

На правах рукописи

ГАНБАРЛИ

Нигяр Фуадовна

**РОЛЬ КИССПЕПТИНА КАК ЭНДОГЕННОГО БИОРЕГУЛЯТОРА
В ПАТОГЕНЕЗЕ НАРУЖНОГО ГЕНИТАЛЬНОГО ЭНДОМЕТРИОЗА
И "КЛАССИЧЕСКОГО ФЕНОТИПА"
СИНДРОМА ПОЛИКИСТОЗНЫХ ЯИЧНИКОВ**

14.01.01 – акушерство и гинекология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург – 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении "Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта"

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор РАН **Яролинская Мария Игоревна**

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор
ГБУЗ МО "Московский областной
научно-исследовательский институт
акушерства и гинекологии",
руководитель отделения
эндоскопической хирургии

Попов Александр Анатольевич

доктор медицинских наук, профессор
ФГБОУ ВО "Санкт-петербургский
государственный педиатрический
медицинский университет" МЗ РФ,
профессор кафедры акушерства и
гинекологии с курсом гинекологии
детского возраста

Гайдуков Сергей Николаевич

Ведущая организация: ФГБВОУ ВО "Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова" Министерства обороны Российской Федерации

Защита диссертации состоится "___" _____ 2018 г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета Д 001.021.01 при ФГБНУ "Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта" (199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, дом 3).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ "Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта" и на сайте: <http://ott.ru/all-news/dissert/zawita-dissertacii-ganbarli-niyar-fuadovna/>

Автореферат разослан "___" _____ 2018 г.

**Ученый секретарь
диссертационного совета**
доктор медицинских наук

Кузьминых Татьяна Ульяновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Кисспептин был открыт в 1996 году в штате Пенсильвания (J. Lee et al., 1996). Ген *KISS1* кодирует белок, содержащий 145 аминокислот и несколько биологически активных пептидных фрагментов, которые называются кисспептин (M. Kotani et al., 2001). Впоследствии *KISS1* был идентифицирован как эндогенный лиганд для G протеин-рецептора-54 (GPR54) или *KISS1R*, который экспрессируется на уровне нейронов ГнРГ (I. Parhar et al., 2004). Показано, что взаимодействие кисспептина и его клеточного рецептора GPR-54 в мозге является определяющим фактором в активации нейронов, высвобождающих ГнРГ, который, в свою очередь, управляет секрецией лютеинизирующего (ЛГ) и фолликулостимулирующего (ФСГ) гормонов, вызывающих овуляцию. Определено, что нарушения взаимодействия кисспептина и его рецептора приводят к ановуляции (J.T. Smith, 2013).

В Великобритании были проведены исследования, которые доказали, что белок кисспептин оказывает положительное воздействие на яйцеклетку (в 2013 году родился первый ребенок от матери с гипогонадотропной недостаточностью яичников, которая получала кисспептин) и делает актуальным его применение в программах ЭКО.

Нормогонадотропной недостаточностью яичников определяются формы заболевания, при которых базальный уровень гонадотропинов в крови не выходит за пределы физиологических колебаний у здоровых женщин (для ЛГ 3-15 МЕ/л, для ФСГ 1,5-10 МЕ/л) (Э.К. Айламазян, 2007; 2014). Нормогонадотропная ановуляция выявляется у каждой третьей больной с ановуляцией. До настоящего времени отсутствуют четкие представления о механизмах развития и нозологической характеристике нормогонадотропной недостаточности яичников. Существуют различные варианты нормогонадотропной недостаточности яичников, такие как наружный генитальный эндометриоз (НГЭ), синдром поликистозных яичников (СПКЯ) и другие (Э.К. Айламазян, 2007; 2014).

Классический фенотип СПКЯ включает ановуляцию, нарушения менструального цикла, чаще всего по типу опсоменореи, андрогензависимую дерматопатию (гирсутизм, *acne vulgaris*, себорею, диффузную алопецию) и УЗ-признаки увеличенных в размерах яичников с характерным строением, а также бесплодие. У женщин с ановуляторным бесплодием СПКЯ диагностируется в 55-91% случаев (Л.В. Адамян и др., 2006; L. Pal, 2014).

Наружный генитальный эндометриоз (НГЭ) широко распространенное, хроническое, прогрессирующее и рецидивирующее заболевание среди женщин репродуктивного возраста. Известно, что при НГЭ в 40-82% случаев нарушается фолликулогенез и стероидогенез в яичниках (Э.К. Айламазян, 2007; 2014). Природа ановуляции при НГЭ неясна.

Несомненно, что кисспептин имеет множество разнообразных функций. Следует отметить, что первоначально белок кисспептин или метастин, который кодируется геном *KISS1*, был известен как ген, супрессирующий метастазирование меланомы. Эндометриоз имеет много сходных черт с опухолевым процессом, характеризуется избыточной пролиферацией, неоангиогенезом, сниженным апоптозом, обладает способностью к инфильтрирующему росту с проникновением в окружающие ткани и деструкцией последних и возможностью метастазирования (М.И. Ярмолинская, Э.К. Айламазян, 2017). Несмотря на многочисленные исследования, патогенез этого многоликого заболевания еще не до конца изучен. Определено, что экспрессия кисспептина отсутствует или незначительна при метастазирующей меланоме по сравнению с неметастазирующими вариантами (J. Lee et al., 1996). Известно, что экспрессия гена *KISS1* подавляет активность матриксных металлопротеиназ (ММП), что может рассматриваться как один из механизмов подавления метастазов опухолей (M. Bilban et al., 2004). Способность кисспептинов подавлять транскрипцию ММП9 во многом обуславливает его антиметастические свойства. Известно, что транскрипция ММП9 регулируется AP-1, Sp1 и рядом других транскрипционных факторов, в том числе NFκB (нуклеарным фактором каппа-би), через который кисспептины регулируют синтез ММП9 (C. Qiao et al., 2005).

Некоторые исследователи утверждают, что кисспептины не оказывают действия на пролиферацию и апоптоз, зато существенно влияют на миграционную способность и инвазивность клеток. Тем не менее, имеются данные, что трансформация геном *KISS1* клеток карциномы молочной железы (MDA-MB-231) приводила к повышению количества клеток, вступающих в апоптоз, более чем на 15% (G. Song, 2013).

Определение кисспептина и его рецептора GPR-54 при проведении иммуногистохимических (ИГХ) исследований биопсийных образцов опухолей помогают прогнозировать положительный исход заболевания раком яичников (T. Ohtaki et al., 2001). Yu L. и соавт. (2017) при ИГХ исследовании образцов ткани эпителиального рака яичников определили, что уровень экспрессии *KISS1* был

значительно ниже, чем при доброкачественных заболеваниях яичников (L. Yu et al., 2017). Имеются данные о том, что отсутствие или снижение экспрессии KISS1 в различных типах опухолей повышает темпы их прогрессирования, метастатический потенциал и снижает прогноз выживания больных. Так, в одном из исследований, KISS1-трансфекция привела к снижению инвазии и миграции клеток карцином эндометрия. В своей работе Kang H. и соавт. продемонстрировали эпигенетическую регуляцию экспрессии KISS1R при раке эндометрия и роль KISS1 в ингибировании метастазирования при раке эндометрия (H. Kang et al., 2011).

Роль кисспептина в особенностях регуляции гонадотропной функции при НГЭ и СПКЯ, а также в процессах инвазии и распространенности эндометриоза в настоящее время остается практически неизученной. Поэтому изучение влияния кисспептина на уровни половых стероидных гормонов при нормогонадотропной овариальной недостаточности, а также в прогрессии или регрессии эндометриозных гетеротопий, является важным и перспективным.

Цель исследования: Определить роль кисспептина в патогенезе наружного генитального эндометриоза и "классического фенотипа" синдрома поликистозных яичников.

Задачи исследования:

1. Определить уровень кисспептина в сыворотке крови у здоровых женщин репродуктивного возраста на 2 и 8 дни менструального цикла.
2. Изучить уровень кисспептина на 2 и 8 дни менструального цикла в сыворотке крови больных с НГЭ I-II степени.
3. Определить уровень кисспептина на 2 и 8 дни менструального цикла в сыворотке крови больных с "классическим фенотипом" синдрома поликистозных яичников.
4. Сопоставить уровень кисспептина в сыворотке крови с содержанием гонадотропинов (ФСГ, ЛГ), пролактина, АМГ, эстрадиола, эстрогена, андрогенов (свободного тестостерона, дегидроэпиандростерона-сульфата (ДГЭА-С)) у здоровых женщин, а также у больных НГЭ и с "классическим фенотипом" СПКЯ.
5. Провести гистологическое исследование и оценить иммуногистохимическим методом экспрессию кисспептина и его рецептора KISS1R в эндометрии, эндометриозных гетеротопиях, биоптатах яичников женщин с НГЭ, в эндометрии и

биоптатах яичников у женщин с СПКЯ, а также в эндометрии, биоптатах яичников и брюшины в контрольной группе.

6. Оценить уровень экспрессии генов *KISS1* и *KISS1R* в эндометрии у больных с НГЭ, СПКЯ и в контрольной группе, а также в эндометриоидных гетеротопиях.

7. Изучить два наиболее частых полиморфных варианта промоторной области гена *KISS1*: rs5780218 (с.-145delT), rs3924587 (с.-89G>A), и три наиболее частых полиморфных варианта промоторной области гена *KISS1R*: rs3810424 (с.-318C>T), rs3810423 (с.-123C>T); с.24A>G у больных НГЭ, СПКЯ и в контрольной группе.

8. Провести корреляционный многофакторный сравнительный анализ содержания кисспептина в периферической крови с его экспрессией в эндометриоидных гетеротопиях, биоптатах яичников женщин с НГЭ, в эндометрии и биоптатах яичников у женщин с СПКЯ, а также в эндометрии, биоптатах яичников и брюшины в контрольной группе.

Научная новизна и теоретическая значимость работы. Впервые проведено определение уровня кисспептина на второй и восьмой дни менструального цикла в периферической крови у здоровых женщин, а также у больных с НГЭ I-II степени по классификации R-AFS и у пациенток с "классическим фенотипом" СПКЯ. Установлено, что уровень кисспептина в сыворотке крови на 2 и 8 дни менструального цикла у больных НГЭ достоверно выше по сравнению со значениями у здоровых женщин.

При обследовании больных с "классическим фенотипом" СПКЯ впервые показано, что содержание кисспептина на 2 и 8 дни менструального цикла положительно коррелирует с уровнем ЛГ. Впервые установлена достоверная прямая корреляционная связь уровня кисспептина у женщин с "классическим фенотипом" СПКЯ с уровнем свободного тестостерона и дегидроэпиандростерона-сульфата. Впервые проведен сравнительный корреляционный анализ уровня кисспептина в периферической крови у больных НГЭ, имеющих нормогонадотропную ановуляцию, и с "классическим фенотипом" СПКЯ.

При иммуногистохимическом исследовании впервые выявлено, что у пациенток с НГЭ относительная площадь экспрессии *KISS1* и рецептора *KISS1R* в эндометрии в секреторную фазу менструального цикла была достоверно ниже при сопоставлении со значениями группы контроля. В очагах эндометриоидных гетеротопий отмечалось достоверное повышение экспрессии белка *KISS1* и рецептора *KISS1R* по сравнению с

фрагментами интактной брюшины. Впервые установлено, что наиболее информативным показателем являлась относительная площадь экспрессии рецептора *KISS1R* в эндометриоидных гетеротопиях, которая достоверно превышала его значения как в эндометрии больных НГЭ, так и в эндометрии женщин контрольной группы.

При СПКЯ впервые определено, что относительная площадь экспрессии в эндометрии и в биоптатах яичников *KISS1* и *KISS1R* была достоверно выше при сопоставлении с группой контроля и с больными НГЭ, что может быть связано с высокой частотой гиперплазии эндометрия и мультифолликулярным строением яичников.

Впервые представлен корреляционный многофакторный сравнительный анализ содержания кисспептина в периферической крови с экспрессией *KISS1* и *KISS1R* в эндометрии, эндометриоидных гетеротопиях, биоптатах яичников у больных НГЭ, а также в интактной брюшине у женщин контрольной группы и в эндометрии, биоптатах яичников у больных СПКЯ.

У пациенток контрольной группы впервые определено, что уровень кисспептина на 8 день менструального цикла в периферической крови достоверно коррелирует с площадью экспрессии рецептора *KISS1R* в интактной брюшине. У больных НГЭ выявлена прямая корреляционная зависимость между площадью экспрессии белка *KISS1* в эндометрии с уровнем кисспептина на 8 день менструального цикла в периферической крови. Впервые установлено, что уровень кисспептина на 2 день менструального цикла в периферической крови достоверно коррелирует с площадью экспрессии рецептора *KISS1R* в эндометриоидной гетеротопии.

Впервые определено, что частота выявления минорного аллеля -145delT гена *KISS1* у больных НГЭ достоверно выше, чем у пациенток с СПКЯ и в контрольной группе. Частота генотипа 24G/G гена *KISS1R* у больных НГЭ составила 3,8%, у больных СПКЯ и в контрольной группе данный генотип обнаружен не был. У больных НГЭ I-II степени в эндометриоидных гетеротопиях впервые были установлены низкий, средний и высокий уровни экспрессии гена *KISS1R*.

Практическая значимость. Впервые определены значения кисспептина в периферической крови на 2 и 8 дни менструального цикла у здоровых женщин, что является базовыми референсными значениями для сравнения с уровнем кисспептина у больных с различными заболеваниями. Выявленное в процессе диссертационного исследования достоверное повышение уровня кисспептина в периферической крови у больных НГЭ I-II степени может рассматриваться в качестве биомаркера для неинвазивной диагностики заболевания.

На основании проведенной работы впервые установлено, что наиболее информативным для изучения экспрессии *KISS1* и *KISS1R* в эндометрии, эндометриоидных гетеротопиях, в биоптатах яичников и интактной брюшины, является определение относительной площади экспрессии по сравнению с оптической плотностью и средней яркостью. Для выявления группы риска развития НГЭ впервые обоснована целесообразность определения полиморфизмов генов *KISS1* и *KISS1R* в периферической крови. Носительство минорного аллеля -145delT гена *KISS1* и генотипа 24G/G гена *KISS1R* может свидетельствовать о диагнозе НГЭ.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. НГЭ I-II степени распространенности по классификации R-AFS в раннюю и среднюю пролиферативную фазы менструального цикла характеризуется достоверным повышением в сыворотке крови уровня кисспептина, гиперэстрогемией, повышением коэффициента активности ароматазы овариальных фолликулов и тенденцией к повышению уровня пролактина по сравнению с группой контроля.

2. Повышение уровня кисспептина в периферической крови у больных НГЭ I-II степени, а также повышение экспрессии в эндометриоидных гетеротопиях *KISS1* и особенно его рецептора *KISS1R*, являются компенсаторно-приспособительными реакциями, направленными на "сдерживание" дальнейшего распространения эндометриоза при начальных стадиях заболевания. Установлена достоверная корреляция между уровнем кисспептина на 2 день менструального цикла в периферической крови и площадью экспрессии рецептора *KISS1R* в эндометриоидной гетеротопии.

3. Распределение частот аллелей и генотипов для полиморфизма -145delT гена *KISS1* и генотипа 24G/G гена *KISS1R* у больных НГЭ достоверно отличается от больных СПКЯ и в контрольной группе. У больных НГЭ I-II степени в эндометриоидных гетеротопиях было установлено 3 уровня экспрессии гена *KISS1R* (низкий, средний и высокий), что подчеркивает полиморфность заболевания и необходимость индивидуального подхода при выборе терапии.

4. У больных с "классическим фенотипом" синдрома поликистозных яичников на 2 и 8 дни менструального цикла отмечена положительная корреляция уровня кисспептина с уровнем ЛГ, свободного тестостерона и ДГЭА-С, а также достоверное снижение коэффициента активности овариальных фолликулов по сравнению с НГЭ и контрольной группой. При СПКЯ относительная площадь экспрессии в эндометрии и в биоптатах

яичников KISS1 и KISS1R была достоверно выше при сопоставлении с группой контроля и с больными НГЭ, что может быть связано с высокой частотой гиперплазии эндометрия и мультифолликулярным строением яичников.

Апробация и внедрение результатов работы в практику. Материалы диссертационной работы доложены на 8 Международном научном конгрессе "Оперативная гинекология – новые технологии", Санкт-Петербург, 2016; IV Национальном конгрессе "Дискуссионные вопросы современного акушерства", Санкт-Петербург, 2017; на Международной конференции "Репродуктивная медицина: взгляд молодых – 2017", Санкт-Петербург, 2017; II Всероссийской конференции с международным участием "Репродуктивное здоровье женщин и мужчин", Москва, 2017; XIII Междисциплинарной научно-практической конференции "Актуальные вопросы урологии и гинекологии (инфекции, доброкачественные и злокачественные новообразования)", Санкт-Петербург, 2017; IV Всемирном конгрессе по эндометриозу, Флоренция (Италия), 2018.

Разработанные методы обследования внедрены в учебный процесс кафедры и клиники акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО "Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова" Минздрава России, в работу гинекологического отделения СПб ГБУЗ "Городская больница № 26".

По теме диссертационной работы опубликовано 11 печатных работ, в том числе 3 – в рецензируемых научных журналах, включенных в перечень изданий, рекомендованных ВАК РФ.

Личный вклад автора в исследование. Автор лично осуществлял ведение пациенток с НГЭ, СПКЯ, участвовал в лапароскопических операциях, собирал биологический материал для лабораторных исследований. Статистическая обработка и интерпретация полученных результатов, сопоставление с данными, полученными отечественными и зарубежными учеными, формулировка теоретических выводов и разработка практических рекомендаций, подготовка материалов диссертационного исследования к публикации проведены автором самостоятельно.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 133 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, клинической характеристики обследованных групп, результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 15 отечественных и 153 иностранных источников. Работа иллюстрирована 13 таблицами и 34 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Работа выполнена в отделении гинекологической эндокринологии отдела эндокринологии репродукции (руководитель отдела – д.м.н., проф. РАН М.И. Ярмолинская) и в гинекологическом отделении с операционным блоком (руководитель отделения – д.м.н. Э.Н. Попов) ФГБНУ "Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта".

Критериями включения в первую группу явился наружный генитальный эндометриоз (НГЭ) I-II степени по пересмотренной классификации Американского общества фертильности (R-AFS), выявленный на основании лапароскопии и подтвержденный результатами гистологического исследования, возраст от 18 до 39 лет. В исследование были включены 38 пациенток с НГЭ. Вторую группу составили 16 больных с "классическим фенотипом" синдрома поликистозных яичников (СПКЯ) (ановуляция, клинические или биохимические признаки гиперандрогении (acne vulgaris, диффузная аллопеция, себорея, гирсутизм, гиперандрогенемия), ультразвуковые признаки мультифолликулярных яичников), подтвержденного на основании результатов гормонального обследования, лапароскопии и гистологического исследования. В контрольную группу вошли 11 здоровых женщин, у которых на основании лапароскопического обследования перед проведением протокола ЭКО не было выявлено гинекологической патологии. Критериями исключения во всех группах явились экстрагенитальный эндометриоз, НГЭ III-IV степени по классификации R-AFS, миома матки, аденомиоз, сочетание НГЭ и СПКЯ, наличие тяжелой сопутствующей соматической патологии (онкологические заболевания, сахарный диабет), прием гормональных препаратов на момент включения в исследование или в течение 2 месяцев до него, гипер- или гипогонадотропная недостаточность яичников, беременность на момент исследования.

Определение в сыворотке крови на 2 и 8 дни менструального цикла уровней киспептина, фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), лютеинизирующего гормона (ЛГ), пролактина, антимюллерова гормона (АМГ), эстрадиола, эстрогена, андрогенов (свободного тестостерона, дегидроэпиандростерона-сульфата (ДГЭА-С)) проводилось иммуноферментным методом (ИФА) с помощью стандартных наборов. Содержание прогестерона определяли с помощью иммуноферментного метода с

усиленной хемилюминесценцией на анализаторе Access2 фирмы "Beckman Coulter" (США) (зав. лабораторией эндокринологии – к.б.н. Н.Н. Ткаченко).

Гистологическое исследование эндометрия, эндометриоидных гетеротопий, расположенных на брюшине, фрагментов яичников, а также фрагментов интактной брюшины в контрольной группе выполнены по стандартной методике. Получение материала для гистологического исследования осуществляли во время выполнения операционной лапароскопии. Операционный материал фиксировали в 10% нейтральном формалине (рН 7.2), обезживали с помощью автоматической станции Leica TP1020 и заливали в парафин согласно стандартной гистологической схеме. Из полученных блоков готовили срезы 3-5 мкм. Для обзорной окраски использовали гематоксилин и эозин.

Иммуногистохимическое исследование проводили на парафиновых срезах толщиной 5 мкм, которые помещали на предметные стекла, покрытые пленкой из поли-L-лизина (Sigma, Япония). В качестве системы визуализации использовали Dako Cytomation LSAB2 System-HRP (Dako, Дания). Для проведения иммуногистохимической реакции использовали стандартный одноэтапный протокол с демаскировкой антигена (высокотемпературной обработкой ткани) в 0,01 М цитратном буфере рН 7.6. Оценка иммуногистохимическим методом экспрессии киспептина и его рецептора KISS1R в ткани яичников, эндометриоидных гетеротопиях и в эндометрии у больных с НГЭ, а также в ткани яичников, в эндометрии у больных с "классическим фенотипом" СПКЯ, в интактной брюшине и в эндометрии у женщин контрольной группы выполнялась с использованием первичных моноклональных мышинных антител к KISS [клон ab 55384] производства Abscam в стандартном разведении 1:100. Для определения KISS1R [клон ab 140839] использовали поликлональные кроличьи антитела производства Abscam в стандартном разведении 1:200. Для иммунофлуоресцентного исследования с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа проводили инкубацию срезов с вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромом Alexa Fluor 647 (1:1000, Abscam, Великобритания), во влажной камере в течение 30 мин. при комнатной температуре. Ядра клеток докрашивали Hoechst 33258 (Sigma, США). Готовые препараты заключали под покровные стекла в монтирующую среду Dako Fluorescent Mounting Medium (Dako, США). Визуализацию образцов осуществляли с помощью конфокального микроскопа FluoView 1000 (Olympus, Япония) при увеличении $\times 200$.

Количественную оценку результатов иммуногистохимической реакции проводили на микрофотографиях, полученных с помощью системы фиксации микроскопических изображений, состоящей из микроскопа Olympus BX46 и программного обеспечения "CellSens 47 Entry" Nikon Eclipse E400. Из фотосъемки исключались поля зрения, содержащие дефекты ткани, дефекты окрашивания и артефакты. Фотосъемку производили на увеличении $\times 400$. Долю занимаемой экспрессии изучаемого маркера рассчитывали с помощью программы ВидеоТест-Морфология 5.0 (ВИДЕОТЕСТ, Россия).

В каждом срезе в 5 полях зрения оценивали следующие показатели:

– оптическую плотность экспрессии – величина вычислялась автоматически в соответствии с законом Бугера-Ламберта-Бера; использование показателя, так называемой "оптической плотности экспрессии", являющегося базовым параметром программы для анализа оптических параметров микрофотографий, является приемлемым, поскольку, измерения осуществляются по аналогии со спектрофотометрическим анализом;

– относительная площадь экспрессии – вычисляли как отношение площади иммунопозитивных клеток к общей площади препарата. После чего вычислялись средние величины исследуемых показателей (руководитель отдела патоморфологии – з.д.н. РФ, д.м.н. проф. И.М. Кветной).

Генетическое исследование выполнено в лаборатории пренатальной диагностики врождённых и наследственных болезней ФГБНУ "НИИ АГиР им. Д.О. Отта" (руководитель лаборатории – чл.-корр. РАН, д.м.н., проф., з.д.н. РФ, главный внештатный специалист МЗ по СЗФО РФ и КЗ СПб по медицинской генетике В.С. Баранов). Геномную ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови стандартным методом (Sambrook et al., 1989). Полиморфизм промоторной области гена *KISS1*: rs5780218 (с.-145delT), rs3924587 (с.-89G>A), и три наиболее частых полиморфных варианта промоторной области гена *KISS1R*: rs3810424 (с.-318C>T), rs3810423 (с.-123C>T); с.24A>G у больных НГЭ, СПКЯ и в контрольной группе изучали методом ПЦР-ПДРФ анализа.

Изучение экспрессии генов *KISS1* и *KISS1R* выполняли методом полимеразной цепной реакции (**ПЦР**) в реальном времени в эндометриоидных гетеротопиях и эндометрии у пациенток с НГЭ и в эндометрии женщин СПКЯ.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием стандартных пакетов статистического анализа (STATGRAPHICS

v.6.0). Методы дескриптивной статистики включали в себя оценку среднего арифметического (M), средней ошибки среднего значения (m) для признаков, имеющих непрерывное распределение, а также частоты встречаемости признаков с дискретными значениями.

Для оценки межгрупповых различий применяли t-критерий Стьюдента и коэффициент корреляции Спирмена с соблюдением рекомендаций для медицинских и биологических исследований. Критическое значение уровня значимости (p) для проверки нулевых гипотез принимали $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клиническая характеристика больных НГЭ, с "классическим фенотипом" СПКЯ и контрольной группы

В исследование были включены 38 больных с НГЭ, из них I степень НГЭ была обнаружена у 18 (47%) больных, II степень – у 20 (53%). Средний возраст пациенток с НГЭ составил $32,5 \pm 6,5$ года. У всех больных с НГЭ отмечено бесплодие. Длительность бесплодия среди обследованных пациенток с НГЭ составила от 1 до 15 лет (в среднем $6,9 \pm 2,4$ лет). Соотношение первичного бесплодия к вторичному составило 1:1. Индекс массы тела (**ИМТ**) у всех больных с НГЭ находился в пределах нормы и в среднем составил $22,9 \pm 1,6$.

У 16 больных с "классическим фенотипом" СПКЯ средний возраст составил $32,5 \pm 7,5$ лет. У 37,5% пациенток с СПКЯ ИМТ находился в пределах нормы $22,7 \pm 1,7$, у большинства пациенток (62,5%) отмечался избыток массы тела, ИМТ составил $26,2 \pm 1,4$. У всех больных с СПКЯ отмечено бесплодие. Длительность бесплодия среди обследованных пациенток СПКЯ составила от 1 года до 10 лет (в среднем $5,3 \pm 3,4$ года). Соотношение первичного бесплодия ко вторичному составило 2:1. В контрольной группе средний возраст женщин составил $34,1 \pm 4,9$ года. Индекс массы тела (**ИМТ**) у всех пациенток находился в пределах нормы и в среднем составил $21,4 \pm 1,9$.

Результаты гормонального обследования

На основании результатов гормонального обследования на 2 и 8 дни менструального цикла у больных НГЭ I-II степени выявлено, что уровень кисспептина, пролактина, эстрадиола и эстрогена, а также ароматазная активность овариальных фолликулов достоверно выше по сравнению с уровнем в контрольной

группе (таблица 1). Уровень АМГ у больных НГЭ был достоверно ниже при сравнении с контрольной группой (таблица 1). На основании изучения уровня прогестерона в периферической крови с 18 по 22 день менструального цикла у 60,5% больных НГЭ установлен овуляторный менструальный цикл. У 7,9% больных отмечалась ановуляция – уровень прогестерона составил $4,2 \pm 1,3$ нмоль/л, у 31,6% больных наблюдалась недостаточность лютеиновой фазы (уровень прогестерона $12,2 \pm 1,8$ нмоль/л).

У больных с "классическим фенотипом" СПКЯ уровень кисспептина в сыворотке крови на 2 и 8 дни менструального цикла имел тенденцию к повышению, уровень ЛГ и АМГ на 2 и 8 дни менструального цикла был достоверно выше по сравнению с контрольной группой (таблица 1). Уровень эстрадиола (на 2 день менструального цикла) и эстрона (на 8 день менструального цикла) был достоверно выше, по сравнению с контрольной группой. При этом ароматазная активность овариальных фолликулов была достоверно ниже, чем в контрольной группе (таблица 1).

Таблица 1 – Результаты гормонального исследования на 2 и 8 дни менструального цикла у больных НГЭ, СПКЯ и контрольной группы

Гормоны	2 день менструального цикла			8 день менструального цикла		
	НГЭ (M±m)	СПКЯ (M±m)	Контроль (M±m)	НГЭ (M±m)	СПКЯ (M±m)	Контроль (M±m)
Кисспептин, нг/мл	$1,3 \pm 0,04$ **	$0,64 \pm 0,06$	$0,57 \pm 0,04$	$0,89 \pm 0,05$ **	$0,62 \pm 0,04$	$0,52 \pm 0,03$
ФСГ, МЕ/л	$6,47 \pm 0,63$	$7,4 \pm 0,54$	$7,24 \pm 0,56$	$7,66 \pm 0,45$	$8,57 \pm 0,46$	$7,14 \pm 0,78$
ЛГ, МЕ/л	$4,25 \pm 0,39$	$11,82 \pm 0,67$ **	$4,43 \pm 0,37$	$5,78 \pm 0,55$	$12,50 \pm 0,63$ **	$6,10 \pm 0,54$
АМГ, нг/мл	$1,72 \pm 0,54$ *	$15,9 \pm 0,63$ *	$5,74 \pm 2,07$	$1,90 \pm 0,76$ *	$17,39 \pm 0,77$ *	$7,54 \pm 2,59$
Эстрадиол, пмоль/л	$286,43 \pm 42,36$ **	$237,23 \pm 34,36$ **	$186,80 \pm 33,74$	$361,31 \pm 52,09$ **	$279,40 \pm 53,07$	$254,46 \pm 67,23$
Эстрон, пмоль/л	$288,39 \pm 37,76$ *	$262,91 \pm 31,17$	$218,08 \pm 31,38$	$329,26 \pm 19,84$ **	$341,84 \pm 35,92$ **	$235,08 \pm 34,21$
Пролактин, мМЕ/л	$387,73 \pm 43,17$ **	$274,38 \pm 40,26$	$235,08 \pm 41,38$	$338,03 \pm 48,74$ **	$214,21 \pm 52,61$	$177,58 \pm 38,60$
F-тест, пмоль/л	$2,36 \pm 0,74$	$9,38 \pm 0,54$ **	$3,86 \pm 0,93$	$2,00 \pm 0,63$	$9,75 \pm 0,98$ **	$2,32 \pm 0,73$
ДГЭА-С, пмоль/л	$6,30 \pm 1,10$	$8,4 \pm 1,61$	$6,50 \pm 1,20$	–	–	–
Коэффициент активности ароматазы овариальных фолликулов, E2/АМГ	$166,53 \pm 17,37$ **	$14,92 \pm 2,49$ **	$32,54 \pm 9,08$	$190,16 \pm 25,48$ **	$16,06 \pm 3,19$ **	$33,75 \pm 8,46$

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой

При изучении уровня прогестерона в сыворотке крови у больных СПКЯ с 18 по 22 день менструального цикла ановуляция установлена у 62,5% больных – уровень прогестерона составил $7,2 \pm 2,4$ нмоль/л. У 37,5% пациенток СПКЯ выявлена недостаточность лютеиновой фазы – уровень прогестерона составил $14,3 \pm 2,9$ нмоль/л.

В группе контроля у всех женщин отмечен овуляторный менструальный цикл (содержание прогестерона составило $38,6 \pm 4,1$ нмоль/л).

Учитывая полученные результаты уровня прогестерона в сыворотке крови у пациенток с НГЭ с 18 по 22 день менструального цикла 15 (39,5%) пациенток с недостаточностью лютеиновой фазы и ановуляцией было решено сравнить с группой больных с "классическим фенотипом" СПКЯ.

По результатам корреляционного многофакторного анализа установлена отрицательная корреляционная связь между уровнем ФСГ и эстрадиола в периферической крови у больных НГЭ (коэффициент корреляции Спирмена (r_s) составил $-0,72$). Отмечена прямая корреляционная зависимость между уровнем эстрадиола на 2 и 8 дни менструального цикла у больных НГЭ в сыворотке крови с уровнем эстрона ($r_s=0,69$ и $r_s=0,69$). Выявлены отрицательные корреляционные связи между уровнем АМГ на 8 день менструального цикла в периферической крови и уровнем ароматазной активности на 2 и 8 дни менструального цикла в сыворотке крови ($r_s=-0,57$ и $r_s=-0,68$ соответственно). Отмечена прямая корреляционная зависимость между уровнем эстрадиола на 8 день менструального цикла в сыворотке крови с уровнем ароматазной активности на 8 день менструального цикла в периферической крови ($r_s=0,60$).

Установлено, что содержание киспептина в сыворотке крови на 2 и 8 дни менструального цикла у больных с "классическим фенотипом" СПКЯ положительно коррелирует с уровнем ЛГ ($r_s=0,57$ и $r_s=0,68$). Установлена прямая корреляционная связь между уровнем киспептина на 2 и 8 дни менструального цикла и содержанием свободного тестостерона ($r_s=0,73$ и $r_s=0,83$), а также уровнем киспептина на 2 день менструального цикла и уровнем ДГЭА-С ($r_s=0,65$).

Результаты гистологического и иммуногистохимического исследований

При проведении гистологического исследования биоптатов эндометрия в среднюю секреторную фазу менструального цикла в группе больных НГЭ, у 18,4% пациенток эндометрий соответствовал ранней стадии фазы секреции, у 57,9% пациенток – средней стадии фазы секреции и у 22,8% пациенток отмечалась слабо

выраженная секреторная трансформация эндометрия с отставанием в развитии стромального компонента, в 2,6% случаев была верифицирована гиперплазия эндометрия.

Гистологическое исследование биоптатов эндометрия в среднюю секреторную фазу менструального цикла выявило простую железистую гиперплазию эндометрия у 62,5% больных с "классическим фенотипом" СПКЯ, у 37,5% пациенток эндометрий находился в ранней стадии фазы секреции.

В контрольной группе у всех пациенток эндометрий соответствовал средней стадии фазы секреции без признаков отставания развития стромального компонента.

У больных НГЭ I-II степени относительная площадь экспрессии KISS1 и KISS1R в эндометриоидных гетеротопиях (рисунок 1), в биоптатах яичников (рисунок 2) и у пациенток СПКЯ в среднюю секреторную фазу менструального цикла достоверно выше при сравнении с контрольной группой (таблица 2). Относительная площадь экспрессии KISS1 и KISS1R в эндометрии в среднюю секреторную фазу менструального цикла у больных НГЭ достоверно ниже при сравнении с контрольной группой (рисунки 3,4; таблица 2). При этом у больных СПКЯ относительная площадь экспрессии KISS1 и KISS1R в эндометрии (рисунки 5,6) и в биоптатах яичников в среднюю секреторную фазу менструального цикла достоверно выше по сравнению с группой НГЭ (таблица 2). Оптическая плотность экспрессии исследуемых маркеров статистически значимо не отличалась.

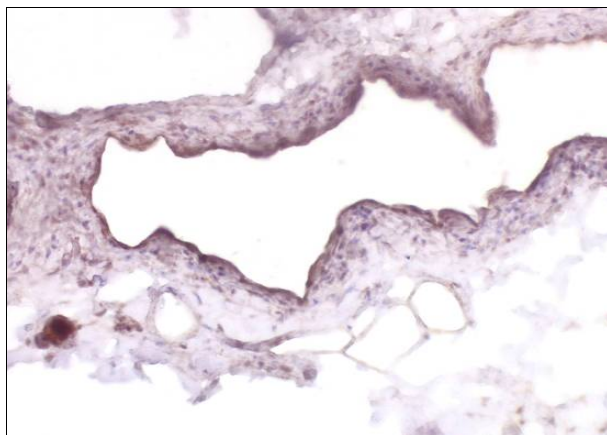


Рисунок 1 – Экспрессия рецептора KISS1R в эндометриоидной гетеротопии. ИГХ. ×400

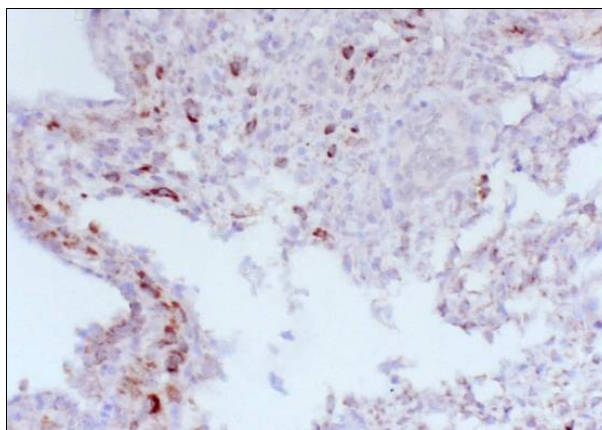


Рисунок 2 – Экспрессия рецептора KISS1R в биоптатах яичников у больных НГЭ. ИГХ. ×400

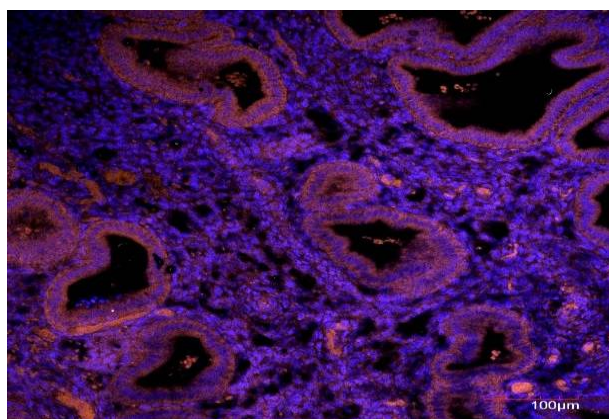


Рисунок 3 – Экспрессия белка KISS1 в эндометрии больных НГЭ (красная флуоресценция), Hoechst (синяя флуоресценция), ×200

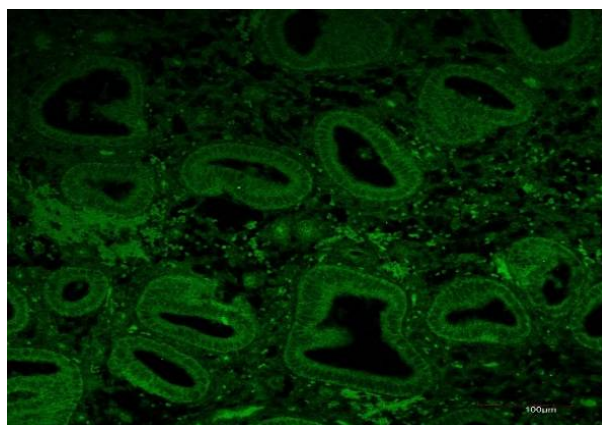


Рисунок 4 – Экспрессия рецептора KISS1R в эндометрии больных НГЭ (зеленая флуоресценция), ×200

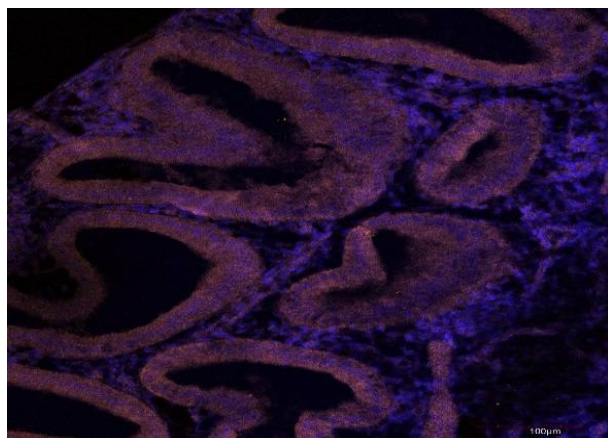


Рисунок 5 – Экспрессия белка KISS1 в эндометрии больных СПКЯ (красная флуоресценция), Hoechst (синяя флуоресценция) ×200

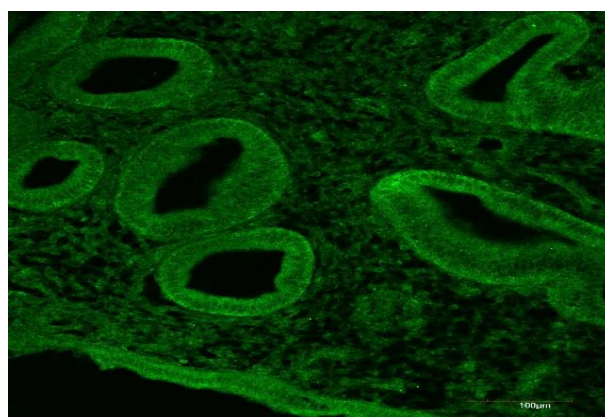


Рисунок 6 – Экспрессия рецептора KISS1R в эндометрии больных СПКЯ (зеленая флуоресценция), ×200

Таблица 2 – Результаты иммуногистохимического исследования у пациенток исследуемых групп

Маркер	НГЭ			Контроль			СПКЯ	
	Биоптаты эндометрия	Эндометр. гетеротопия	Биоптаты яичников	Биоптаты эндометрия	Интакная брюшина	Биоптаты яичников	Биоптаты эндометрия	Биоптаты яичников
Относительная площадь экспрессии (%)								
KISS1	28,5±2,79 *	33,6±5,21 *	26,7±7,4	41,7±4,1	9,5±3,24	17,9±4,1	54,3±5,6 *	39,4±2,8 **
KISS1R	30,7±1,6 *	43,7±2,5 ***	28,2±6,4	36,7±2,2	11,8±2,7	17,3±7,1	63,4±4,0 ***	42,8±5,8 **

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ при сравнении с контрольной группой

У больных НГЭ выявлена прямая корреляционная зависимость между относительной площадью экспрессии белка KISS1 в эндометрии с уровнем

кисспептина на 8 день менструального цикла в периферической крови ($rs=0,90$). Определено, что уровень кисспептина на 2 день менструального цикла в периферической крови коррелирует с площадью экспрессии рецептора *KISS1R* в эндометриодных гетеротопиях ($rs=0,57$). Отмечается прямая корреляционная зависимость между уровнем кисспептина у больных НГЭ в сыворотке крови на 2 день менструального цикла с относительной площадью экспрессии *KISS1* в яичнике ($rs=0,53$).

В контрольной группе отмечается прямая корреляционная зависимость между относительной площадью экспрессии рецептора *KISS1R* в интактной брюшине с уровнем кисспептина на 8 день менструального цикла в сыворотке крови ($rs=0,90$).

Результаты генетического исследования

Используя Интернет-ресурсы <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, <http://genome.ucsc.edu> проанализированы последовательности промоторной области генов *KISS1* и *KISS1R*. По данным SNP database и базы данных 1000 геномов промоторная область гена *KISS1* содержит 35 различных полиморфных вариантов, однако, за исключением двух, частота этих вариантов экстремально мала. Для анализа выбраны два наиболее частых полиморфных варианта промоторной области гена: rs5780218 (с.-145delT) – частота аллеля delT 47.479% (1036/2182); insT 52.521% (1146/2182) и rs3924587 (с.-89G>A) – частота аллеля A: 7.927% (397/5008); G: 92.073% (4611/5008). Для анализа выбранных полиморфных вариантов разработана система праймеров для ПЦР с использованием программного обеспечения Oligo6 и метод детекции анализируемых вариантов. Замена G на A (rs3924587: с.-89G>A) приводит к исчезновению сайта для эндонуклеазы рестрикции TseFI, при гидролизе данной рестриктазой фрагмент, содержащий делецию с.-145delT, составляет 107 пар оснований, тогда как фрагмент с инсерцией – 108 пар оснований. Согласно полученным результатам в общей группе (в состав которой вошли пациентки с НГЭ, СПКЯ и здоровые женщины) частота минорного аллеля -89A составила 10%, а генотипа -89G/A – 20%, генотип -89A/A зарегистрирован не был. Частота аллеля -145delT составила 86%, а генотипа -145delT/delT – 72%, таким образом, в общей выборке аллель -145delT оказался мажорным и его частота достоверно отличается от таковой полученной при анализе 1000 геномов ($X^2=49,1$; $p<0,001$). Сочетание двух полиморфных вариантов -89G/A и -145delT/delT выявлено с частотой 20%. При анализе групп пациенток с НГЭ и СПКЯ был выявлен ряд особенностей. Частота минорного аллеля -89A в группе с СПКЯ

составила 9,1%, а генотипа -89G/A – 16,6%, генотип -89A/A зарегистрирован не был. Частота минорного аллеля -89A в группе больных НГЭ составила 7,7%, а генотипа -89G/A – 16,3%, генотип -89A/A зарегистрирован не был. Частота минорного аллеля -89A в контроле составила 18,1%, а генотипа -89G/A – 36,4%, генотип -89A/A зарегистрирован не был. Однако из-за немногочисленности выборки полученные различия статистически не достоверны. Частота минорного аллеля -145insT в группе пациенток с НГЭ оказалась достоверно выше, чем в контрольной выборке и в группе пациенток с СПКЯ. Проведено дополнительное исследование полиморфизма гена *KISS1* на 60 образцах ДНК, полученных от больных НГЭ. В этой группе частота минорного аллеля -89A составила 12%, а генотипа -89G/A – 23,7%, генотип -89A/A также зарегистрирован не был. Определено, что частота аллеля -145delT в группе больных НГЭ составила 84%, генотипа -145delT/delT – 68,4%, генотипа -145delT/insT – 31,6%, генотип -145insT/insT зарегистрирован не был. Таким образом, распределение частот аллелей и генотипов для полиморфизма -145delT гена *KISS1* у больных НГЭ достоверно отличается от такового в контрольной группе и в группе пациенток с СПКЯ.

По данным SNP database и программы 1000 геномов промоторная область гена *KISS1R* содержит 45 различных полиморфных вариантов. Частота большинства полиморфных вариантов составляет менее 1%. Для анализа выбраны три наиболее частых полиморфных варианта промоторной области гена *KISS1R*: rs3810424 (с.-318C>T) C=0.987, T=0.013; rs3810423 (с.-123C>T) C=0.951; T=0.049; с.24A>G A=0.814 G=0.186. Для анализа выбранных полиморфных вариантов разработана система праймеров для ПЦР с использованием программного обеспечения Oligob и метод детекции анализируемых вариантов. Замена С на Т (rs3810424 с.-318C>Т) приводит к исчезновению сайта для эндонуклеазы рестрикции [Hae III](#). Замена А на G (с.24A>G) приводит к возникновению сайта для эндонуклеазы рестрикции [Hae III](#). Замена С на Т rs3810423 (с.-123C>Т) приводит к исчезновению сайта для эндонуклеазы рестрикции [BmeI8 I](#).

В общей группе (пациентки с НГЭ, СПКЯ и здоровые женщины) не было выявлено полиморфных вариантов rs3810424 (с.-318C>Т) и rs3810423 (с.-123C>Т). Частота аллеля с.24G составила 16%, генотипов 24A/A, 24G/A, 24G/G – 69%, 28%, 3% соответственно. При анализе групп пациентов с НГЭ и СПКЯ был также выявлен ряд особенностей. Частота минорного аллеля с.24G в группе с СПКЯ составила 16,7%, а генотипа 24G/A – 33,3%, генотип 24G/G зарегистрирован не был. Частота минорного аллеля с.24G в группе с НГЭ составила 15,4%, генотипов 24A/A, 24G/A, 24G/G –

73,1%, 23,1%, 3,8% соответственно. Частота минорного аллеля с.24G в контрольной группе составила 18,2%, а генотипа 24G/A –36,4%, генотип 24G/G зарегистрирован не был.

При анализе экспрессии генов *KISS1* и *KISS1R* в эндометрии у больных НГЭ, СПКЯ и контрольной группы был обнаружен низкий уровень экспрессии этих генов и не было выявлено достоверных различий между группами ($p>0,05$). Однако при исследовании материала эндометриоидных гетеротопий мы обнаружили, что по уровню экспрессии гена *KISS1R* существуют достоверные отличия между образцами. Гетеротопии по уровню экспрессии гена *KISS1R* были разделены на 3 группы: первая – низкий уровень экспрессии (20 гетеротопий – 52,6%), вторая – средний (12 гетеротопий – 31,6%) и третья группа – высокий (6 эндометриоидных гетеротопий – 15,8%). Экспрессия гена *KISS1R* в гетеротопиях группы 2 повышена по сравнению с эутопическим эндометрием в 2 раза и в 5,7 раза по сравнению с гетеротопиями 1 группы, различия достоверны ($p=0,01$). Уровень экспрессии гена *KISS1R* в гетеротопиях группы 3 был в 21 раз выше, чем в эутопическом эндометрии ($p=0,018$) и в 67 раз выше, чем в гетеротопиях первой группы ($p=0,016$). Также достоверные различия были обнаружены между уровнем экспрессии в гетеротопиях 2 и 3 групп ($p=0,021$) (рисунок 7).

Для 38 пациенток с НГЭ проведено попарное сравнение экспрессии гена *KISS1R* в эндометриоидных гетеротопиях и в эутопическом эндометрии. Экспрессия гена *KISS1R* в эутопическом эндометрии во всех проанализированных случаях достоверно не отличалась, в том числе у пациенток с высоким уровнем экспрессии данного гена в эндометриоидных гетеротопиях.

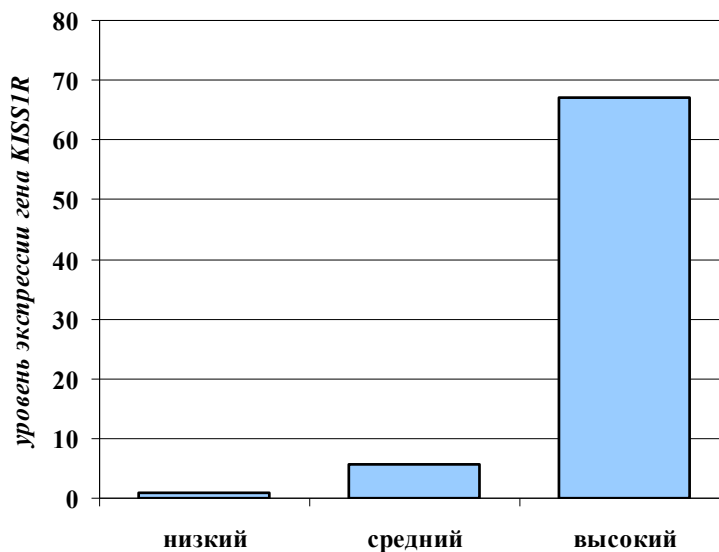


Рисунок 7 – Экспрессия гена *KISS1R* в эндометриоидных гетеротопиях

ВЫВОДЫ

1. Уровень киспептина у здоровых женщин в периферической крови на 2 и 8 дни менструального цикла составил $0,57 \pm 0,04$ нг/мл и $0,52 \pm 0,03$ нг/мл соответственно. У больных НГЭ I-II степени в раннюю пролиферативную фазу менструального цикла уровень киспептина в 2,3 раза превышает значения в контрольной группе, в среднюю пролиферативную фазу – в 1,7 раза выше по сравнению с группой контроля, а также достоверно выше по сравнению с уровнем киспептина у больных с "классическим фенотипом" СПКЯ (в 2 и 1,4 раза соответственно).

2. У больных НГЭ I-II степени в раннюю и среднюю пролиферативную фазы менструального цикла наблюдалась гиперэстрадиолемиа и гиперэстронемия. Уровень эстрадиола на 2 и 8 дни менструального цикла составил $286,4 \pm 42,3$ пмоль/л и $361,3 \pm 52,1$ пмоль/л при НГЭ по сравнению со значениями в контрольной группе ($186,8 \pm 33,7$ пмоль/л и $254,4 \pm 67,2$ пмоль/л) и достоверно превышал значения в группе СПКЯ (в 1,2 и 1,3 раза соответственно). Уровень эстрогена у больных НГЭ на 2 и 8 дни менструального цикла в 1,3 и 1,4 раза выше по сравнению с показателями в контрольной группе. Полученные результаты характеризуют НГЭ как эстрогензависимое заболевание. Уровень пролактина у больных НГЭ достоверно превышал значения в контрольной группе.

3. Коэффициент активности ароматазы овариальных фолликулов у больных НГЭ на 2 и 8 дни менструального цикла, рассчитанный по формуле (E2/AMГ), достоверно выше в 5,1 и в 5,6 раза по сравнению со значениями в группе контроля и достоверно ниже в группе больных СПКЯ (в 2,2 и 2,1 раза соответственно), что свидетельствует о высокой ароматазной активности при НГЭ и низкой при классическом синдроме СПКЯ.

4. У пациенток с НГЭ I-II степени относительная площадь экспрессии KISS1 и KISS1R в эндометрии в среднюю секреторную фазу менструального цикла достоверно ниже в 1,5 раза и в 1,2 раза соответственно при сопоставлении с показателями группы контроля. При НГЭ выявлена прямая корреляционная зависимость между относительной площадью экспрессии белка KISS1 в эндометрии и уровнем киспептина в периферической крови на 8 день менструального цикла ($r_s=0,90$).

5. Относительная площадь экспрессии белка KISS1 в эндометриоидных гетеротопиях в секреторную фазу менструального цикла в 1,2 раза выше по сравнению

с площадью экспрессии в эндометрии у больных НГЭ, а также в 1,3 раза выше, чем в биоптатах яичников и в 3,5 раза выше по сравнению с фрагментами интактной брюшины контрольной группы, что свидетельствует об антиметастатической роли данного белка в патогенезе заболевания.

6. Относительная площадь экспрессии рецептора *KISS1R* в эндометриоидных гетеротопиях у больных НГЭ в 1,4 раза выше при сопоставлении с площадью экспрессии в эндометрии и в 1,5 раза выше при сравнении с биоптатами яичников. Отмечено, что относительная площадь экспрессии рецептора *KISS1R* в эндометриоидных гетеротопиях в 4,6 раза выше по сравнению с площадью экспрессии белка *KISS1*, а также в 3,8 раза выше площади экспрессии рецептора *KISS1R* в интактной брюшине группы контроля, что может быть объяснено индуцибельными свойствами данного рецептора. Установлена средняя корреляция между уровнем кисспептина на 2 день менструального цикла в периферической крови и площадью экспрессии рецептора *KISS1R* в эндометриоидной гетеротопии ($r_s=0,57$).

7. У больных с "классическим фенотипом" СПКЯ на 2 и 8 дни менструального цикла отмечена положительная корреляция уровня кисспептина с уровнем ЛГ ($r_s=0,57$ и $0,68$), свободного тестостерона ($r_s=0,73$ и $0,83$) и ДГЭА-С ($r_s=0,65$), а также достоверное снижение коэффициента активности овариальных фолликулов по сравнению с НГЭ и контрольной группой, что указывает на гормонотормозящую роль кисспептина в патогенезе СПКЯ.

8. У пациенток с СПКЯ относительная площадь экспрессии в эндометрии *KISS1* и *KISS1R* была достоверно выше в 1,3 раза и в 1,7 раза при сопоставлении с группой контроля, а также в 1,9 и в 2,1 раза по сравнению с больными НГЭ, что может быть связано с высокой частотой гиперплазии эндометрия. В биоптатах яичников у больных с СПКЯ выявлено достоверное повышение площади экспрессии *KISS1* и *KISS1R* в 2,2 раза и в 2,5 раза соответственно по сравнению со значениями в группе контроля и в 1,4 и 1,5 раза выше по сравнению с больными НГЭ, что может быть объяснено мультифолликулярным строением яичников.

9. Частота минорного аллеля -145delT гена *KISS1* в периферической крови у больных НГЭ достоверно выше, чем у пациенток с СПКЯ и в контрольной группе ($\chi^2=3,57$ $p<0,05$). Частота генотипа 24G/G гена *KISS1R* у больных НГЭ составила 3,8%, у больных СПКЯ и в контрольной группе данный генотип обнаружен не был.

10. У больных НГЭ I-II степени в эндометриоидных гетеротопиях выявлено 3 уровня экспрессии гена *KISS1R* (низкий, средний и высокий), что подчеркивает

полиморфность заболевания. Высокий уровень экспрессии в эндометриоидных гетеротопиях в 11,8 раза превышает значения среднего уровня и в 67 раз выше по сравнению с низким уровнем; при этом средний уровень экспрессии в эндометриоидных гетеротопиях в 5,7 раза превышает низкий уровень.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Информативным биомаркером неинвазивной диагностики начальных форм НГЭ является определение уровня кисспептина в периферической крови на 2 день менструального цикла.

2. Установленные значения уровня кисспептина на 2 и 8 дни менструального цикла у здоровых женщин $0,57 \pm 0,04$ нг/мл и $0,52 \pm 0,03$ нг/мл соответственно могут быть использованы для дифференциальной диагностики с различными заболеваниями.

3. Наиболее информативным при изучении экспрессии *KISS1* и *KISS1R* в эндометрии, эндометриоидных гетеротопиях, в биоптатах яичников и интактной брюшины является определение относительной площади экспрессии по сравнению с оптической плотностью.

4. С целью выявления группы риска развития НГЭ рекомендовано проводить анализ полиморфных вариантов генов *KISS1* и *KISS1R* в периферической крови. Выявление минорного аллеля -145delT гена *KISS1* и генотипа 24G/G гена *KISS1R* может свидетельствовать о диагнозе НГЭ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Оценка влияния различных групп гормональных препаратов на частоту рецидивов генитального эндометриоза / М.И. Ярмолинская, А.А. Цыпурдеева, Е.Н. Байлюк, А.С. Молотков, Т.О. Ефименко, Д.З. Цицкарава, Н.Ф. Ганбарли // Terra Medica. – 2015. – № 4. – С.59-60.

2. Особенности экспрессии кисспептина и его рецептора у больных наружным генитальным эндометриозом / Н.Ф. Ганбарли, Г.Х. Толибова, М.И. Ярмолинская, Т.Г. Траль, А.А. Цыпурдеева, В.В. Рулев // Журнал акушерства и женских болезней. – 2016. – Т.LXV, спецвыпуск. – С.42-43.

3. Ганбарли, Н.Ф. Значение кисспептина в регуляции функции репродуктивной системы / Н.Ф. Ганбарли, М.И. Ярмолинская, Э.К. Айламазян // Журнал акушерства и женских болезней. – 2016. – Т.LXV, вып. 6. – С.4-8.

4. Ярмолинская, М.И. Роль нейромодулятора кисспептина в патогенезе генитального эндометриоза / М.И. Ярмолинская, Н.Ф. Ганбарли, Н.Н. Ткаченко // Репродуктивное здоровье женщин и мужчин: II Всероссийская конференция с международным участием: сборник тезисов. – М., 2017. – С.44.

5. Роль метастина в патогенезе наружного генитального эндометриоза /Э.К. Айламазян, М.И. Ярмолинская, Н.Ф. Ганбарли, Н.Н. Ткаченко, Г.Х. Толибова, Т.Г. Траль, В.В. Рулев, А.А. Цыпурдеева // Журнал акушерства и женских болезней. – 2017. - Т.LXVI, № 3. – С.16-24.

6. Кисспептин в патогенезе синдрома поликистозных яичников / Н.Ф. Ганбарли, М.И. Ярмолинская, В.В. Потин, Н.Н. Ткаченко, В.В. Рулев, В.И. Николаева // Журнал акушерства и женских болезней. – 2017. – Т.LXVI, спецвыпуск. – С.22-23.

7. Кисспептин и синдром поликистозных яичников – есть ли связь? / М.И. Ярмолинская, Н.Ф. Ганбарли, Н.Н. Ткаченко, В.И. Николаева, Г.Х. Толибова, Т.Г. Траль, В.В. Рулев, А.А. Цыпурдеева // Журнал акушерства и женских болезней. – 2017. – Т.66, № 6. – С.73-80.

8. Изучение содержания кисспептина в сыворотке крови у пациенток с синдромом поликистозных яичников / Н.Ф. Ганбарли, М.И. Ярмолинская, Н.Н. Ткаченко, В.И. Николаева // Terra Medica. – 2017. – № 1-2 (87-88) – С.74.

9. Исследование экспрессии генов *KISS1* и *KISS1R* у пациенток с наружным генитальным эндометриозом / Н.Ю. Швед, О.В. Малышева, Н.С. Осиновская, О.С. Коптева, Н.Ф. Ганбарли, В.С. Баранов, М.И. Ярмолинская // XII Международный конгресс по репродуктивной медицине. – М., 2018. – С. 46-47.

10. Implication of kisspeptin in pathogenesis of endometriosis/ M. Yarmolinskaya, N. Ganbarli, N. Tkachenko, G. Tolibova, T. Tral // Abstracts from the 4st Congress of the Society of Endometriosis and Uterine Disorders. – Florence, 2018.

11. Next-generation sequencing of matched ectopic and eutopic endometrium identifies novel endometriosisrelated genes/A.V.Predeus, E.S.Vashukova, A.S.Glotov, M.M.Danilova, N.S.Osinovskaya, O.V.Malysheva, N.Yu.Shved, N.Ganbarli, M.I. Yarmolinskaya, T.E. Ivashchenko, V.S.Baranov// Генетика. – 2018. – Т. 54, № 11.