девочек с АМК ПП. Стратегия формирования выраженного проангиогенного статуса является, по-видимому, одним из компенсаторных механизмов сохранения оптимальной тканевой перфузии в эндометрии при нарушении условий ее существования [67, 79].

Дальнейшее **перспективы** изучение молекулярно-генетических механизмов реализации данной патологии расширит возможности прогнозирования и профилактики маточных кровотечений у девочек-подростков [80]. Предложенный авторами алгоритм прогнозирования АМК ПП, основанный на изучении полиморфизма генов NOS3 и ESR1 позволит сформировать группу риска по развитию нарушений становления менструальной функции с учетом внутриутробно программируемых заболеваний и оптимизировать наблюдение педиатрами и детскими гинекологами за развитием девочек из групп риска АМК ПП.

Таким образом, аномальные маточные кровотечения пубертатного периода у девочек, рожденных от матерей с осложненным течением гестации в виде

преэклампсии, хронической плацентарной недостаточности с исходом в синдром задержки внутриутробного роста плода, могут иметь в основе патогенеза синдром эндотелиальной дисфункции с нарушением регуляции ангиогенеза и сосудистого тонуса. Дисбаланс активности вазоконстрикторов и вазодилататоров микроциркуляторного русла на фоне активации ангиогенеза и повышения уровня экспрессии эстрогеновых рецепторов у девочек, рожденных с внутриутробной задержкой роста, является одним из механизмов рецидивирующего характера аномальных маточных кровотечений.

**Обозначить Перспективы дальнейшего исследования**

## ВЫВОДЫ

1. Девочки-подростки, рожденные с внутриутробной гипотрофией, отличаются от здоровых сверстниц погранично высоким индексом массы тела ( $24,3 \pm 1,89$  кг/см<sup>2</sup>), ранним наступлением менархе ( $10,88 \pm 0,31$  лет), опережением темпов и дисгармоничным характером полового развития ( $Ma4,28 \pm 0,16$ ;  $Ax4,02 \pm 0,16$ ;  $Pb3,96 \pm 0,21$ ;  $Me10,94 \pm 0,31$ ). Клиническая картина аномальных маточных кровотечений у девочек, рожденных с задержкой внутриутробного роста, отличается их дебютом с менархе в 85,5% случаев, длительным рецидивирующим течением у 57,4% девочек, отсутствием эффекта от консервативной терапии с развитием осложнений в 68,8% случаев.

2. Уровень экспрессии рецепторов к эстрадиолу альфа в слизистой влагалища у девочек с маточными кровотечениями, рожденных с СЗРП, в 12 раз выше, чем у тех, кто родился с нормальной массой тела, и в 24 раза выше здоровых сверстниц. Носительство полиморфизма  $Rvu11-CC$   $ESR1$  повышает риск развития аномальных маточных кровотечений пубертатного периода ( $OR=4,58$ ; 95% CI; 0,97-21,68;  $p=0,04$ ).

3. Фенотипическими проявлениями дисфункции эндотелия у девочек, рожденных с внутриутробной задержкой роста, являются снижение синтеза и биодоступности общего оксида азота и его метаболитов на 58,2%, уменьшении уровня эндотелина-1 в 2,8 раза и компенсаторной активации ангиогенза за счет увеличения уровня VEGF-A в 1,3 раза. Носительство полиморфного аллеля С в локусе 786 гена эндотелиальной NO-синтазы связано с повышенным риском развития у девочек аномальных маточных кровотечений пубертатного периода ( $OR=2,56$ ; 95% CI 1,01-6,50;  $p=0,04$ ).

4. Применение разработанного алгоритма обследования и прогнозирования аномальных маточных кровотечений пубертатного периода способствует раннему доклиническому выделению групп высокого риска и проведению своевременных профилактических мероприятий.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. С целью ранней доклинической диагностики нарушений формирования репродуктивного здоровья девочек необходимо с периода новорожденности проводить качественный учет факторов риска, включающий в себя семейный анамнез, течение беременности, родов, соматического и гинекологического здоровья матери, а так же перинатальных заболеваний девочек, в том числе синдрома задержки роста плода.

2. Всем девочкам, вступившим в пубертатный период, после наступления менархе рекомендуется посещение детского гинеколога для расчета степени риска развития АМК ПП по разработанной формуле прогноза, включающей возраст менархе, индекс массы тела и исследование полиморфизма генов ESR- $\alpha$  и NOS3.

3. У девочек с высоким риском АМК ПП, особенно рожденных с СЗРП, в комплекс клинико-лабораторного обследования должны быть включены иммуцитохимическое исследование уровня экспрессии рецепторов к стероидным гормонам в слизистой оболочке влагалища и исследование функции эндотелиальной системы.

4. Все девочки с высоким риском развития АМК ПП требуют диспансерного наблюдения детским гинекологом 1 раз в 3 месяца в течение первого года после менархе. Они должны быть обучены ведению меноциклограммы и оценке интенсивности менструации. Все девочки-подростки должны быть информированы о целесообразности коррекции и поддержании оптимальной массы тела (как при дефиците, так и при избыточной массе тела), нормализации режима труда и отдыха, здорового образа жизни.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

- АГ – артериальная гипертензия
- АКТГ - адренкортикотропный гормон
- АМКПП – аномальные маточные кровотечения пубертатного периода
- ВСД – вегетососудистая дистония
- ЖКТ – желудочно-кишечный тракт
- ИМТ – индекс массы тела
- ЛГ – лютеинизирующий гормон
- МВС – мочевыделительная система
- НМПК – нарушение маточно-плацентарного кровообращения
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- СД – сахарный диабет
- СДСТ – синдром дисплазии соединительной ткани
- СЗРП – синдром задержки роста плода
- ФСГ – фолликулостимулирующий гормон
- ХФПН – хроническая фетоплацентарная недостаточность
- E2 - эстрадиол
- ER $\alpha$  – эстрогеновый рецептор  $\alpha$
- ESR1 – ген эстрогеновых рецепторов альфа
- HIF гипоксия индуцированный фактор
- HIF-1 $\alpha$  - гипоксия-индуцирующий фактор-1  $\alpha$
- NO – оксид азота II
- NOS3 – эндотелиальная синтаза оксида азота (II)
- PR – рецептор к прогестерону
- VEGF- сосудистый эндотелиальный фактор роста



## Список литературы

1. Аганезова, Н.В. Ассоциации проявлений предменструального синдрома в психоэмоциональной сфере с генным полиморфизмом гена рецептора эстрогенов ER-1 / Н.В.Аганезова, З.В.Корчагина, Е.Б.Морозова //Журнал акушерства и женских болезней.- 2011.- № 2.- С.14-21.

2. Аганезова, Н.В. Ассоциация функциональных вариантов генов транспортеров серотонина и дофамина с психовегетативными нарушениями у больных с предменструальным синдромом / Н.В.Аганезова, Е.Б. Морозова, А.Б.Чухловин //Молекулярная диагностика – 2010 : сборник трудов VII Всероссийской научно-практич. конференция с международным участием . – М., 2010. – Т. 3. – С. 4-5.

3. Адамян, Л.В. Лечение нарушений менструального цикла у девочек препаратами, содержащими фитоэстрогены / Л.В.Адамян, Е.А.Богданова, Т.М.Глыбина и др. //Материалы VI Международного конгресса по репродуктивной медицине.–Проблемы репродукции.-2012.– Спецвыпуск.- С. 112-113.

4. Адамян, Л.В. Новые патогенетические аспекты распространенного инфильтративного эндометриоза: теории и практика / Л.В.Адамян, О.В.Зайратьянц, Ю.В.Максимова и др.//Проблемы репродукции.- 2010.-№ 4.- С.31-36.

5. Адамян, Л.В. Особенности становления репродуктивной системы у девочек с гипоталамо — гипофизарной дисфункцией / Л.В.Адамян, Е.А.Богданова, Т.М.Глыбина и др.//Материалы VI Международного конгресса по репродуктивной медицине. – Проблемы репродукции.-2012. – Спецвыпуск.- С.113-114.

6. Адамян, Л.В. Этиология, патогенез, клиника маточных кровотечений пубертатного периода (обзор литературы) /Л.В.Адамян, Е.А.Богданова, Е.В.Сибирская и др.// Пробл. репродукции. - 2011. - № 5. - С. 33-37.

7. Адильханова, А.Х. Социальные факторы нарушения менструальной функции у подростков / А.Х.Адильханова, Г.Ф.Кутушева //Врач – аспирант.- 2011.- № 2.- С.207- 212.

8. Адильханова, А.Х. Становление менструальной функции у девочек – подростков с аддиктивным поведением /А.Х.Адильханова, Г.Ф.Кутушева //Профилактическая и клиническая медицина.- 2011.- №2.- С.174-175.

9. Андреева, В.О. Аномальные маточные кровотечения пубертатного периода: прогноз рецидивов и выбор лечебной тактики / В.О.Андреева, А.А.Машталова// Репродуктивное здоровье детей и подростков. – 2013.- №5.- С.28-33.

10. Андреева, В.О. Состояние системной продукции факторов роста у пациенток с маточными кровотечениями и олигоменореей в пубертате/ В.О.Андреева, А.А.Машталова //Репродуктивное здоровье детей и подростков.- 2012.-№ 6.- С.16-24.

11. Андреева, В.О. Оптимизация тактики ведения пациенток с рецидивами маточных кровотечений пубертатного периода / В.О.Андреева //Эффективная фармакотерапия.Акушерство и Гинекология.- 2013.- №4.-С. 54-60.

12. Ашхаб, М.Х. Иммуногистохимические исследования экспрессии рецепторов стероидных гормонов в эндометрии женщин в ходе нормального менструального цикла / М.Х.Ашхаб, А.Л.Владимирцева, Н.Н.Шелястина// Вестник Российского университета дружбы народов.- 2002.- №1.-С.54-60. – (Сер.Медицина).

13. Баранов, А.А. Здоровье и развитие подростков России / А.А.Баранов, В.Р.Кучма,Л.С.Намазова-Баранова.- М.: НЦЗД РАМН, 2010.- 102с.

14. Баранов, А.А. Региональные особенности здоровья детей – основа выбора приоритетов педиатрической науки и практики / А.А. Баранов, В.Ю. Альбицкий // Научная сессия академий. – М.: Наука, 2007. – С. 68-69.

15. Баряева, О.Е. Маточные кровотечения пубертатного периода / О.Е.Баряева / ГБОУ ВПО ИГМУ Минздрава России. - Иркутск : ИГМУ, 2012. - 25 с.
16. Башмакова, Н.В. Воздействие низкочастотного ультразвука на рецепторное поле эндометрия: возможности реабилитации после регрессирующей беременности / Н.В.Башмакова, О.А.Мелкозерова, Д.В.Погорелко // Проблемы репродукции.- 2014.- № 3.- С. 87-94.
17. Башмакова, Н.В. Возможности низкочастотной ультразвуковой кавитации в восстановлении эндометрия у пациенток с неразвивающейся беременностью в анамнезе / Н.В.Башмакова, О.А.Мелкозерова, Д.В.Погорелко и др. //Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии.- 2013.- № 6.- С. 14-18.
18. Бебякова, Н.А. Взаимосвязь периферической вазоконстрикции с полиморфизмом т-786с гена эндотелиальной синтазы оксида азота / Н.А.Бебякова, А.В.Хромова, О.М.Феликсова //Медицинские науки.- 2013.- № 2.- С.176–179.
19. Бисадзе, В.О.Тромбофилия как важнейшее звено патогенеза осложнений беременности / В.О.Бисадзе, А.Д.Макацария, Х.Д.Хизроева и др.//Практическая медицина.- 2012.- № 5.- С.22-29.
20. Богатырева, Е.М. Структура гиперандрогении в пубертатном периоде / Е.М.Богатырева, Г.Ф.Кутушева, И.Н.Гоготадзе// Репродуктивное здоровье детей и подростков.- 2015. - № 1. - С. 50-57.
21. Богданова, Е.А. Практическая гинекология молодых / Е.А.Богданова. – М.: Медицинская книга, 2011. – 268 с.
22. Волкова, Е.В. Роль сосудистых факторов роста в патогенезе плацентарной недостаточности / Е.В.Волкова, Ю.В.Копылова// Акушерство, гинекология и репродукция.- 2013.- №2- С.29-33.
23. Галина, Т.В. Преэклампсия: резервы улучшения исходов для матери и плода : дис. ...д-ра мед.наук / Т.В.Галина.- М., 2011.- 215с.

24. Гинекология : учебник / Б. И. Байсова и др. ; под ред. Г. М. Савельевой, В. Г. Бреусенко. - 4-е изд., перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. - 432 с.
25. Глотов, А.С. Генетический паспорт и современные методы ранней диагностики необходимые компоненты формирования здоровья: за и против / А.С.Глотов, В.С.Баранов // Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения.- 2012.- №2. - С.813-814.
26. Глотов, А.С. Молекулярно-генетическая диагностика предрасположенности к артериальной гипертензии / А.С.Глотов, Т.Э.Иващенко, Г.И.Образцова // Клинико-лабораторный консилиум.- 2008. - № 23.- С. 46-51.
27. Гоготадзе, И.Н. Ведение пациенток с аномальными маточными кровотечениями пубертатного периода в амбулаторных условиях (опыт ГКДЦ «Ювента») / И.Н.Гоготадзе, П.Н.Кротин, Т.Ю.Кожуховская // Педиатр.- 2015.- № 1.- С.54-61.
28. Гоготадзе, И.Н. Маточные кровотечения пубертатного периода: опыт ведения в условиях дневного стационара / И.Н.Гоготадзе, П.Н.Кротин // Фарматека.-2011.- №6.-С.42-48.
29. Гончаров, Н. П. Значение и роль методов определения гормонов в развитии эндокринологии как общебиологической науки / Н.П.Гончаров // Вестник Российской академии медицинских наук. -2012.- №3. – С.42-49.
30. Гончарова, С.В. Особенности периода новорожденности, физического и полового развития у девочек, имевших и не имевших задержку внутриутробного развития / С.В.Гончарова, Н.В.Башмакова, Г.Н.Чистякова //Репродуктивное здоровье детей и подростков. -2012.- № 4.- С.19-28.
31. Гончарова, С.В.Сравнительная характеристика состояния здоровья женщин, родивших девочек с задержкой внутриутробного развития и нормальной массой тела / С.В. Гончарова, Н.В. Башмакова // Уральский медицинский журнал. – 2012. - № 7. – С. 39-43.

32. Громова, О.А. Систематический анализ фундаментальных и клинических исследований, как обоснование необходимости совместного использования эстрогенсодержащих препаратов с препаратами магния и пиридоксина / О.А.Громова, О.А.Лиманова, И.Ю.Торшин // *Акушерство, гинекология и репродукция*. – 2013.- № 3.- С.35-50.
33. Гуркин, Ю.А. Гинекология подростков / Ю.А.Гуркин.- СПб.: Фолиант, 2000.- 345с.
34. Гуркин, Ю.А. Детская и подростковая гинекология / Ю.А.Гуркин.- СПб.: Медицинское информационное агентство, 2009.- 698с.
35. Гуркин, Ю.А. Концепция «перинатального следа в детской гинекологии» / Ю.А. Гуркин // *Буковинський вісник*. — 2001. — № 2. — С. 56–57.
36. Данькова, И.В. Особенности течения пубертата у девочек-подростков, родившихся с проявлениями задержки внутриутробного развития / И.В.Данькова, Н.В.Башмакова, Г.Н.Чистякова // *Репродуктивное здоровье детей и подростков*. -2013.- №1.- С.44-52.
37. Дедов, И.И. Половое развитие детей: норма и патология /И.И.Дедов, Т.В.Семичева, В.А.Петеркова. – М.: Медицина, 2002. – 232 с.
38. Демакова, Н.А. Молекулярно-генетические механизмы развития гиперпластических процессов эндометрия / Н.А.Демакова, О.Б.Алтухова, С.П.Пахомов и др.//*Научные ведомости Белгородского государственного университета*.- 2014.-№ 4.- С.177-182.- (Сер.Медицина. Фармация).
39. Дынник, В.А. Нарушения динамического равновесия в системе свертывания крови при аномальных маточных кровотечениях пубертатного периода /В.А.Дынник // *Научные ведомости Белгородского государственного университета*.- 2015.-№ 22. – С.73-80. (Сер. Медицина. Фармация).
40. Дынник, В.А. Характер гипоталамо-гипофизарно-гонадных взаимоотношений при различных клинических вариантах течения пубертатных маточных кровотечениях / В.А.Дынник, Т.Н.Сулима // *Акушерство и гинекология*.- 2013. - № 12.- С.102-107.

41. Жерновая, Н.А. Становление гипофизарно-гонадных отношений у девочек, родившихся доношенными с малой массой «тела» / Н.А.Жерновая // Акушерство и гинекология.-1990.- №6.- С.19-23.
42. Замалеева, Р.С. Состояние проблемы лечения и прогнозирования задержки развития плода / Р.С.Замалеева, Л.И.Мальцева, Н.А.Черепанова и др.//Практическая медицина.- 2016.- №1.- С.23-28.
43. Зернюк, А.Д. Анализ нарушений менструальной функции у девочек, страдающих декомпенсированной хронической экстрагенитальной патологией/А.Г.Зернюк,Г.Ф.Кутушева,Ю.И.Гуркин//Репродуктивное здоровье детей и подростков.- 2013. -№3. - С.59-60.
44. Зернюк, А.Д. Роль педагогов в формировании позитивного отношения подростков к здоровому образу жизни /А.Д.Зернюк, Г.Ф.Кутушева // Репродуктивное здоровье детей и подростков. — 2011. - №5. — С.66-72.
45. Зильбер, М.Ю. Состояние рецепторного аппарата эндометрия при острой плацентарной недостаточности в анамнезе / М.Ю.Зильбер, О.С.Гребнева, С.В.Цыганенко //Мать и дитя: мат. XIV Всерос. науч. форума. - М., 2013.- С. 69-70.
46. Иванова, О.Ю.Состояние вазорегулирующей функции эндотелия при преэклампсии / О.Ю.Иванова, М.Г.Газазян, Н.А.Пономарева //Мать и дитя: мат. XIV Всерос. науч. форума.- М., 2013.- С. 72-73.
47. Каде, А.Х. Физиологические функции сосудистого эндотелия / А.Х.Каде,С.А.Занин, Е.А.Губарева и др. // Фундаментальные исследования. — 2011. — № 11. — С. 611-617.
48. Калашникова, И.В. Патологически значимые факторы аномальных маточных кровотечений в пубертатном периоде / И.В.Калашникова, В.С.Орлова, О.К.Аджей // Научные ведомости Белгородского государственного университета.- 2011.- № 22. — С. 5-12.
49. Карева, Е.Н. Эстрогены и головной мозг / Е.Н.Карева, О.М.Олейникова, В.О.Панов //Вестник РАМН.- 2012.- № 2.- С.48-59.

50. Киреева, О.В. Биохимические маркеры эндотелиальной дисфункции и повреждения миокарда у новорожденных детей от матерей с преэклампсией / О.В.Киреева, И.М.Сутулина //Мать и дитя: мат. XIV Всерос. науч. форума. –М., 2013.- С.441-442.
51. Клевно, М.Е.Современные методы диагностики причин маточных кровотечений у пациенток репродуктивного возраста : дис. ...канд.мед.наук / М.Е.Клевно.- М., 2013.-179 с.
52. Клинышкова, Т.В. Клиническое значение комплексной оценки рецепторного статуса эндометрия при эндометриальных полипах / Т.В.Клинышкова, Н.Б.Фролова, С.И.Мозговой// Акушерство и гинекология. - 2011. -№3.-С.37-41.
53. Коколина ,В.Ф. Гинекология детского и подросткового возраста / В.Ф.Коколина.- М.: Медпрактика, 2006.- 670с.
54. Коколина, В.Ф. Состояние здоровья девочек и девушек-подростков в современных условиях / В.Ф.Коколина, М.Ю.Митин// Российский вестник акушера-гинеколога.-2005.- №3. – С.19-23.
55. Колмык, В.А. Клинико-иммуногистохимические аспекты восстановления репродуктивной функции женщин с хроническим эндометритом / В.Ф.Колмык, Р.А.Насыров, Г.Ф.Кутушева // Журнал акушерства и женских болезней.-2014. - № 4. - С.34-38.
56. Колмык, В.А. Преимущества иммуногистохимического метода в диагностике хронического эндометрита/ В.Ф.Колмык, Р.А.Насыров, Г.Ф.Кутушева //Педиатр.-2015.-№1.-С.11-15.
57. Крукиер, И.И. Плацентарная продукция простаглицлинов и тромбоксанов в динамике физиологической и осложненной беременности/ И. И. Крукиер// Российский вестник акушера-гинеколога. — 2008. — №3. — С. 9–11.
58. Крымшюкалова, З.С. К вопросу о курабельности синдрома задержки роста плода/ З. С. Крымшюкалова // Российский вестник акушера-гинеколога. — 2012. — №3. — С. 59–61.

59. Кузнецова, М.Н. Патология репродуктивной системы в период ее становления / М.Н.Кузнецова //Эндокринная гинекология /под ред. Е.М.Вихряевой.- М., 2002.- С.214-249.
60. Кутушева, Г.Ф. Особенности диагностики и лечения гинекологической патологии у девочек на этапе оказания скорой медицинской помощи / Г.Ф.Кутушева, А.В.Емельянова, А.А.Бойков // Журнал акушерства и женских болезней.- 2012.- № 4.- С.61-66.
61. Лысяк, Д.С. Роль плацентарных факторов ангиогенеза в формировании плацентарной недостаточности у беременных женщин с маточным кровотечением пубертатного периода в анамнезе / Д.С.Лысяк, Н.Н.Штель, Т.С.Быстрицкая и др.//Бюллетень физиологии и патологии дыхания.- 2013.- № 49.- С.92-96.
62. Львова ,Т.Ю. Формирование трубок сосудов эндотелиальными клетками линии EA.HY926 в присутствии секреторных продуктов ткани плацент / Т.Ю.Львова, О.И.Степанова, Е.А.Постолицына //Мать и дитя: мат. XIV Всеросс. науч. форума.- М., 2013.- С.111-112.
63. Макаренко, Л.В. Алиментарно-конституциональное ожирение как фактор риска формирования перинатальной патологии: дис. канд. мед. наук / Л.В.Макаренко.- Челябинск, 2007. -136 с.
64. Малевич, Ю. К. Фетоплацентарная недостаточность/ Ю. К. Малевич, В.А. Шостак. — Мн.: Беларусь, 2007. — 157 с.
65. Мальков, О.А. Взаимообусловленность дисфункции эндотелия и гемостаза у больных с шоком / О.А.Мальков,Т.Н.Юдакова, С.В.Максимишин и др. // Омский научный вестник.- 2013.- № 2.- С. 31-34.
66. Манушарова, Р.А. Руководство по гинекологической эндокринологии / Р.А.Манушарова, Э.И.Черкезова. - М.: МИА, 2011.- 496 с.
67. Машталова, А.А. Роль факторов роста и маркеров апоптоза в патогенезе маточных кровотечений пубертатного периода : автореф. дис. ...канд.мед.наук / А.А.Машталова.- СПб., 2012.- 24с.



68. Милованов, А.П. Внутриутробное развитие человека / А.П.Милованов.- М.: МИА, 2006.- 234с.
69. Неонатология.: национальное руководство / А.Г.Антонов, Н.Н.Арестова, Е.Н.Байбарина /под ред. Н.Н. Володина. - М., 2009.-1200с.
70. Осипова, Г.Т.Оптимизация подходов к лечению маточных кровотечений пубертатного периода в ургентной гинекологии : дис. ...канд.мед.наук /Г.Т.Осипова.- М., 2014.-115с.
71. Пономарева, Н.А.Использование маркеров иммунологической и эндотелиальной дисфункции в раннем прогнозе преэклампсии / Н.А.Пономарева, М.Г.Газазян, О.Ю.Иванова //Мать и дитя: мат. XIV Всерос. науч. форума. -М., 2013.- С..162-163.
72. Посисеева, Л.В. Плацентарные факторы мертворождаемости: возможности профилактики / Л.В.Посисеева, Л.П.Перетятко, Л.В.Кулида // Российский вестник акушера-гинеколога.- 2014.- № 5.- С.82-86.
73. Пуршаева, Э.Ш. Дефицит массы тела и репродуктивное здоровье женщин: взгляд на проблему / Э.Ш.Пуршаева, М.Б.Хамошина, Р.З. Омарова // Вестник РУДН. - 2011. - № 6. - С. 330-337.( Сер. Медицина. Акушерство и гинекология).
74. Пустотина, О.А. Разговор на языке будущего (стандарты репродуктивного образования: международный опыт) / О.А.Пустотина, М.Б.Хамошина // Status Praesens. - 2012. - № 4. - С. 16-19.
75. Робертон, Н.Р.К. Практическое руководство по неонатологии / Н.Р.К.Робертон. - М.: Медицина, 1998. – 516с.
76. Руководство по эндокринной гинекологии / под ред. Е. М. Вихляевой. — 3-е изд., доп. — М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2006. — 784 с.
77. Салий, М.Г. Медико-социальные аспекты гипоталамического синдрома периода полового созревания с нарушениями репродуктивной функции у девушек-подростков / М.Г.Салий, Л.В.Ткаченко, Н.В.Григорян // Мать и дитя: мат. XI Всероссийского форума. — М., 2010. — С. 497–498.

78. Сибирская, Е.В. Аномальное маточное кровотечение пубертатного периода - состояние гормонального фона / Е.В.Сибирская, Л.В.Адамян, С.П.Яцык //Вопросы современной педиатрии.- 2014.-№ 4.- С.136-139.

79. Сибирская, Е.В. Аномальные маточные кровотечения пубертатного периода: определение и тактика ведения (обзор литературы) / Е.В.Сибирская, Л.В.Адамян, О.Н.Логинова и др.//Проблемы репродукции .- 2015.-№ 5.- С.74-79.

80. Сибирская, Е.В. Маточное кровотечение пубертатного периода: медико-генетические аспекты клиники, диагностики, лечения и профилактики : автореф. дис. ...д-ра мед.наук/ Е.В.Сибирская.- М., 2011.- 45с.

81. Стандартные принципы обследования и лечения детей и подростков с гинекологическими заболеваниями и нарушениями полового развития /под ред. Е.В.Уваровой .-М.: «Триада-Х», 2008.-176 с.

82. Стрижаков, А.Н. Синдром задержки роста плода / А.Н.Стрижаков, И.В.Игнатко, Е.В.Тимохина и др.- М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012.- 120 с.

83. Сундетова, Р.А. Особенности ранней неонатальной адаптации доношенных и недоношенных новорожденных с задержкой внутриутробного развития: дис. канд. мед. наук / Р.А.Сундетова.-М., 2008. -112 с.

84. Таюкина, И.П.Экспрессия рецепторов стероидных гормонов и морфофункциональное состояние эндометрия у больных с аномальными маточными кровотечениями / И.П.Таюкина, Л.М.Мустафина, О.А.Тихоновская и др. // Бюллетень сибирской медицины.-2009.- №2. – С.50-56.

85. Ткаченко, Л.В. Усовершенствование подходов к лечению и реабилитации пациенток с маточными кровотечениями пубертатного периода / Л.В.Ткаченко, М.А.Яхонтова //Репродуктивное здоровье детей и подростков.-2012.- № 5.- С.25-32.

86. Уварова, Е.В. Пособие по обследованию состояния репродуктивной системы детей и подростков: для врачей педиатров, акушеров-гинекологов и урологов-андрологов / Е.В.Уварова. - М.: Триада-Х, 2009. – 232 с.

87. Уварова, Е.В. Аномальные маточные кровотечения пубертатного периода / Е.В.Уварова //Репродуктивное здоровье детей и подростков.- 2013.- № 3:.-С.73-87.

88. Хамошина, М.Б. Нейроэндокринные гинекологические синдромы: что могут комбинированные оральные контрацептивы? / М.Б.Хамошина, Е. О.Цапиева, Е.А.Зорина // Доктор. Ру. Гинекология. Эндокринология. - 2012. - № 7. - С. 49-54.

89. Хамошина, М.Б. Ювенильная гинекология : проблемы и перспективыXXI века / М.Б.Хамошина, М.Г.Лебедева, М.И.Вахабова и др.// Вестник репродуктивного здоровья.- 2011.- № 2.- С.30-34.

90. Храмова, И.А. Секреторно-синтетическая активность моноцитов/макрофагов и экспрессия рецепторов к половым гормонам в эндометрии/И.А.Храмова, Е.Е.Слюсарева,В.С.Каредина //Фундаментальные исследования.- 2014.- № 4.- С.181-185.

91. Хурасева, А. Б. Адаптация новорожденных и их развитие в первый год жизни в зависимости от массы тела при рождении / А.Б.Хурасева //Научные ведомости Белгородского государственного университета. – 2014.- № 4.- С.102-104.

92. Хурасева, А.Б. Маточные кровотечения пубертатного периода - проблемы и пути решения / А.Б.Хурасева // Репродуктивное здоровье детей и подростков.- 2015.- № 2.- С.84-88.

93. Хурасева, А.Б. Репродуктивное здоровье женщин, родившихся с полярными значениями массы тела: автореф. дис... д-ра мед. наук / А.Б.Хурасева. — Волгоград, 2010. — 46 с.

94. Чернуха, Г.Е.Современные представления о гиперплазии эндометрия/ Е.Г.Чернуха, М.Р.Думановская // Акушерство и гинекология. - 2013.- № 3.- С.26-32.
95. Щёктова, А.П. Эндотелиальная дисфункция и полиморфизм гена эндотелиальной синтазы оксида азота (NOS3) при хронических заболеваниях печени / А.П.Щекотова, А.В.Кривцов, И.А.Булатова и др.// Современные проблемы науки и образования: электронный журнал.- 2012.- №2.- URL: [www.siens-education.ru](http://www.siens-education.ru).
96. Ялфимова, Е.А. Медико-социальные факторы, оказывающие влияние на нарушение менструальной функции у девушек-подростков с избыточной массой тела /Е.А.Ялфимова,Г.Ф.Кутушева// Педиатр.-2015.-№1.- С.71-75.
97. Яхонтова, М.А. Этапная реабилитация гипоталамо-гипофизарно-яичниковой системы при маточных кровотечениях пубертатного периода : дис. ...канд.мед.наук / М.А.Яхонтова.- Волгоград, 2012 .-147с.
98. Alevizaki, M. Severity of cardiovascular disease in postmenopausal women: Associations with common estrogen receptor alpha polymorphic variants / M.Alevizaki, K.Saltiki, A.Cimponeriu et al. //European Journal of Endocrinology. - 2007.- Vol.156.- P.489–496.
99. Arnal, J.F. Estrogens receptors and endothelium / J.F.Arnal, C.Fontaine, A.Billon-Galés // Arteriosclerosis. Thrombosis and Vascular Biology. - 2010.- Vol. 30:.- P.1506–1512.
100. Asif, A.R. Polymorphism of the nos-3 Gene and the Endothelial Cell Response to Fluid Shear Stress - A Proteome Analysis / A.R.Asif, M.Oellerich, V.W.Armstrong //Journal of Proteome Research.- 2009.- Vol.8.-P. 3161–3168.
101. Bell, S. Contraception and mechanisms of endometrial bleeding / S.Bell.- In: D' C.Arcangues. Contraception and Mechanisms of Endometrial Bleeding. - Cambridge: Cambridge University Press, 1990.- P.188.

102. Burton, G.I. Regulation of vascular growth and function in the human placenta / G.I. Burton, D.S. Charnock-Jones, E. Jauniaux // *Reproduction*. -2009.- Vol. 138.- P.895-902.
103. Cao, Y. In vivo angiogenic activity and hypoxia induction of heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor / Y. Cao, P. Linden, D. Shima // *J. Clin. Invest.*- 1996.- Vol.98.-P.2507–2511.
104. Casablanca, Y. Management of dysfunctional uterine bleeding / Y. Casablanca // *Obstet. Gynecol. Clin. N. Am.*- 2008.- Vol.35, №2.- P.219-234.
105. Casey, M. Modulation of endometrial blood flow: regulation of endothelin-1 biosynthesis and degradation in human endometrium / M. Casey, U. MacDonald.- In: Alexander N, d’Arcangues C, editors. *Modulation of Endometrial Blood Flow: Regulation of Endothelin-1 Biosynthesis and Degradation in Human Endometrium*. - Washington, DC: AAAS Press, 1992.- 123p.
106. Chow, R.W. Minireview: rapid actions of sex steroids in the endothelium / R.W. Chow, D.J. Handelsman, M.K. Ng // *Endocrinology*. -2010.- Vol.151.- P.2411–2422.
107. Clapauch, R. Endothelial function and insulin resistance in early postmenopausal women with cardiovascular risk factors: importance of ESR1 and NOS3 polymorphisms / R. Clapauch, A.F. Mourão, A.S. Mecnas // *PLoS One*. - 2014.- Vol. 9.- P.34-44.
108. Cocks, T.M. Protease-activated receptors: sentries for inflammation? / T.M. Cocks, J.D. Moffatt // *Trends Pharmacol Sci.*- 2010.- Vol.21.-P.103–108.
109. Dellamea, B.S. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of diabetic nephropathy: a systematic review and meta-analysis / B.S. Dellamea, L.C. Pinto, C.B. Leitao et al. // *BMC Medical Genetics*. - 2014.- Vol.15.- P.9- 23.
110. Doshi, A.A. Promoter polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with reduced mRNA and protein expression in failing human myocardium / A.A. Doshi, M.T. Ziolo, H. Wang // *Journal of Cardiac Failure*. - 2010.- Vol. 16.-P. 314–319.

111. Entringer, S. Fetal Programming of Body Composition, Obesity, and Metabolic Function: The Role of Intrauterine Stress and Stress Biology/ S.Entringer, C. Buss, J.M.Swanson // *J. Nutr. Metab.*- 2012;.- Vol.34.-548.-632.
112. Erbs, S. Both T-786C and G894T polymorphism of endothelial nitric oxide synthase affect in-vitro endothelium-dependent relaxation of internal mammary artery rings from patients with coronary artery disease / S.Erbs, S.Möbius-Winkle,A. Linke // *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* -2006.- Vol.13.- P.826-831.
113. Forbes, K. Maternal growth factor regulation of placental development and fetal growth / K.Forbes, M.Westwood // *Journal of Endocrinology.*-2010.- Vol.207.- P. 1-16.
114. Forsythe, J.A.Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1 / J.A.Forsythe, B.H. Jiang, N.V.Yer // *Mol. Cell. Biol.*- 2013.- Vol.16.- P.4604–4613
115. Heldring, N. Estrogen Receptors: how Do They Signal and What Are Their Targets / N.Heldring, A.Pike, S.Andersson // *J. Physiol. Rev.* -2007.-Vol. 87.- P. 905-931.
116. Hoffmann, P.Role of EG-VEGF in human placentation: Physiological and pathological implications / P.Hoffmann,Y.Saoudi, M.Benharouga // *J. Cell. Mol. Med.*- 2009.- Vol. 13.- P.2224-2235.
117. Hrachovinová, III. Enteraction of P-selectin and PSGL-1 generates microparticles that correct hemostasis in a mouse model of hemophilia A / III.Hrachovinová // *Nat. Med.* — 2003. - Vol. 9. — P. 1020—1025.
118. Jacqueline, da C.E.P. Interaction between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms (-786T>C, 894G>T and intron 4 a/b) and cardiovascular risk factors in acute coronary syndromes / C.E.P. da Jacqueline// *Arch. Med. Res.*- 2012.- Vol.43,№ 3.- P.205–211.
119. Kahler, C. Nitric oxide donors / C. Kahler // *Eur. J. Obstet. Gynecol.* — 2004. — Vol. 115, №1. — P. 10–14.

120. Knowlton ,A.A.Estrogen and the cardiovascular system / A.A.Knowlton , A.R.Lee //Pharmacology & Therapeutics. -2012.- Vol.135.- P. 54–70.
121. Kowalski, T.W. New findings in e NOS gene and thalidomide embryopathy suggest pre-transcriptional effect variants as susceptibility factors./ T.W.Kowalski, L.R,Fraga, L.Tovo-Rodrigues et al.// Sci Rep.- 2016.- Vol. 23, №6.- P.234 - 304.
122. Kupferminc, M.J. Low molecular weight heparin treatment during subsequent pregnancies of women with inherited thrombophilia and previous severe pregnancy complications / M.J.Kupferminc, E. Rimon, A.J.Many // Matern. Fetal. Neonatal Med.- 2011.- Vol. 24.- P. 1042-1045.
123. Lanir, N. Haemostatic mechanisms in human placenta /N. Lanir, A. Aharon , B.Brenner // Best Pract. Res. Clin.Haematol. -2006.- Vol. 16.- P.183-195.
124. Levy, A.P. Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia / A.P.Levy, N.S.Levy, M.A.Goldberg // J. Biol. Chem. - 2014.- Vol.271.- P.2746–2753/
125. Li, Y.Y.Association of the 894G>T polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene with risk of venous thromboembolism in Chinese population / Y.Y.Li, Z.G.Zhai, Y.H.Yang et al.//Thromb. Res.- 2011.- Vol.127, №4.- P.324–327.
126. Lin, B.C.Stimulating the GPR30 estrogen receptor with a novel tamoxifen analogue activates SF-1 and promotes endometrial cell proliferation / B.C.Lin, M.Suzawa , R.D.Blind // Cancer Res. – 2009. – Vol. 69. – P. 5415–5423.
127. Lockwood C.J. Mechanisms of normal and abnormal endometrial bleeding / C.J.Lockwood //Menopause. -2011.- Vol.18.- P. 408-411.
128. Lockwood, C.J. Decidualized Human Endometrial Stromal Cells Mediate Hemostasis, Angiogenesis, and Abnormal Uterine Bleeding /C.J. Lockwood, Y.Nemerson, S.Guller //Reprod Sci. Feb .-2009.- Vol.16.- P. 162–170.

129. Lockwood, C.J. Progesterational regulation of human endometrial stromal cell tissue factor expression during decidualization / C.J. Lockwood, Y.Nemerson, S.Guller // *J Clin Endocrinol Metab.*- 1993.- Vol.76.- P.231–236.
130. Lockwood, C.J.A biological model for the regulation of peri-implantational hemostasis and menstruation / C.J.Lockwood, F.J.Schatz // *J. Soc. Gynecol .Investig.*- 2006.- Vol.3.- P.159–165.
131. Lowenstein, C.J.Nitric oxide: a physiologic messenger / C.J.Lowenstein, J.L.Dinerman, S.H.Snyder // *Annals of internal medicine.*- 1994 .- Vol.120.- P.227-237.
132. Maranhão, P.A. Endothelial function and insulin resistance in early postmenopausal women with cardiovascular risk factors: importance of ESR1 and NOS3 polymorphisms / P.A.Maranhão // *PLoS One.* -2014.- Vol. 9.- P.34-44.
133. Markee, J.E. Morphological basis for menstrual bleeding / J.E.Markee // *Bull. NY. Acad. Med.*- 1948;- Vol.24.- P.253–268.
134. Maruo, T.Effects of the progesterone on uterine leiomyoma growth and apoptosis / T.Maruo, H.Matsuo // *Steroids.* – 2010. – Vol. 65. – P. 585–592.
135. Masood ,D. Impact of Sex Hormone Metabolism on the Vascular Effects of Menopausal Hormone Therapy in Cardiovascular Disease / D.Masood ,E.C.Roach, K.G.Beauregard // *Current .Drug. Metabolism.*- 2010.-Vol. 11.- P. 693–714.
136. Maynard ,S.E.Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia /S.E. Maynard ,J.Y.Min, J.J.Merchan // *Clin. Invest.* -2003.- Vol.111.- P.649-658.
137. Merckx, M. Menstrual-like vaginal bleeding in prepubertal girls: an unexplained condition / M.Merckx, S.Weyers, R.Santegoeds et al.// *Facts Views Vis Obgyn.*- 2011.- Vol.3, № 4.- P. 170-267.
138. Molvarec, A.Association between estrogen receptor alpha (ESR1) gene polymorphisms and severe preeclampsia / A.L.Molvarec , A.Vér, A.Fekete // *Hypertens Res.*- 2007.- Vol.30.- P.205-211.



139. Momeni, A. Correlation of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism (GG, TT and GT Genotype) with proteinuria and retinopathy in type 2 diabetic patients./ A.Momeni, M.H.Chaleshtor, S.Saadatmand// J. Clin. Diagn. Res.- 2016.- Vol.10, №2.- P.32-35.
140. Monti, L.D. Pharmacogenetic influence of NOS3 gene variant on endothelial and glucose metabolism responses to L-arginine supplementation: Post hoc analysis of the L-arginine trial./ L.D.Monti, E.Galluccio, B.Fontana et al. //Metabolism.- 2015.- Vol.64,№11.- P.1582-1591.
141. Munro, M.G.The FIGO classification of causes of abnormal uterine bleeding (for the FIGO Working Group on Menstrual Disorders) / M.G.Munro, H.O.Critchley,I.S. Fraser // Int. J. Gynaecol. Obstet. - 2011. - Vol. 113. - P. 1 – 2.
142. Nakaki ,T. Physiological and clinical significance of NO (nitric oxide) - a review / T.Nakaki ,T. Keio // J.Med.-1994.- Vol.43.- P. 15-26.
143. Nasr, H.B. Functional G894T (rs1799983) polymorphism and intron-4 VNTR variant of nitric oxide synthase(NOS3) gene are susceptibility biomarkers of obesity among Tunisians./ H.B.Nasr, S.Dimassi, R.M'hadhbi et al.// Obes. Res. Clin. Pract. -2015.- Vol.5. – P.1871-1903.
144. Nofer, J.R. Estrogens and atherosclerosis: insights from animal models and cell systems / J.R.Nofer //Journal of Molecular Endocrinology.- 2012 .- Vol.48.- P.13–29.
145. Nowak, D.Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Splicing from Pro-angiogenic to Anti-angiogenic Isoforms / D.Nowak, E.Amin, E.Rennel // J. Biol. Chemistry. - 2010. - Vol. 285, N 8. - P. 5532 - 5540.
146. Oh, N.J. Expression of endothelial nitric oxide synthase in the uterus of patients with leiomyoma or adenomyosis / N.J.Oh, K.Y.Ryu, C.N.Jung //Obstet Gynaecol Res.- 2013.- Vol.39.- P. 536-542.
147. Ozsoy, A.Z.The Evaluation of IL6 and ESR1 Gene Polymorphisms in Primary Dysmenorrhea/ A.Z. Ozsoy, N.H.Karakus, S.G.Yigit //Immunol Invest.- 2016.- Vol.45.- P.75-86.

148. Pakarinen, P. The effect of intrauterine and oral levonorgestrel administration on serum concentrations of sex hormone-binding globulin, insulin and insulin-like growth factor binding protein-1 / P.Pakarinen, P.Lähteenmäki, E.M. Rutanen // *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.* – 2009. – Vol. 78, № 5. – P. 423–428.
149. Pijnenborg, R. The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversie / R.Pijnenborg, L.Vercruyse, M.Hanssens // *Placenta.* -2006.- Vol.27.- P.939–958.
150. Poggi, C. Genetic contributions to the development of complications in preterm newborns./ C.Poggi, B.Giusti, E.Gozzini et al.// *PLoS One.*- 2015.- Vol.10, №7.- P.131- 1741.
151. Redman, C.W. Latest advances in understanding preeclampsia / C.W.Redman, J.L. Sargent // *Science.* -2005.- Vol.308.- P.1592-1594.
152. Rey, E. Dalteparin for the prevention of recurrence of placenta-mediated complications of pregnancy in women without thrombophilia: a pilot randomized controlled trial / E.Rey, P.J.Garneau // *Thromb. Haemost.* -2009.- Vol.9.- P. 58-64.
153. Rubel, C.A. Epithelial-stromal interaction and progesterone receptors in the mouse uterus / C.A.Rubel, J.W.Jeong // *Semin Reprod Med.* -2010.- Vol.28.- P.627-635.
154. Saleh, A. Angiogenesis related genes NOS3, CD14, MMP3 and IL4R are associated to VEGF gene expression and circulating levels in healthy adults./ A.Saleh, M.G.Stathopoulou et al.// *BMC Med. Genet.*- 2015.- Vol.5.- P.16 - 90.
155. Seckin, S. 786T/c endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and coronary collateral circulation / S.Seckin, B.Emrah, I.Biyik // *Hig. Med. Dosw.*- 2016.- Vol.11, №70.- P.80-85.
156. Shen, C. Association between the polymorphism of estrogen receptor  $\alpha$  and coronary artery disease in a Chinese population / C.Shen J.Chen S.Fan // *European Journal of Internal Medicine.*- 2012.- Vol. 23.- P.175–178.

157. Śladowska-Kozłowska, J. Associations of the NOS3 G894T gene polymorphism with target organ damage in children with newly diagnosed primary hypertension./ J.Śladowska-Kozłowska, M.Litwin, A.Niemirska et al.// *Pediatr Nephrol.*-2015.- Vol.30, №12.- P.2189-2197.
158. Sljivic, S.Possible interactions of genetic and immuno-neuro-endocrine regulatory mechanisms in pathogenesis of congenital anomalies / S.Sljivic , B.Kamenov, S.Maglajlic // *Med Hypotheses.*- 2006.- Vol.67.- P.57-64.
159. Sung, J.H.Association between NOS3 polymorphisms and risk of coronary artery disease in a Korean population: a meta-analysis./J.H.Sung, B.E.Lee, J.O.Kim et al.// *Genet. Mol. Res.*- 2015.- Vol.9.- № 4.- P.16508-16520.
160. Tabanelli, S. In vitro decidualization of human endometrial stromal cells / S.Tabanelli, B. Tang , E.S.Gurpide // *J. Steroid. Biochem. Mol Biol.* -2004.- Vol.118.- P.652–670.
161. Tikvica, A. Nitric oxide synthesis in placenta is increased in intrauterine growth restriction and fetal hypoxia / A. Tikvica // *Coll An-tropol.* — 2008. — Vol. 32, №2. — P. 565–570.
162. Tong, Y. A tailed primers protocol to identify the association of NOS3 gene variable number of tandem repeats polymorphism with ischemic stroke in Chinese Han population by capillary electrophoresis / Y.Tong, X.Yin, Z.Wang et al. // *Genecolog.*- 2013.- Vol.517, № 2.- P.218–223.
163. Wrzosek, M. Impact of obesity and nitric oxide synthase gene G894T polymorphism on essential hypertension./ M.Wrzosek, M.Sokal, A.Sawicka et al. // *J. Physiol. Pharmacol.* -2015.- Vol.66, №5.- P.681-689.