

ЗАПАДНО-КАЗАХСТАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ имени МАРАТА ОСПАНОВА

УДК 612.017.34: 615.9:618.11

На правах рукописи

**БАЛМАГАМБЕТОВА АРУ ДЮСЕНОВНА**

**Морфофункциональная оценка овариального резерва яичников в  
условиях воздействия хлорорганических пестицидов (линдан).  
(клинико-экспериментальное исследование)**

Специальность - 6D110100 «Медицина»

Диссертация на соискание степени

доктора философии (PhD)

Научный руководитель:  
к.м.н., доцент  
Г.А.Журабекова

Научный консультант:  
МД, PhD профессор Университета Л'Акуила  
Г. Маккиарелли

Республика Казахстан

Актобе, 2016

## СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ .....	3
ОПРЕДЕЛЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....	4
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
1 Экологическая обстановка зоны Приаралья и влияние хлорсодержащих пестицидов (линдан) на организм.....	11
1.1 Морфофункциональная характеристика яичников как центральное звено репродуктивной системы.....	17
1.2 Современные представления фолликулогенеза и ультраструктура гранулезных клеток.....	20
1.3 Особенности кровоснабжения яичников и их функциональное состояние.....	22
1.4 Понятие овариального резерва и определяющих его основных маркеров.....	24
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	30
2.1 Клиническая часть исследовательской работы.....	30
2.1.1 Ультразвуковое исследование яичников.....	31
2.1.2 Определение гормонального статуса .....	32
2.2 Экспериментальная работа.....	33
2.3 Статистическая обработка .....	38
3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ .....	39
3.1 Ультразвуковая характеристика овариальной функции яичников.....	39
3.2 Характеристика гормонального состояния яичников.....	53
3.3 Оценка характера взаимосвязи между показателями объема яичников, биохимическими показателями и доплерографическими данными.....	55
3.4 Морфологическая характеристика гранулезных клеток яичников мышей в норме и при воздействии различных доз линдана при <i>in vitro</i> исследовании.....	62
3.5 Морфостереометрия гранулезных клеток.....	77
3.6 Определение уровня белка P53 в культуре клеток методом белкового блотинга.....	79
4 ОБСУЖДЕНИЕ И ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ.....	80
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	91
ВЫВОДЫ.....	91
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	92
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	93
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	

## **НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ**

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 7.32-2001 - (Межгосударственный стандарт) Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления.

ГОСТ 15.101-98 - (Межгосударственный стандарт) Система разработки и постановки продукции на производство. Порядок выполнения научно-исследовательских работ.

ГОСТ 7.1-84 - Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Библиографическое описание документа. Общие требования и правила составления.

ГОСТ 7.9-95 (ИСО 214-76) - Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Реферат и аннотация. Общие требования.

ГОСТ 7.12-93 - Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Библиографическая запись. Сокращение слов на русском языке. Общие требования и правила.

ГОСТ 7.54-88 - Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Представление численных данных о свойствах веществ и материалов в научно-технических документах. Общие требования.

## ОПРЕДЕЛЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

В настоящей диссертации применяют следующие термины с соответствующими определениями:

*Репродуктивная система* – это совокупность органов и процессов в организме, направленных на воспроизводство биологического вида.

*Овариальный резерв* – это функциональный резерв яичника, который определяет способность последнего к развитию здорового фолликула с полноценной яйцеклеткой и его ответ на овариальную стимуляцию.

*Ангиогенез* – это процесс образования новых кровеносных сосудов в органе или ткани.

*Пестициды* (от лат. *pestis* - «зараза» и *cido* - «убиваю») – химические или биологические препараты, используемые для борьбы с вредителями и болезнями растений, сорными растениями, вредителями хранящейся сельскохозяйственной продукции, бытовыми вредителями и внешними паразитами животных, а также для регулирования роста растений, предуборочного удаления листьев (дефолианты) и предуборочного подсушивания растений (десиканты).

*Корреляция* – статистическая взаимосвязь двух или более случайных величин (наличие линейной связи или общей пропорциональности между переменными).

*Индекс резистентности* – количественный анализ кривых скоростей кровотока, который представляет собой отношение разности максимальной систолической и конечной диастолической скорости к максимальной систолической скорости кровотока, увеличение которого указывает на повышение циркуляторного сопротивления, а его уменьшение на снижение периферического сопротивления в бассейне лоцируемой артерии;

*Максимальная систолическая и минимальная диастолическая скорости* являются качественными показателями, отражающими наибольшую систолическую и диастолические скорости кровотока в точке локации.

*Пульсационный индекс* – отношение разности максимальной систолической и конечной диастолической скорости кровотока к средней величине, отражающей состояние периферического сосудистого сопротивления регионарных артерий, и служит для определения функциональных изменений, происходящих в сосудистой стенке регионарных артерий.

*Цветовое доплеровское картирование* – совмещение двухмерной эхоимпульсной и цветовой информации о скоростях потоков крови в исследуемых органах, благодаря высокой разрешающей способности, дает возможность визуализировать и идентифицировать мельчайшие сосуды микроциркуляторного русла.

## ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АМГ	- антимюллеров гормон.
ДДТ	- дихлородефинилтрихлорэтан.
ДМСО	- диметил сульфоксид.
ГЦХГ	- гексахлорциклогексан.
ИР	- индекс резистентности.
ИФА	- иммуноферментный анализ.
КАФ	- количество антральных фолликулов.
КД	- килоджоуль.
ЛГ	- лютеинизирующий гормон.
ЛЯ	- левый яичник.
МЕ	- международная единица.
МСС	- максимальная систолическая скорость.
МДС	- минимальная диастолическая скорость.
НГ	- нанограмм.
ОЯ	- объем яичников.
ПИ	- пульсационный индекс.
ПХБ	- полихлоринад бифенил.
ПЯ	- правый яичник.
РС	- репродуктивная система.
УЗИ	- ультразвуковое исследование.
ФСГ	- фолликулостимулирующий гормон.
ФСБР	- фосфатно-солевой буферный раствор.
ЦДК	- цветное доплеровское картирование.
RMSG	- Pregnant Mare Serum Gonadotropin – сыворотка гонадотропина фолликулостимулирующего действия.
PBS	- Phosphate buffered saline - фосфатный буфер, физиологический раствор с рН: 7-7.4.
DMEM	- Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	- Dimethyl sulfoxide
DPBS	- Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline
MEM HEPES	- Minimum Essential Medium Eagle HEPES Modification
V <sub>max</sub>	- максимальная систолическая скорость
V <sub>min</sub>	- минимальная диастолическая скорость

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность проблемы**

Здоровье общества и возможность продолжения человеческого рода всегда выступало одним из важнейших факторов, определяющих статус цивилизации. Ключевыми показателями уровня здоровья населения являются: физическое развитие, рождаемость, заболеваемость и смертность. Поэтому для прогнозирования и укрепления здоровья человеческого потомства, необходимо тщательное исследование и разработка определенных мероприятий по сохранению репродуктивных возможностей человека с учетом всех современных неблагоприятных факторов окружающей среды [1,2,3,4].

По данным статистических отчетов Министерства здравоохранения Республики Казахстан отмечено, что в стране в последние годы прослеживается высокий рост числа гинекологических заболеваний, стойко ведущих к повышению уровня первичного бесплодия, увеличению рисков самопроизвольных выкидышей, возникновению тяжелой патологии беременности и большого количества врожденных аномалий новорожденных [5,6,7]. Функциональная способность репродуктивной системы современной женщины резко снижена. При этом прослеживается четкая связь между экологической обстановкой районов проживания женщин и ростом заболеваемости. Этот факт настораживает и приводит к большому количеству вопросов, которые по рекомендациям большинства исследователей необходимо изучать в комплексе с возникшими условиями, состояния окружающей среды и организма в целом [8,9].

Так вот уже более 50 лет под пристальным вниманием ученых находится зона Приаралья экологическое бедствие, которого сформировалось в результате трагедии Аральского моря [10,11,12]. До сегодняшнего дня реализовано большое количество исследовательских проектов по изучению здоровья населения региона, укреплению здоровья детей и женщин, вакцинации, витаминно-профилактики среди детей и т.д.[13]. Но, к сожалению, до сих пор недостаточно работ, отражающих репродуктивный потенциал населения, качественное состояние репродукции в последующих поколениях, и, самое главное, нет исследований с морфологическим обоснованием возникающих проблем.

Как известно, морфологические аспекты проблемы могут быть изучены путем постановки эксперимента или применения специальных методик, обширно дающих сведения не только о внутренней структуре органа, но и функциональной анатомии его при жизни. Так, в настоящее время, по данным современных научных исследований, наиболее точную функциональную оценку женской репродуктивной системы может дать состояние овариального резерва. Этот маркер угасания функции яичников, отражает уменьшение количества примордиальных фолликулов и снижение качества ооцитов в них [14,15]. Овариальный резерв – параметр, дающий четкую характеристику

функции органа и доступно оцениваемый с помощью ультразвуковых и гормональных параметров [16,17].

Касательно изучаемого вопроса: Что же все-таки является губительным в экологии Арала в отношении репродуктивной системы человека? Анализ данных имеющихся исследований показал, что среди химических соединений, присутствующих в почве, воде и воздухе региона лидирующее место занимают хлорсодержащие пестициды (Mazhitova Z., Zetterstrom R. 1997). Это наиболее агрессивные соединения, которые в свое время были нерационально, в чрезмерном количестве использованы в агрокультуре региона [18,19]. Доказано, что данные пестициды кумулируются до 150 лет, оказывая свое токсическое воздействие на многие поколения [20,21]. Также показано, что данные пестициды, действуя как эндокринные дисрапторы (разрушители), имеют высокую избирательную тропность к эндокринному звену репродуктивной системы, и приводят к функциональным нарушениям во многих поколениях [22,23].

Изучив доступную литературу, мы выяснили, что наиболее информативным, доступным клиническим методом исследования, позволяющим изучить репродуктивный потенциал женщин фертильного возраста – овариальный резерв, проживающих в экологически неблагоприятном регионе Арала, является ультразвуковое исследование яичников с определением гормонального статуса специфических маркеров. Определенное понимание возникновения функциональных нарушений позволит дать морфологический эксперимент с детальным изучением ультраструктуры органа, а именно гранулезных клеток. Именно эти клетки функционально секретируют Антимюллеровый гормон, который позволяет оценить репродуктивную функцию. Учитывая выше приведенные данные, мы поставили перед собой цель и определенные задачи.

**Цель исследования:** Изучить морфофункциональное состояние яичников у женщин репродуктивного возраста в условиях воздействия хлорорганических пестицидов и исследовать ультраструктурные изменения гранулезных клеток мышей в *in vitro* условиях.

**Задачи:**

1. Изучить ультразвуковые показатели, характеризующие овариальный резерв яичников женщин в условиях воздействия хлорорганических пестицидов (на примере Приаралья).
2. Оценить показатели уровня гормонов (АМГ, ФСГ), характеризующие функциональную активность яичников женщин в условиях воздействия хлорорганических пестицидов (на примере Приаралья).
3. Изучить ультраструктурные изменения гранулезных клеток яичников мышей при воздействии Линдана в эксперименте.
4. Провести анализ корреляционных взаимоотношений между ультразвуковыми и гормональными показателями яичников женщин.

## **Теоретическая и практическая значимость тематики диссертации**

- Выявленное в настоящей работе снижение овариального резерва женщин проживающих в экологически неблагоприятном регионе Приаралья, имеет большое теоретическое и практическое значение, так выявленная положительная достоверная корреляционная связь между ультразвуковыми и гормональными показателями органа, позволяют рекомендовать использование данных методик в качестве основных в определении овариального резерва женщин.
- Полученные результаты состояния овариального резерва женщин экологически неблагоприятного региона, послужат подспорьем в разработке тактики подготовки женщин по лечению бесплодия с использованием программ вспомогательных репродуктивных технологий.
- Полученные результаты по воздействию пестицидов на репродуктивный потенциал яичников будут предпосылкой для дальнейшей разработки санитарно-гигиенических нормативов по применению данных соединений.
- Результаты экспериментального исследования по действию Линдана на структуру гранулезных клеток мышей пополнят научную базу по изучению токсических свойств пестицидов на развитие, формирование, структуру и функции репродуктивных органов.

## **Научная новизна результатов исследований**

- Впервые установлены морфофункциональные и гормональные показатели овариального резерва женщин, проживающих в условиях повышенного содержания пестицидов и проведено сравнение с контрольной группой. Представлены морфофункциональные критерии овариального резерва женщин проживающих в экологически неблагоприятном регионе Приаралья.
- Впервые выявлена зависимость между состоянием стромального кровотока и морфологической структурой характеризующей овариальный резерв яичников женщин.
- Впервые представлены ультраструктурные данные воздействия различных концентраций Линдана на гранулезные клетки в условиях эксперимента.

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

- У женщин, проживающих в регионе Приаралья, в условиях воздействия хлорорганических пестицидов отмечается активация компенсаторного механизма по сохранению овариального потенциала органа; сохранность объема яичника за счет изменения соотношения коркового и мозгового веществ.
- У женщин, проживающих в регионе Приаралья, отмечается снижение функциональной активности органа, отражающейся в гормональном спаде в конце фолликулярной фазы менструального цикла и имеющее тесную связь с ультразвуковыми показателями.

- Воздействие Линдана на гранулезные клетки в *in vitro* условиях на мышах показало дозозависимый эффект: низкая концентрация 1  $\mu\text{M}$  приводит к замедлению физиологического апоптоза; при воздействии концентрации 10  $\mu\text{M}$  апоптоз протекает по некротическому типу; при высокой концентрации в дозе 100  $\mu\text{M}$  Линдан оказывает полный токсический эффект.

### **Апробация работы**

Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на:

- Международной - практической конференции «Modern problems and prospects of clinical Medicine, Healthcare and Pharmacy development», MONOGRAPH, Publishing House WSziA 2014, Ополе, Польша;
- Международной научной конференции III International Scientific and Practical Conference “Topical Issues in Medicine” (17-18 апреля 2014 года) г.Актобе;
- XXIV Международном симпозиуме морфологических наук. Anatomy. An International Journal of Experimental and Clinical Anatomy. Special Issue includes abstract for the XXIV International Symposium Morphological Science (2-6 сентября 2015 года) Стамбул, Турция;
- Международной научной конференции IV Annual Conference “Medicine Pressing Questions” (29-30 октября 2015 года) Баку, Азербайджан;
- Заседаний межкафедрального совещания по морфологическим дисциплинам ЗКГМУ имени Марата Оспанова (г. Актобе).

### **Сведения о публикациях**

По теме диссертационного исследования опубликовано 13 научных работ, из них: 1 публикация в международном научном издании, имеющем ненулевой импакт-фактор, входящим в международную базу данных по цитируемости Thomson Reuters “European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology” (импакт - фактор 1,695 в 2014 году); 1 - в международном научном издании, входящем в международную базу данных Scopus “Italian journal of anatomy and embryology”; 1 – в международном научном издании, входящем в международную базу данных Google Scholar “Journal of Infertility and Reproductive Biology”; 3 - в научных изданиях, рекомендованных Комитетом по контролю в сфере образования и науки МОН РК; 1 – в РИНЦ; 6 – в материалах международных научных конференций (в том числе зарубежных - 5).

### **Объем и структура диссертации**

Работа изложена на 109 страницах компьютерного текста. Диссертация состоит из введения, аналитического обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов и практических рекомендаций. Текст иллюстрирован 8 таблицами и 42 рисунками. Список использованной литературы включает 220 источник, из них 74 на русском языке и 146 на английском языке.

Работа выполнена в рамках научно-исследовательской работы «Морфогенез и структурно-функциональные особенности органов и систем человека и экспериментальных животных при воздействии дестабилизирующих факторов», номер государственной регистрации 0114РК00213 кафедры нормальной и топографической анатомии с оперативной хирургией Западно-Казахстанского Государственного медицинского университета имени Марата Оспанова.

## 1 Экологическая обстановка зоны Приаралья и влияние хлорсодержащих пестицидов (линдан) на организм

Хорошо известно, что на сегодняшний день для Казахстана важнейшей проблемой остается экологическая ситуация вокруг Арала [24]. Чрезмерное использование воды для сельскохозяйственных целей в сочетании с низким уровнем осадков и наличием большого масштаба засушливых районов, привели к гибели бассейна [25]. Десятилетия разрушительной сельскохозяйственной практики и общей экологической бесхозяйственности привели к исчезновению моря, которое когда-то было четвертым по величине водоемом в мире с площадью 66000 км<sup>2</sup>. Постепенное вымирание моря повлекло за собой загрязнение воздуха, почвы и воды токсичными сельскохозяйственными химикатами. Катастрофа, начавшаяся еще в 60-е годы, имеет свое пролонгированное на долгие десятилетия токсическое воздействие на здоровье населения [26].

Бесконтрольное применение различных пестицидов, удобрений, химикатов, а также нерациональное использование водного ресурса с ирригационной целью, привели к тому, что обратное пропитывание этих веществ из почвы в море, в настоящее время представляют токсическую основу пыльных бурь часто возникающих в зоне Приаралья [27]. Климатические условия региона резко изменились: зимы стали холоднее, лето жарким и засушливым, с преобладанием песчаных бурь. Многочисленные исследования, проведенные в зоне Приаралья, показали высокую заболеваемость среди детского населения, уязвимость женщин и пожилых. Так исследования, проведенные в 2013 году [28,29] показали, что местное население подвержено различным заболеваниям, первое место среди которых занимают болезни крови, в частности анемии, на втором месте стоят заболевания дыхательной системы, лидируют в регионе заболевания пищеварительной системы, а также болезни мочеполовой системы. Эти данные, несомненно, говорят о путях попадания загрязнителей в организм – вода, пищевые продукты, вдыхаемый воздух. Данные литературы по изучению проблемы показали, что в пылевых частицах со дна моря преобладают хлорорганические пестициды: дихлорфенилдихлорэтилен, гептахлор, гексахлорциклогексан, гексахлоран, альдрин [30]. О преобладании каких-либо заболеваний в регионе доказывает также сложное химическое содержимое, т.е. микст химических загрязнителей в Приаралье [31].

По данным современных классификаторов, пестициды (от лат. *pestis* - «зараза» и *cido* - «убиваю») - химические или биологические препараты, используемые для борьбы с вредителями и болезнями растений, сорными растениями, вредителями хранящейся сельскохозяйственной продукции, бытовыми вредителями и внешними паразитами животных, а также для регулирования роста растений, предуборочного удаления листьев (дефолианты) и предуборочного подсушивания растений (десиканты).

На сегодняшний день известно большое количество экспериментальных и клинических исследований воздействия этих веществ на организм человека и экспериментальных животных. При нарушении функции репродуктивной системы, особая роль гормоноподобных токсикантов обусловлена их способностью связываться со специфическими рецепторами половых стероидов, и маскироваться под естественные гормоны. Гормоноподобные токсиканты, проникая в различные ткани репродуктивной системы женщин, вызывают аномалии репродуктивного тракта, проявляются нарушением менструального цикла, снижением фертильности, изменяют биосинтез половых гормонов, вызывают синдром поликистозных яичников и спонтанные аборт, увеличивают количество выкидышей, приводят к раннему наступлению полового развития, развивают различные виды онкологических заболеваний [32,33,34,35,36].

Репродуктивная система является наиболее уязвимой к действию неблагоприятных факторов экологии. Экологические химикаты проявляют свое отрицательное действие на органы репродуктивного тракта на протяжении всей жизни [37]. Негативное действие окружающей среды на здоровье женщин изучается вне и во время беременности, учитываются возраст, гормональная и фертильная способность женского организма [38,39]. Так М.Э. Ситдыкова у обследованных женщин, контактировавших с пестицидами, выявила тяжелые заболевания органов мочевого выделения (нефроптоз, кисты почек и гидронефроз), осложнения и нарушения репродуктивной функции (орхит, орхоэпидидимит, эпидидимиорхит, эпидидимит) [40]. При исследовании репродуктивных токсикантов как нитробензол, карбендазим, нитрофен, винколизин и др. они не только оказывали негативное влияние на фертильность, но и обладали канцерогенным и мутагенными свойствами [41]. Изучение влияния пестицидов на репродуктивное здоровье женщин, проживающих в селе и работающих в агрокультуре, показало увеличение случаев неблагоприятного исхода беременностей в виде абортов и преждевременных родов, в крови увеличение уровней прогестерона и эстрадиола, со снижением уровня фолликулостимулирующего гормонов [42]. У работниц производства, контактирующих с трихлорэтиленом, гербицидами, акарицидами, органическими растворителями на нефтеперерабатывающих заводах, были выявлены нарушения менструального цикла и овариальной функции яичников, отмечались неблагоприятный исход родов и нарушения развития новорожденных [43,44].

При исследовании женщин, работающих в теплицах (парниковые работницы) и постоянно контактирующих с пестицидами, было выявлено увеличение самопроизвольных абортов, появление случаев мертворождения [45]. Действие пестицидов как ДДТ, метоксихлор и линдан вызывают нарушения фертильной способности у женщин за счет изменения развития и функции яичников, они снижают уровень гормона прогестерона в сыворотке крови, тем самым нарушая имплантацию эмбриона в стенку эндометрия [46]. Гистопатологическая картина яичников под влиянием этих пестицидов

выглядит в виде атрезии первичных, вторичных и везикулярных фолликулов, увеличения эпителизации поверхностного слоя яичников, сопровождается вакуолизацией и пикнозом ооцитов. Изучение влияния фенвалерата на ткань яичников при гистологическом анализе показало значительное снижение количества преантральных фолликулов и желтых тел [47,48].

Экотоксиканты путем изменения стероидогенной активности репродуктивных клеток оказывают неблагоприятное воздействие на функции половых желез и свойства половых клеток [49]. При изучении влияния органохлоридных пестицидов на общий ген экспрессии гранулезных клеток и ФСГ в течение 48 часов выявлено, что пестициды тормозят стероидный путь гена экспрессии, активизированный ФСГ и стероидогенез гранулезных клеток. Кроме того, влияние химиката уже было отмечено на вторые сутки исследования, что привело к изменению клеточного цикла, развития, обмена веществ, адгезии, и росту апоптоза. При воздействии иминодипропионитрила морфологическая картина показала повышенное количество атретических и кистозных фолликулов, признаки ановуляции, обнаруженные ооциты были деформированы, что указывает на явную дисфункцию яичников [50,51].

При изучении влияния на мышах низкой дозы широко используемого фунгицида этилен-бис-дитиокарбамада, были выражены морфологические изменения в гранулезных клетках и отмечено снижение уровней экспрессии после воздействия отравляющего вещества. Данные результаты показали, что влияние химиката на клетки фолликулов яичника млекопитающего способно вызвать предраковое состояние, и эти проявления опасны в той же степени, как для гранулезных клеток мышей, так и для человека [52].

Изучено влияние микотоксина и его апоптотический механизм индукции на репродуктивную систему. Отмечено, что токсин в зависимости от дозы подавляет рост гранулезных клеток, происходит накопление в клетках активного кислорода и малоинальдегида, что – в совокупности свидетельствует о способности химиката усиливать апоптоз в гранулезных клетках крыс через окислительный процесс. Оценка влияния ПХБ 126 и 153 (полихлоринад бифенил) дистраптора на гранулезные клетки и тека клеточный апоптоз показало возникновение изменений в конечной дифференцировке фолликулов и ослабление спонтанной элиминации атретических фолликулов (Gregoraszcuk E.L.) [53,54].

При изучении секреторной активности (инсулиноподобный фактор) гранулезных клеток яичников под действием токсиканта выявлены пролиферация и апоптоз гранулезных клеток через гормональные и внутриклеточные пептиды, такие как циклин и каспаза. Длительное воздействие этого же вещества приводит к стойкой репродуктивной дисфункции, включающую снижение фертильности, раннее наступление менархе [55,56]. Негативное влияние на организм человека диоксина, результата выброса хлорорганических соединений, проявляется снижением продукции половых гормонов, их метаболизмом и выведением, что приводит к бесплодию у обоих полов [57]. Влияние фталатов привело к замедлению

секреции прогестерона, увеличению апоптозных гранулезных клеток. Метилпаратион, дикофол и другие органохлоридные пестициды могут вызывать нарушения менструального цикла [58,59]. Установлено, что длительный контакт с химикатом, приводит к изменениям эндокринной функции яичников, повышает рост необратимых клеточных аномалий и задержку нормальной пролиферации клеток. Результаты исследований дихлордифенилдихлорэтилена показали снижение способности к оплодотворению яйцеклеток и нарушение имплантации эмбрионов. Влияние пестицида карбендазима вызывает хромосомные мутации в течение эмбриогенеза, снижение имплантации, выкидыши и эмбриолетальность. Действие эпоксид гептахлора проявилось нарушением менструального цикла в виде удлинения или укорочения фаз, с признаками ановуляции [60,61,62]. Отмечается роль пестицидов на неблагоприятный исход родов. В плаценте у женщин, имеющих производственный контакт с химикатами, обнаружены массивные отложения фибриноида в области базальной пластинки и плодовой части, коллагенизация стромы и бедность кровеносными сосудами стволовых и концевых ворсин, сужения межворсинчатого пространства, удлинения гестационного периода, сокращение площади эндометрия с миометрием, уменьшение диаметра ооцитов в примордиальных фолликулах [63].

Исследования показали высокий уровень содержания экопеллутанта у женщин с повторяющимися выкидышами по сравнению с контрольной группой. Так и при исследовании случаев преждевременных родов было обнаружено высокое содержание пестицида в материнской и пуповинной крови [64,65]. Плетенева Т.В. (2013) обобщив имеющиеся научные данные по хлорсодержащим пестицидам, представила следующие их свойства:

- способны к биоаккумуляции в пищевых цепях за счет высокой липофильности;
- обладают неограниченной миграцией, вплоть до территорий, удаленных на тысячи километров от ближайшего источника использования;
- обладают чрезвычайной устойчивостью к физическим, химическим и биологическим воздействиям;
- обладают высокой токсичностью в низких концентрациях для живых организмов всех иерархических уровней.

Таким образом, анализ изученных данных свидетельствует о том, что пестициды обладают устойчивостью к разложению; токсичностью; распространяются на сотни и тысячи километров; накапливаются в различных органах и системах. Влекут за собой нарушения иммунной системы, вызывают рост числа онкологических заболеваний, увеличивают процент патологии беременности, увеличивают рост спонтанных аборт у женщин, проявляются в последующих поколениях, приводят к компенсаторной яичниковой гипертрофии, снижению количества здоровых фолликулов, увеличению атретических фолликулов, влияя на секрецию гонадотропинов и, нарушая репродуктивный цикл, приводят к бесплодию.

Из целого ряда пестицидов, особой активностью отличаются хлорорганические пестициды, для которых характерны высокая персистентность, продолжительное сохранение ксенобиотиком биологической активности в окружающей среде: почве, атмосфере, гидросфере, растениях - и в тканях животных и человека. Персистентность характеризуется периодом полураспада соединения, который для некоторых хлорорганических пестицидов измеряется десятками лет. Они воздействуют на транспортные системы переноса через мембраны ионов натрия, калия, кальция и хлора, ингибируют ферменты и влияют на высвобождение медиаторов в нервных окончаниях. По данным ряда авторов наиболее уязвимой к воздействию хлорсодержащих пестицидов является женская репродуктивная система [66].

Наиболее агрессивным представителем из ряда хлорорганических пестицидов является гамма-гексахлорциклогексан или линдан, который по степени воздействия на организм классифицируется (Мирошниченко А.Н., 2012) как чрезвычайно опасное вещество [67]. Линдан является хлорорганическим инсектицидом широкого спектра, на рынке с 1938 года, этот продукт нашел применение в обработке древесины и деревянных конструкций, семян зерновых, плодовых и овощных культур, в приманках для борьбы с грызунами, а также для лечения чесотки (клещи) и вшей [68]. Линдан (гамма-гексахлорциклогексан) и его изомеры являются хлорорганическими соединениями пестицидов, которые представляют собой коричневатый-белый кристаллический порошок с резким запахом (рисунок 1) [69]. Он крайне опасен для человека и вреден для окружающей среды. Отравление линданом, как и другими поллютантами содержащимися в окружающей среде, происходит в основном пероральным путем, кожу и путем вдыхания паров [70,71]. Химикат быстро всасывается из желудочно-кишечного тракта, и начинает всесторонне распространяться по организму. Особенностями их негативного воздействия на организм является то, что эти вещества могут аккумулироваться в организме длительное время и оказывать постепенный эффект или отражаться на здоровье потомства [72,73]. 90% линдана в первую очередь поступает в организм человека вместе с пищей. Изомеры ГХЦГ были измерены в молочных продуктах, в говядине, рыбе, птице, фруктах, овощах, маслах и жирах, а также в сахаре. Наиболее высокие уровни альфа и бета-изомеров были обнаружены в специях и ароматических растениях, в то время как в животном жире были выявлены самые высокие уровни гамма-ГХЦГ. В некоторых странах, например, в Израиле в молочных продуктах содержание концентрации линдана было в 100 раз выше, чем измеренный в подобных продуктах в Соединенных Штатах [74].

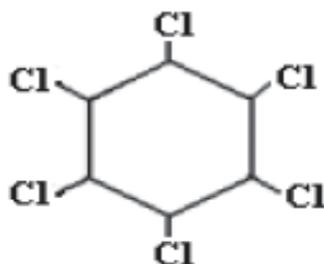


Рисунок 1 – Химическая структура гамма-гексахлорциклогексана.

По данным экспериментальных исследований, линдан, накапливаясь в организме, оказывает вредное действие на различные органы и системы в разные стадии жизненного цикла [75]. Линдан может вызвать повреждение печени, нервной системы, яичников и семенников. Кроме того, линдан классифицируется как вероятный канцероген для человека на основе развития рака у облученных лабораторных животных [76,77,78,79]. Рядом авторов было установлено, что длительное пероральное введение линдана самкам грызунов приводит к накоплению химиката в органах репродуктивной системы, что приводит к изменениям эндокринной физиологии яичников. Изучение влияния линдана на развивающиеся ооциты в *in vivo* показало рост необратимых клеточных аномалий и задержку нормальной пролиферации, а в *in vitro* условиях линдан угнетал тестикулярный стереодогенез, что приводило к снижению продукции тестостерона [80]. Линдан – органический пестицид, который характеризуется как вещество, изменяющее различные функции репродуктивной системы у млекопитающих. Так было выявлено изменение в формировании первого мейотического веретена деления и экстрезии первого полярного тела, что свидетельствовало о действии пестицида на общие внутриклеточные мишени [81].

К большому сожалению, как было уже сказано выше, данный химикат активно применялся в агропромышленности Приаралья с целью выращивания агрокультур еще в 60е годы. И в настоящее время мы имеем плачевный результат, изучая воздействие пылевых частиц со дна моря на здоровье населения. Наряду с исследованием окружающей среды и побочного действия токсикантов на здоровье, катастрофа Аральского моря привлекла большой круг ученых с целью реализации различных проектов по спасению моря и стабилизации экологической обстановки [82]. В 1992 году Правительством Республики Казахстан принят закон «О социальной защите граждан, пострадавших вследствие экологического бедствия в Приаралье», в связи, с чем для рационального внедрения проектов по охране здоровья и принятия, профилактических мер, определены границы территории:

1. Зона экологической катастрофы (Арал, Казалы, Шалкар)
2. Зона экологического кризиса (некоторые районы Кызылординской области)

### 3. Регионы, близлежащие к экологическому кризису (Байганин, Иргиз, Мугалжар, Темир)

Шалкарский район, несмотря на то, что территориально входит в состав Актюбинской области (Западный Казахстан), как видно из границ деления территории, относится к зоне экологической катастрофы, так как находится близко к Аральскому морю. Район, занимающий площадь 62 200 км<sup>2</sup>, имеет население 27 399 человек. Промышленность района в основном связана с сетью нефте- и газопроводов АО «Казтрансойл», АО «Казтрансгаз», Каспийского трубопроводного консорциума, а также линий электропередач Единой энергетической системы Казахстана. Функционируют множество тепло и газотурбинных электростанций. Географическое положение района характеризуется степными равнинами, средняя температура зимой -42°C, летом +43°C. Районный центр, г. Шалкар, имеет городскую инфраструктуру. Все эти данные исследователям необходимо учитывать при изучении различных аспектов здоровья населения региона.

Таким образом, анализ имеющейся литературы, проведенных многочисленных исследований по проблеме Арала, показал, что до сих пор в регионе сохраняется напряженная экологическая обстановка в условиях которого показатель здоровья населения ниже показателей других регионов. Способность превалирующих в окружающей среде хлорсодержащих пестицидов пагубно отражается на репродуктивном здоровье женщин, на здоровье детей и подростков. Поэтому исследование состояния половых эндокринных желез женщины является ключевым моментом в подобных научных исследованиях.

#### **1.1 Морфофункциональная характеристика яичников как центральное звено репродуктивной системы**

Для понимания возникающих структурных и функциональных изменений в репродуктивной системе женщины, в первую очередь необходимо полное понимание современных представлений морфологии и функции ее ключевых звеньев. По данным Никитиной И.Л. [83] женская репродуктивная система человека включает совокупность органов и систем, функциональное взаимодействие которых регулируется лигандрецепторными взаимоотношениями в пределах организованной гипоталамо-гипофизарно-яичниковой системы. Это значит, что все циклически протекающие в организме женщины процессы строго зависимы и контролируются данной системой, и так же как все эндокринные органы функционируют по принципу «+» «-» обратная связь.

Как известно женская репродуктивная система, представленная внутренними половыми органами: яичники, матка, маточные трубы, влагалище и наружными половыми органами: женская половая область и клитор, выполняет ряд важных функций. Это секреторная, транспортная (передвижение гамет и эмбрионов), функция родовых путей, защитная (инфекции) [84, 85].

Ключевым звеном данной системы являются яичники. Они имеют размер 4,0-2,5-1,5 см, снаружи покрыты однослойным кубическим (зародышевым) эпителием, под которым расположена соединительнотканная белочная оболочка. Под белочной оболочкой располагается паренхима яичника, в которой различают корковое и мозговое вещество. Корковое вещество состоит из тесно расположенных веретеновидных клеток, напоминающих набухшие фибробласты, межклеточного вещества в нем мало, а в тонкой внешней зоне этого вещества прослеживается полоса коллагеновой стромы, которая содержит относительно мало клеток. Во внутренней зоне коркового вещества яичников располагаются фолликулы, являющиеся основной структурно-функциональной единицей. Согласно Международной гистологической номенклатуре фолликулы подразделяются на примордиальные, первичные, вторичные и третичные [86,87]. Примордиальные фолликулы и спиралевидные артерии начинают развиваться с периода полового созревания.

Специалисты, всесторонне исследуя орган, для прогнозирования фертильности, внедрения вспомогательных репродуктивных технологий используют различные данные. К примеру, широко используется классификация строения яичников Даниловой Р.К., Борового Т.Г. (2003), в которой авторами предлагаются 3 типа строения яичников: нормопластический, гипопластический и гиперпластический. При нормопластическом типе отмечается большое количество примордиальных фолликулов, а также атрезия отдельных зреющих фолликулов. Гипопластический тип имеет признаки эмбрионального состояния, без явлений созревания и атрезии фолликулов. Гиперпластический тип строения яичников характеризуется усиленными процессами созревания и кистозной атрезии большого числа фолликулов с выраженной гиперплазией межклеточной ткани на фоне выраженной гиперемии органа [88].

Распределение фолликул в корковом веществе имеет строгую специфичность, так в репродуктивном периоде примордиальные фолликулы располагаются периферийно, а зреющие в более глубоких зонах коркового вещества. Известно, что примордиальный фолликул состоит из окруженного одним слоем плоских фолликулярных клеток ооцита 1 порядка, который сохраняется в данной стадии до наступления овуляции, и даже могут сохраняться десятилетиями. Установлено, что количество примордиальных фолликулов может косвенно определять возраст женщины, так как их количество варьирует от возраста [89]. Немаловажное значение в исследованиях имеет также определение толщины слоев. Установлено, что толщина коркового вещества от рождения до репродуктивного периода онтогенеза непрерывно возрастает, а затем происходит уменьшение медленным темпом. Если говорить о толщине мозгового вещества, ее самый наименьший показатель оказался в период новорожденности, а наибольший – в период старости. Мозговое вещество яичников представлено рыхлой соединительной тканью. Вокруг сосудов и нервных стволиков нередко определяются небольшие пучки из округлых или полигональных клеток эпителиоидного вида. Значит, изменение соотношения

коркового и мозгового вещества в фертильном возрасте может служить показателем функционального состояния органа [90]. Основными структурами яичника являются ооцит и гранулезные клетки. Источниками циклически продуцируемых яичниками гормонов являются соматические клетки овариальных фолликулов, называемые гранулезными клетками [91]. Гранулезные клетки в примордиальных фолликулах небольших размеров, в дальнейшем происходит увеличение их числа и размеров. Формируя несколько слоев, они приобретают кубическую или цилиндрическую формы. Ооцит - основа структурного и функционального единства фолликулярного комплекса. На ранних этапах фолликулогенеза динамика размеров ооцита пропорциональна росту фолликула. Первичные фолликулы образуются ооцитами 1 порядка, окруженных несколькими слоями фолликулярных клеток кубической, цилиндрической или округлой формы [92]. Фолликулярные клетки продуцируют мукополисахариды, окружающие ооцит формирующие так называемую *zona pellucida*. *Zona pellucida* представляет собой зону трофического и информационного контакта ооцита и фолликулоцитов. Вскоре после начала пролиферации гранулезных клеток в первичном фолликуле начинаются изменения в окружающей его строме. По мере созревания фолликула веретенообразные клетки слоями окружают фолликул, увеличиваются в объеме, становятся эпителиоидными, приобретают органеллы, характерные для стероидогенных клеток – формируется *theca interna*. По периферии остаются слои веретенообразных клеток, сливающиеся со стромой – *theca externa*. Происходит увеличение количества кровеносных сосудов, доходящих до базальной мембраны. Пролиферация гранулезных клеток, дифференциация и гипертрофия тека клеток, рост ооцита ведут к увеличению диаметра фолликула. При диаметре фолликула 100-200 мкм среди клеток гранулезы появляются скопления жидкости, которые, увеличиваясь, формируют полость фолликула [93]. С этого момента фолликул называется вторичным. В яичнике происходит одновременное развитие нескольких полостных фолликулов, но только один из них становится доминантным. Третичный фолликул быстро растет за счет накопления жидкости в полости. Он имеет максимальные размеры, крупную полость, заполненную фолликулярной жидкостью, эксцентрично расположенный ооцит, окруженный 2-3 слоями образующих яйценосный бугорок гранулезных клеток, высокую митотическую активность фолликулоцитов [94]. Зрелый, или везикулярный, фолликул представляет собой пузырь диаметром 15-20 мм, заполненный жидкостью и содержащий в толще своего многослойного эпителия – гранулезы – ооцит первого порядка, который после первого деления становится ооцитом второго порядка. Стенка зрелого овариального фолликула состоит из трех слоев: гранулезной оболочки, внутренней теки и внешней теки. Их координированные изменения обеспечивают течение этапов гамето-, фолликуло- и стероидогенеза, а также овуляции и формирования желтых тел [95].

Таким образом, полноценность женской репродуктивной активности зависима от функционального состояния и течения фолликулогенез, где ключевую роль играет способность гранулезных клеток обеспечивать гормональную цикличность процесса созревания ооцита. С этой целью необходим анализ проведенных исследований по детальному изучению фолликулогенеза и морфологии гранулезных клеток.

## **1.2 Современные представления фолликулогенеза и ультраструктура гранулезных клеток**

Общеизвестно, что репродуктивная система весь период своего функционирования находится под влиянием центральной нервной системы, а именно корой головного мозга, гипоталамусом, гипофизом – которые являются высшими уровнями регуляции. А низшие уровни регуляции осуществляются в первую очередь яичниками, маткой и другими органами [96,97].

По данным Назаренко Т.А. [98] начиная с пубертатного периода, в яичниках находится около 200000 первичных фолликулов. Затем идет постепенный рост фолликулов, выбор доминантного фолликула, созревание ооцита в доминантном фолликуле, овуляция и формирование желтого тела, которые являются гонадотропин-зависимым процессом. В этом процессе ведущими являются гонадотропин-рилизинг-гормоны гипоталамуса, гонадотропины гипофиза – фолликулостимулирующий гормон и лютеинизирующий гормон, гормоны яичника эстрадиол, прогестерон и гормон, вырабатываемый гранулезными клетками – Антимюллеровый гормон.

Как известно, основной функцией яичников является овуляция. Фолликулогенез и овуляция тесно связаны между собой посредством ооцитов, гранулезных клеток и тека клеток яичников. Согласно исследованиям Архипкиной Т.Л. фолликулогенез состоит из трех периодов:

- гормон-независимый,
- гормон-чувствительный,
- гормон-зависимый.

*Гормон-независимый* период характеризуется формированием пула растущих фолликулов, ростом их от стадии примордиального до стадии вторичного.

*Гормон-чувствительный* период фолликулогенеза характеризуется базальным ростом фолликулов от стадии вторичного до стадии большого антрального диаметром 1–2 мм. Рост фолликулов в эту стадию может происходить только в присутствии базальных уровней гипофизарных гонадотропинов, а именно ФСГ.

*Гормон-зависимый* период фолликулогенеза характеризуется формированием пула малых антральных фолликулов и их ростом, селекцией, созреванием доминантного фолликула и собственно овуляцией [99].

Как уже говорилось выше, гранулезные клетки являются неотъемлемой частью фолликулов, которые играют важную роль в функции яичников. Гранулезная оболочка в зрелом фолликуле многослойная, различают

фолликулоциты яйценосного бугорка, которые выполняют следующие функции:

- опорную,
- трофическую,
- регуляторную.

Наружная тека, выполняющая опорную функцию, состоит преимущественно из миофибробластов. По данным Ю. И. Афанасьева, Н. В. Бойчук (2016), во внутренней теке полостных фолликулов выделяют три функциональных слоя. Внутренний слой, выполняющий трофическую по отношению к фолликулоцитам функцию, расположен у базальной мембраны фолликула и состоит из веретенообразных клеток, характеризующихся развитой гранулярной эндоплазматической сетью, большим количеством рибосом и микропиноцитозных везикул. Средний слой внутренней теки состоит из эпителиоидного вида текоцитов, имеющих типичную для стероидных клеток ультраструктурную организацию. В каждом менструальном цикле один зрелый пузырьчатый фолликул, заполненный фолликулярной жидкостью, выпячивает поверхность яичника и разрывает его белочную оболочку. Далее под действием лютеинизирующего гормона он разрывается сам, высвобождая в брюшную полость овоцит второго порядка. И третий слой, который располагается по ходу кровеносных сосудов, необходимый для дальнейшего развития фолликулов.

Гранулезные клетки яичников играют центральную роль в стероидогенезе, которые имеют важное значение для женской репродуктивной системы (Сесconi S., 2001). Первой соматической клеткой взаимодействующей с зародышевыми клетками является гранулезная клетка или гранулезные клетки предшественники. По данным Rossi G., Canipari R. и др. [100] природа этого взаимодействия является двунаправленной и устанавливается с момента формирования фолликула и остается активной на протяжении всего периода его существования. Вторичная популяция соматических клеток, тека клеток, созревает во время поздней стадии фолликулогенеза. Во время ранней стадии фолликулогенеза гранулезные клетки и тека клетки начинают взаимодействие друг с другом через сигналы от клетки к клетке, которые в первую очередь осуществляются посредством местных паракринных и юкстакринных механизмов. Несмотря на связь с факторами роста, для поздней стадии фолликулогенеза необходимо воздействие гонадотропинов фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) и лютеинизирующий гормон (ЛГ). Лютеинизирующий гормон до преовуляторной стадии действует на тека клетки, в то время когда фолликулостимулирующий гормон активизирует гранулезные клетки вызывая стероидогенную дифференцировку. На протяжении оогенеза, между ооцитом и клетками фолликула, устанавливается сложная система взаимодействия друг с другом, что в конечном итоге приводит к приобретению соответствующей способности [101].

Фолликул яичника морфологически и функционально одно целое, в котором, компоненты соматической и зародышевой клетки близко связаны и

взаимозависимы. Согласованное развитие фолликула и ооцита приводит к количественному видоизменению в растущем ооците, необходимого для приобретения зрелости, оплодотворению и развитию эмбриона. Образование зрелого ооцита – это комплексный процесс в течение, которого зародышевые и соматические клетки поддерживают тесный союз. Рост ооцитов млекопитающих зависит от последовательных стадий развития и различных этапов у обоих типов клеток, как зародышевых, так и соматических может быть клеточно-автономным или зависеть от дифференцировки гранулезных клеток. Более того, ооцит может самостоятельно модулировать и влиять на дифференцировку гранулезной клетки и развитию нормального фолликула [102]. Паракринные факторы, высвобождающиеся из обоих типов клеток, стимулируют образование премордиальных фолликулов и также поддерживают начальные фазы роста фолликула. В то же время эти процессы зависят от связи щелевых контактов между зародышевыми и соматическими клетками. На более поздних стадиях развития фолликула, активность высвободившихся ооцитов вызывает четкий специализированный фенотип с гранулезными клетками. В свою очередь, эти клетки регулируют способность ооцита к совершенствованию через процесс мейоза и приобретению полного развития [103].

Таким образом, реализация эндокринного контроля гипоталамо-гипофизарной системы над полноценной функцией яичника строго зависима от состояния кровоснабжения органа. Функциональная несостоятельность сосудистой системы органа может повлечь за собой каскад патологических процессов приводящих к дефекту созревания, формирования и выхода созревшего ооцита. Поэтому необходимо перед исследованием изучить особенности кровоснабжения, возможные компенсаторные механизмы при его нарушении и состояние микроциркуляторного русла.

### **1.3 Особенности кровоснабжения яичников и их функциональное состояние**

Известно, что кровоснабжение яичников осуществляется в основном яичниковой артерией и яичниковой ветвью маточной артерии. Сапин М.Р. [104] объединив многочисленные исследования по изучению кровоснабжения органа, представил 3 типа кровоснабжения яичников: первый в 51% случаев яичник равномерно кровоснабжается из маточной и яичниковой артерии, второй в 11%, преимущественно из ветви маточной артерии, третий в 38%, преимущественно из яичниковой артерии.

Митьков В.В., Медведев М.Б. (1997) на основании ангиографии выделяют 4 типа кровоснабжения яичников: два биартериальных и два моноартериальных. При биартериальном типе яичника он получает питание от яичниковой ветви маточной артерии и от яичниковой артерии, при этом может наблюдаться незначительное преобладание одной из них. При моноартериальном типе яичник кровоснабжается за счет яичниковой ветви

маточной артерии, которая идет вдоль ворот яичника и отдает ему веточки, анастомозируя в воронко-тазовой связке с яичниковой артерией, либо при другом варианте, яичник получает питание исключительно из яичниковой артерии. Так, при пересечении маточной трубы, полноценное кровоснабжение яичников будет зависеть от того, из какой артерии происходит их преимущественное кровоснабжение [105].

Многочисленные исследования показали, что морфогенетические преобразования в яичнике сопровождаются изменениями его гемодинамики. В яичнике существует высокий градиент в распределении кровеносных сосудов с преимущественной их локализацией в глубоких слоях коры и мозговом веществе. Macchiarelli G., Jiang J.Y [106] предполагают, что в инициации роста фолликула важен контакт примордиального фолликула с сосудами: вступившие в рост фолликулы перемещаются из поверхностных в более глубокие слои коры, поскольку для продолжения своего развития нуждаются в хорошей васкуляризации. Вокруг крупных фолликулов наблюдается более густая сосудистая сеть, чем в корковом веществе яичников. Динамичность сосудистого русла сохраняется и при атрезии фолликулов, однако показатели их васкуляризации значительно ниже.

Такие процессы, как фолликулогенез, овуляция и образование желтого тела, тесно связаны с циклическим ростом капиллярных сосудов, т.е. ангиогенезом, а также структурными и функциональными изменениями микроциркуляции яичников. Среди факторов ангиогенеза фактор роста эндотелия сосудов играет важную роль в процессе фолликулярного ремоделирования сосудов.

Ангиогенез – это процесс образования новых кровеносных сосудов в органе или ткани (Кушнарева Е.А., 2004, Соколов Д.И., 2007, Макеев О.Г., 2010, Шурыгин М.Г., 2013). По данным Jarvela I.Y., Sladkevicius P. и соавторов [107], созревание и регрессия сосуда не только влияют на общий кровоток яичников в разные фазы менструального цикла, а, самое главное, играют решающую роль в определении доминантного фолликула, овуляции и функции желтого тела. Спринджук М.В. [108] представляет физиологический ангиогенез как тканевый ответ на гормональную стимуляцию в репродуктивной системе, а также на изменение окружающей среды, при котором ткань способна расширять сосудистую сеть в ответ на ишемию. Изучение сосудистых изменений, как в самих яичниках, так и фолликулах, и в желтом теле, дает важную информацию о нормальных и патологических состояниях яичников [109,110].

Установлено, что при нарушениях гемодинамики в органах репродуктивной системы отмечается снижение овариального стероидогенеза при различных формах недостаточности яичников. Снижение внутрияичникового кровотока в ранней фолликулярной фазе менструального цикла сопровождается нарушением лютеогенеза в последующем. Так Ниаури Д.А., Джемлиханова Л.Х. [111] показали, что с увеличением возраста у женщин

происходит возрастание показателей периферического сосудистого сопротивления и снижение значений скорости кровотока в яичниках.

На сегодняшний день широко распространенным методом в исследовании гемодинамики яичников во время менструального цикла является доплерография сосудов [112,113]. Допплерография является одним из наилучших методов, оценки фолликулярного состояния во время овуляции, и имеет преимущество неинвазивности, которое позволяет трансвагинально исследовать сосудистые изменения яичников у женщин с нормальным менструальным циклом [114,115,116,117,118]. Цветовое доплеровское картирование дает четкую картину соотношения скорости и турбулентности внутри сосуда. Учитывая, что в яичниковой артерии, скорость потока является низкой, то и сопротивление будет изменяться в зависимости от фазы цикла. Мощность доплерографии лучше подходит для изучения стромальных сосудов яичников, так как является более чувствительной к низким скоростям кровотока [119]. Для анализа скорости потока крови используются значения: индекс пульсации и индекс резистентности (RI), результаты которых дают точные данные о кровообращении в сосудах яичника. По данным Cil A.p., Karabulut A.A. [120] наиболее точным параметром измерения является пульсационный индекс (PI), описывающий изменения в пульсации и периферическое сопротивление, которые обратно пропорциональны потоку. Цветовое доплеровское картирование (ЦДК) – совмещение двухмерной эхоимпульсной и цветовой информации о скоростях потоков крови в исследуемых органах, благодаря высокой разрешающей способности, дает возможность визуализировать и идентифицировать мельчайшие сосуды микроциркуляторного русла. Метод незаменим в диагностике большого количества патологических состояний, препятствующих нормальному функционированию внутренних половых органов. Без ультразвуковой доплерографии, оценка патологических изменений невозможна [121].

Таким образом, детально изучив теоретические основы морфологии железы, большое количество исследований демонстрирующих ключевые звенья фолликулогенеза; зависимость функции от состояния кровоснабжения, исследователь начинает приближаться к понятию «овариальный резерв». Данное понятие имеет в настоящее время высокую актуальность в связи с внедрением в практическое здравоохранение высоких вспомогательных технологий.

#### **1.4 Понятие овариального резерва и определяющих его основных маркеров.**

В современной репродуктологии изучение овариального резерва занимает весомое положение, как основного прогностического индикатора функционального состояния яичников женщины. Под овариальным резервом по данным Н.Г. Мишиевой (2008) понимают функциональный резерв яичника, который определяет способность последнего к развитию здорового фолликула с

полноценной яйцеклеткой и его ответ на овариальную стимуляцию. Другими словами, овариальный резерв является показателем репродуктивного возраста женщины. Что же предполагается под понятием репродуктивный возраст, и какое место занимает в нем овариальный резерв? По данным Айламазян Э.К.,(2015) репродуктивный возраст это продолжительность функциональной активности репродуктивной системы генетически закодирована на период, который является оптимальным для зачатия, вынашивания и вскармливания ребенка. Данный период занимает промежуток времени от 16-17 до 45 лет. Функция репродуктивной системы направлена на регуляцию овуляторного менструального цикла. К 45 годам репродуктивная активность угасает, а к 55 уже угасает гормональная активность репродуктивной системы.

Несмотря на такой возрастной диапазон, ученые все таки подчеркивают, что репродуктивная активность женщины зависит от многих факторов, начиная от соматического состояния заканчивая окружающей обстановкой где проживает женщина. Sarwat J.,Sadiqa S. и др., (2016) отмечают, что пик репродуктивного потенциала достигается к 20 годам, в 27-28 лет отмечается незначительное снижение, которое к 35 и 40 годам проявляется более выражено, а к 45 годам репродуктивная способность приближается к нулю [122, 123]. Как известно, из 2-4 млн. имеющихся при рождении примордиальных фолликулов достигают пубертатного возраста в количестве примерно 270 000–470 000 фолликулов, и только около 400 из них достигают конечных этапов фолликулогенеза и овулируют, что необходимо для фертильности женщины в течение всего репродуктивного возраста. Остальные фолликулы подвергаются атрезии. Фолликулы, выйдя из состояния покоя, начинают расти и в дальнейшем либо подвергаются атрезии, либо доходят до овуляции. Поэтому овариальный резерв отражает количество находящихся в яичниках фолликулов (примордиальный пул и растущие фолликулы) и зависит от физиологических и патофизиологических факторов [124]. Запас яичников является основным указателем на возможность рождаемости. Возраст считается самым важным фактором в определении качества и количества овариальной возможности [125, 98, с.23, 126]. Овариальный запас - это способность яичников обеспечивать организм яйцеклетками, которые способны к оплодотворению.

По данным Beltadze K., Barbakadze L. [127] овариальный резерв является важным фактором, предсказывающий исход вспомогательных репродуктивных технологий. Так как, представляя часть репродуктивной системы, характеризует ее функциональное состояние и оценивается с помощью биохимических и ультразвуковых параметров, морфологически описывает величину пула примордиальных фолликулов, функциональные способности яичников продуцировать фолликулы под воздействием гонадотропинов, содержащие качественные ооциты [128]. Идеальные параметры овариального резерва должны быть легко измеримы, минимально инвазивны, недорогими и должны иметь хорошее прогностическое значение [129].

Основными критериями овариального резерва являются: 1) возраст; 2) объем яичников; 3) количество антральных фолликулов; 4) уровни антимюллера гормона (АМГ) и 5) ФСГ [130].

Мишиева Н.Г., Назаренко Т.А., и др. предлагают оценивать овариальный резерв в зависимости от уровней: нормальный и сниженный [131]. *Нормальный овариальный резерв* – это регулярный менструальный цикл – 28-30 дней, уровень ФСГ не более 10 МЕ/мл, уровень АМГ не менее 1,0 нг/мл, объем яичников не менее 5см<sup>3</sup>, число антральных фолликулов не менее 5 в каждом яичнике. *Сниженный овариальный резерв* – это укорочение менструального цикла на 2-3 дня, повышение уровня ФСГ >15МЕ/м, уровень АМГ <1,0 нг/мл, объем яичников от 3 до 5см<sup>3</sup>, число антральных фолликулов не более 3 в каждом яичнике. Данные показатели помогают оценить состояние резерва при обследовании женщин и имеют большое практическое значение. Исследователь ставит перед собой цель акцентировать внимание только на значимые индикаторы в обследовании: объем яичника, подсчет антральных фолликулов и определение уровня гормонов. Первые два показателя легко определимы в настоящее время с помощью ультразвукового исследования. Jung S.I. как большинство исследователей подчеркивает, что УЗИ является одним из основных методов определения морфофункционального состояния яичников, не требующий определенной подготовки [132].

В основе ультразвукового исследования используется эхолокационный принцип получения информации об изучаемых органах и структурах [133]. В процессе исследования проводится фолликулометрия – это современный анатомический метод, которое дает нам данные о процессе созревания фолликула в первой фазе менструального цикла, выявления признаков произошедшей овуляции (выхода яйцеклетки из яичника) и оценку состояния желтого тела во второй фазе цикла [134]. В репродуктивном возрасте яичники легко визуализируются при ультразвуковом исследовании по наличию фолликулов. До первой менструации и после менопаузы яичники имеют небольшие размеры, фолликулы в них не определяются, поэтому их визуализация затруднена. Яичники в норме обычно располагаются кнутри от внутренних подвздошных сосудов, отмечают любое положение, имеют овальную форму, измеряются в трех плоскостях, размеры зависят от возраста, индивидуальных особенностей, фазы менструального цикла, состоят из мозговой зоны, окруженной корковым слоем, в котором обычно обнаруживаются фолликулы. Фолликулы визуализируются в виде анэхогенных жидкостных включений, которые претерпевают циклические изменения. Мозговое вещество яичника подковообразно охватывает фолликулы и состоит из соединительной ткани, содержит много сосудов [135]. При патологиях, например как поликистоз яичников, яичники увеличены в размере, имеют сферическую форму, с более эхогенной стромой по сравнению с миометрием, по периферии и в строме отмечается множество мелких фолликулов. При опухоли яичников они обычно многокамерные содержат плотные компоненты, имеют утолщенные стенки с пристеночными разрастаниями [136].

Превосходство методики: достаточно точное выявление факта овуляции и определение ее сроков. Фолликулометрия позволяет определить полноценность фаз менструального цикла и проводится несколько раз в течение цикла [137]. Считаем необходимым повторяться о достоинствах этого метода: большая информативность, доступность, отсутствие лучевой нагрузки, возможность многократных обследований и использования в качестве скринингового метода [138].

Как было уже сказано выше, овариальный резерв также определяется двумя основными гормональными показателями: уровнем Антимюллерова (АМГ) и фолликулостимулирующего гормонов (ФСГ). Антимюллеровый гормон (АМГ) По данным Desforages-Bullet V., Gallo C. и соавторов [139] является гликопротеиновым гормоном, принадлежащим к трансформирующему фактору роста суперсемейства – b, действует на рост ткани и дифференцировку, состоящий из 535 аминокислот, с молекулярным весом 140 кДа. При активации гормона отделяется биологически активный фрагмент весом 25 кДа. Ген этого гормона у человека находится на хромосоме 19 p13.3–p13.2. Во время развития плода мужского пола АМГ синтезируется в яичках клетками Сертоли и вызывает дегенерацию Мюллеровых протоков.

На момент рождения у женщин в крови АМГ, секретлируемый гранулезными клетками, низкий, но достигает высоких значений после полового созревания. В отличие от большинства гормональных маркеров фолликулярного статуса, АМГ исключительно продуцируется гранулезными клетками преантральных и антральных фолликулов, независимо от ФСГ и имеет большое значение в развитии и созревании фолликулов, не зависит от цикла и отражает процессы в самом яичнике. Выход фолликулов из примордиального пула происходит постоянно в течение репродуктивной жизни женщины до наступления менопаузы [140,141]. Предполагают, что АМГ участвует в регуляции выхода фолликулов из состояния покоя, устанавливает темп, в котором фолликулы возобновляют мейоз, и регулирует скорость уменьшения примордиального пула. АМГ оказывает сдерживающее влияние на рост фолликула. Гранулезные клетки маленьких антральных фолликулов секретлируют АМГ как в фолликулярную жидкость, так и в кровотоки.

Определение уровня гормонов для установления овуляции проводится в первую и вторую фазы цикла. Исследователи подчеркивают, что подход к назначению определения уровня гормонов в тот или иной день цикла должен быть индивидуален в зависимости от продолжительности цикла [142,143,144, 145].

АМГ является уникальным среди известных продуктов секреции фолликула, так как в доминантном фолликуле происходит снижение его синтеза [146,147,148]. Ivana Z., Tislaric-Medenjak D. [149] указывают, что основная физиологическая роль АМГ в яичнике, направлена на ингибирование изначального набора фолликула, тем самым предотвращая слишком раннее истощение фолликулярного резерва. Концентрация АМГ постепенно в течение репродуктивного периода снижается и приближается к нулю в

менопаузе. Гюльмамедова Е.А., Трофимова Е.А. [150] акцентируют наше внимание, что АМГ абсолютно не принимает участия в гипоталамо-гипофизарно-яичниковой регуляции, а также не зависит от колебаний гонадотропинов, стероидов и ингибинов, это отражается невесомыми колебаниями уровня в сыворотке в течение менструального цикла. У женщин репродуктивного возраста оценка уровня АМГ в сыворотке самый надежный маркер овариального резерва. Даже одиночное измерение АМГ на любой день менструального цикла дает полную клиническую информацию о состоянии овариального резерва. При этом, применение пероральных контрацептивов или применение заместительной гормональной терапии на момент обследования не влияют на уровень АМГ.

По проведенным работам Боярского К.Ю. и многих других исследователей [151,152,153], стало известно, что крайне высокие уровни АМГ говорят о развитии гранулезоклеточной опухоли, а снижение его уровня является наиболее ранним и достоверным показателем старения женской репродуктивной системы. При этом базальные уровни гонадотропинов, ингибинов и прогестерона могут оставаться неизменными. Смирнова И.В. [154] в своей работе указывает, что для определения нижнего порогового значения АМГ в диагностике овариального резерва обычно используют уровень от 0,2 до 0,5 и даже 1,0 нг/мл.

Таким образом, АМГ, секретируемый растущими фолликулами и который определяется в сыворотке крови, является маркером функциональной активности яичников и диагностическим критерием сохранности фолликулярного аппарата. Кроме того, уровень АМГ коррелирует с числом антральных фолликулов, величиной пула примордиальных фолликулов и снижается с возрастом.

Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), продуцируется гипофизом, который является эндокринной железой, расположенной у основания головного мозга, регулирующий действие гормональной системы. ФСГ является наиболее часто используемым тестом для оценки овариального резерва. Определение уровня гормона на третий день цикла является наилучшим, поскольку ожидается низкий уровень эстрадиола влияющий на уровень ФСГ, связанный с отрицательной его обратной связью [155]. У женщин ФСГ стимулирует рост и созревание фолликулов яичников в раннюю фолликулярную фазу, их подготовку к овуляции, а во время поздней, когда уровень гормона снижается, играет ключевую роль в выборе доминантного фолликула [156]. У мужчин – является основным стимулятором роста семявыносящих канальцев, увеличивает концентрацию тестостерона в плазме, обеспечивая тем самым процесс созревания сперматозоидов. По химической структуре является гетеродимерным гликопротеидом с молекулярной массой 28 кД и 45 кД и состоит из  $\alpha$ - и  $\beta$  субъединиц [157]. Фолликулостимулирующий гормон имеет много функций. Он участвует в пролиферации и дифференцировке гранулезных клеток, развитии антральных фолликулов и др. Исследование

содержания фолликулостимулирующего и антимюллера гормонов являются ценными показателями состояния овариального резерва женщин [158].

Таким образом, обобщая литературный обзор, проведенный по данному исследованию, мы хотим подчеркнуть важность исследования овариального резерва женщин фертильного возраста, маркеры которого строго определены на сегодняшний день. Простота проведения ультразвукового исследования и ориентация исследования всего лишь на два гормональных показателя, дает большие возможности специалистам сделать оценку фертильной способности женщин, решить многие диагностические проблемы и разработать тактику планирования лечения с применением вспомогательных репродуктивных технологий.

## 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дизайн исследования утвержден Локальной Этической Комиссией от 8.10.2013, протокол №4 и представлен контролируемым сравнительным исследованием, экспериментальное исследование на мышах.

**2.1 Клиническая часть исследовательской работы** проводилась на базе Шалкарской Центральной Районной Больницы (ШЦРБ), Клинике красоты и здоровья «Айгерим», лабораториях ГКП Областного Перинатального Центра (ОПЦ) и «In vivo» г. Актобе.

В исследование было включено 108 женщин в возрасте от 27 до 40 лет т. к. по данным научных исследований в более старшем возрасте около 99% женщин, не способны к зачатию и рождению ребенка [159]. Данный контингент женщин проживал в городе Шалкар (зона Приаралья) в условиях воздействия хлорорганических пестицидов и городе Актобе (контрольная группа). После получения информированного согласия и утверждения протокола исследования этической комиссией ЗКГМУ имени Марата Оспанова были сформированы две исследуемые группы:

- контрольная группа - женщины г. Актобе (54),
- исследуемая группа - женщины г. Шалкара (54).

В исследование включены женщины, проживающие только в городских условиях (г. Актобе и г. Шалкар), имеющих идентичные условия проживания, характер питания, климатические условия, развитую инфраструктуру и т.д.

Для изучения овариальной способности в исследуемых группах проводили медико-социальный аудит с помощью анкетирования, интервьюирования (клинические симптомы экстрагенитальной патологии, время их появления, длительность заболевания, состояние менструальной функции и репродуктивной системы, наследственность, образ жизни и вредные привычки) и анализа медицинской документации. По результатам исследования была разработана карта обследования женщин репродуктивного возраста (приложение А). Для исключения в качестве фактора риск дефицита питания был определен индекс массы тела (ИМТ).

Индекс массы тела рассчитывали по формуле Кетле [160]:

$$I = \frac{m}{h^2}$$

где:

- $m$  — масса тела в килограммах
- $h$  — рост в метрах,

единица измерения - в кг/м<sup>2</sup>.

На основании данных карт отобраны женщины. Критерии включения в исследование: женщины с рождения, проживающие в городе Шалкар.

Критерий исключения, согласно которым женщины не включены в исследовательскую группу, вошли состояния:

- перенесенные хирургические вмешательства на органах малого таза
- неэндокринные формы бесплодия
- пороки развития половых органов
- анемия
- артериальная гипертензия
- заболевания сердца
- эндокринные заболевания (диабет, тиреотоксикоз)
- туберкулез
- индекс массы тела от 19 до 26

За время исследования из основной группы были исключены четыре женщины в связи с наступлением беременности.

### **2.1.1 Ультразвуковое исследование яичников**

В настоящее время получила развитие прижизненная анатомия различных органов и областей. Использование прижизненных методов исследования, является одним из перспективных направлений в морфологии, среди которых широкое применение получила визуализация с помощью ультразвуковой диагностики [161, 162,163].

УЗИ (ультразвуковое исследование) яичников проводилось с использованием трансабдоминального и трансвагинального сканирования на аппарате MEDISON: ACCUVIXV 10 с диапазоном центральной частоты – 50/60 Гц. Данный метод играет важную роль в оценке овариальной способности: с оценкой объема яичников и подсчетом количества антральных фолликулов [164].

УЗИ яичников проводилось на 3-5 день и на 11-13 дни менструального цикла, и вычисляются объем их на основании трёх измерений, сделанных в двух перпендикулярных плоскостях, по следующей формуле:

$$V = 0,5236 \times L \times W \times T \text{ (см}^3\text{)},$$

где: L — длина

W — ширина

T — толщина яичника (продольный, переднезадний и поперечный) размеры.

Объём яичника менее 3 см<sup>3</sup> свидетельствует о недостаточности овариальной способности [165].

Ультразвуковой подсчёт числа антральных фолликулов — наиболее точный метод оценки овариальной способности, определяется число мелких антральных фолликулов в диаметре 2–5 мм.

В своем исследовании мы использовали три варианта интерпретации показателя овариальной способности по количеству фолликулов [166]:

- неактивные яичники – менее 5 фолликулов
- нормальные – 5-12 фолликулов
- поликистозные – более 12 фолликулов

Дополнительно с помощью специального датчика на ультразвуковом аппарате нами проведено доплерографическое картирование сосудов яичника с определением: индекса резистентности, максимальной систолической скорости, минимальной диастолической скорости, пульсационного индекса. Исследование таких гемодинамических показателей являются еще одним из показателей овариальной способности яичников и дополняют сведения необходимые для оценки его состояния [167].

Индекс резистентности – количественный анализ кривых скоростей кровотока, который представляет собой отношение разности максимальной систолической и конечной диастолической скорости к максимальной систолической скорости кровотока, увеличение которого указывает на повышение циркуляторного сопротивления, а его уменьшение на снижение периферического сопротивления в бассейне лоцируемой артерии;

Пульсационный индекс – отношение разности максимальной систолической и конечной диастолической скорости кровотока к средней величине, отражающий состояние периферического сосудистого сопротивления регионарных артерий, и служит для определения функциональных изменений, происходящих в сосудистой стенке регионарных артерий.

Максимальная систолическая скорость и минимальная диастолическая скорости являются качественными показателями, отражающими наибольшую систолическую и диастолические скорости кровотока в точке локации.

### **2.1.2 Определение гормонального статуса**

Изучение овариальной способности проводили пассивным способом с помощью определения уровня фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) в сыворотке крови с использованием ИФА, а также основного маркера овариальной способности – Антимюллерова гормона (АМГ), методом иммуноферментного анализа (AMG Gen II ELISA производства Beckman Coulter, Inc. USA). Обязательным требованием перед проведением исследования явилось это взятие крови натощак.

С использованием иммуноферментного анализатора ELx808 фирмы DIALAB GmbH (Австрия) серийный номер № 250993, применены диагностические наборы: ИммуноФА-ФСГ ЗАО «НБО Иммунотех», АМН Gen II Elisa Beckman Coulter. Оценка фолликулостимулирующего гормона

проводилась двухкратно на 3-5 день и 11-13 дни менструального цикла, а Антимюллеров гормон проводился однократно в начале фолликулярной фазы, т.к. уровень данного гормона сохраняется на протяжении всего менструального цикла неизменным.

**Методика определения гормонов:** все компоненты наборов и исследуемые образцы перед проведением анализа были доведены до комнатной температуры + (20-25°C) и тщательно перемешаны. Приготовлен рабочий раствор фосфатно-солевого буферного раствора (ФСБР) из расчета: 1 объем концентрата ФСБР + 19 объемов дистиллированной воды: внесены реагенты в лунки планшета – в дубликатах 2 мкл калибровочных проб исследуемых образцов сывороток крови и в каждую лунку 100 мкл конъюгата. Перемешаны, закрыт планшет крышкой. Инкубированы 1 час при температуре +37°C (без встряхивания в шейкере). Промыты 3 раза по 250 мкл рабочего раствора ФСБР на лунку (при автоматической промывке – 300-350 мкл), тщательно удалены остатки влаги из лунок. Внесены в каждую лунку планшета 100 мкл раствора субстрата в той же последовательности, что и конъюгат. Инкубированы 10-15 мин при температуре +37°C в темноте (без встряхивания в шейкере). Внесены в каждую лунку планшета 100 мкл стоп-реагента с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата. Перемешены на шейкере в течение 1 минуты. Измерена оптическая плотность в лунках планшета при длине волны 450 нм. Построен калибровочный график и определена концентрация гормонов.

## 2.2 Экспериментальная работа

**Протокол экспериментального исследования:** Работа проведена в лаборатории Центра микроскопии Департамента жизни, здоровья и наук об окружающей среде университета Л'Акуила, Италия (Centre of Microscopy Department of Life, Health and Environmental Sciences); период с мая по июль 2014г. на 80 самках мышей, возраст 21-23 дня, весом 25-30гр., с использованием оптической и трансмиссионной электронной микроскопии. Использованы Швейцарские мыши линии – CD1, беспородные, половозрелые аутбредные альбиносы, штаммы, полученные путем скрещивания особей из разных пометов.

В качестве **объекта исследования** взяты гранулезные клетки яичников мышей. Выбор данного вида лабораторных животных обусловлен схожестью физиологии и генетики с человеческим организмом, в ускоренном процессе размножения, что является наиболее удобным при проведении серии экспериментов [168]. Животные перед экспериментом содержались в условиях карантина, затем во время эксперимента содержались со свободным доступом к воде и пище, в условиях постоянной температуры (21-22°C), с соблюдением светового режима 12/12 [169]. Уход и использование лабораторных животных проводился согласно общепринятым руководствам, все протоколы

исследования были одобрены местным Комитетом по уходу за животными (университета Л'Акуила, Италия).

Для **стимуляции фолликулогенеза** самкам за 48 часов вводили 5 ЕД сыворотки PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin) – сыворотка гонадотропина фолликулостимулирующего действия. Техника стимуляции фолликулогенеза: Фиксировали животное, в месте инъекции состригалась шерсть и дезинфицировалась. Стенку живота в нижней трети захватывали большим и указательным пальцами в складку, у основания которой производился прокол, и внутривенно вводился препарат.

**Фоллигон (Folligon)** – содержащий действующее вещество PMSG (pregnant mare serum gonadotropin) со свойствами фолликулостимулирующего (ФСГ) и лютеинизирующего (ЛГ) гормонов, (производитель Sigma Life Science, Spruce Street, St. Louis, MO, США). У самок стимулирует рост и созревание фолликулов, у самцов - развитие интерстициальных тканей семенников и сперматогенез. Лекарственная форма: лиофилизированная масса для приготовления раствора для инъекций с растворителем. Фоллигон содержит в 1 флаконе в качестве действующего вещества 1000 или 5000 МЕ гонадотропина из сыворотки жеребых кобыл (ГСЖК), в качестве вспомогательных веществ: 5 мг маннитола, 0.315 мг гидрофосфата натрия дигидрата, 0.33 мг дигидрофосфата натрия дигидрата. Растворитель в 1 мл содержит 0.63 мг гидрофосфата натрия дигидрата, 0.66 мг дигидрофосфата натрия дигидрата и 998.71 мг дистиллированной воды. По внешнему виду препарат представляет собой лиофилизированную таблетку белого цвета, растворитель – прозрачный бесцветный раствор. Сыворотка жеребых кобыл содержит гонадотропный гормон, обладающий фолликулостимулирующей (ФСГ) и лютеинизирующей (ЛГ) активностью. При попадании в организм животного связывается с ЛГ и ФСГ рецепторами органов мишеней. ФСГ вызывает рост и развитие фолликулов, ЛГ стимулирует овуляцию и образование желтого тела. При инъекционном введении максимальная концентрация гонадотропина достигается через 8 часов. Период полувыведения гормона из организма животных в зависимости от их вида составляет 34-150 часов. Фоллигон по степени воздействия на организм относится к малоопасным веществам (4 класс опасности по ГОСТ 12.1.007-76).

**Техника получения материала исследования:** Через 48 часов после стимуляции фолликулогенеза под легким эфирным наркозом проводили забой животных методом цервикальной дислокации [170].

После рассечения брюшной стенки производилось изъятие яичников, отыскивались маточные трубы, на концах которых в слое жировой клетчатки обнаруживались яичники, которые осторожно срезались. Изъятый орган под микроскопом тщательно очищали от жировой клетчатки.

После изъятия яичников органы промывались в растворе PBS - Phosphate buffered saline (фосфатный буфер – физиологический раствор с pH: 7-7.4) при 37 ° C, затем переносились в чашки для культивирования (производитель 1008, Becton Dickinson и Компания, Franklin Lakes, Нью-Джерси, США), содержащей

сбор MEM hepes - Minimum Essential Medium Eagle Modification (производитель Life Technologies Italia, Fil. Life Technologies Europe BV, Monza MB, Италия), высокой мощности буферизации. Путем многократного прокалывания яичников вылущивалось содержимое фолликулов и получали кучевые ооцит-клеточные комплексы [171]. Смесь перемещалась в капсулы 3001 (производитель Becton Dickinson Company, и Franklin Lakes, NJ, США).

**Выбор химического соединения и расчет его концентрации:** В качестве химического вещества был использован пестицид – линдан, его разведение в соответствующие концентрации проводилось согласно протоколам Pagès *et al.*, 2002, Scascitelli and Pacchierotti, 2003., т.е. основной целью послужило исследование его воздействия в возрастающей концентрации.

Линдан ( $\gamma$ -1,2,3,4,5,6 - гексахлорциклогексан) (производитель Sigma Life Science, Spruce Street, St. Louis, MO, USA 45548-250MG) разводили в диметилсульфоксиде (производитель Sigma Life Science, Spruce Street, St. Louis, MO, США), чтобы получить концентрации, описанные выше. Серии разведения готовились от исходного раствора ДМСО для получения конечной концентрации 1, 10 и 100  $\mu\text{M}$ , но, таким образом, чтобы не превышать максимальную концентрацию ДМСО 0,1%. Концентрация линдана для *in vitro* исследований взaimствована Ханнелоре др., 1998 [172], в диапазоне от 7,5 до 100  $\mu\text{M}$  и использована в диапазоне от 1 до 100  $\mu\text{M}$ .

**Расчет концентрации Линдана:** Для получения дозы вещества, которое будет использовано для приготовления различных концентраций Линдана (гексахлорциклогексан) берется молекулярная масса химического вещества равная – 290,83 g/mol. В качестве растворяющего вещества использован специальный растворитель в объеме – 10 mM. По данной формуле:  $Mg = mM/mW$  был проведен расчет и получена доза  $10mM/290,83 = 0,034g$  – линдана.

0,034 грамм линдана разводили в 1 мл DMSO, чтобы получить 10 mM (ммоль), из этого расчета делаем разведения, в результате которого получаем 10 mM – 1 mM 1:10000 (линдан 1  $\mu\text{M}$ ), 10 mM – 1 mM 1:1000 (линдан 10  $\mu\text{M}$ ), 10 mM – 1 mM 1:100 (линдан 100  $\mu\text{M}$ ).

Таким образом, нами исследованы 5 групп (таблица 1).

Таблица 1 – Распределение животных по экспериментальным группам

№ Группы	Варианты опыта	Количество животных
I	Контроль	10
II	Контроль с раствором (диметилсульфоксид, ДМСО)	10
III	Линдан 1 $\mu$ M	20
IV	Линдан 10 $\mu$ M	20
V	Линдан 100 $\mu$ M	20
Всего:		80

#### Этапы культивирования клеток:

Для созревания клеток была использована среда DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium (производитель GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Великобритания) 5% FBS, дополненная 2 mM L-глутамина и антибиотиками (пенициллин 100 mM и 100  $\mu$ g / ml стрептомицин) (производитель Sigma Life Science, Spruce Street, St. Louis, MO, США). В контроле с раствором ДМСО использован в концентрации 0,01%. В приготовленные чашки со средой DMEM (2,5 мл), содержащих гранулезные клетки, добавляются содержимые пробирок с линданом в различных концентрациях: контроль с DMSO, 1 mM линдан, 10 mM линдан, 100 mM линдан. После образцы помещались в термостат при 37 °C и 5% CO<sub>2</sub> в течение 24 часов. После промывания в PBS, центрифугирования и фиксирования в 2.5% глутаральдегиде (SIC, Roma, Италия) в PBS.

**Подготовка образцов** для оптической микроскопии и трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ).

ТЭМ: промывка в PBS, постфиксация с 1% тетраоксида осмия (Agar Scientific, Stansted, Великобритания) в PBS и с повторной промывкой в PBS. Гранулы помещены в 1% агар, который подвергся дегидратации в возрастающей серии спиртов (Carlo Erba реагенты, Milan, Италия).

Далее образцы фиксированы в пропиленоксиде в течение двадцати минут (BDH Italia, Milan, Италия), с последующим добавлением эпоксидной смолы (Electron Microscopy Sciences, 1560 Industry Road, Hatfield, PA, UK Великобритания). Ультратонкие срезы получены на ультрамикротоме Reichert-Jung Ultracut.

Срезы окрашены толуидиновым синим для оценки под оптическим микроскопом (Zeiss Axioskop), снимки сделаны с помощью цифровой камеры (Leica DFC 230).

Ультратонкие срезы (60-80 нм) получены на ультрамикротоме и контрастированы солями тяжелых металлов: уранилацетатом и цитратом свинца (Sic Рим, Италия). Получены микрофотографии с Zeiss EM 10 и трансмиссионной электронной микроскопией Philips CM 100 (80 кВ).

**Морфостереометрический анализ** гранулезных клеток и подсчет количества апоптозных тел проведен с помощью программного обеспечения ImageJ software; одностороннее исследование ANOVA - тест (Ezanova), программа с открытым исходным кодом для анализа и обработки изображений.

### **Определения уровня белка P53 методом белкового блоттинга.**

Клетки контрольной группы и групп подвергшихся воздействию линдана повторно суспендировали в буфере для лизиса (50 мМ Трис, pH 7,4, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА и 1% Igepal). Буфер включал в состав: ингибиторы протеазы (1мМ фенолметилсульфонилфторид, 1 мкг/мл Лейпептина и 1 мкг/мл Апротинина) и ингибиторы фосфатазы (1мМ Фторида натрия, 10мМ Пирофосфата натрия и 1мМ Ортованадата натрия).

Суспендирование проводилось в течение 20 мин с последующим трехкратным замораживанием и размораживанием. В последующем лизаты центрифугировали при 14000 xg в течение 20 мин при 4°C. Концентрацию белка в надосадочной жидкости определяли с помощью Bio-Rad Protein Assay. Белки (80 мкг/образец) подвергали восстановлению в 10% SDS-PAGE, а затем помещали в гели электроблоттинга на нитроцеллюлозной мембране толщиной 0,45 мкм (Hybond C экстра, Amersham, UK), при 100В в течение 1 ч.

Мембраны инкубировали в течение ночи при 4°C с первичными антителами: анти-P53 (SC-99, Santa Cruz Biotechnology, USA) и анти-β-тубулина (SC-5274, Santa Cruz Biotechnology, USA) (1:200), анти-фосфо-p53 (Cell Signaling Technology, USA) (1:1000). В качестве вторичного антитела конъюгированному пероксидазой козьему антителу был использован противомышинный IgG (SC-2005, Santa Cruz Biotechnology, USA) (1:5000). Белки определялись с помощью хемилюминесцентного субстрата Super Signal West Pico (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Нитроцеллюлозные мембраны исследовали с использованием системы LS2-77WL изображений Alliance (Uvitec, UK). Денситометрические показатели стандартизированы с использованием бета тубулина в качестве контроля нагрузки и рассчитаны с помощью программы NIH Image с общедоступным доменом v.1.62. Связь фосфо-p53 была впоследствии упорядочена соответственно общей сложности уровня экспрессии p53.

### **2.3 Статистическая обработка**

Математическая обработка полученных данных проводилась с помощью программы Microsoft Office Excel 2007 и пакета статистических программ «Statistica 10.0». Оценку статистической значимости различий производили с использованием при нормальном распределении парных переменных с использованием t-критерия Стьюдента и ANOVA в случае множественных независимых. При отсутствии нормального распределения и в случае парных независимых совокупностей с использованием U-критериев Манна-Уитни (Mann-Whitney). Различия во всех случаях оценивали как статистически значимые при  $p < 0,05$ . Для выявления зависимостей между изучаемыми параметрами проводили корреляционный анализ с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r).

### 3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

#### 3.1 Ультразвуковая характеристика овариальной функции яичников

При проведении ультразвукового исследования яичники лоцировались в параметральной области, отмечалось типичное расположение, размеры в пределах нормы, с ровным контуром и четкими границами, с не уплотненной капсулой.

В контрольной группе (г. Актобе) при проведении описания ультразвуковой структуры яичников были изучены особенности в начале и в конце фолликулярной фазы, а также особенности правого и левого органа. Так, в начале фолликулярной фазы объем левого яичника составил  $7.44 \pm 2.88 \text{ см}^3$  (таблица 2), что при сравнении с исследуемой группой был в 1,1 раза больше (рисунок 2). Из общего объема левого яичника корковое вещество составило 66.6%, а мозговое вещество составило 33.4%. В исследуемой группе (г. Шалкар) показатели были следующими, из общего объема левого яичника  $6.5 \pm 4.9 \text{ см}^3$ , где корковое вещество левого яичника составило 41,2% и мозговое вещество 58.7% (таблица 3). Объем правого яичника в контрольной группе исследования также был в 1,3 раза больше при сравнении с исследуемой группой и составил  $6.3 \pm 2.63 \text{ см}^3$  (таблица 2). Из общего объема правого яичника корковое вещество было 66.7%, а мозговое вещество составило 33.3%. В исследуемой группе из общего объема правого яичника  $4.7 \pm 3.59 \text{ см}^3$  корковое вещество было 42.2%, а мозговое вещество составило 57.7% (таблица 3).

В конце фолликулярной фазы в контрольной группе объем левого яичника составил  $7.61 \pm 2.25 \text{ см}^3$  (таблица 2), что при сравнении с исследуемой группой был в 1,2 раза больше (рисунок 3). Корковое вещество левого яичника составило 66.5%, а мозговое вещество составило 33.5%. Такие же показатели исследуемой группы соответствовали показателям контрольной группы исследования (таблица 3). Объем правого яичника в контрольной группе исследования был в 1,5 раза больше при сравнении с исследуемой группой и составил  $7.15 \pm 3.62 \text{ см}^3$  (таблица 2), из общего объема которого корковое вещество составило 66.8%, а мозговое вещество 33.1%. В исследуемой группе из общего объема правого яичника  $4.7 \pm 4.4 \text{ см}^3$ , корковое вещество было 34%, а мозговое вещество составило 66% (таблица 3).

Таким образом, в группах отмечается уменьшение объема яичников в исследуемой группе в сравнении с контролем, но при этом эти показатели остаются в пределах нормы. Разница в соотношении коркового и мозгового вещества желез, демонстрирует тенденцию к уменьшению объема коркового вещества в сравнении с мозговым в начале и конце фолликулярной фазы менструального цикла исследуемой группы. Сохранность объема за счет некоторого увеличения мозгового вещества связано, по-видимому, с особенностями ангиогенеза яичников.

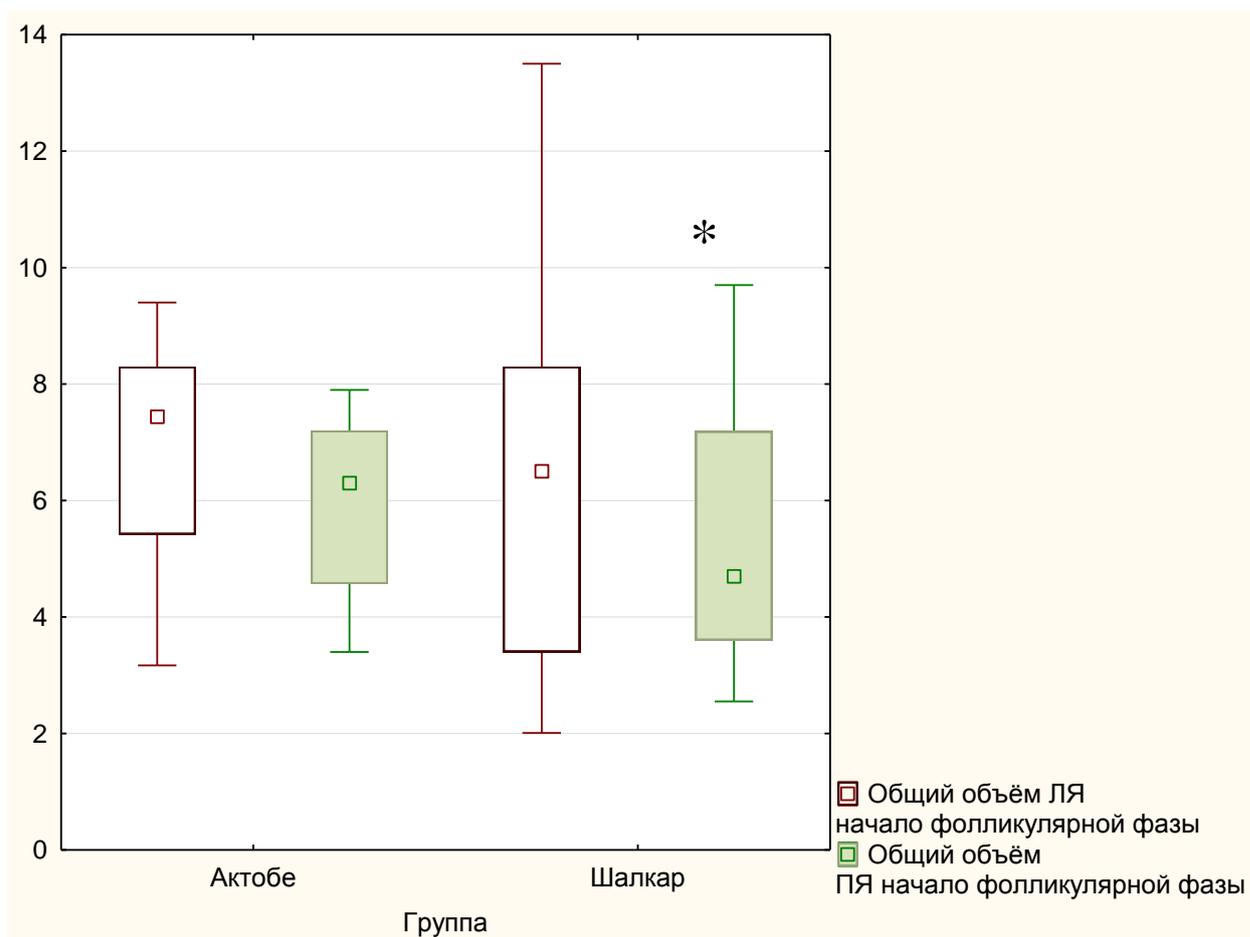
Таблица 2 – Объем яичников в контрольной и исследуемой группах исследования в начале и в конце фолликулярной фазы менструального цикла

Переменные	Исследуемая группа (Шалкар) Начало фолликулярной фазы	Контрольная группа (Актобе) Начало фолликулярной фазы	Исследуемая группа (Шалкар) Конец фолликулярной фазы	Контрольная группа (Актобе) Конец фолликулярной фазы
Правый ОЯ (См <sup>3</sup> ) Среднее ±SD	4.7±3.59*	6.3 ± 2.63	4.8±4.4	7.15 ± 3.62
Левый ОЯ (См <sup>3</sup> ) Среднее ±SD	6.5±4.9	7.44 ± 2.88	6.2±6.5	7.61 ± 2.25
Примечание *- p≤0,05 достоверность различий в сравнении с контрольной группой				

Таблица 3 – Объем коркового и мозгового веществ яичников в контрольной и исследуемой группах в начале и в конце фолликулярной фазы менструального цикла

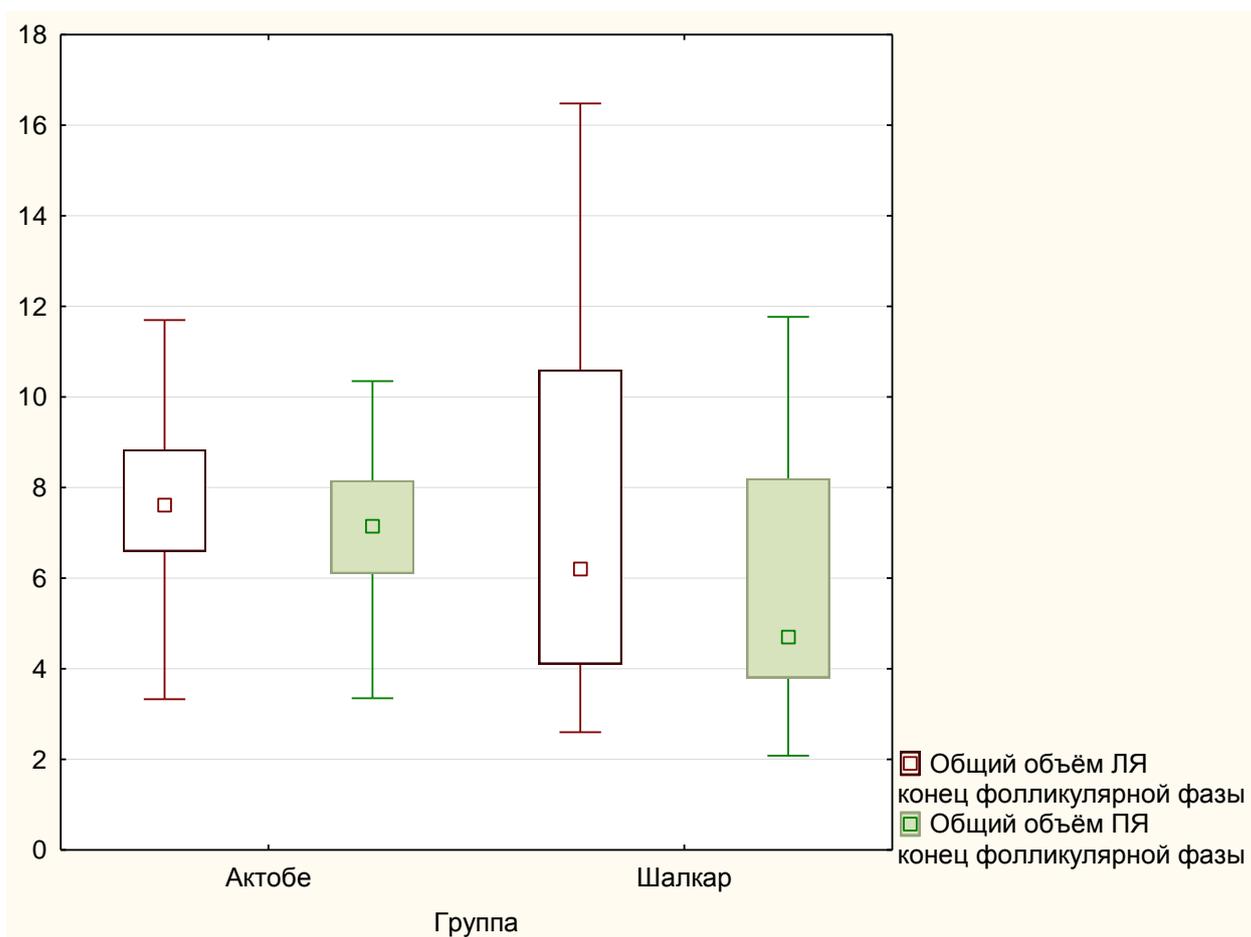
Переменные	Исследуемая группа (Шалкар) Начало фолликулярной фазы	Контрольная группа (Актобе) Начало фолликулярной фазы	Исследуемая группа (Шалкар) Конец фолликулярной фазы	Контрольная группа (Актобе) Конец фолликулярной фазы
Корковое вещество ЛЯ (См <sup>3</sup> )	2.46 ± 1.86*	4.96 ± 1.94	2.06±2.2**	5.02±1.42
Мозговое вещество ЛЯ (См <sup>3</sup> )	3.5 ±3.29*	2.48 ± 1.08	4.1±4,36**	2.53±0,62
Корковое вещество ПЯ (См <sup>3</sup> )	1.9±1,3*	4.2±1.76	1.6±1.4**	4.82±2.4
Мозговое вещество ПЯ (См <sup>3</sup> )	2.6±1.8*	2.1±0.87	3.1±2.9**	2.39±1.16
Примечание Для статистического анализа был использован U – критерий Манна-Уитни *- p≤0,05 достоверность различий в сравнении с контрольной группой (начало фолликулярной фазы) **- p≤0,05 достоверность различий в сравнении с контрольной группой (конец фолликулярной фазы)				

Рисунок 2 – Объемы левого и правого яичников в начале фолликулярной фазы в контрольной и исследуемой группах.



\*-  $p \leq 0,05$  достоверность различий в сравнении с контрольной группой

Рисунок 3 – Объемы левого и правого яичников в конце фолликулярной фазы контрольной и исследуемой группах.



Ультразвуковое изучение стромы яичника обнаружило содержание анэхогенных включений в виде антральных фолликулов в корковом веществе органа, которые, как было описано выше, являются ценным диагностическим маркером определяющим функциональное состояние органа. Антральные фолликулы визуализировались в виде округлых или овальной формы образований, четко отграниченные от окружающей стромы, расположенные преимущественно по периферии (рисунок 4).

Анализ количества антральных фолликулов показал, что **в начале фолликулярной фазы** они составили не более 5 фолликулов в контрольной группе у 29,6% исследуемых в правом яичнике и 44,4% левом яичнике (рисунок 5).

В исследуемой же группе вероятность обнаружения не более 5 антральных фолликулов в аналогичную фазу цикла был значительно выше: у 85,1% исследуемых в правом яичнике и 62,9% левом яичнике (таблица 4).

**В конце фолликулярной фазы** цикла в контрольной группе у 35,1% женщин в правом яичнике и 48,1% левом яичнике, в исследуемой группе у 81,4% женщин в правом яичнике и 74% левом яичнике определялось не более 5 антральных фолликулов (таблица 4, рисунок 6).

Таким образом, среднее количество антральных фолликулов в исследуемой группе в левом яичнике был снижен на 7.5%, в правом яичнике на 41.4% по сравнению с контрольной группой в начале фолликулярной фазы менструального цикла ( $P = 0.001$ ,  $P = 0.005$ ). В конце фолликулярной фазы в исследуемой группе количество антральных фолликулов в левом яичнике был снижен на 15%, в правом яичнике на 34.4% по сравнению с контрольной группой исследования ( $P = 0.001$ ,  $P = 0.04$ ) (таблица 5).

Таблица 4 – Количество антральных фолликулов в контрольной и исследуемой группах

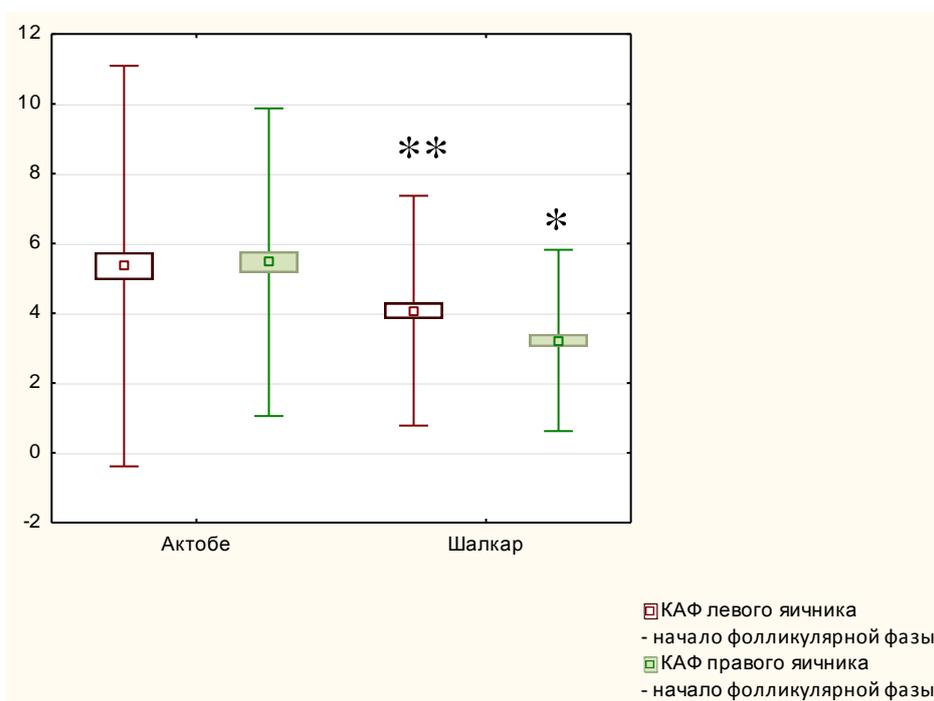
КАФ	Актобе Начало фолликулярной фазы (n-54)		Шалкар Начало фолликулярной фазы (n-54)		Актобе Конец фолликулярной фазы (n-54)		Шалкар Конец фолликулярной фазы (n-54)	
	ПЯ	ЛЯ	ПЯ	ЛЯ	ПЯ	ЛЯ	ПЯ	ЛЯ
До 5	16 (29.6%)	24 (44.4%)	45 (85.1%)	34 (62.9%)	19 (35.1%)	26 (48.1%)	44 (81.4%)	40 (74%)
5-15	38 (70.3%)	30 (55.5%)	9 (16.6%)	20 (37%)	35 (64.8%)	28 (51.8%)	10 (18.5%)	14 (26%)
15>	-	-	-	-	-	-	-	-

Таблица 5 – Количество антральных фолликулов в обеих исследуемых группах в начале и в конце фолликулярной фазы менструального цикла

Переменные	Шалкар Начало фолликулярной фазы	Актобе Начало фолликулярной фазы	Шалкар Конец фолликулярной фазы	Актобе Конец фолликулярной фазы
Правый КАФ Среднее $\pm$ SD	3.2 $\pm$ 1.29*	5.46 $\pm$ 2.2	3.3 $\pm$ 1.31**	5.03 $\pm$ 1.7
Левый КАФ Среднее $\pm$ SD	4.07 $\pm$ 1.64*	4.4 $\pm$ 1.84	3.74 $\pm$ 1.54**	4.4 $\pm$ 1.84
Примечание Для статистического анализа был использован t-критерии Стьюдента *- $p \leq 0,05$ достоверность различий в сравнении с контрольной группой (начало фолликулярной фазы) **- $p \leq 0,05$ достоверность различий в сравнении с контрольной группой (конец фолликулярной фазы)				



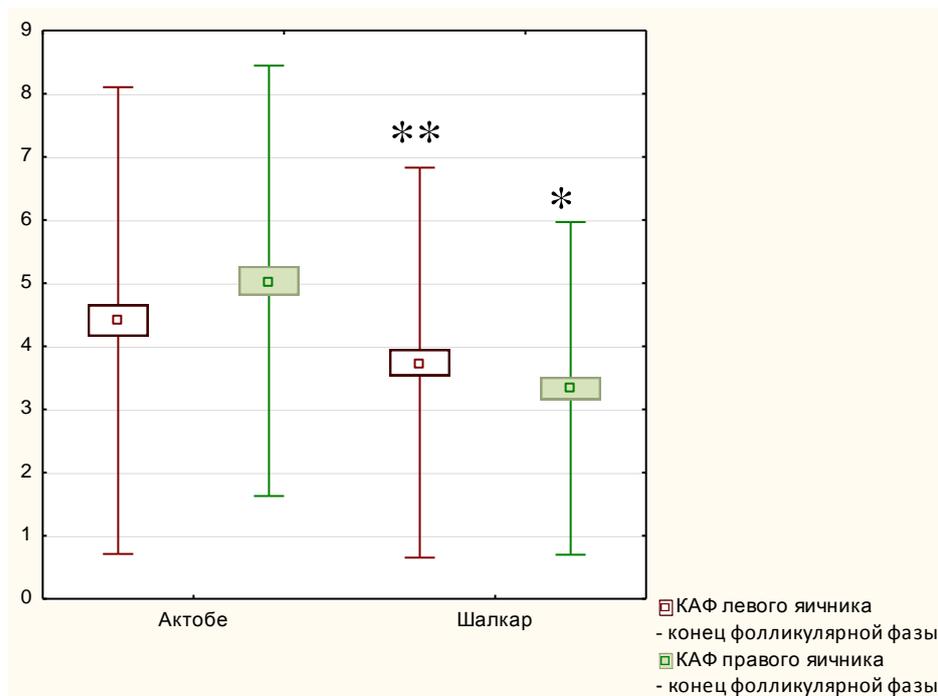
Рисунок 4 – Подсчет количества антральных фолликулов в норме.



\*- $p \leq 0,05$  достоверность различий в сравнении с контрольной группой (правый яичник)

\*\* - $p \leq 0,05$  достоверность различий в сравнении с контрольной группой (левый яичник)

Рисунок 5 – Показатели количества антральных фолликулов в начале фолликулярной фазы менструального цикла в исследуемых группах.



\*- $p \leq 0,05$  достоверность различий в сравнении с контрольной группой (правый яичник)

\*\* - $p \leq 0,05$  достоверность различий в сравнении с контрольной группой (левый яичник)

Рисунок 6 – Показатели количества антральных фолликулов в конце фолликулярной фазы менструального цикла в исследуемых группах.

При ультразвуковом исследовании мозговой слой яичников определялся в виде однородной, низкой по эхоплотности структуры, содержащее умеренное количество сосудов. При проведении исследования с помощью цветового доплеровского картирования (ЦДК) на 3-5 и 11-13 дни менструального цикла для количественной интерпретации спектральных кривых скоростей кровотока использовали такие показатели доплерометрического исследования, как индекс резистентности (ИР) и пульсационный индекс (ПИ) [173].

Показатель периферического сосудистого сопротивления – индекс резистентности (IR) стромальных артерий яичников, который характеризует внутри яичниковый кровоток, показал, в контроле в начале **фолликулярной фазы** в правом яичнике ( $0.66 \pm 0.18$ ), а в левом яичнике ( $0.60 \pm 0.14$ ) (рисунок 7).

У женщин исследуемой группы показатель индекса резистентности в правом яичнике ровнялся ( $0.54 \pm 0.10$ ), в левом ( $0.63 \pm 0.11$ ) что показало снижение на 18% ( $P < 0,05$ ).

В конце **фолликулярной фазы** показатель индекса резистентности контрольной группы составил в правом яичнике ( $0.68 \pm 0.15$ ), левом ( $0.60 \pm 0.14$ ). В исследуемой группе справа ( $0.64 \pm 0.25$ ) слева ( $0.58 \pm 0.09$ ) (рисунок 9).

Показатель пульсационного индекса (PI) контрольной группы, в правом и левом яичниках, в первую и во вторую фазу цикла  $1.34 \pm 0.77$  и  $1.15 \pm 0.55$ ,  $1.75 \pm 0.96$  и  $1.08 \pm 0.53$ ; а в исследуемой группе:  $1.44 \pm 1.1$  и  $0.94 \pm 0.09$ ,  $1.47 \pm 1.67$  и  $0.91 \pm 0.28$  (рисунок 8).

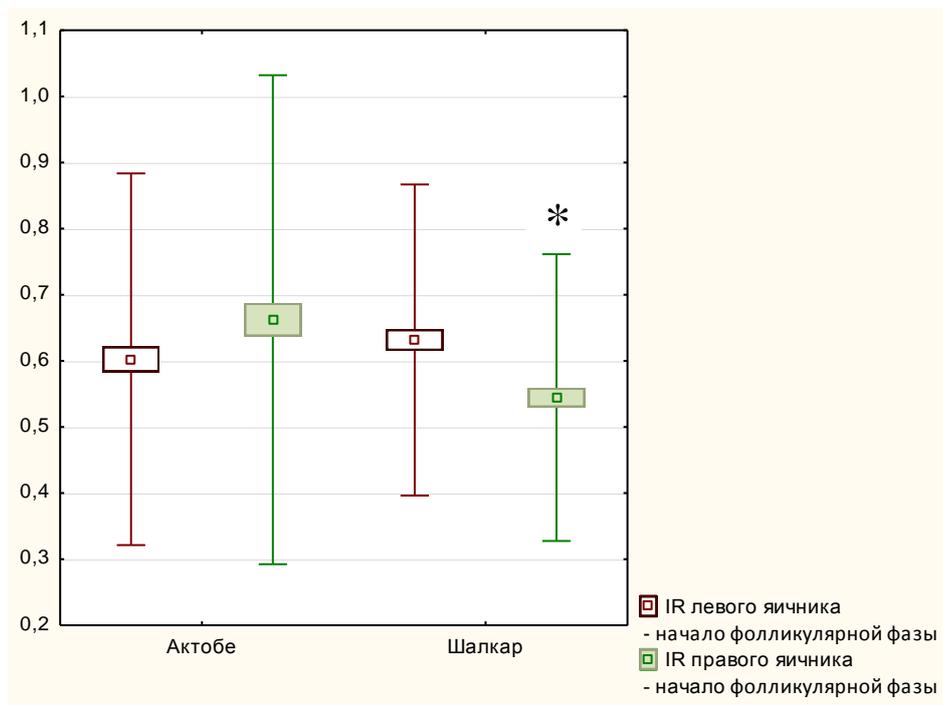
Показатели двух кратного исследования качественного максимального ( $V_{\max}$ ) и минимального ( $V_{\min}$ ) параметра кровотока обеих яичников в контрольной и основной группах выявило снижение данных в исследуемой группе, чем в контрольной группе (таблица 6,7).

В начале **фолликулярной фазы** показатель качественного параметра кровотока максимальное систолическое сопротивление правого яичника в контрольной группе исследования показал  $12,1 \pm 7,6$  cm/s, по сравнению с исследуемой группой  $10,7 \pm 2,2$  cm/s, что на 12% меньше. Этот же показатель в левом яичнике контрольной группы  $13,4 \pm 7,3$  cm/s был достоверно выше на 19% по сравнению с исследуемой группой  $10,9 \pm 1,28$  cm/s (рисунок 9).

Показатель минимального диастолического сопротивления правого яичника контрольной группы показал  $4,24 \pm 2,48$  cm/s, что на 16% снижено в сравнении с исследуемой группой  $3,55 \pm 1,6$  cm/s. Минимальное диастолическое сопротивление левого яичника в исследуемой группе равнялся  $3,6 \pm 1,16$  cm/s, что было достоверно ниже на 34% по сравнению с контрольной группой, где данный показатель равнялся  $5,44 \pm 3,1$  cm/s (рисунок 10).

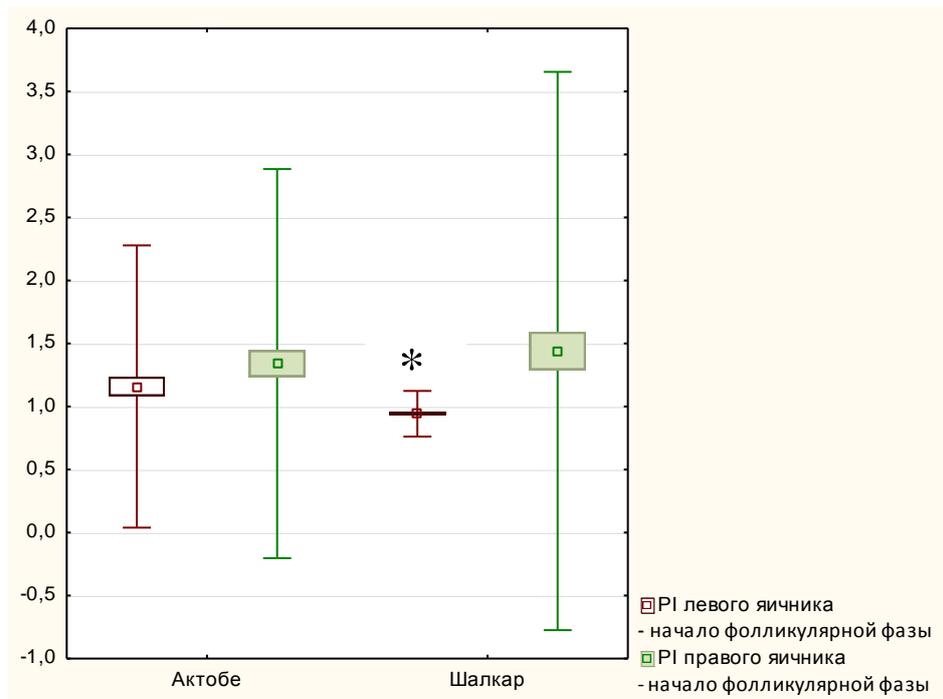
В конце **фолликулярной фазы** показатель максимального систолического сопротивления контрольной группы в правом яичнике равнялся  $15,7 \pm 5,73$  cm/s, в левом яичнике  $14,1 \pm 6,34$  cm/s; в исследуемой группе справа  $11,09 \pm 4,19$  cm/s и  $10,4 \pm 2,87$  cm/s слева, т.е. снижен на 29 и 26% соответственно (рисунок 11).

Минимальное диастолическое сопротивление в правом яичнике контрольной группы составило  $4,25 \pm 2,09$  cm/s, в исследуемой группе  $3,21 \pm 2,02$  cm/s, что показало снижение на 24,5%. В левом яичнике контрольной группы данный показатель составил  $4,93 \pm 2,84$  cm/s, а в исследуемой группе снижено на 39% и составило  $3,03 \pm 1,35$  cm/s (рисунок 12).



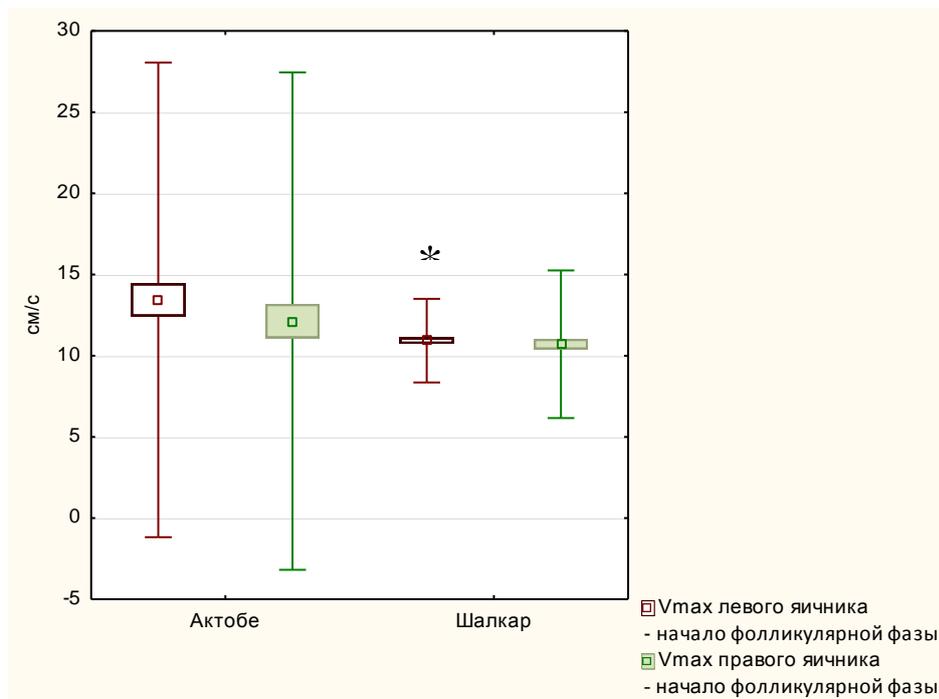
\*- $p \leq 0,05$  достоверность различий в сравнении с контрольной группой

Рисунок 7 – Показатели индекса резистентности в начале фолликулярной фазы менструального цикла в исследуемых группах.



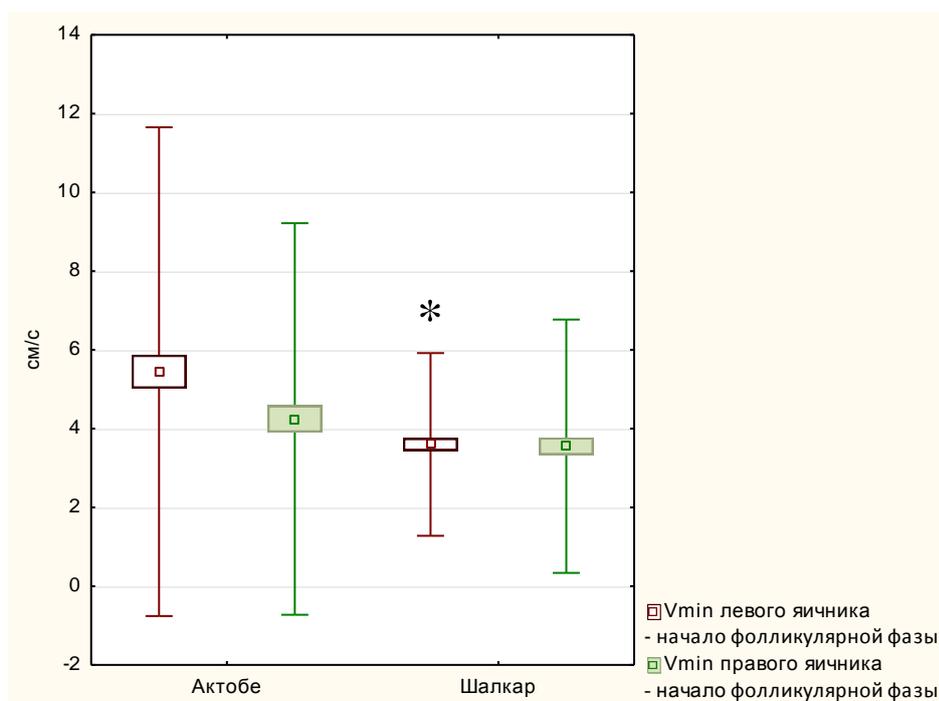
\*- $p \leq 0,05$  достоверность различий в сравнении с контрольной группой

Рисунок 8 – Показатели пульсационного индекса в начале фолликулярной фазы менструального цикла в исследуемых группах.



\*- $p \leq 0,05$  достоверность различий в сравнении с контрольной группой

Рисунок 9 – Показатели максимального систолического сопротивления в начале фолликулярной фазы менструального цикла в исследуемых группах.



\*- $p \leq 0,05$  достоверность различий в сравнении с контрольной группой

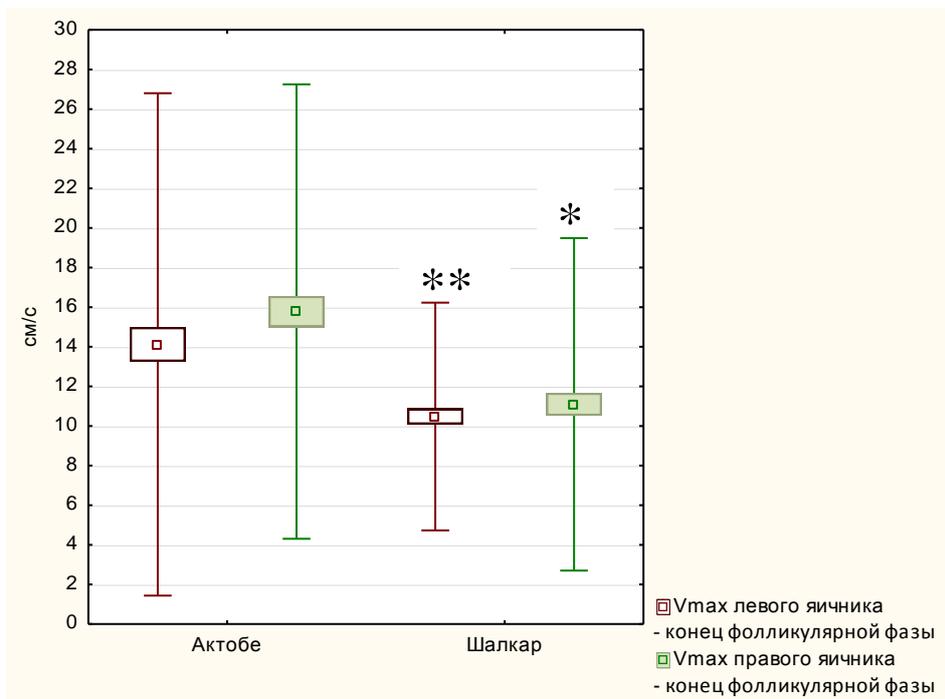
Рисунок 10 – Показатели минимального диастолического сопротивления в начале фолликулярной фазы менструального цикла в исследуемых группах.

Таблица 6 – Показатели кровотока в обеих исследуемых группах в начале фолликулярной фазы

Переменные	Исследуемая группа (Шалкар)	Контрольная группа (Актобе)	P значение
ПИ (правый) Среднее $\pm$ SD	1.44 $\pm$ 1.1	1.34 $\pm$ 0.77	НД
ПИ (левый) Среднее $\pm$ SD	0.94 $\pm$ 0.09*	1.15 $\pm$ 0.55	P = 0.005
ИР (правый) Среднее $\pm$ SD	0.54 $\pm$ 0.10*	0.66 $\pm$ 0.18	P= 0.0001
ИР (левый) Среднее $\pm$ SD	0.63 $\pm$ 0.11	0.60 $\pm$ 0.14	НД
V <sub>max</sub> (cm/s) (правый) Среднее $\pm$ SD	10.7 $\pm$ 2.2	12.1 $\pm$ 7.65	НД
V <sub>max</sub> (cm/s) (левый) Среднее $\pm$ SD	10.9 $\pm$ 1.28*	13.4 $\pm$ 7.3	P = 0.01
V <sub>min</sub> (cm/s) (правый) Среднее $\pm$ SD	3.55 $\pm$ 1.6	4.24 $\pm$ 2.48	НД
V <sub>min</sub> (cm/s) (левый) Среднее $\pm$ SD	3.6 $\pm$ 1.16*	5.44 $\pm$ 3.1	P = 0.0001
Примечание Для статистического анализа был использован t-критерии Стьюдента *- p<0,05 достоверность различий в сравнении с контрольной группой			

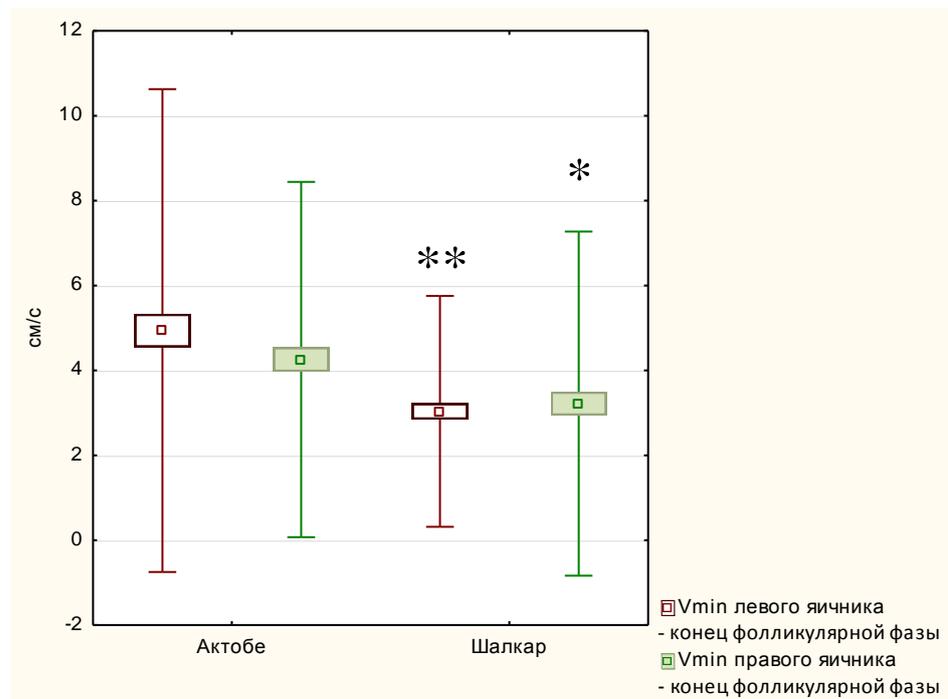
Таблица 7 – Показатели кровотока в обеих исследуемых группах в конце фолликулярной фазы

Переменные	Исследуемая группа (Шалкар)	Контрольная группа (Актобе)	Р значение
ПИ (правый) Среднее $\pm$ SD	1.47 $\pm$ 1.67	1.75 $\pm$ 0.96	НД
ПИ (левый) Среднее $\pm$ SD	0.91 $\pm$ 0.28	1.08 $\pm$ 0.53	НД
ИР (правый) Среднее $\pm$ SD	0.64 $\pm$ 0.25	0.68 $\pm$ 0.15	НД
ИР (левый) Среднее $\pm$ SD	0.58 $\pm$ 0.09	0.60 $\pm$ 0.14	НД
V <sub>max</sub> (cm/s) (правый) Среднее $\pm$ SD	11.09 $\pm$ 4.19*	15.7 $\pm$ 5.73	P = 0.0001
V <sub>max</sub> (cm/s) (левый) Среднее $\pm$ SD	10.4 $\pm$ 2.87**	14.1 $\pm$ 6.34	P = 0.0002
V <sub>min</sub> (cm/s) (правый) Среднее $\pm$ SD	3.21 $\pm$ 2.02*	4.25 $\pm$ 2.09	P = 0.01
V <sub>min</sub> (cm/s) (левый) Среднее $\pm$ SD	3.03 $\pm$ 1.35**	4.93 $\pm$ 2.84	P = 0.0001
<p>Примечание                      Для статистического анализа был использован t-критерии Стьюдента                      *- p&lt;0,05 достоверность различий в сравнении с контрольной группой (правый)                      **- p&lt;0,05 достоверность различий в сравнении с контрольной группой (левый)</p>			



\*-  $p < 0,05$  достоверность различий в сравнении с контрольной группой  
 \*\*-  $p < 0,05$  достоверность различий в сравнении с контрольной группой

Рисунок 11 – Показатели максимального систолического сопротивления в конце фолликулярной фазы менструального цикла в исследуемых группах.



\*-  $p < 0,05$  достоверность различий в сравнении с контрольной группой  
 \*\*-  $p < 0,05$  достоверность различий в сравнении с контрольной группой

Рисунок 12 – Показатели минимального диастолического сопротивления в конце фолликулярной фазы менструального цикла в исследуемых группах.

**Заключение:** Сравнительный анализ полученных результатов показывает, что в исследуемой группе объем левого яичника был снижен на 12.7%, объем правого яичника на 25.4% по сравнению с контрольной группой в начале фолликулярной фазы менструального цикла. В конце фолликулярной фазы цикла было аналогичное снижение, объем левого яичника на 18.5%, объем правого яичника 32.9% в исследуемой группе, по сравнению с контролем. При этом объем коркового вещества левого и правого яичников исследуемой группы в сравнении с контролем уменьшен в начале фолликулярной фазы на 2.01 и 2.2 раз и в конце фолликулярной фазы на 2.4 и 3.01 раз соответственно.

Количество антральных фолликулов в исследуемой группе в левом яичнике был снижен на 7.5%, в правом яичнике на 41.4% по сравнению с контрольной группой в начале фолликулярной фазы менструального цикла. В конце фолликулярной фазы в исследуемой группе количество антральных фолликулов в левом яичнике был снижен на 15%, в правом яичнике на 34.4% по сравнению с контрольной группой исследования. Эти два ценных ультразвуковых показателя: объем яичников и количество антральных фолликулов в нашем исследовании демонстрируют снижение овариального резерва в группе женщин проживающих в Приаралье, причем функциональный дефицит наиболее выражен в правом яичнике, а функция левого приближена к норме. Наряду с этими параметрами нами получено достоверное снижение, как в количественных, так и качественных показателей кровотока, особенно в конце фолликулярной фазы. Отмечается уменьшение пульсационного индекса правого и левого яичников в начале и конце фолликулярной фазы цикла (в 1,5 раза в правом яичнике в начале фазы исследования, и на 1,2 раза в обоих яичниках в конце фазы исследования); снижение индекса резистентности в исследуемой группе на 1,2 раза как справа, так и слева; а также отмечена значительная разница максимального объема кровотока справа в начале фолликулярной фазы менструального цикла.

### 3.2 Характеристика гормонального состояния яичников

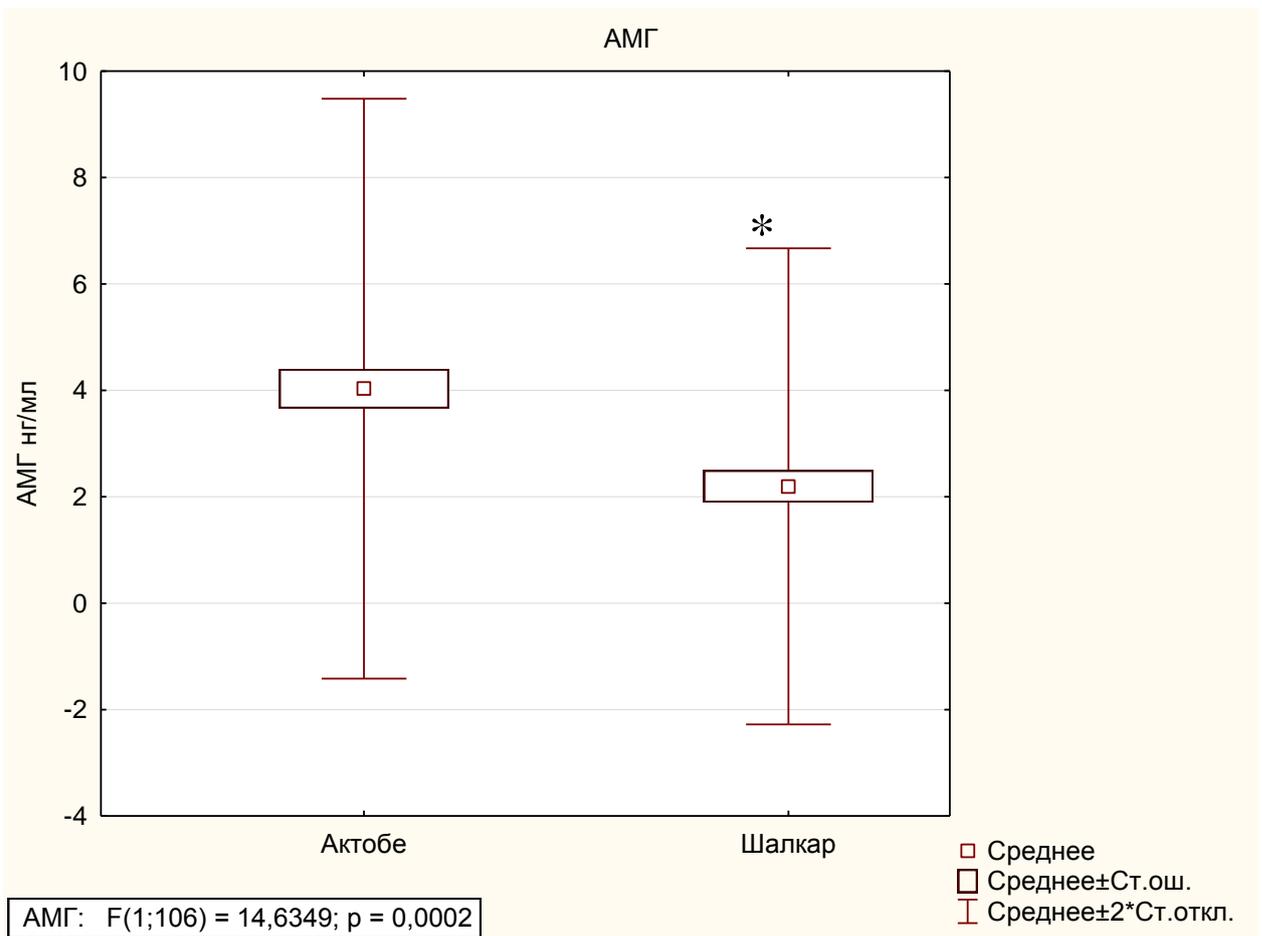
Как видно из данных таблицы 8, у женщин контрольной группы уровень Антимюллера гормона (АМГ), как наиболее раннего и информативного маркера овариальной способности [174], колебался от 0,068 до 4,98 нг/мл и в среднем составил  $3,07 \pm 1,6$  нг/мл, что было в 1,7 раза выше в сравнении с женщинами исследуемой группы, где уровень АМГ колебался от 0,014 до 2,73 нг/мл со средним значением  $1,81 \pm 1,3$  нг/мл, ( $p < 0,004$ ) (рисунок 13).

Средний уровень ФСГ в сыворотке крови в начале фолликулярной фазы цикла у женщин контрольной и исследуемой групп одинаково колебался от 3,1 до 14,5 МЕ/л и в среднем был равен  $6,1 \pm 2,9$  МЕ/л, (рисунок 14).

В конце фолликулярной фазы менструального цикла уровень ФСГ в контрольной группе колебался от 1,63 до 21,5 МЕ/л, и в среднем составил  $8,3 \pm 6,1$  МЕ/л, что было выше в 1,43 раза по сравнению с исследуемой группой женщин, где уровень ФСГ колебался от 0,3 до 11 МЕ/л, и в среднем составил  $5,8 \pm 3,2$  МЕ/л ( $p < 0,01$ ) и показал снижение на 41% (рисунок 14).

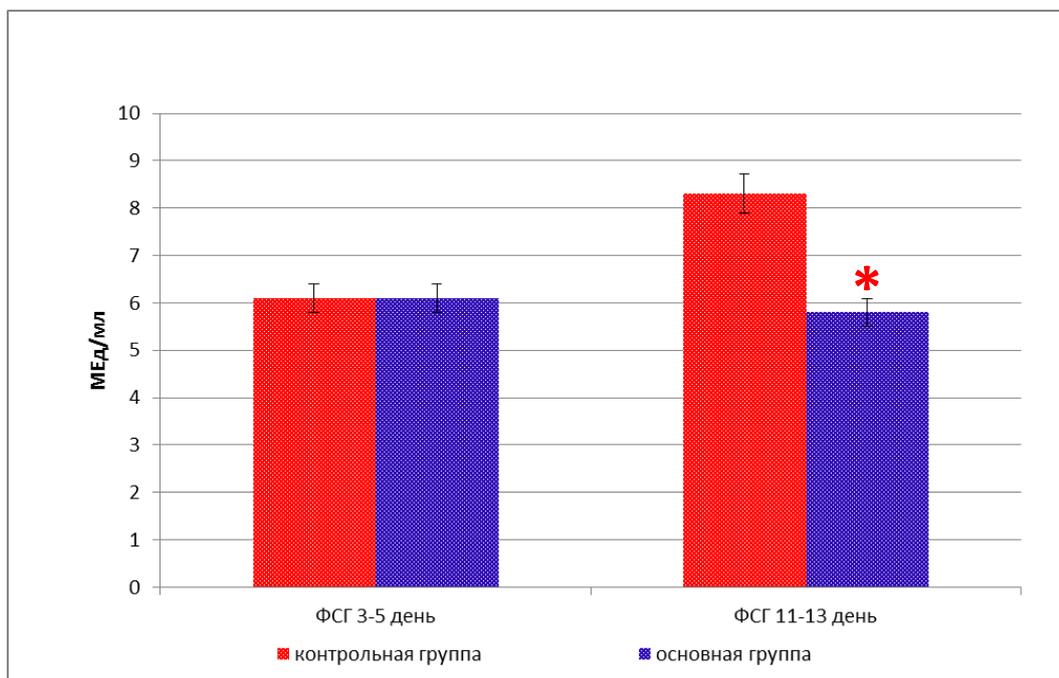
Таблица 8 – Уровни ФСГ и АМГ в обеих исследуемых группах (в начале и в конце фолликулярной фазы менструального цикла)

Переменные	Исследуемая группа – начало фолликулярной фазы	Контрольная группа – начало фолликулярной фазы	Исследуемая группа – конец фолликулярной фазы	Контрольная группа – конец фолликулярной фазы
ФСГ (МЕ/мл) Среднее $\pm$ SD	$6.1 \pm 2.9$	$6.1 \pm 2.9$	$5.8 \pm 3,2^{**}$	$8.3 \pm 6.1$
АМГ (нг/мл) среднее $\pm$ SD	$1.81 \pm 1.3^*$	$3.07 \pm 1.6$	-	-
Примечание Для статистического анализа был использован t-критерии Стьюдента *- $p \leq 0,05$ достоверность различий в сравнении с контрольной группой **- $p \leq 0,05$ достоверность различий в сравнении с контрольной группой				



\*-  $p \leq 0,05$  достоверность различий в сравнении с контрольной группой

Рисунок 13 – Показатель АМГ в исследуемых группах в начале фолликулярной фазы.



\*-  $p \leq 0,05$  достоверность различий в сравнении с контрольной группой

Рисунок 14 - Показатель ФСГ в исследуемых группах в начале и в конце фолликулярной фазы.

**Заключение:** Уровень исследуемых гормональных маркеров овариальной способности ФСГ и АМГ, в исследуемой группе уменьшена соответственно на 30.2% и 41.1% что характеризует снижение овариального резерва. Сравнительный анализ показал, что уровень АМГ оказался равным 59% в исследуемой группе, по сравнению с контрольной группой. Уровень ФСГ в начале фолликулярной фазы цикла не имел различия в обеих группах, в конце фолликулярной фазы гормон был равен 70% в исследуемой группе, по сравнению с контрольной группой.

### 3.3 Оценка характера взаимосвязи между показателями объема яичников, биохимическими показателями и доплерографическими данными

#### 3.3.1 Корреляционный анализ

С целью изучения связи между объемом яичников и показателями уровня гормонов нами был проведен корреляционный анализ Спирмена. Корреляционный анализ позволил выявить достоверную слабую положительную связь между объемом левого яичника (по показателю  $\Delta G$ ) и уровнем фолликулостимулирующего гормона ( $r=0,2086$ ,  $p < 0,05$ ,  $n=108$ ), демонстрирующую, что амплитуда объема яичника прямо пропорциональна уровню биохимического показателя ФСГ (рисунок 15).

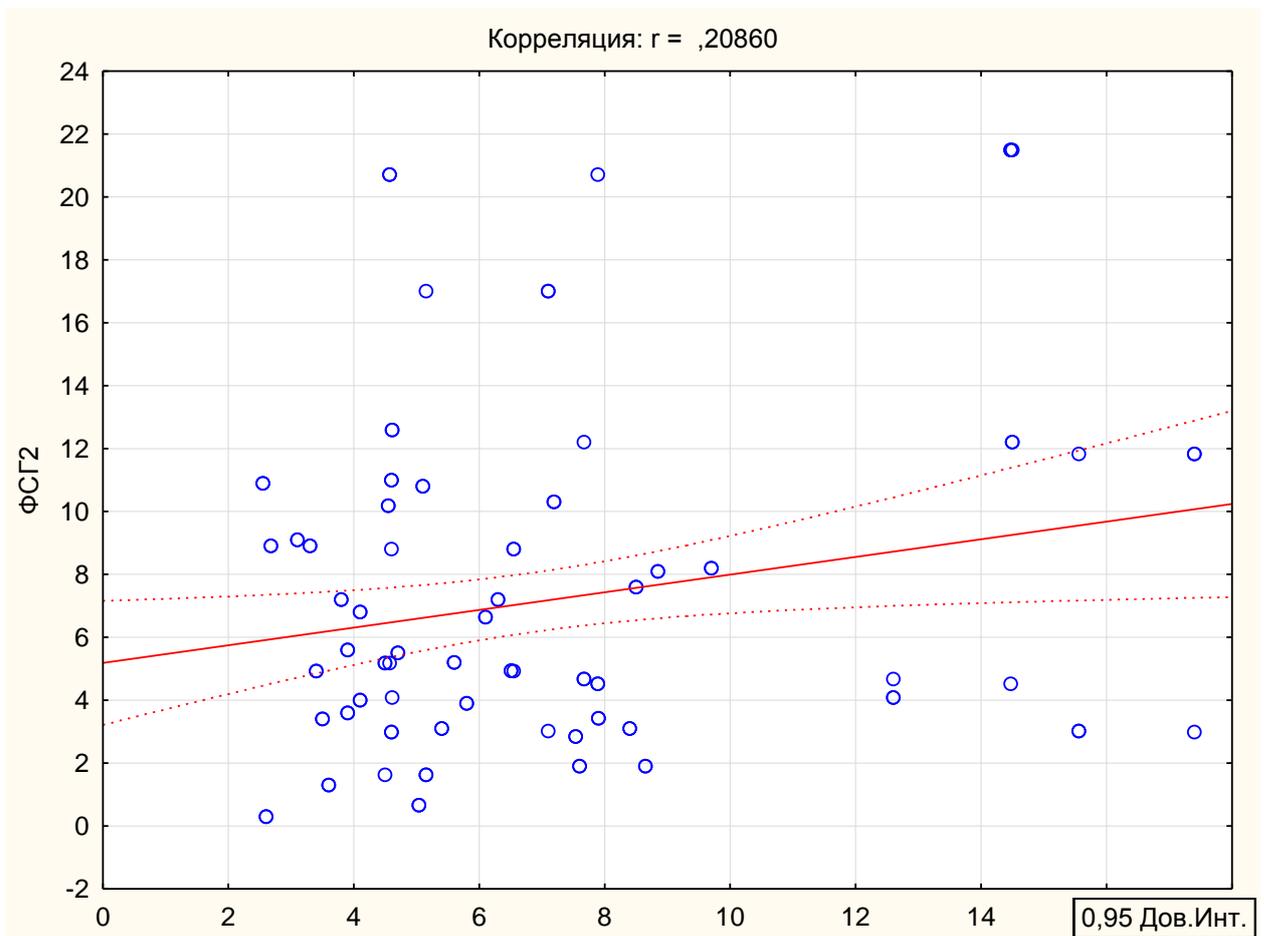


Рисунок 15 – Взаимосвязь между объемом левого яичника (по показателю  $\Delta G$ ) с уровнем фолликулостимулирующего гормона ( $r=0,2086$ ,  $p<0,05$ ,  $n=108$ ).

Также выявлена достоверная положительная корреляция между объемом правого яичника (по показателю  $\Delta G$ ) и уровнем Антимюллера гормона ( $r=0,37208$ ,  $p<0,0001$ ,  $n=108$ ) (рисунок 16).

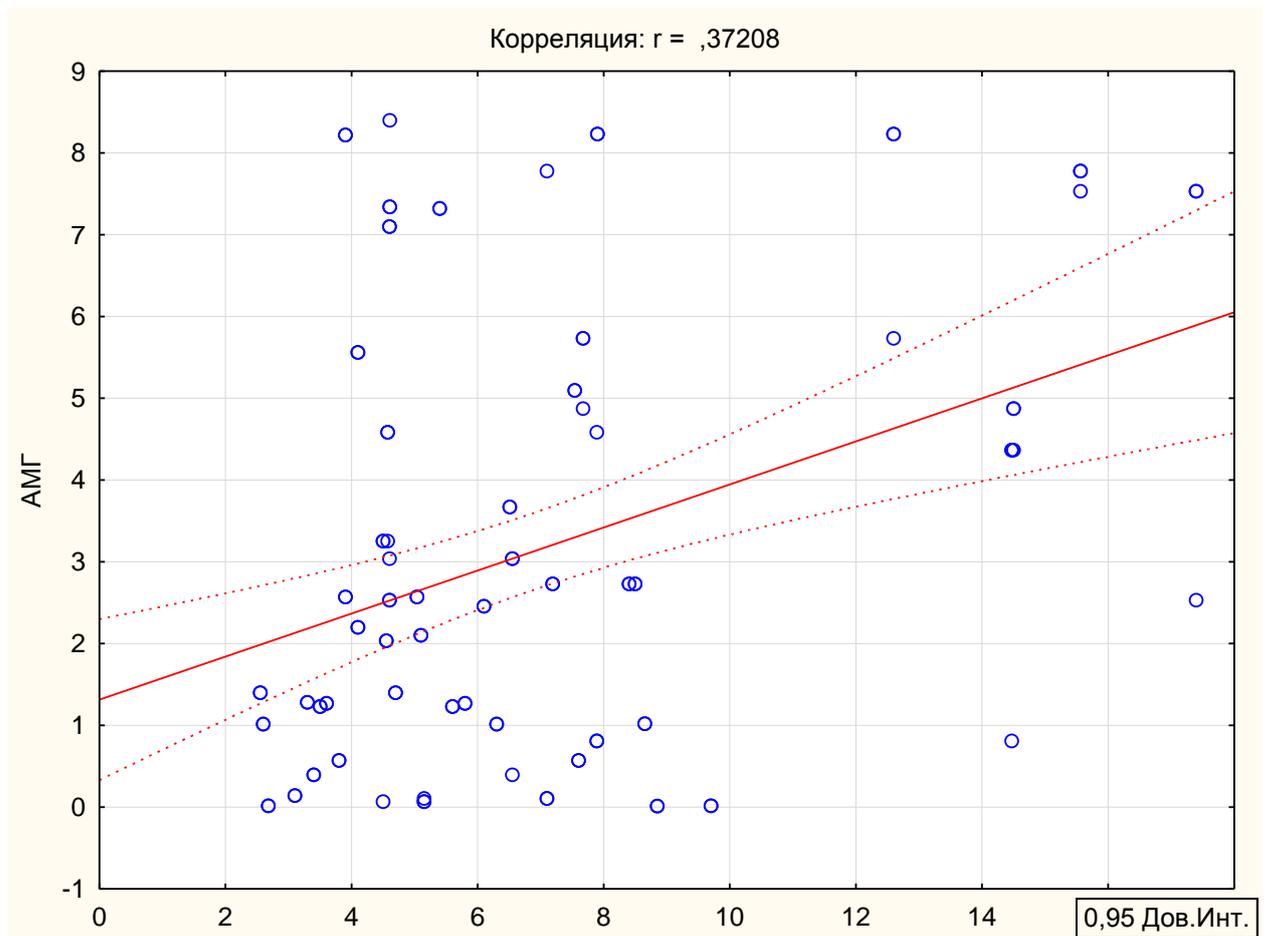


Рисунок 16 – Взаимосвязь между объемом правого яичника (по показателю  $\Delta G$ ) с уровнем антимюллера гормона ( $r=0,37208$ ,  $p<0,0001$ ,  $n=108$ ).

При изучении корреляции между количеством антральных фолликулов левого и правого яичников (по показателю  $\Delta G$ ) с уровнем фолликулостимулирующего гормона в лютеинизирующую фазу менструального цикла, также выявлялась слабая ( $r=0,28064$ ,  $p<0,005$ ,  $n=108$ ), ( $r=0,26420$ ,  $p<0,005$ ,  $n=108$ ) соответственно, но положительная достоверная связь (рисунок 17-18).

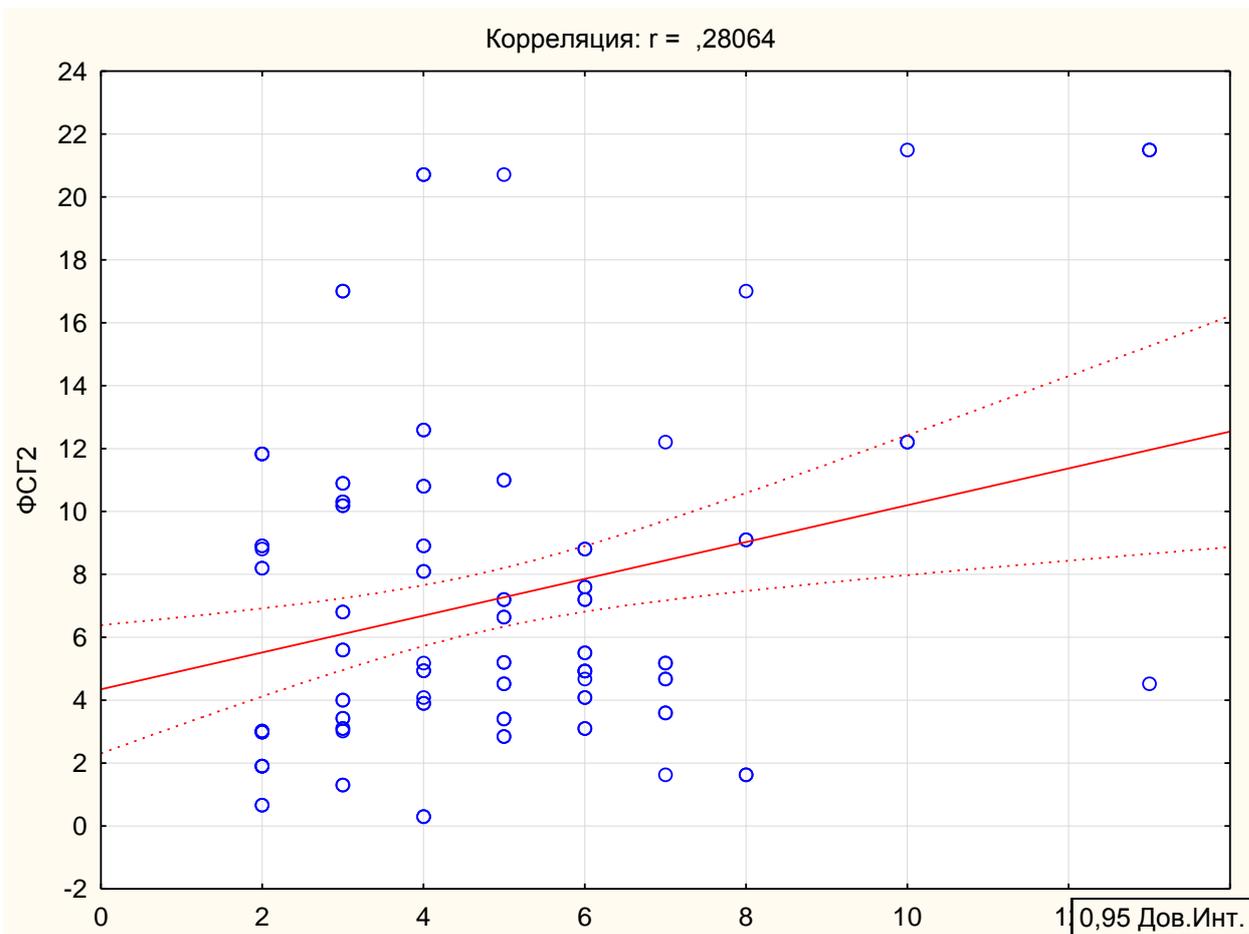


Рисунок 17 – Взаимосвязь между количеством антральных фолликулов левого яичника (по показателю  $\Delta G$ ) с уровнем фолликулостимулирующего гормона ( $r=0,28064$ ,  $p<0,005$ ,  $n=108$ ).

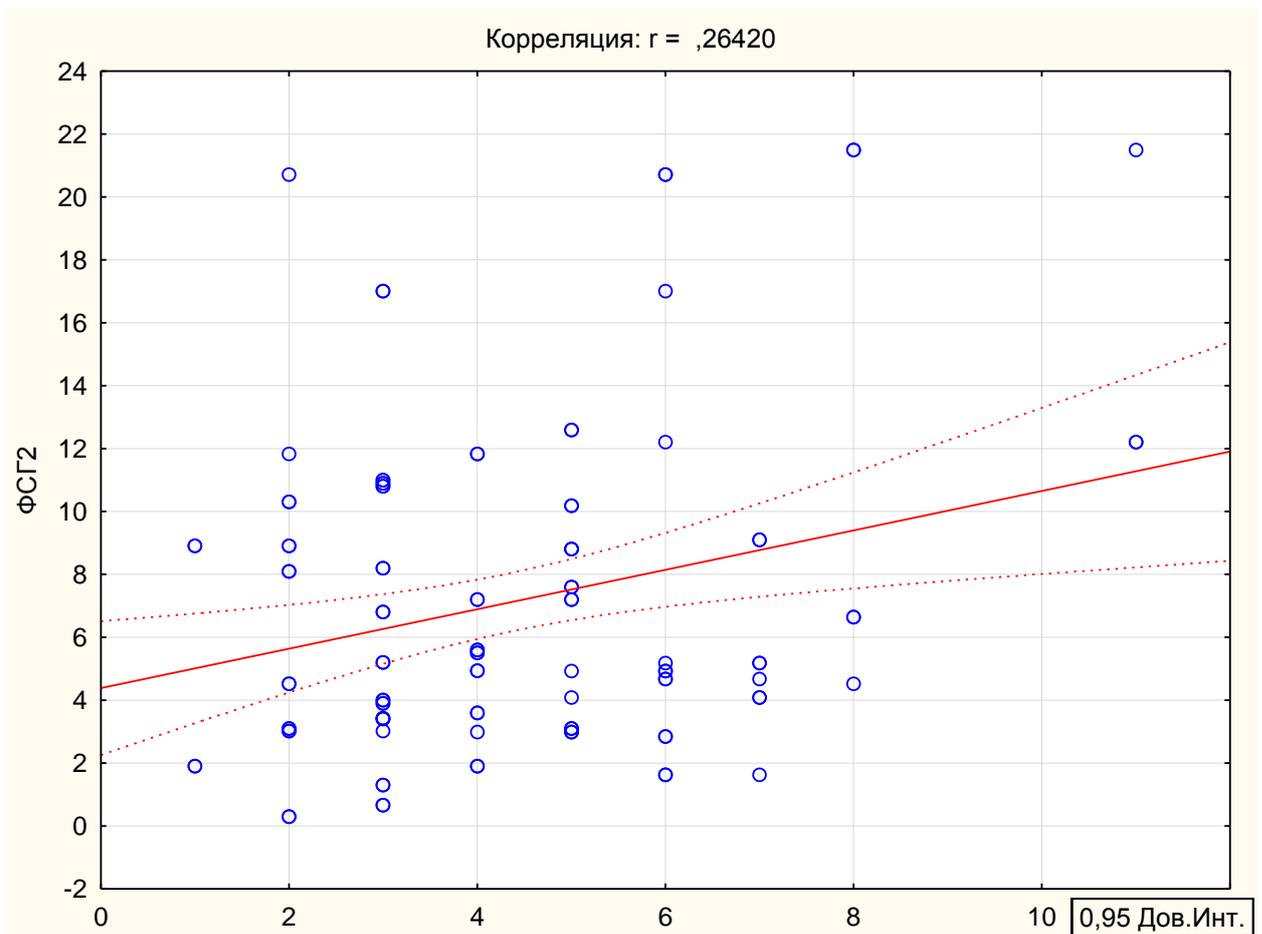


Рисунок 18 – Взаимосвязь между количеством антральных фолликулов правого яичника (по показателю  $\Delta G$ ) с уровнем фолликулостимулирующего гормона ( $r=0,26420$ ,  $p<0,005$ ,  $n=108$ ).

При изучении корреляции между объемом правого яичника (по показателю  $\Delta G$ ) с максимальной систолической скоростью ( $r=0,24438$ ,  $p<0,01$ ,  $n=108$ ), и объемом левого яичника с индексом пульсации ( $r=0,19775$ ,  $p<0,05$ ,  $n=108$ ), также выявлена положительная достоверная связь, (рисунок 19-20).

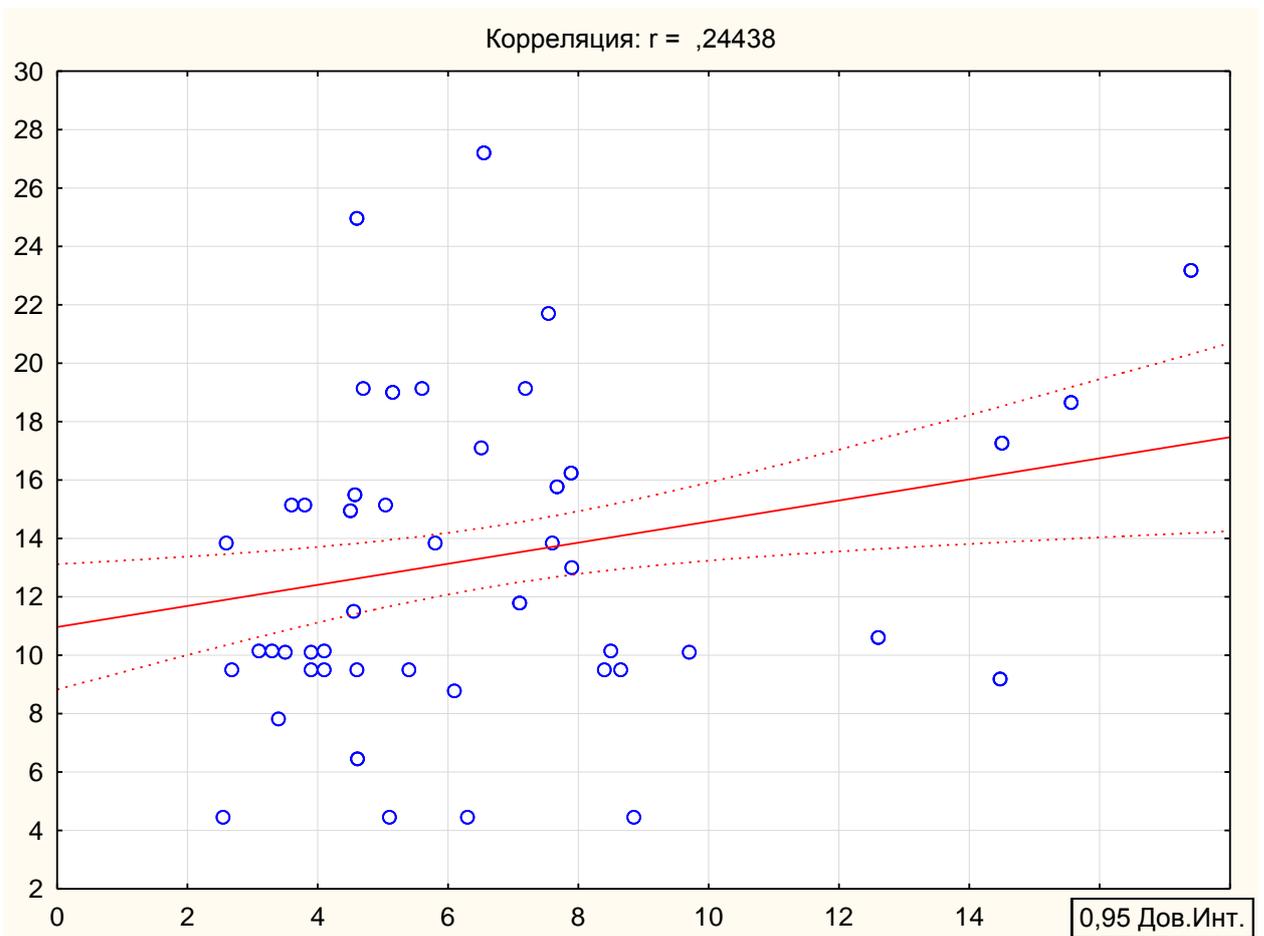


Рисунок 19 – Взаимосвязь между объемом правого яичника (по показателю  $\Delta G$ ) с максимальной систолической скоростью ( $r=0,24438$ ,  $p<0,01$ ,  $n=108$ ).

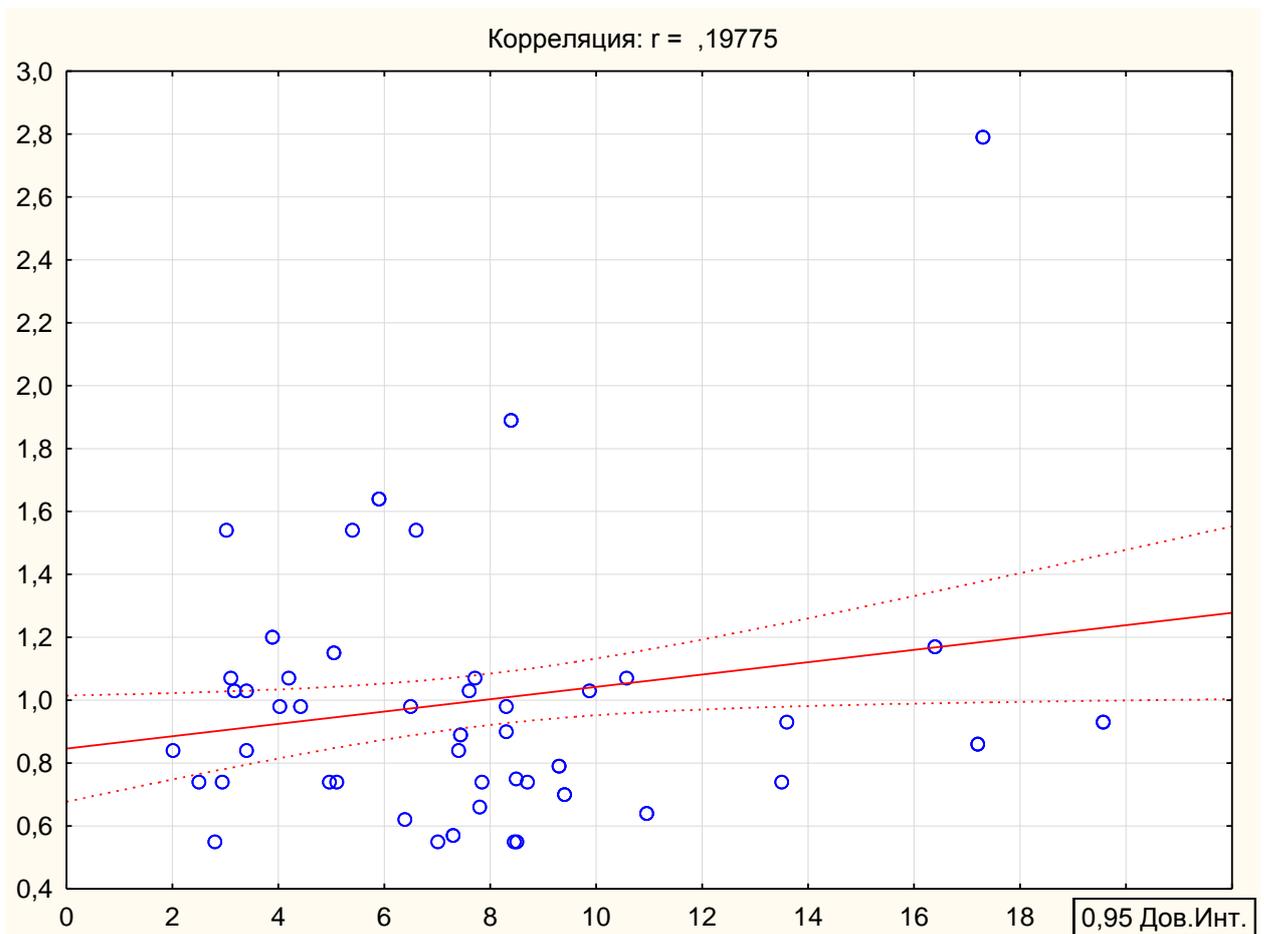


Рисунок 20 – Взаимосвязь между объемом левого яичника (по показателю  $\Delta G$ ) с индексом пульсации ( $r=0,19775$ ,  $p<0,05$ ,  $n=108$ ).

**Заключение:** Обнаруженные корреляционные зависимости между данными ультразвукового исследования яичников и гормональными показателями свидетельствуют о том, что имеется положительная корреляционная связь между морфологическими показателями органа, такими как объем яичников, количество антральных фолликулов с уровнем гормонов в крови женщин определяющих овариальный резерв. Эти данные подтверждаются выявленной положительной корреляционной связью между состоянием стромального кровотока, а именно пульсационного индекса и объемом яичника.

### **3.4 Морфологическая характеристика гранулезных клеток яичников мышей в норме и при воздействии различных доз линдана при *in vitro* исследовании**

Полученные результаты клинического исследования женщин, длительно проживающих в регионе Приаралья, показало, что действие токсических соединений с преобладанием хлорсодержащих пестицидов приводит к функциональной недостаточности яичников, к некоторому снижению показателей овариального резерва в пределах нормы. Снижение объема яичников исследуемой группы за счет сужения коркового слоя, при повышении индекса резистентности и уменьшение количества антральных фолликулов говорит о дисбалансе внутриклеточных механизмов, способности химиката нарушать физиологически протекающие процессы. Исходя из этих позиций, предполагается, что морфологическое исследование органа при непосредственном воздействии пестицида – Линдана (как наиболее часто встречаемого соединения) раскроет понимание клеточного разрушения.

*В контрольной группе* при изучении полутонкого среза в поле зрения обнаруживались гранулезные клетки, располагавшиеся хаотично, местами сливаясь между собой. Гранулезные клетки имели различную форму от овальной до многоотростчатой, местами имели вид сморщенности.

Прослеживалась хорошо видимая цитоплазматическая мембрана, сохранившая свою структуру и целостность. Ядра клеток с четко прослеживаемой ядерной оболочкой (рисунок 21). Ядра различных размеров и формы, большую часть овальной формы. В ядрах при оптической микроскопии визуализировались хорошо окрашенные ядрышки, располагающиеся в центре ядра. В некоторых клетках отмечалось деление ядрышек, так что ядро заполнялось несколькими фрагментами ядрышек. Чаще единичные ядрышки располагались эксцентрично.

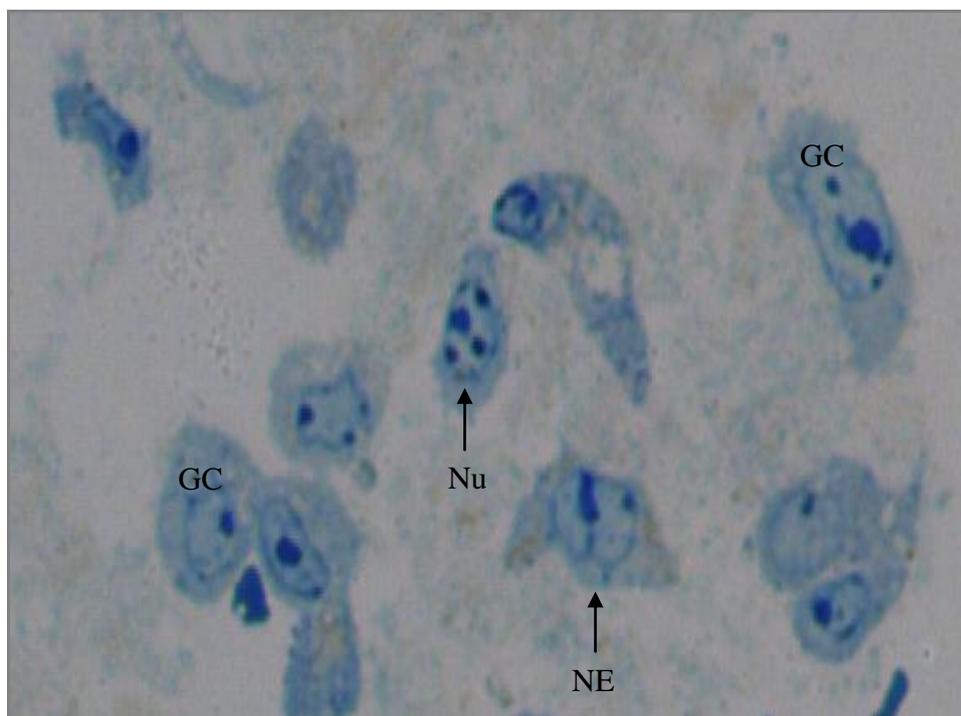


Рисунок 21 – Ув 40. Полутонкий срез созревших в *in vitro* условиях гранулезных клеток контрольной группы, GC – гранулезная клетка, NE – ядерная оболочка, Nu – ядрышки. Ядра клеток различной формы с несколькими ядрышками, расположенными по периферии.

При изучении препарата отмечается изменение цитоплазматической мембраны, теряется четкость ее формы. Мембрана цитоплазмы представлена многочисленными микроворсинками, указывающими на интенсивную активность межклеточной коммуникации. Отмечено, что после 48 часов инкубации, микроворсинки клеток не только сохранялись, более того они местами «отщеплялись» от мембраны, теряли структуру. В некоторых местах появляются мелкие пузыри. Между гранулезными клетками имелись хорошо выраженные межклеточные контакты. Средний показатель диаметра клеток составил 20  $\mu\text{m}$  (рисунок 40).

Ядерная оболочка характеризовалась нечеткостью, местами с деформацией. В ядре часто образовывались бороздчатые глубокие перегибы, ограниченные ядерной мембраной, образующие небольшие инвагинации. Отмечается маргинализация ядер. В ядрах обнаруживались в большом количестве осмиофильные скопления хроматина, который был конденсирован, распределялся в сгустках и местами утолщался (рисунок 22-23). В некоторых полях зрения ядра теряли структуру, фрагментировались, рассеивались в цитоплазме клетки и даже за ее пределами в виде небольших островков – апоптозных тел.

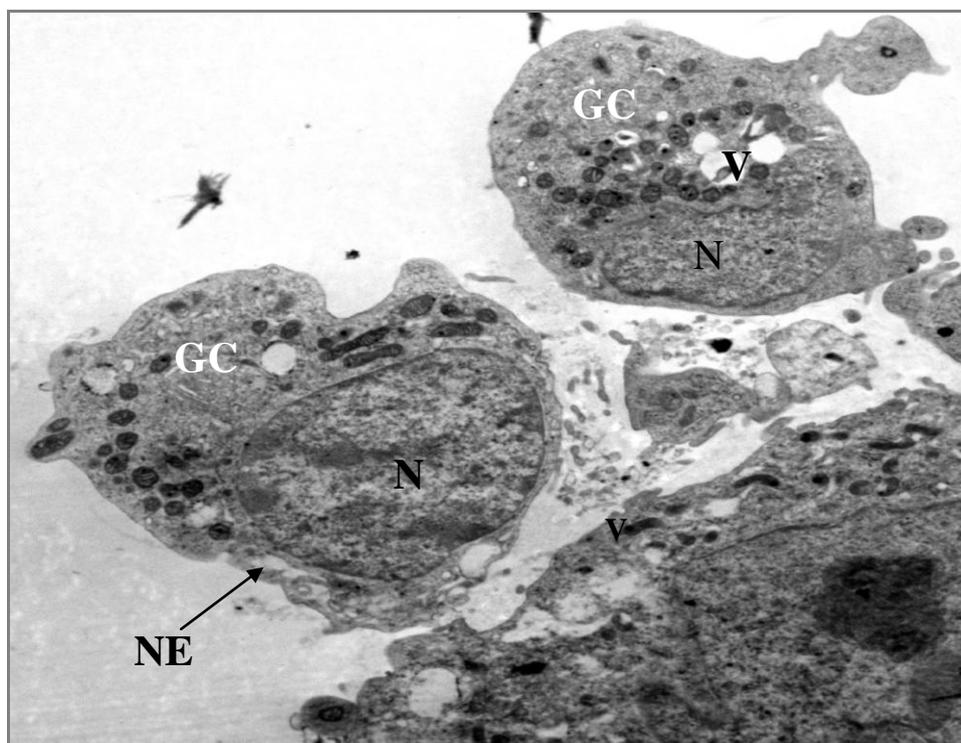


Рисунок 22 – ТЭМ, Ув. 2 nm GC: гранулезная клетка; N: ядро; V: вакуоль; NE: ядерная оболочка.

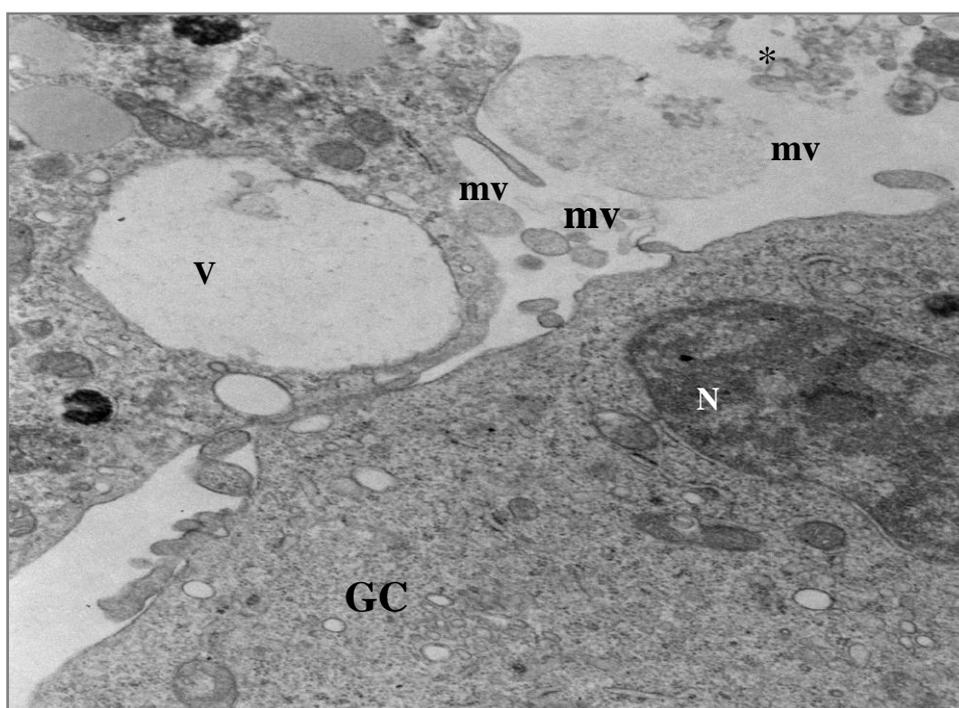


Рисунок 23 – ТЭМ, Ув. 2nm GC: гранулезная клетка; V: вакуоль; N: ядро; mv: микроворсинки; \* = остатки клеток.

Из структурных элементов клетки, в первую очередь внимание привлекали митохондрии, содержащиеся в большом количестве, имеющие округлую

«вздутую» или эллиптическую формы, с четкой внутренней исчерченностью. На втором плане отмечалось большое количество пузырьков липидов, которые, несомненно, свидетельствуют о повышенной стероидогенной функции клеток на данном этапе. Были выявлены также многочисленные трубчатые электронегативные элементы гладкой эндоплазматической сети несколько расширенные. Отмечались несколько расширенные пузырьки Гольджи (рисунок 24-26).

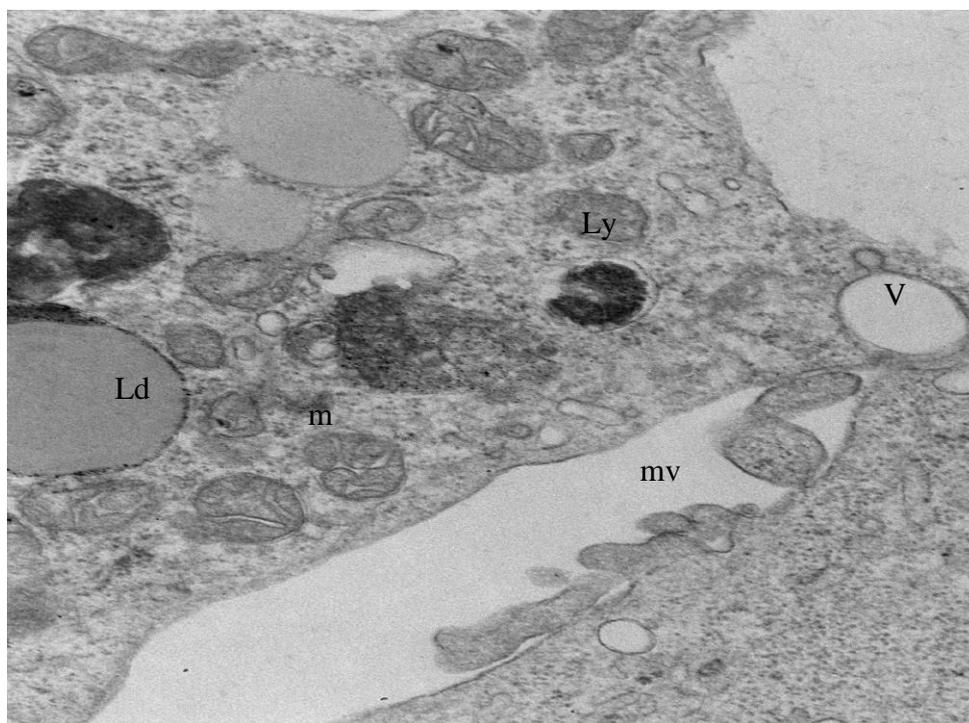


Рисунок 24 – ТЭМ, Ув. 2 nm. N: ядро, m: митохондрии, Ld: жировые капли, Ly: лизосома, mv: микроворсинки, \* = остатки клеток.

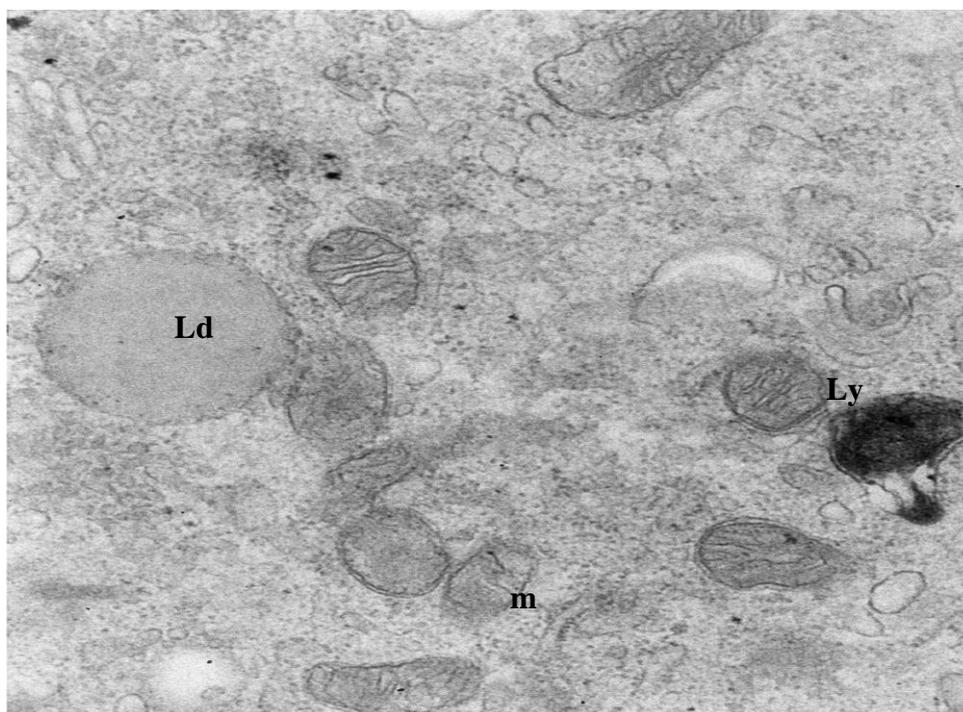


Рисунок 25 – ТЭМ, Ув. 2 nm. m: митохондрии, Ld: жировые капли, Ly: лизосома.

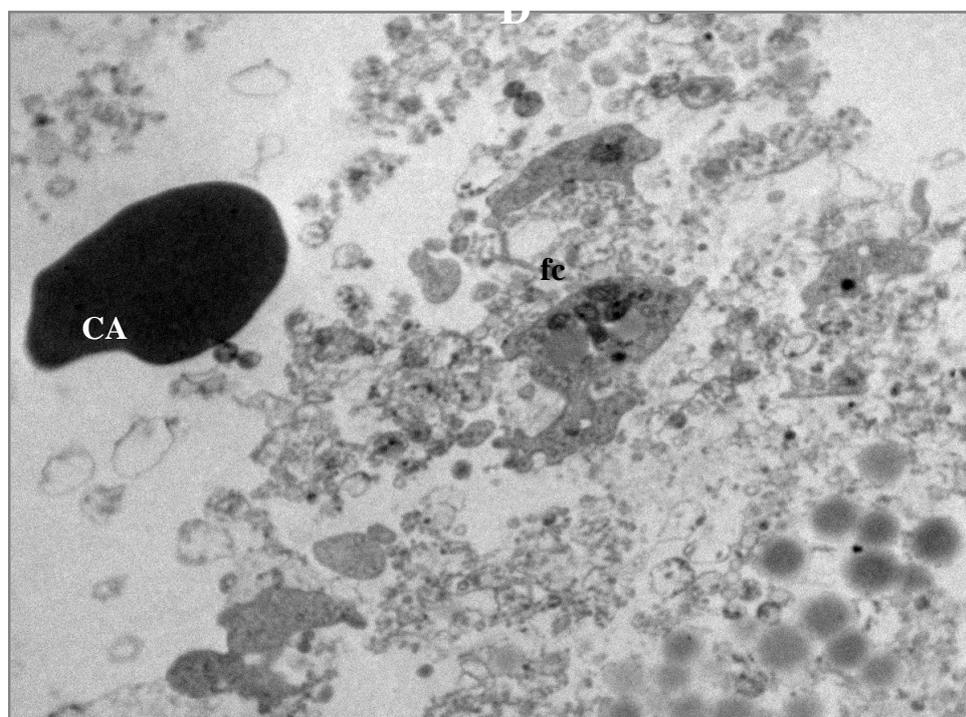


Рисунок 26 – ТЭМ, Ув.2 nm. ультраструктура гранулезных клеток (контроль), указывающая на признаки клеточной дегенерации. CA: апоптическое тело; FC: фрагменты клетки.

**Таким образом,** ультраструктура гранулезных клеток в контрольной группе характеризовалась дегенерацией, свойственной данным клеткам в процессе их функциональной активности. Морфологическая картина свидетельствует о функциональной активности гранулезных клеток проявляющееся усилением физиологического апоптоза: потеря клеточной мембраной микроворсинчатости, маргинализация ядра, конденсация хроматина, фрагментация ядер с образованием апоптозных тел. Активность процесса апоптоза оказалась высокой по сравнению с другими группами (рисунок 41).

О функциональной активности клеток свидетельствует высокое содержание липидных включений обуславливающих процесс стероидогенеза половых клеток.

*В 2ой группе,* где гранулезные клетки культивированы с целью контроля с растворителем для линдана раствором ДМСО, популяция гранулезных клеток была представлена здоровыми клетками. На препаратах полутонких срезов клетки располагались хаотично, количество гранулезных клеток было несколько уменьшено в поле зрения, но между ними визуализировались в большом количестве фрагменты разрушенных клеток. Форма клеток в основном округлая, некоторые клетки сливались между собой. В отличии от контроля, некоторые клетки окрашивались более интенсивно.

Цитоплазма клеток нечеткая, ядра клеток набухшие, несколько оттеснены к периферии, с четко визуализируемой ядерной оболочкой с ядрышками, располагаются в основном по периферии (рисунок 27).

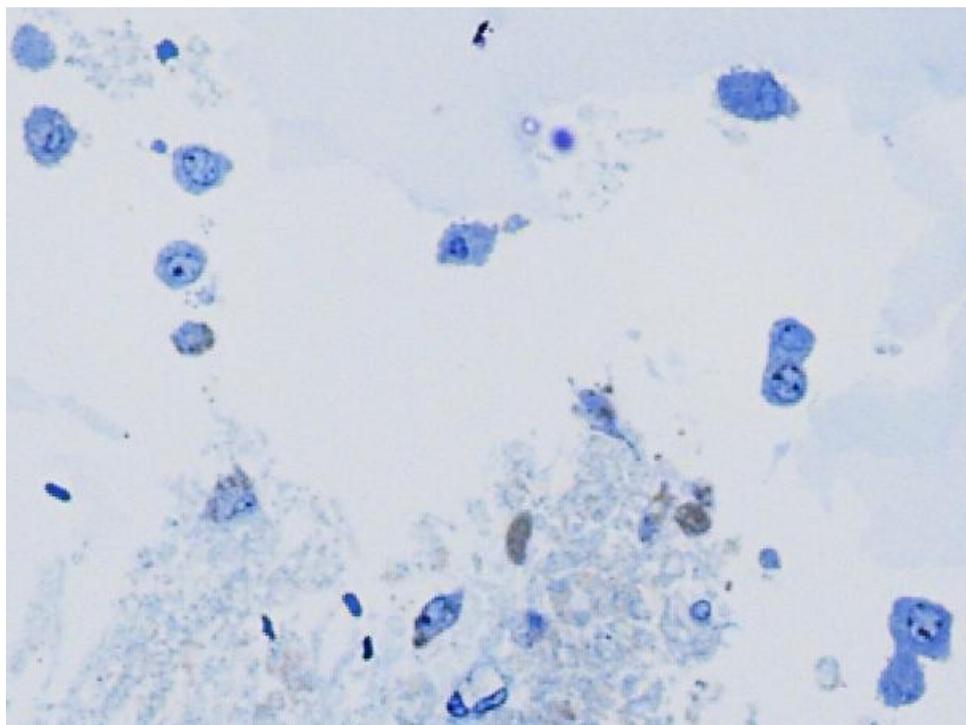


Рисунок 27 – Ув. 40. Полутонкий срез гранулезных клеток при культивировании с ДМСО.

При ТЭМ клетки не сохраняют свою форму, клетка как бы «размывается» по форме, теряется видимое на глаз ядерно-цитоплазматическое соотношение. Клетки тесно прилегают друг к другу, образуя узкую межклеточную щель, местами непрерывную, отмечается ретракция клеточных контактов. Клетка неравномерно окрашена, местами имея бледность, местами насыщенность. Среднее значение диаметра клеток 13  $\mu\text{m}$ , что в 1,5 раза меньше контрольных показателей.

Обращает на себя внимание форма и размеры ядер. Ядра клеток данной группы увеличены, неправильной многоотростчатой формы. Ядерная оболочка инвагинирует, образуя ее зазубренность, появляющиеся в большом количестве везикулы в ядерной мембране несколько отличают эту группу от контроля (рисунок 28-29). Фрагментация ядра выражена в сравнении с контрольной группой. Ядро распадается на дискретные фрагменты окруженные цитоплазмой с неповрежденной ядерной мембраной. Отмечаются большие апоптотические тела вероятно в экзоцитозе. В данной группе при воздействии ДМСО чётче отмечается феномен клеточной дегенерации (рисунок 30-31).

Для ультраструктур клетки характерно наличие большого количества липидов различных размеров, от мелких капель до больших конгломератов. Жировые капли имеют различную интенсивность окраски от светло серого до насыщенного черного. Количество митохондрий, состояние эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи не отличается от контроля.

**Таким образом,** в данной группе при воздействии ДМСО в процессе культивирования идет интенсификация процесса апоптоза проявившееся выраженной деструкцией ядер, их деформацией с последующей фрагментацией, везикулизацией ядерной мембраны и образованием апоптотических тел. Подсчет количества апоптотических тел показал уменьшение их в 1,6 раза в сравнении с контролем. На фоне апоптотических процессов не отмечено процессов некроза клетки.

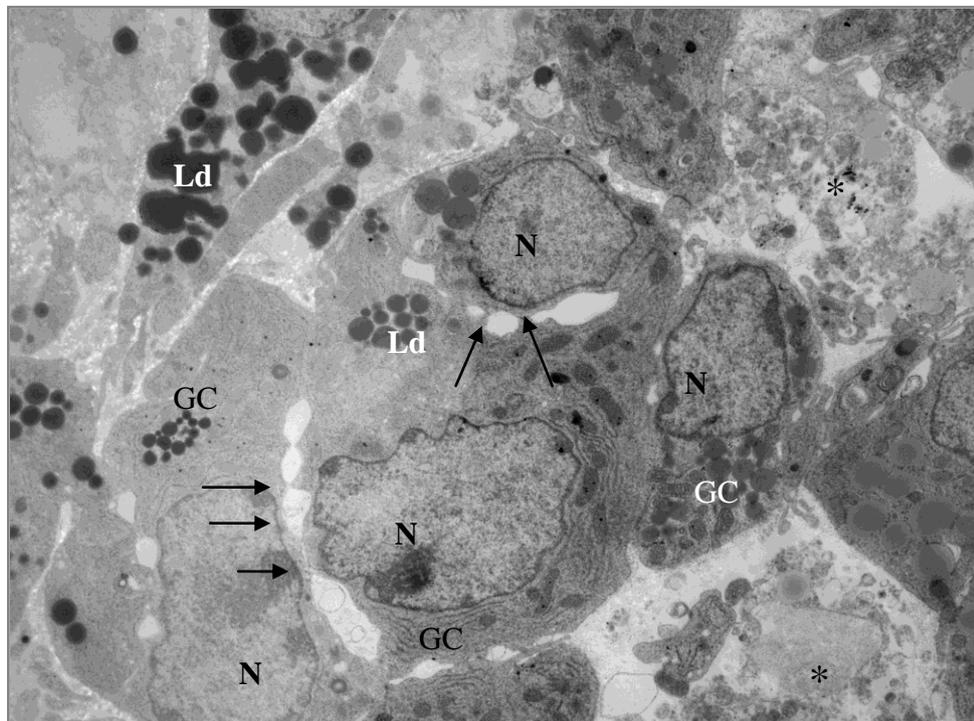


Рисунок 28 – ТЭМ, Ув. 2nm GC: гранулезная клетка; lp: жировые капли; N: ядро; \*: клеточные остатки.

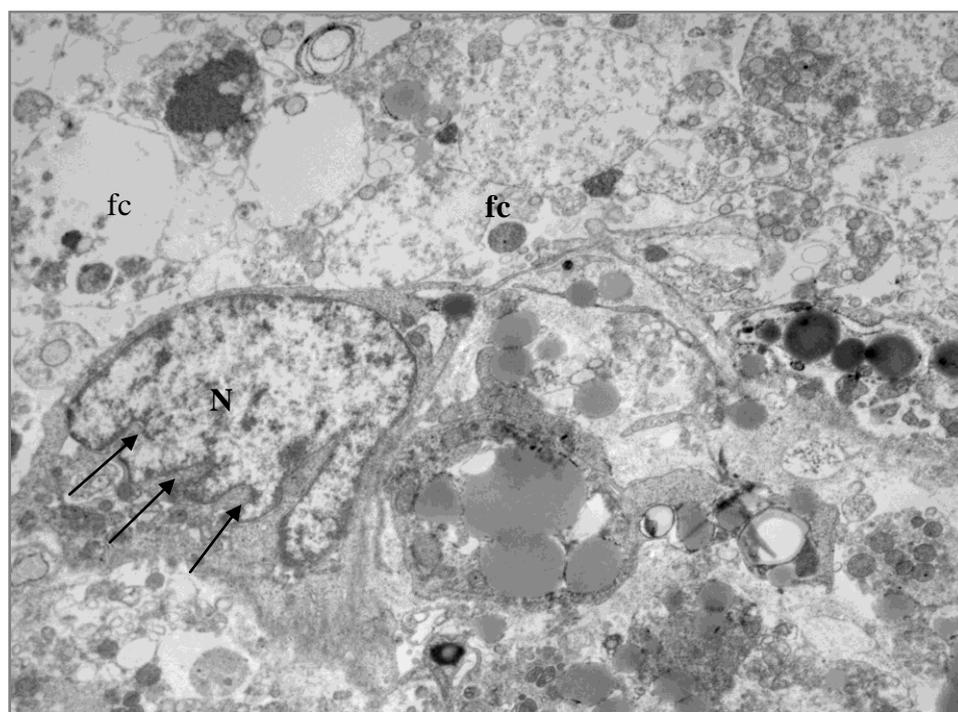


Рисунок 29 – ТЭМ, Ув. 2nm ультраструктура гранулезных клеток, подвергнувшихся действию раствором, (контроль с ДМСО). Клетки, имеющие признаки втягивания межклеточных соединений (стрелки). Обратите внимание на неправильную форму клетки и ядерных мембран. N: ядро, fc: фрагменты клетки.

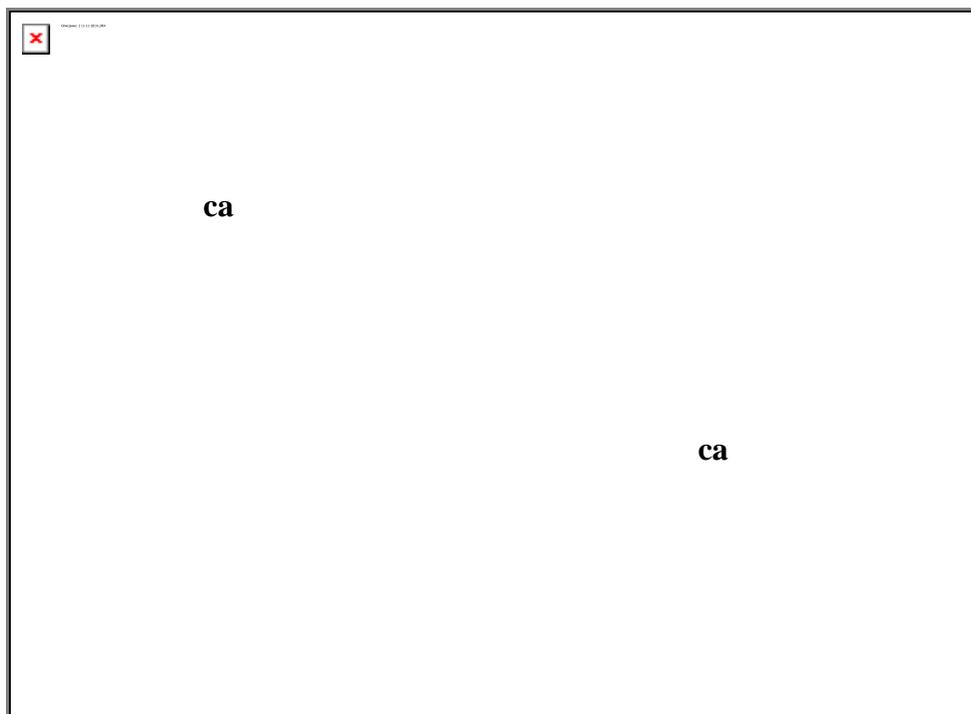


Рисунок 30 – ТЭМ, Ув. 2nm ультраструктура гранулезных клеток, подвергнувшихся действию раствором, (контроль с ДМСО).  
Две клетки, показывающие апоптозные тела (са), возможно, в процессе экзоцитоза.

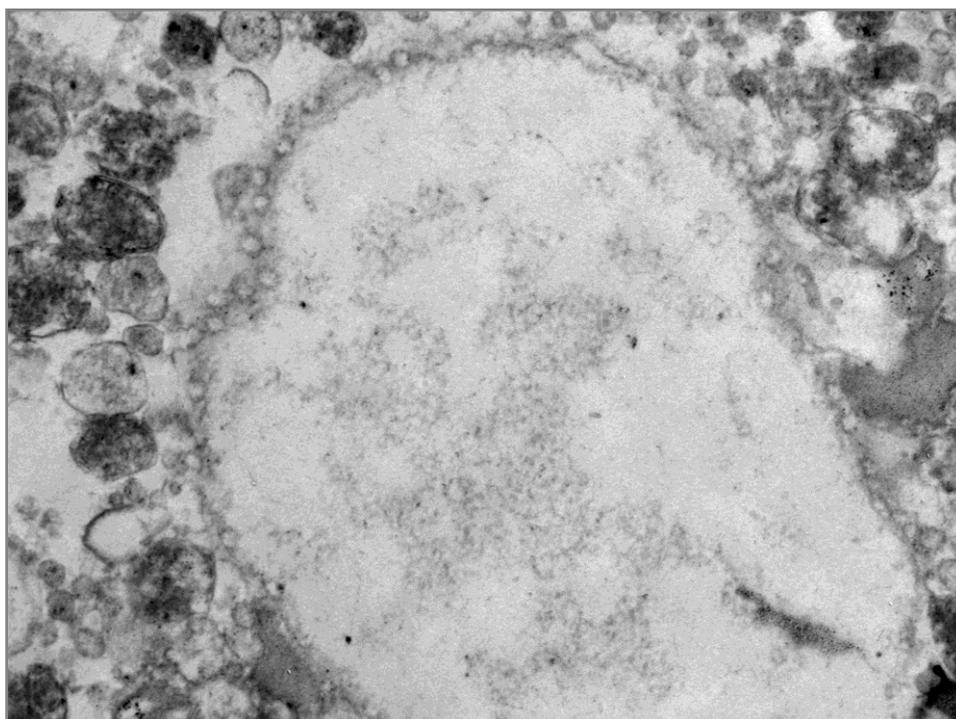


Рисунок 31 – ТЭМ, Ув. 2nm ультраструктура гранулезных клеток, подвергнувшихся действию раствором.  
Фрагментация участка ядерной мембраны и цитоплазмы.

В третьей группе при воздействии линдана в концентрации 1  $\mu\text{M}$  на полутонких срезах популяция гранулезных клеток была представлена в большом количестве. На препаратах полутонких срезов клетки располагались хаотично, между ними визуализировались в большом количестве фрагменты разрушенных клеток. Форма клеток многоотростчатая, клетки сливаются между собой, имеют интенсивный цвет при окрашивании (рисунок 33).

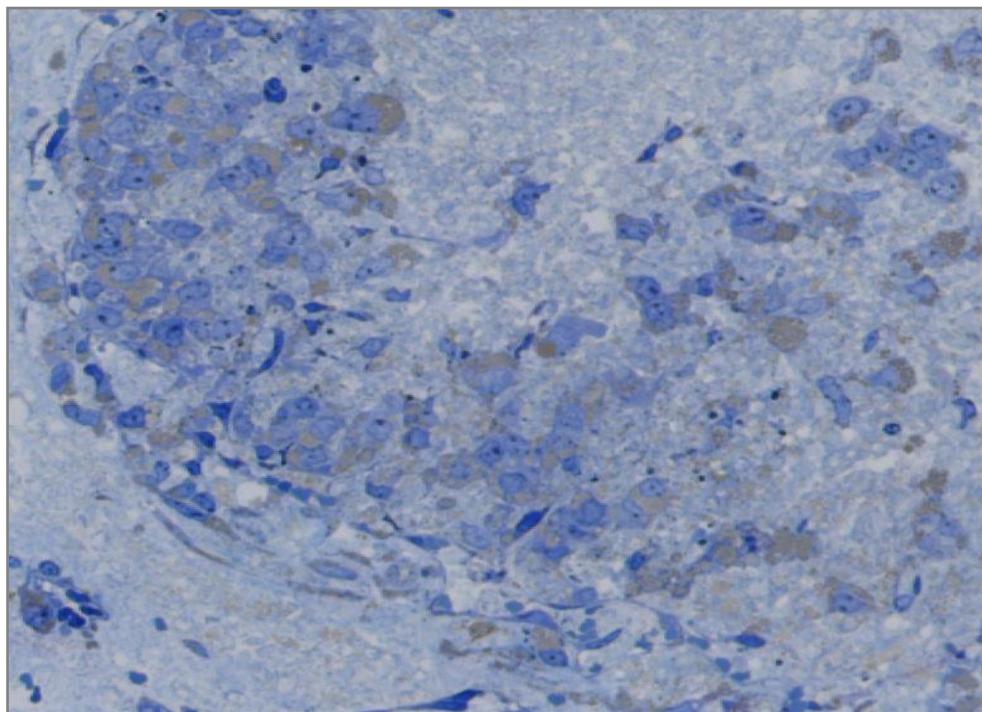


Рисунок 32 – Ув.40. Полутонкий срез гранулезных клеток при дозе 1  $\mu\text{M}$  линдан.

Оценка ТЭМ выявила наличие клеток неправильной формы, оснащенных большими, яйцевидной формы ядрышками. Создаются некоторые трудности в определении границы клеточной мембраны, так как межклеточные щели в сравнении со 2-ой группой не выражены, клетки практически сливаются между собой. На некоторых участках были обнаружены начальные признаки фрагментации цитоплазмы (рисунок 34). Средний показатель диаметра клеток 3ей группы составил - 16  $\mu\text{m}$ , в 1,25 раза меньше контроля и в 1,23 больше 2ой группы (рисунок 40). Межклеточные пространства заполнены («напичканы») клеточными фрагментами из участков цитоплазмы с ядрышками и апоптозными тельцами. Сохраненные ядра клеток крупные, оттеснены на периферию клетки. Хроматин в ядрах конденсирован, местами сгруппирован в центре, образует большое количество глыбок (рисунок 33).

Особенностями морфологической картины данной группы было наличие большого количества митохондрий заполняющих цитоплазму клетки, между которыми отмечались единичные жировые капли. Расширяется эндоплазматический ретикулум.

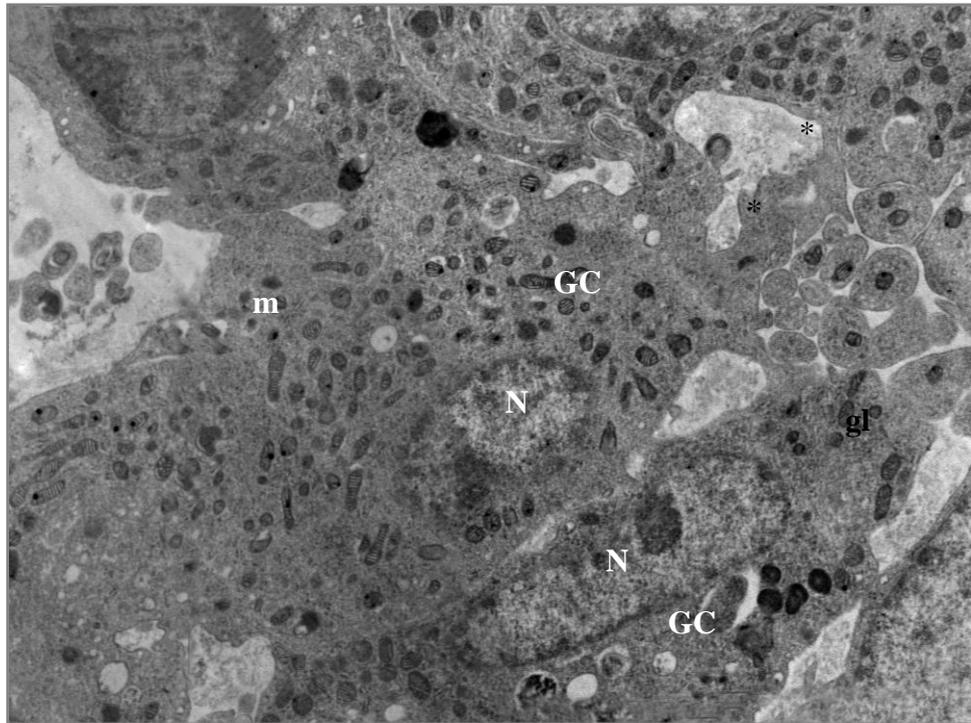


Рисунок 33 – ТЭМ, Ув. 2nm ультраструктура гранулезных клеток линдан 1 μM.  
N: ядро; m: митохондрии; GC: гранулезные клетки

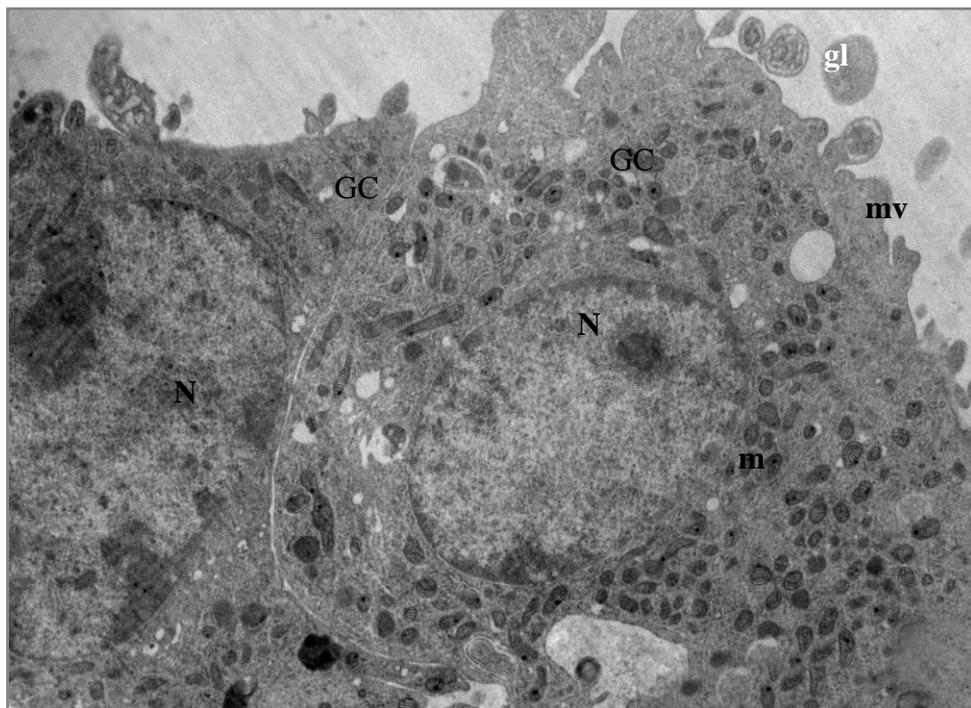


Рисунок 34 – ТЭМ, Ув. 2nm ультраструктура гранулезных клеток линдан 1 μM. MV: микроворсинки; N: ядро; m: митохондрии; GL: жировые капли.

**Таким образом,** характерными особенностями в группе с начальной низкой концентрацией линдана, показало клеточную дезорганизацию с наличием большого количества фрагментов клеток образующих в последующем апоптозные тельца, уменьшением межклеточного пространства и содержанием большого количества митохондрий. Количественный подсчет апоптозных тел показал резкое снижение в сравнении с предыдущими двумя группами (рисунок 42). Морфологическая картина говорит о возможном «стрессе» механизма физиологического апоптоза гранулезных клеток при воздействии низкой концентрации соединения. Несмотря на низкую активность апоптоза, все же процесс запрограммированной клеточной дегенерации протекает, но в более низком темпе и без некротической гибели клеточных структур.

В 4ой группе при воздействии линдана в концентрации 10  $\mu\text{M}$  при оптической микроскопии на полутонких срезах отмечается выраженная бледность окраски клеток. Цитоплазматическая мембрана становится размытой, клетки большей частью сливаются в пары и приобретают различные формы (рисунок 35). Показатель диаметра клеток составил 14  $\mu\text{m}$ , что в 1,42 раза меньше контроля, больше 2-ой группы в 1,07 раза, и меньше 3-ей группы в 1,14 раза (рисунок 40). Ядерная оболочка плохо дифференцируется, ядрышки «плавают» в цитоплазме, клетки стремятся «кучковаться». Среди однородно голубой окраски отмечаются липидные включения светло коричневого цвета.

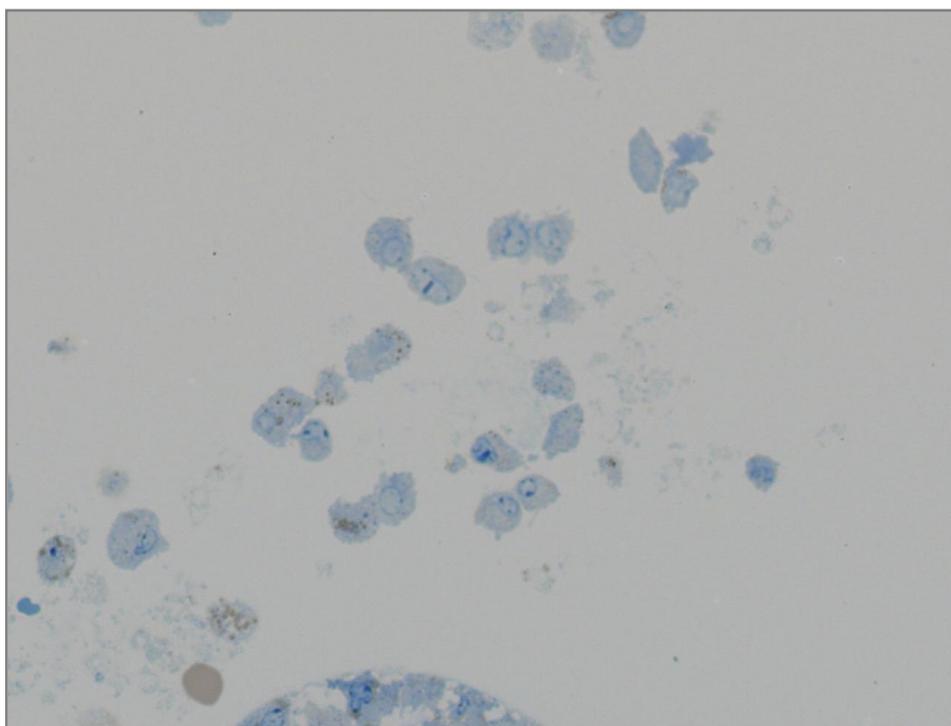


Рисунок 35 – Ув.40. Полутонкий срез *in vitro* созревшие гранулезные клетки при дозе 10  $\mu\text{M}$  линдан.

При ТЭМ на срезе видны единичные сохранные клетки, широкие межклеточные пространства которых заполнены фрагментами разрушенных клеток и апоптозными тельцами. Отмечается набухание клетки, цитоплазматическая мембрана местами разрушена, клетка приобретает неправильную многоотростчатую форму, ядро занимает периферическое или краевое положение, увеличивается в размере, ядрышки смещены на периферию, вместе с которым отмечается маргинализация ядерного хроматина (рисунок 36А). Гетерохроматин распределен по всему ядру неравномерно, местами в виде густой сети насыщенного цвета, местами в виде просветления (рисунок 36В). В клетке даже при сохранном ядре видны мелкие апоптозные фрагменты, которые в последующем отщепляются от клетки. Ультраструктурные элементы клетки теряют свою четкость, жировые капли распространяются неравномерно по клетке с распределением вперемежку с вакуолями.

Таким образом, Морфологическая картина представленная разреженностью гранулезных клеток, межклеточные пространства которых заполнены разрушенными фрагментами цитоплазмы, которые в виде островков заполняют межклеточные пространства и содержат апоптозные тела. Линдан в концентрации 10  $\mu\text{M}$  оказал дозозависимое токсическое действие на клетки, при котором разрушение структурных компонентов клетки привело к усилению апоптоза, выраженность которого было выше в сравнении со 2-ой и 3-ей группой.

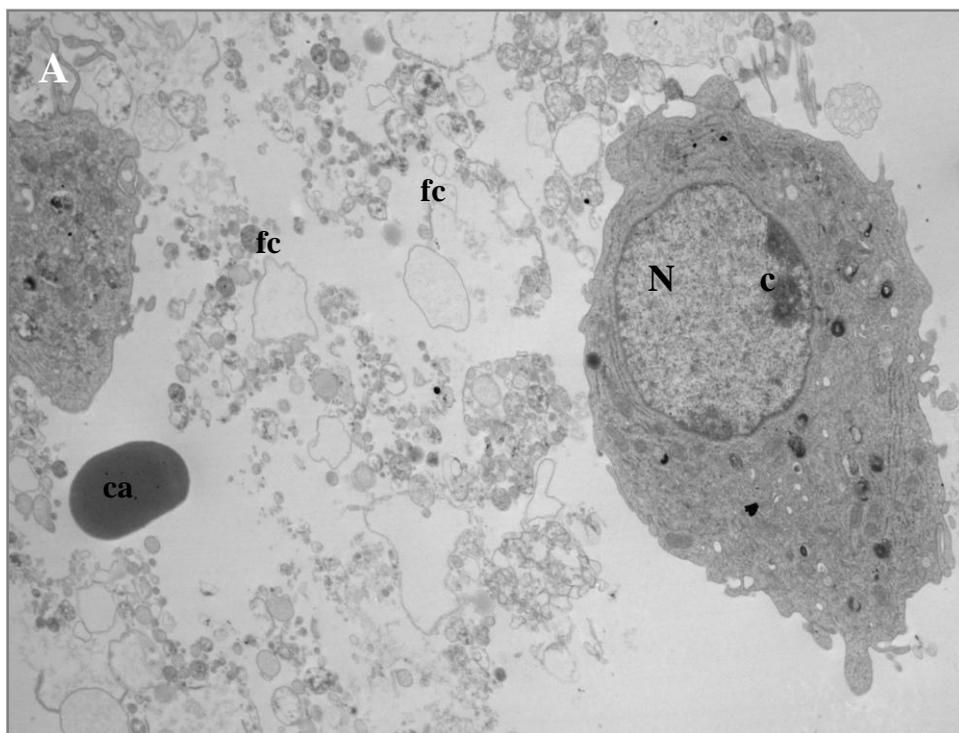


Рисунок 36 – ТЭМ, Ув. 2 nm. ультраструктура гранулезных клеток при дозе 10 $\mu\text{M}$  линдан. А. Дегенерация клеток с утолщением хроматина под ядерной мембраной, с фрагментами цитоплазмы по близости и апоптозное тело (ca). N: ядро; fc: фрагменты клетки; c: хроматин.

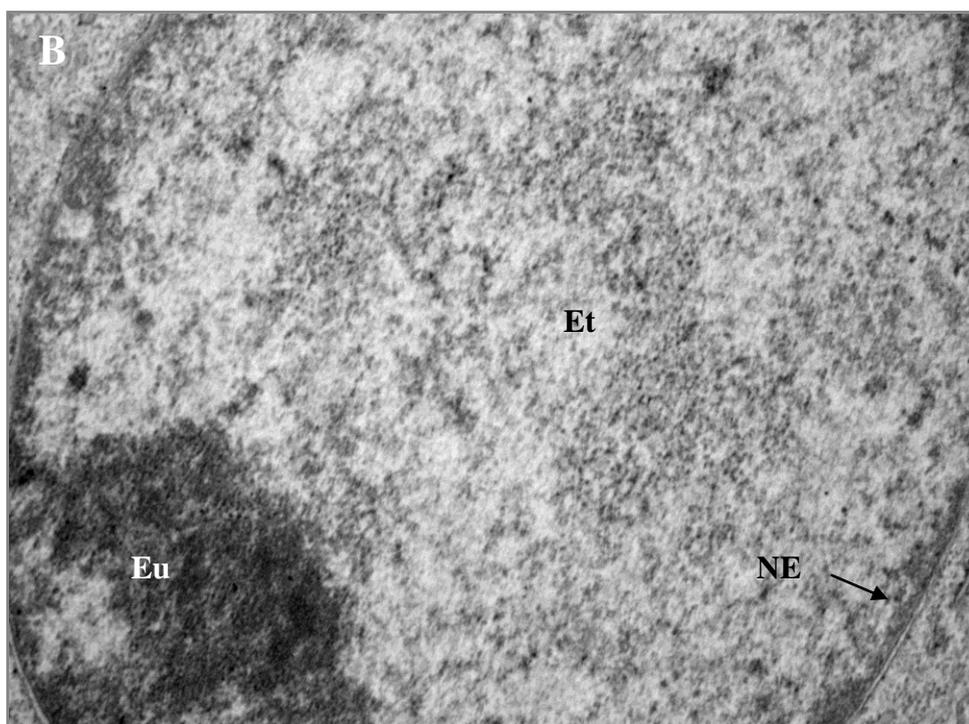


Рисунок 36 – ТЭМ, Ув. 400 nm. ультраструктура гранулезных клеток при дозе 10μМ линдан. В: показано увеличение основного гетерохроматина (Et) и эухроматином (Eu) расположенного под ядерной мембраной (mn).

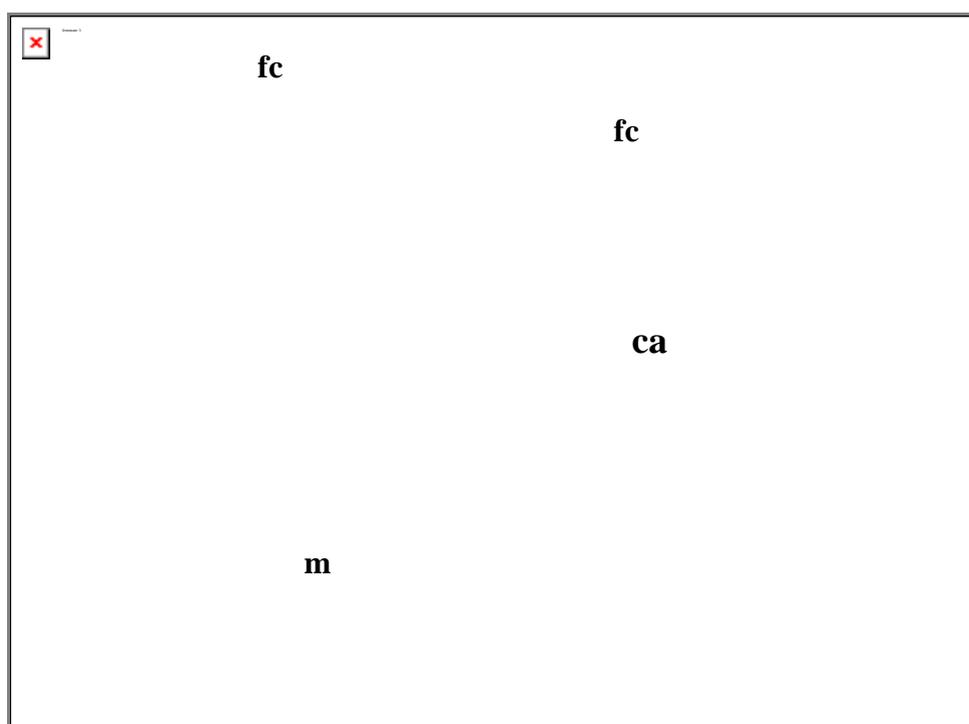


Рисунок 37 – ТЭМ, Ув. 2nm. экзоцитоз апоптозного тела.

В 5ой группе при воздействии линдана в концентрации 100 μМ на полутонких срезах клетки единичны в поле зрения, на фоне разрушенных клеточных фрагментов видны клетки, подвергнутые некрозу. Интенсивность

окраски очень слабая. При ТЭМ отмечается полное разрушение цитоплазматической мембраны клеток, ультраструктурные элементы клеток подвергаются феномену вакуолизации, т.е. ультраструктурные элементы теряют свою функциональную способность, клетка разрушается, подвергаясь постепенному некрозу (рисунок 38). Диаметр единичных сохранившихся клеток составил 10  $\mu\text{m}$ , что значительно ниже в сравнении со всеми группами исследования. Ядра набухают, отмечается кариолизис, ядерная оболочка значительно истончена и на снимках ТЭМ визуализируется бледной, еле заметной границей, заполнена жировыми каплями. На фоне полного некроза клеточных структур, апоптозные тельца единичны, т.е. активность апоптоза в данной группе практически снижена (рисунок 39).

**Таким образом,** воздействие линдана в концентрации 100  $\mu\text{M}$  *in vitro* показало выраженное токсическое действие на гранулезные клетки. В клетках преобладали процессы некроза над апоптозом: деструкция мембраны, лизис ядра, разрушение цитоплазмы с выходом внутриклеточного содержимого в межклеточное пространство. Подсчет количества апоптозных тел показал их резкое снижение в сравнении со всеми группами.

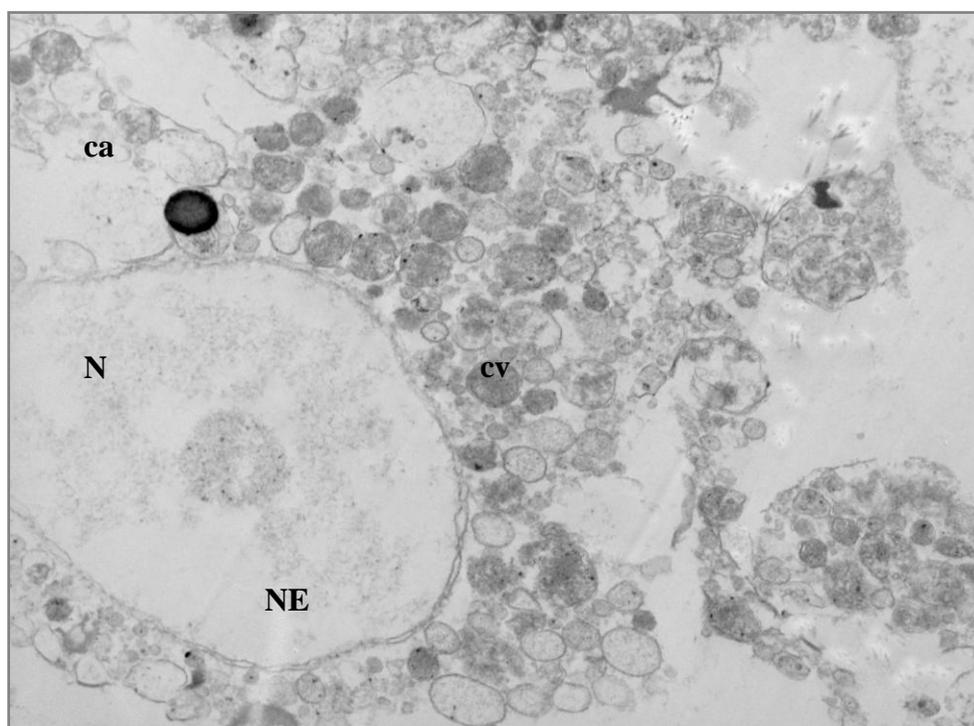


Рисунок 38 – ТЭМ, Ув. 2nm ультраструктура гранулезных клеток 100  $\mu\text{M}$  линдан, клеточная дегенерация разной степени. ca. апоптические тела; N: фрагмент ядра, cv: цитоплазматические пузырьки.

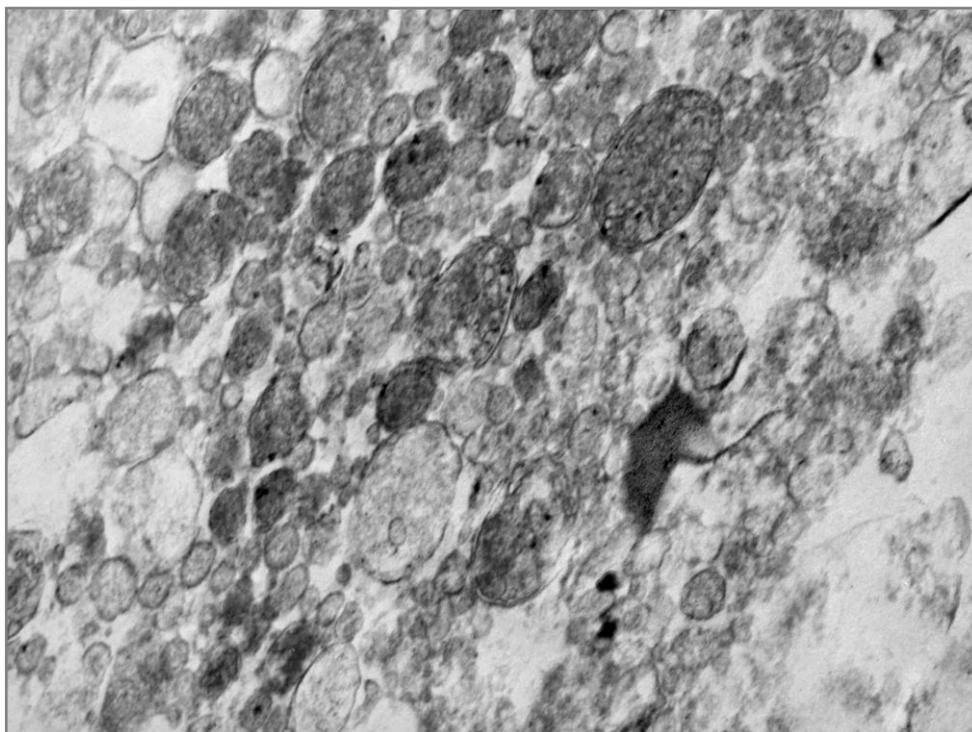
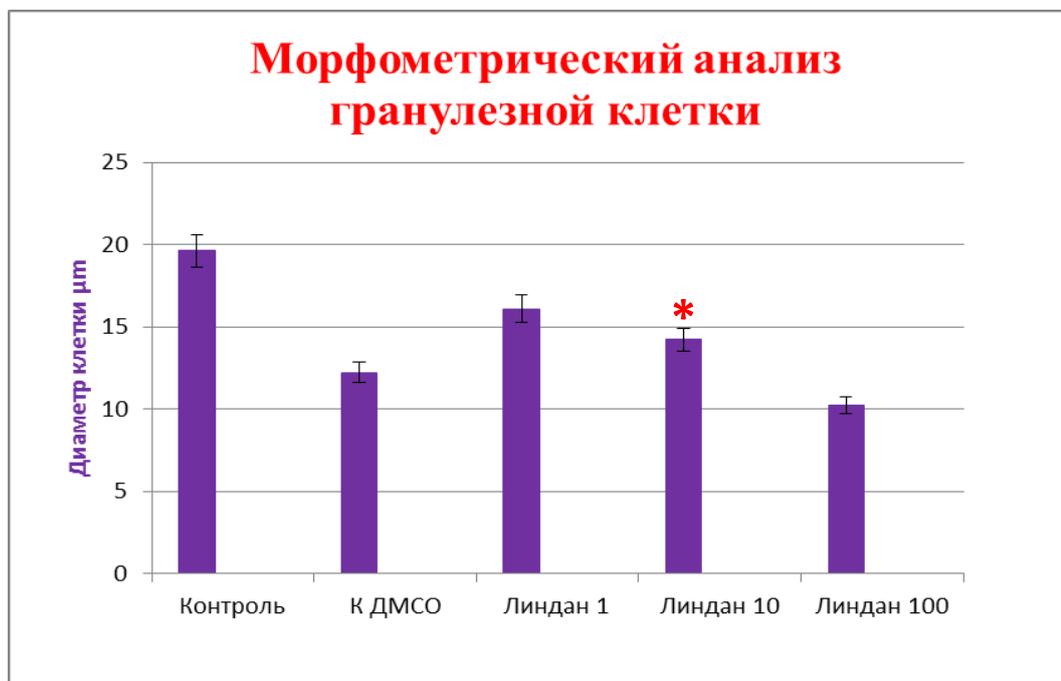


Рисунок 39 – ТЭМ, Ув. 2nm интенсивный феномен везикуляции цитоплазмы.

### 3.5. Морфостереометрия гранулезных клеток

Морфостереометрический анализ диаметра гранулезных клеток показал, что в контрольной группе средний диаметр гранулезных клеток составил  $19,6 \pm 7,5 \mu\text{m}$ ; а контроль с ДМСО  $12,2 \pm 2,9 \mu\text{m}$ , что на 37,8% меньше контроля. При воздействии Линдана в концентрациях 1, 10 и 100 отмечается динамическое уменьшение диаметра клеток  $16,1 \pm 4,9 \mu\text{m}$ ;  $14,2 \pm 3,9 \mu\text{m}$ ;  $10,2 \pm 1,6 \mu\text{m}$ , соответственно (Рисунок 40). Подсчет количества апоптотных клеток показал высокую активность апоптоза в контрольной и группе при воздействии линдана  $10 \mu\text{M}$ :  $22 \pm 1,7$ ,  $15,6 \pm 0,92$ . Самый низкий уровень апоптоза обнаружен в последней группе и составил  $4 \pm 0,89$ . Небольшие колебания в показателях отмечены в группе с ДМСО и в концентрации линдана  $1 \mu\text{M}$ :  $14,8 \pm 0,88$ ;  $13,1 \pm 0,62$  (Рисунок 41).

**Таким образом:** морфостереометрический подсчет диаметра клеток показал, что в условиях культивирования в ДМСО заметное уменьшение диаметра и резкое возрастание их при включении Линдана в концентрации  $1 \mu\text{M}$ , возможно за счет активации внутриклеточного биосинтеза как ответная реакция на стрессор. При дальнейшем повышении концентрации Линдана отмечается постепенное уменьшение объема, по-видимому за счет преобладания процессов апоптоза и некроза.



\*-  $p \leq 0,05$  достоверность различий в сравнении с контрольной группой

Рисунок 40 – Результат морфометрического анализа диаметра клетки в исследуемых группах.



\*-  $p \leq 0,005$  достоверность различий в сравнении с контрольной группой  
 \*\*-  $p \leq 0,0001$  достоверность различий в сравнении с контрольной группой  
 \*\*\*-  $p \leq 0,01$  достоверность различий в сравнении с контрольной группой  
 \*\*\*\*-  $p \leq 0,001$  достоверность различий в сравнении с контрольной группой

Рисунок 41 – Показатель количества апоптозных тел в исследуемых группах.

### 3.6. Определение уровня белка P53 в культуре клеток методом белкового блотинга

Использование белкового блотинга для определения уровня белка P53 с использованием позитивного контроля (Crt Pos) линии нейронных клеток показал, что высокий показатель в группе с концентрацией Линдана 10  $\mu\text{M}$  в контрольной группе, в группе с ДМСО и Линдан 100  $\mu\text{M}$  белок не обнаружен, по-видимому, за счет полного лизиса клеток. В группах с концентрацией Линдана 1  $\mu\text{M}$  и 10  $\mu\text{M}$  слабое и более интенсивное (соответственно) изменение цвета говорит о повреждении ДНК гранулезных клеток и активации клеточного апоптоза (Рисунок 42).

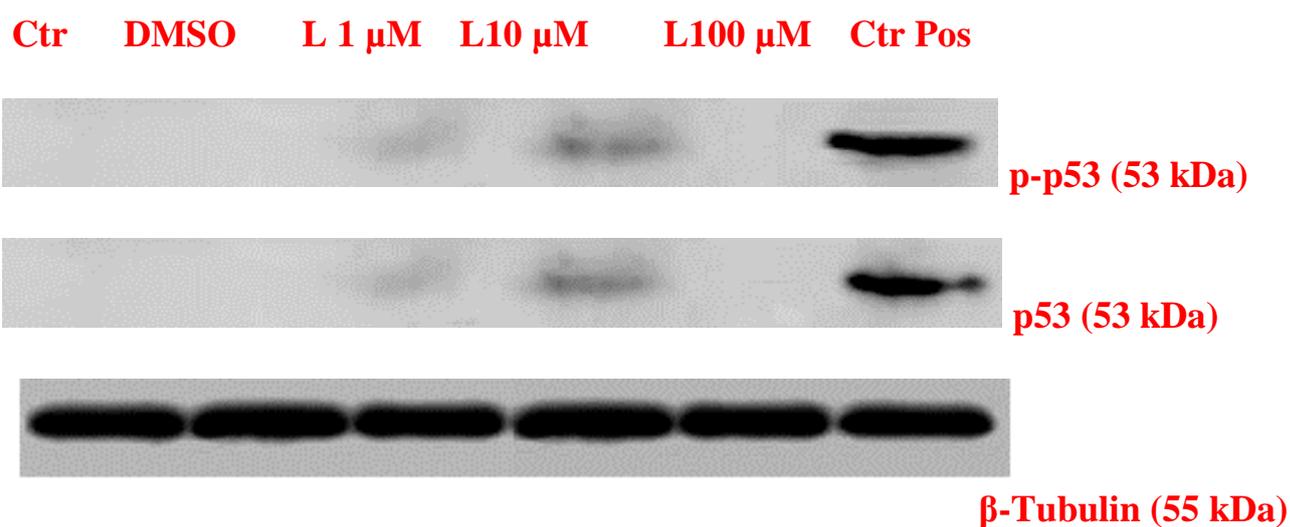


Рисунок 42 – Белковый блотинг с выявлением белка P53 в культуре гранулезных клеток.

**Таким образом:** умеренное содержание белка P53 в группе с Линданом 1  $\mu\text{M}$  и повышение его в группе с Линданом 10  $\mu\text{M}$  говорит о запуске апоптоза с повреждением генома клеток. Активация белка P53 в 3ей и 4ой группах дала мощный апоптогенный сигнал, благодаря которому элиминируются гранулезные клетки, подвергшиеся разрушению при воздействии Линдана. Отсутствие P53 в 5ой группе (Линдан 100  $\mu\text{M}$ ) говорит о низкой активности апоптоза.

## ОБСУЖДЕНИЕ И ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Как известно, социальный портрет современной женщины значительно претерпел изменения, поменялись приоритеты, в результате которых предназначение женщины – продолжение рода, часто откладывается на поздний репродуктивный период, что требует знаний не только состояния резерва яичников в возрастном аспекте, но и факторов, определяющих репродуктивный потенциал. Согласно многочисленным научным исследованиям снижение репродуктивного потенциала женщины может развиваться вследствие снижения фолликулярного пула, нарушения процесса фолликулогенеза, усиления апоптоза и атрезии фолликулов [175, 176, 177].

Овариальный резерв в научной литературе описывается как природный дар, во многом определяемый женским возрастом. Однако возраст сам по себе имеет ограниченное значение в оценке овариального резерва, репродуктивные возможности во много зависят от влияния различных факторов. Во-первых, от того как протекал период «утробного детства», как в дальнейшем идет становление репродуктивной системы в препубертатном и пубертатном периодах [85, с.301]. Во-вторых, от наличия фоновой патологии органов женской половой и эндокринной систем (поликистоз яичников, эндометриоз и т.д.). В-третьих, наличия факторов, негативно влияющих как на закладку фолликулов и их атрезию, так и на формирование репродуктивной системы в период ее становления – это воздействие неблагоприятных факторов окружающей среды (хронические интоксикации тяжелыми металлами, продуктами нефтепереработки, агрессивными органическими соединениями и т.д.) наличия вредных привычек – курение и употребление алкоголя [2, с.60].

Среди выше перечисленных факторов, влияющих на функциональное состояние женской репродуктивной системы, многими исследователями акцентируется роль экологической обстановки, где проживает женщина, ими подчеркивается, что исследование необходимо проводить, учитывая биогеохимическое состояние окружающей среды, ее качественные и количественные характеристики, так как изменения окружающей среды могут прямо отражаться на репродуктивном здоровье женщины [178]. Так в настоящем исследовании мы поставили **цель** изучить морфофункциональное состояние яичников в условиях воздействия хлорорганических пестицидов женщин репродуктивного возраста (на примере Приаралья).

В исследование включены женщины фертильного возраста (n=108), проживающие в двух отдаленных друг от друга территориях, имеющих разные биогеохимические критерии. После разработки протоколов исследования с соблюдением принципов Хельсинской декларации дизайн исследования был утвержден на заседании БЭК, у всех женщин, добровольно включенных в проект, были взяты информированные согласия. Исследуемую группу составили женщины, проживающие в г. Шалкар (n=54). С 1992 года согласно Закону «О социальной защите граждан, пострадавших вследствие экологического бедствия в Приаралье», данный населенный пункт относится к

зоне экологической катастрофы гибели Аральского моря [179]. В связи с высоким содержанием различных химических соединений, в частности агрессивных хлорсодержащих соединений, разносимых со дна высохшего моря, регион имеет глобальные изменения не только почвы, воды и воздуха, но и резкие изменения климата. Так по данным многочисленных исследований, лето характеризуется засушливостью с сильными сухими ветрами, а зима с очень низкой температурой [180, 181, 182]. Контрольная группа была сформирована из женщин города Актобе (n=54). Данный регион не входит в зону экологического бедствия.

Одним из основных условий отбора женщин в исследование, согласно поставленной цели, было условие проживания женщин в данных регионах на протяжении последних 10 лет. Помимо учета критериев исключения (ряд патологических состояний), мы определились с необходимым возрастным промежутком. Ориентиром нам послужили работы [83, с.77, 96, с.18,148, с.59], где указано, что фертильный возраст это диапазон от 25 до 37 лет, и характеризуется разгаром функциональной активности, т.е. хорошими показателями овариального резерва. К 37 годам овариальный резерв имеет тенденцию к постепенному физиологическому снижению, и при этом отмечено, что часто возникает раннее снижение функциональных возможностей яичников в результате воздействия различных факторов [96, с.19], что, несомненно, отражается на репродуктивной способности молодой женщины. Установлено, что скорость потери фолликулов удваивается, когда примордиальный пул сокращается до 25000 фолликулов и соответствует возрасту 37,5 лет. Этот возраст определяется как критический, после которого овариальный резерв резко снижается (Faddy M., Gosden R., 1995) [14, с.772].

В клинической части работы мы провели двухкратное ультразвуковое исследование яичников с определением объема органа, подсчетом количества антральных фолликулов, доплерографией сосудов яичников и определением уровней Антимюллерового и фолликулостимулирующего гормонов.

Как известно, ультразвуковое исследование неинвазивный, информативный и технический легко выполняемый метод, проводился нами двухкратно на 3-5 и 11-13 дни менструального цикла с четким мониторингом менструального цикла исследуемых женщин. *Результаты исследования показали, что объем левого и правого яичников в исследуемой группе (женщины г.Шалкар) был снижен на 12.7% и 25.4% соответственно по сравнению с контрольной группой в начале фолликулярной фазы. В конце фолликулярной фазы цикла отмечено аналогичное уменьшение объема органа левого на 18.5%, правого на 32.9% в исследуемой группе, по сравнению с контролем.* У здоровой женщины фертильного возраста овариальный **объем в основном около 4-6 см<sup>3</sup>**. Значительные изменения, которого претерпевают в начале и в конце репродуктивной жизни. Более того, объем яичников может изменяться в определенных экстремальных патологических ситуациях, таких как анорексия, первичная овариальная недостаточность, при которой заметный гипоестрогенный статус. Так, к примеру, у женщин, страдающих ожирением,

объем яичников по данным УЗИ был выше по сравнению с контрольной группой, и это увеличение происходило за счет мультифолликулярной трансформации и наличия кист у обследованных. И при этом число фолликулов с диаметром 2-5 мм было в 2 раза больше, чем в контрольной группе [183]. Если проводить анализ уменьшения объема яичников соответственно возрасту, наши данные сходятся с имеющимися исследованиями, где указывается четкая связь возраста с объемом органа, и при этом еще исчерпывается оставшийся пул примордиальных фолликулов [184]. В рамках скрининга по Программе рака яичников Университета Кентукки 13,963 женщин, в возрасте от 25 до 91 лет, ежегодный УЗИ скрининг показал статистически значимое уменьшение объема яичников с каждым десятилетием жизни от 30 лет до 70 лет [185].

Снижение объема яичников в нашем исследовании как физиологического возрастного процесса дополнительно «стимулируется» воздействием экологического фактора. Особенностью полученных результатов нашего исследования было снижение объема органа, при котором произошло неравномерное изменение соотношения объема составляющих его зон: коркового и мозгового. Корковое вещество, представленное фолликулами в разных стадиях созревания уменьшилось в объеме на 2 раза в сравнении с контрольной группой и относительно мозгового вещества, которое, как известно, представлено сосудами и нервами органа. Данный результат мы связываем с особенностями ангиогенеза сосудов яичников женщин, постоянно проживающих в специфических условиях экологического окружения. Воздействие хлороганических пестицидов привело по видимому к компенсаторному усилению развития сосудистой системы органа в ответ на токсическое воздействие. Мозговое вещество расширено в объеме, корковое, несмотря на сужение, сохраняет функциональную активность, но при этом качество резко снижается. Подобное компенсаторное развитие ангиогенеза достаточно информативно описывается в работах G.Macchiarelli [186].

Действие экотоксикантов на объем яичников прослеживается во многих исследованиях изучающих роль экологического фактора, при этом получаемые результаты порой противоположны. Так, к примеру, ультразвуковое исследование женщин, проживающих в неблагоприятных регионах Таджикистана, показали увеличение среднего размера яичников, с множеством атретичных фолликулов по периферии [187]. В исследованиях Т.Б. Макухиной [188] яичники, подвергнутые транзиторной ишемии, не изменяли ультразвуковых особенностей параметров объема и качества фолликулярного аппарата.

*Подсчет количества антральных фолликулов в исследуемой группе в левом и правом яичниках был снижен на 7.5% и 41.4% соответственно по сравнению с контрольной группой в начале фолликулярной фазы менструального цикла. В конце фолликулярной фазы в левом яичнике уменьшение фолликулов было на 15%, справа на 34.4% по сравнению с контрольной группой исследования. Эти два ценных ультразвуковых показателя: объем яичников и количество антральных фолликулов в нашем исследовании демонстрируют снижение*

овариального резерва в группе женщин, проживающих в Приаралье, и подчеркивают большую значимость этих параметров для определения функционального состояния органа. Так Pavlik E. et al. (2000) установил значимость измерения объема яичников и подсчета количества антральных фолликулов с использованием УЗИ. Он показал, что женщины с низкими показателями овариального резерва, имели очень высокий шанс неудачного ответа на индукцию овуляции экзогенными гонадотропинами, проводимыми в ходе экстракорпорального оплодотворения и программ внутрицитоплазматической инъекции (ИКСИ/ЭКО). Erdem M. с соавторами [189] исследовав детородных и бесплодных женщин, показал сильную прямую связь между средним значением объема яичников и овариальным резервом. Так, среди современных женщин фертильного возраста с низкими показателями овариального резерва у 15% репродуктивная функция не может быть осуществлена, а у 63% реализация ее крайне затруднительна (Левина Л.И., 2006; Киселев А.М., Коновалов О.Е., 2011). У женщин, проживающих в Саудовской Аравии, ультразвуковое исследование показало, что измерительными оказались фолликулы с диаметром 2-9 мм, распределявшихся по периферии яичника и объем яичников был больше 9 см<sup>3</sup> [190]. При обследовании женщин, страдающих СПКЯ, была обнаружена корреляция между числом фолликулов, которое было <10 мм, и объем яичников также был увеличен [191].

Измерение соотношения коркового и мозгового вещества показало, что соотношение коркового и мозгового вещества неравномерно увеличено в сторону мозгового, а в сравнении с контролем корковое вещество уменьшено в 2-2,5 раза. Несмотря на данные изменения, объем яичников исследуемой группы, уменьшившись относительно контрольной, все же остается в пределах нормы. По нашему мнению, данный результат можно объяснить особенностями формирования ангиогенеза органа женщин, длительно проживающих в регионе Приаралья, как компенсаторно-приспособительный механизм на хроническое воздействие токсикантов.

Изучение локального кровотока яичников проведено при помощи цветового доплеровского картирования (ЦДК), которое базируется на способности метода выявлять как доплерографические характеристики потоков в кровеносных сосудах, так и показатели скоростей в них при различных патологических состояниях. В нашем исследовании полученные результаты демонстрируют достоверные различия в пульсационном индексе левого яичника между группами. В частности, пульсационный индекс основной группы соответствовала  $0,94 \pm 0,09$ , в контрольной группе  $1,15 \pm 0,55$  что было в 1,2 раза выше чем в исследуемой группе. По данным J. Zaidi и соавт., М.В. Медведева и соавт. пульсационный индекс в норме колеблется от 0,6 до 1 в овулирующем яичнике и от 0,8 до 1,03 в неовулирующем яичнике.

В нашем исследовании мы пользовались показателями кровотока в норме в фолликулярную фазу установленные Т.В. Клинышковой (2014) и выявили, что индекс резистентности и максимальный объем кровотока правого яичника в

начале фолликулярной фазы снижен в сравнении с поздней фолликулярной фазой в исследуемой группе и при сравнении с контролем [192].

По данным нашего исследования, в начале фолликулярной фазы в сравнении с поздней фолликулярной фазой, в исследуемых группах отмечается снижение показателей кровотока с преимуществом в правом яичнике. А, как известно в норме сосудистая резистентность яичников женщин репродуктивного возраста высокая в течение начальной фазы менструального цикла и прогрессивно снижается с увеличением эстрогенного уровня до времени овуляции и в течении лютеинизирующей фазы. Полученные нами результаты дали противоречивые аргументы, демонстрирующие последующие возрастной период женщины, и мы предполагаем, что это феномен «раннего физиологического старения» органа.

Вторым интересным фактом оказалось «равновесие» между плавно сниженными показателями кровотока и функциональными показателями органа, при котором показатели кровотока и объема с количеством антральных фолликулов в начале и в конце фолликулярной фазы изменялись однотипно, свидетельствующее о возможной независимости степени кровотока и функциональной способности. По нашему мнению, это свидетельствует о возможной активации адаптационных механизмов органа женщин при длительном воздействии экологических поллютантов.

Качественный показатель кровотока максимальная систолическая скорость обоих яичников (правого и левого) незначительно увеличивались в течение начала фолликулярной фазы как в исследуемой группе, так и в контрольной группе ( $10,7 \pm 2,2$  и  $12,1 \pm 7,65$ ,  $10,4 \pm 1,28$  и  $13,4 \pm 7,3$  см/с соответственно) и возрастали в период поздней фолликулярной фазы менструального цикла ( $11,09 \pm 4,19$  и  $15,7 \pm 5,73$ ,  $10,9 \pm 2,87$  и  $14,1 \pm 6,34$  см/с соответственно).

Показатели минимального диастолического сопротивления правого яичника показал  $3,55 \pm 1,6$  и  $4,24 \pm 2,48$  см/с (в контрольной и исследуемой группах соответственно), левого яичника ровнялся  $3,6 \pm 1,16$  см/с и  $5,44 \pm 3,1$  см/с ( $p=0,000082$ ) в начале фолликулярной фазы, а в конце фолликулярной фазы показало в правом яичнике  $4,25 \pm 2,09$  см/с и  $3,21 \pm 2,02$  см/с ( $p=0,01$ ) и в левом  $4,93 \pm 2,84$  см/с и  $3,03 \pm 1,35$  см/с ( $p=0,00002$ ) (в контрольной и исследуемой группах соответственно).

При норме по данным М.Н. Буланова (2009) максимальная систолическая скорость на 5-7 день менструального цикла в пределах (9,8-19,8 в овулирующем яичнике и 4,7-14,3 неовулирующем яичнике), на 11-14 день цикла (16,3-20,9 в овулирующем яичнике и 8,6-10,6 неовулирующем яичнике). Показатели минимального диастолического сопротивления на 5-7 день менструального цикла варьируют в пределах (0,45-0,55 в овулирующем яичнике и 0,48-0,61 неовулирующем яичнике), на 11-14 менструального цикла (0,45-0,52 в овулирующем яичнике и 0,42-0,57 неовулирующем яичнике).

*Приведенные выше результаты* показывают, что экологическая обстановка Приаралья имеет свое неблагоприятное воздействие и способно изменять морфологическую структуру органа отражающееся в четко установленных

современными исследователями параметрах отражающих овариальный резерв. В исследуемой группе женщин идет заметное снижение показателей объема органа, количества антральных фолликулов и показателей стромального кровотока. Для уточнения функциональной способности органа при измененных ультразвуковых показателях проведено биохимическое исследование гормонального статуса. Так при сравнении между двумя группами показатели АМГ имели значительные различия, несмотря на то, что показатель гормона находился в пределах нормы в обеих исследуемых группах, в исследуемой группе уровень гормона был низкий, по сравнению с контролем. Уровень АМГ оказался сниженным на 41,1% в исследуемой группе, по сравнению с контрольной группой исследования. По данным литературных источников, уровень АМГ в сыворотке крови в ранней фолликулярной фазе связан с возрастом пациентов, длительностью бесплодия, состоянием яичников при трубно-перитонеальном бесплодии (ТПБ), он является одним из точных показателей репродуктивного потенциала яичников, биологического возраста яичников и отражает характер происходящих внутрияичниковых процессов [193]. По данным исследования van Disseldorp J. et al. (2008 г.) показало, что чем ниже уровень АМГ у женщины репродуктивного возраста, тем быстрее темп снижения концентрации гормона и более раннее наступление менопаузы [194]. Отмечено, что при оценке факторов риска нарушений функции репродуктивной системы выявлена зависимость между низким уровнем АМГ и курением [195]. По данным К.Ю. Боярского и соавт. (2009) при таких патологиях как эндометриоз, синдром преждевременного истощения яичников, трубно-перитонеальное бесплодие уровень АМГ не определялся или был крайне низким менее 2 нг/мл, а также избыточный вес и ожирение играют роль в снижении уровня данного гормона [196,197].

Существенного различия в отношении биохимических маркеров овариального резерва, включающего ФСГ мы не обнаружили в начале фолликулярной фазы менструального цикла. В конце фолликулярной фазы, было выявлено незначительное снижение показателя гормона в исследуемой группе, по сравнению с контролем. Так в конце фолликулярной фазы гормон был снижен на 30,2% в исследуемой, по сравнению с контрольной группой. Несмотря на то, что Erdem M. et al. , пришли к выводу, что базальный уровень ФСГ и количество антральных фолликулов не отличались у женщин как с бесплодием, так и у детородных женщин, Scheffer et al., пришли к выводу, что определенное количество малых антральных фолликулов имеют лучшую корреляцию с хронологическим возрастом в раннюю фолликулярную фазу менструального цикла [198]. Larsen et al. (2003), установили, что овариальный резерв у перенесших онкологическое заболевание в детском возрасте, с регулярным менструальным циклом и уровнем базального ФСГ <10 МЕ / л имели значительно меньший объем яичников и сниженное количество малых антральных фолликулов в яичнике, чем в контрольной группе. При изучении синдрома поликистозных яичников оказалось, что уровень ФСГ относительно

низкий, в то время когда уровень АМГ более высокий, чем у здоровых женщин [199].

Для установления степени вероятности развития синдрома слабого ответа яичников в программах вспомогательных репродуктивных технологий при контролируемой стимуляции яичников была проведена сравнительная характеристика двух методов диагностики: определение антимюллера гормона и доплерометрическое исследование кровоснабжения яичников. Допплерометрическое исследование кровоснабжения яичников во всех исследуемых группах показало ответ яичников на протоколы стимуляции, а уровень антимюллера гормона был ниже нормы у женщин с нормальным ответом яичников и имел нормальные значения у пациенток со слабым ответом яичников [200].

Нами проведено исследование корреляционной связи между полученными результатами. Обнаруженные корреляционные зависимости между данными ультразвукового исследования яичников и гормональными показателями свидетельствуют о том, что имеется положительная корреляционная связь между морфологическими показателями органа, такими как объем яичников, количество антральных фолликулов с уровнем гормонов в крови женщин определяющих овариальный резерв. Эти данные подтверждаются выявленной положительной корреляционной связью между состоянием стромального кровотока, а именно пульсационного индекса и объемом яичника. А. Обгуса в своем исследовании обнаружил положительную корреляционную связь между уровнем сывороточного эстрадиола и овариальным объемом, которое хорошо демонстрировалось только в пубертатном и в более старшем возрасте в начале менопаузы [201].

Следующим шагом в нашем научном исследовании было морфологическое исследование, проведенное с целью изучения воздействия различных концентраций линдана в *in vitro* эксперименте, которое резюмировало неблагоприятное экологическое состояние региона Приаралья. Анализ различных исследований, проведенных в зоне катастрофы, выявил преобладание содержания хлорсодержащих пестицидов в биологических объектах, а также их кумулятивную способность в отношении репродуктивных органов экспериментальных животных. Не говоря о наличии этих химикатов в воде, почве и воздухе, также было обнаружено их присутствие в грудном молоке женщин жительниц региона [65, с.747]. Доказано, что агрессивность токсикантов зависит не только от дозы, но и строго коррелирует с кратностью и длительностью воздействия. Так, к примеру, длительное введение грызунам женской особи гексахлоргексана показало его высокое накопление в органах репродуктивной системы, что привело к четко выраженным изменениям эндокринной физиологии яичников, задержке развивающихся ооцитов, росту аномальных клеток, изменению эстрального цикла и продолжительности других фаз [202].

Выбор концентрации линдана нами определен на основании имеющихся исследований, где были применены концентрации химиката в диапазоне от 1 до

100  $\mu\text{M}$  [172]. Исследователи показали, что нормальная архитектура фолликула была четко изменена при дозе линдана 15  $\mu\text{M}$  в *in vitro* условиях, показанный отсутствием развития нормальных межклеточных щелевых контактов из-за снижения экспрессии гена коннексина 43 [203]. При дозе же близкой к 100  $\mu\text{M}$  наблюдалась высокая частота гибели клеток путем апоптоза. Изучение воздействия непосредственно на клетку в условиях *in vitro* дает более детальную морфологическую картину понимания прямого, однократного воздействия соединения. Экспериментально доказан эффект пестицидов, приводящий к компенсаторной яичниковой гипертрофии, снижению количества здоровых фолликулов, увеличению атретических фолликулов, а также изменению секреции гонадотропинов [204].

Наши результаты, полученные в *1 группе* (контроль), продемонстрировали гранулезные клетки с ультраструктурной характеристикой присущие здоровой, метаболически активной, нормальной стероидной клетки. Ультраструктура гранулезных клеток в контрольной группе характеризовалась дегенерацией, свойственной данным клеткам в процессе их функциональной активности проявляющуюся усилением физиологического апоптоза: потеря клеточной мембраной микроворсинчатости, маргинализация ядра, конденсация хроматина, фрагментация ядер с образованием апоптозных тел, средний показатель диаметра гранулезных клеток оставался нормальным. Активность процесса апоптоза была высокой по сравнению с другими группами исследования. О функциональной активности клеток свидетельствовало также высокое содержание липидных включений, обуславливающих процесс стероидогенеза половых клеток. Nottola S.A. Heyn R. [205] показали, что здоровые гранулезные клетки положительно влияют на раннее *in vitro* эмбриональное становление под действием их стероидной и белковой секреции, который ими был определен как мнимый «эмбриотрофический» фактор. Так как апоптоз представляет собой процесс, неотъемлемый от функционирования яичника и отвечает за развитие доминантного фолликула, желтого тела, фолликулярную атрезию и овуляцию, мы полностью руководствуемся полученными нормальными показателями контрольной группы для дальнейшего сравнительного изучения с экспериментальными группами.

Результаты *2ой группы* с применением ДМСО в процессе культивирования, на фоне благоприятной клеточной морфологии с отсутствием процессов некроза клеток, активность апоптоза снижена в 1,6 раз в сравнении с контролем и показатель клеточного диаметра равнозначен показателю активности апоптоза. Можно судить о том, что воздействие ДМСО несколько нарушило процесс физиологического апоптоза, но не привело к некротической гибели клеток, за счет положительных свойств раствора на клетки и ткани. Возможность применения ДМСО благодаря способности предотвращения оксигенного стресса и сохранения клеточной проницаемости в культивировании клеток отражена в большом количестве исследований. К примеру, (Keros V.) показал, что использование в качестве криопротектора

ДМСО концентрации 5% сохраняет морфологию клеток Лейдига и их способность к синтезу тестостерона в культуре после криоконсервирования [206]. По нашему мнению, если инкубирование гранулезных клеток провести более длительно, то показатель активности апоптоза дал бы показатели близкие к контролю, за счет адаптации клеток к изменившейся среде. Сохранение клеточной мембраны при действии ДМСО объясняет De la Torre (1981) способностью вещества улучшать мозговое и спинальное кровообращение после травмы, при котором он предохраняет разрушение цереброваскулярной эндотелиальной поверхности, снижает адгезию коллагена [207]. Предполагается, что ДМСО снижает утилизацию кислорода и ингибирует эффект его на митохондриальную функцию (Ghosh A.K.) [208].

Результаты 3-ей группы с концентрацией линдана 1  $\mu\text{M}$  продемонстрировали противоположные данные: не высокая активность клеточного апоптоза с высокими показателями диаметра клеток ( $16,1 \pm 4,9$ ), характеризовавшееся выраженной клеточной дезорганизацией. Диаметр клеток несколько меньше контроля, но самый высокий среди остальных групп.

В данной группе при проведении белкового блотинга отмечено повышение уровня белка p53 в сравнении с постконтролем. Известно, что при отсутствии повреждений генетического аппарата белок p53 находится в неактивном состоянии, а при появлении повреждений ДНК активируется и запускает транскрипцию группы генов дальнейшего повреждения клетки. Результатом активации p53 является остановка клеточного цикла и репликации ДНК; при сильном стрессовом сигнале - запуск апоптоза. Белок p53 активируется при повреждениях генетического аппарата, а также при стимулах, которые могут привести к подобным повреждениям, или являются сигналом о неблагоприятном состоянии клетки (стрессовом состоянии). Функция белка p53 состоит в удалении из пула реплицирующихся клеток тех клеток, которые являются потенциально онкогенными (отсюда образное название белка p53 англ. *guardian of the genome* — хранитель генома). Данное представление подтверждается тем фактом, что потеря функции белка p53 может быть установлена в ~50 % случаев злокачественных опухолей человека.

Результаты 4ой группы наряду с токсическим действием линдана в концентрации 10  $\mu\text{M}$  в виде разреженности клеток, наполненностью межклеточного пространства разрушенными фрагментами цитоплазмы, отмечается высокая активность апоптоза в сравнении с 2ой и 3ей группами. Так в исследованиях Heimler I, Rawlings RG [209] отмечена активация апоптоза человеческих лютеинизирующих гранулезных клеток при воздействии различных концентраций трихлордиметила в *in vitro* эксперименте. Через 48 часов инкубации при дозах 3,1mM и 3,1  $\mu\text{M}$  апоптоз увеличился на 45 и 62% соответственно. Так, при исследовании влияния фунгицида этиленбисдитиокарбамата на ооциты мышей было выявлено доза-зависимое морфологическое изменение на стадии развития мейоза, влияние на скорость оплодотворения и апоптоз эмбриона. Также, при исследовании влияния низкой концентрации данного вещества на гранулезные клетки, были отмечены доза-

зависимые морфологические изменения клеток и снижение экспрессии p53, вплоть до развития предракового состояния клеток [210, 211].

Результаты *5ой группы* с концентрацией линдана 100  $\mu\text{M}$  *in vitro* показало дозозависимое токсическое действие на гранулезные клетки. Возникшие ультраструктурные изменения гранулезных клеток строго коррелировали от применной дозы, при высокой дозе линдана 100  $\mu\text{M}$  произошли выраженные некротические процессы: деструкция мембраны, лизис ядра, разрушение цитоплазмы с выходом внутриклеточного содержимого в межклеточное пространство. Как и показали результаты исследования, статистически доказано резкое снижение процесса апоптоза в сравнении со всеми группами. Известно, апоптоз признан как важный механизм сложной фолликулярной атрезии. Пролиферация, миграция, дифференциация и клеточная гибель составляющие наиболее важные шаги в процессе развития и перехода тканей в органы. Клеточная смерть может произойти двумя путями: некрозом или апоптозом. Некроз есть результат клеточного повреждения или экологически неблагоприятного воздействия с продукцией серии клеточных альтерации, что начинается с повышения проницаемости клеточной мембраны являющееся последствием изменений цитоплазматической структуры с последующей ядерной дегенерацией. С другой стороны, апоптоз – это процесс самостоятельной клеточной деструкции, который также вызывает активный процесс внутриклеточного синтеза и контролирует клеточный геном. Апоптоз гранулезных клеток первичный результат ядерного уплотнения, разрушение хроматина в большие бесформенные массы окружающие ядерную оболочку.

Таким образом, по результатам нашего исследования отмечена прямая зависимость степени структурных клеточных изменений от дозы линдана, чем выше концентрация, тем отчетливее проявляется деструкция органелл, апоптотические изменения. В 1ой и 2ой группах процесс апоптоза выраженный на фоне сохранных клеточных структур. Лишь при воздействии ДМСО активность несколько снижена. В 3ей группе процесс апоптоза резко снижается в сравнении с 1ой и 2ой группами, уже на фоне дезорганизации клеточных структур. Усиление апоптоза в 4ой группе при концентрации линдана 10  $\mu\text{M}$  мы понимаем усилением процесса некротической формы апоптоза. А резкое снижение его в 5ой группе, соответствует морфологическому состоянию, т.е. полному некрозу клеточных структур. Исследования, проведенные С.Сампagna, М.Сирард [212] по воздействию органохлоридной микстуры содержащей в своем составе более 10 сложных органических компонентов на созревание, оплодотворение и развитие эмбриона показало, что также имеется строгая дозозависимость проявления клеточных повреждений. Ими установлено, что в изучаемых группах качество расширения (распространения на стекле) кучевого облака клеток коррелировало от дозы, применной в группе [213]. Полученные результаты совпадают с полученными нами результатами: выявлено линейное возрастание уровня апоптоза клеток, т.е. чем выше концентрация, тем выраженнее структурные изменения. Однако преимуществом нашего исследования в сравнении с полученными

результатами С.Campagna, M.Sirard [212] является возможность избирательного изучения хлорсодержащего пестицида, что дает наиболее точную картину токсичности Линдана в различных концентрациях.

M.Scascitelli, F.Pacchierotti [214] исследовали репродуктивную токсичность линдана на самках в условиях *in vivo*, а конкретно их влияние на развивающиеся ооциты до оплодотворения и кратковременную эмбриотоксичность на ранних стадиях деления клеток. Исследование расширило представление о токсичности пестицида и представило также дальнейший возможный механизм линдан-индуцированного эмбриотоксического эффекта. Данная работа подтверждает наши результаты: при воздействии линдана возникли необратимые повреждения в виде лизиса, фрагментации клеточных структур.

Согласно результатам ряда исследований, токсичность связана с возможными изменениями на уровне рецепторов гормонов, в частности, на рецептор эстрогена [215]. Некоторые исследования показывают, что токсический эффект может быть вызван торможением клеточных стыков [216], и индукционными механизмами запрограммированной клеточной гибели или апоптоза [217]. Линдан и другие хлорорганические соединения могут действовать как антагонисты на рецепторы эстрогена, действуя как эндокринные модуляторы или "эндокринные разрушители» во время созревания органов женской репродуктивной системы [218]. Кроме того, воздействие высоких доз токсического агента (40-100  $\mu\text{M}$ ) вызывают проапоптотические факторы, активирующие запрограммированную гибель гранулезных клеток [219]. Это подтверждается данными нашего исследования, полученными при высокой концентраций линдана (100  $\mu\text{M}$ ). Ультраструктурный анализ показал наличие явления апоптоза, а также зависимость между концентрацией токсичного агента и гибелью клеток [220]. Кроме полученных и обсужденных выше показателей, мы также можем судить о активности процесса апоптоза проявлением белка P53. Наибольшая активность проявилась в 3 и 4ой группе исследования, свидетельствующая о запуске апоптоза с повреждением генома клетки. Из ряда исследований известно, что увеличение концентрации белка P53 свидетельствует о подготовке клетки для быстрой реакции на возможное возникновение повреждений ДНК.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Проведенный научный поиск доступных результатов научных исследований полностью отражает актуальность экологической проблемы современного Казахстана. Проблема гибели Арала, повлекшая за собой негативное последствие на состоянии здоровья населения, а в частности здоровья женщин и детей, продолжает оставаться в центре научных исследований.

Как известно, здоровье потомков напрямую зависит от исходного состояния женщины, способности ее к нормальному зачатию, вынашиванию и рождению здорового ребенка. Научными исследованиями доказано, что ключевая роль в оценке овариального резерва женщины отведена эндокринным органам. Исследования различных авторов, а также полученные нами результаты свидетельствуют, что экология с высоким содержанием хлорсодержащих пестицидов способно нарушать морфофункциональную организацию яичников, изменять нормальное соотношение функциональных зон железы, за счет усиленного развития компенсаторного ангиогенеза; приводить к нарушению функции желез внутренней секреции, вызывать устойчивые ультраструктурные изменения с запуском процессов апоптоза и некроза клеток. Резюмирую проведенное исследование, мы пришли к следующим выводам:

1. Определены морфологические критерии, характеризующие овариальный резерв яичников женщин, проживающих в зоне Приаралья, контактирующих с хлорорганическими пестицидами в сравнении с контролем:
  - ✓ обнаружено снижение объема яичников в пределах нормы за счет изменения соотношения объемов коркового и мозгового слоев;
  - ✓ выявлено снижение функциональной активности органа за счет уменьшения количества антральных фолликул на 41,4% в первую фазу менструального цикла в правом яичнике;
  - ✓ обнаружено снижение индекса резистентности внутриорганного кровотока на 18%, пульсационного индекса на 18%, снижение общего объема кровотока в сравнении с контролем, демонстрирует развитие компенсаторных механизмов развитых в процессе ангиогенеза репродуктивной системы.
2. Выявлены функциональные нарушения в виде снижения уровня ФСГ и АМГ (30,2 % и 41,1% соответственно), что свидетельствует о тесной положительной корреляционной связи структуры и функции органа.
3. Воздействие Линдана на гранулезные клетки в *in vitro* эксперименте является дозозависимым:
  - ✓ при воздействии Линдана 1 мкМ запускается защитная реакция сохранения ультраструктур, гранулезные клетки увеличиваются в диаметре (16μm) с богатым содержанием митохондрий на фоне сужения межуточного

пространства, наряду с этим продолжается физиологический апоптоз клеток подтверждаемый уровнем белка P53;

- ✓ активация апоптоза происходит в концентрации 10μМ по типу некротической формы апоптоза;
- ✓ воздействие 100 μМ Линдана приводит к увеличению количества некротических клеток, при котором количество апоптозных тел становится в 4 раза меньше в сравнении с Линданом 10 μМ.

4. Изучение полученных экспериментальных и клинических результатов показало достоверную корреляционную связь между ультразвуковыми показателями и уровнем гормонов. Клинические данные подтверждают полученные экспериментальные результаты, что воздействие возрастающей концентрации Линдана приводит к развитию цепи ультраструктурных нарушений: дистрофии, некротической формы апоптоза и некрозу.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Представленные морфофункциональные результаты путем постановки эксперимента и исследования женщин территории Приаралья, отражают ультраструктурные изменения, и состояние овариального резерва женщин фертильного возраста, послужат предпосылкой в дальнейших поисках путей изучения яичников.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Zachow M. R. Developmental exposure to environmental endocrine disruptors: Consequences within the ovary and on female reproductive function // *Reproductive Toxicology*. – 2007. – №23. – P.337– P.352.
- 2 Османов Э.М., Пышкина А.С. Влияние алкоголя на репродуктивное здоровье женщин // *Вестник Тамбовского Государственного Университета*. – 2010. – №1. – Т.15. – С.59-62.
- 3 Grande M., Borobio V., Jimenez J. M., Bennasar M., Stergiotou I., Penarrubia J., Borrell A. Antral follicle count as a marker of ovarian biological age to reflect the background risk of fetal aneuploidy // *Human Reproduction*. – 2014. – Vol.29, No.6. – P.1337–1343.
- 4 Stephen A. S. Noise Effects on Health in the Context of Air Pollution Exposure // *Int. J. Environ. Res. Public Health*. – 2015. – №12. – P.12735-12760.
- 5 Локшин В.Н. Вспомогательные репродуктивные технологии в комплексном лечении бесплодия в Республике Казахстан // *Вестник Уральской медицинской академической науки*. – 2013. – №3. – С.20-23.
- 6 Каримсакова Б.К. Влияние хронических воспалительных заболеваний органов малого таза на качество жизни женщин // В сборнике: Теоретические и практические аспекты развития современной науки материалы XVIII международной научно-практической конференции. – 2015. – С.90-92.
- 7 Ципурия Н.Г. Клинико-эпидемиологический ретроспективный анализ женского бесплодия // *Вестник Кыргызско-Российского Славянского университета*. – 2014. – Т. 14, № 4. – С.165-167.
- 8 Krivonogov S. K. , Burr G. S., Kuzmin Y.V., Gusskov S.A., Kurmanbaev R.K., Kenshinbay T.I., Voyakin D.A. The fluctuating Aral Sea: A multidisciplinary-based history of the last two thousand years // *Gondwana Research*. – 2014. – №26. – P.284–300.
- 9 Тажиева А.Е. Оценка гинекологической заболеваемости работниц промышленных предприятий Республики Казахстан // *Журнал акушерства и женских болезней*. – 2008. – Т. LVIII, №1. – С. 92-99.
- 10 Indoitu R., Orlovsky L., Orlovsky N. Dust storms in Central Asia: Spatial and temporal variations // *Journal of Arid Environments*. – 2012. – №85. – P.62-70.
- 11 Семенов О.Е., Шапов А.П., Галаева О.С., Идрисова В.П. Ветровой вынос и песчано-солевые выпадения с осушенной части дна Аральского моря // *Аридные экосистемы*. – 2006. – Т.12, №29. – С.47-58.
- 12 Kuni O., Hashizume M., Chiba M., Sasaki S., Shimoda T., Caupil W., Dauletbaev D. Respiratory Symptoms and Pulmonary Function among School-Age Children in the Aral Sea Region // *Archives of Environmental Health*. – 2003. – Vol. 58, №11. – P.468-470.
- 13 The future of the Aral Sea lies in transboundary co-operation Article reproduced from United Nations Environment Programme (UNEP) Global Environmental Alert Service (GEAS) // *Environmental Development*. – 2014. – №10. – P.120–128.

- 14 Faddy M., Gosden R. A mathematical model of follicle dynamics in the human ovary // *Human Reproduction*. – 1995. – Vol.10. – P. 770-775.
- 15 Richardson S.J., Senikas V., Nelson J.F. Follicular depletion during the menopausal transition: evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 1987. – Vol. 65, №6. – P.1231-1237.
- 16 Селютина М.Ю., Евдокимов В.И., Сидоров Г.А. Врожденные пороки развития как показатель экологического состояния окружающей среды. // *Научные ведомости*. – 2014. – №11. – С. 173-177.
- 17 Беспалова О.Н. Генетика невынашивания беременности // *Журнал акушерства и женских болезней*. – 2007. – №1. – С.81-92.
- 18 Jensen S., Mazhitova Z., Zetterstrom R. Environmental pollution and child health in the Aral Sea region in Kazakhstan // *Sci Total Environ.* – 1997. – №206. – P. 187-193.
- 19 Aguilar-Garduño C., Lacasaña M., Blanco-Muñoz J., Rodríguez-Barranco M., Hernández A.F., Bassol S., González-Alzaga B., Cebrián M.E. Changes in male hormone profile after occupational organophosphate exposure. A longitudinal study // *Toxicology*. – 2013. – №307. – P. 55–65.
- 20 Toft G., Hågmar L., Giwercman A., Bonde J.P. Epidemiological evidence on reproductive effects of persistent organochlorines in humans // *Reproductive Toxicology*. – 2004. – Vol.19. – Vol.5–26.
- 21 McKinlay R., Plant J.A., Bell J.N., Voulvoulis N. Endocrine disrupting pesticides: Implications for risk assessment // *Environment International*. – 2008. – Vol. 34. – P. 168–183.
- 22 Andersson A.M., Frederiksen H. Special issue in the impact of indocrine disrupters on reproductive health // *Reproduction and fertility*. – 2014. – №147(4).
- 23 Amaral Mendes J.J. The endocrine disrupters: a major medical challenge // *Food and Chemical Toxicology*. – 2002. – №40. – P.781–788.
- 24 Kislitskaya V.N., Kenzhin Zh.D., Kultanov B.Zh., Dosmagambetova R.S., Turmuhambetova A.A. Disturbance of Antioxidant Enzymes and Purine Metabolism in the Ejaculate of Men Living in Disadvantaged Areas of Kyzylorda Region // *Macedonian Journal of Medical Sciences*. – 2015. – № 3(3). – P.489-492.
- 25 Izhitskiy A. S., Zavialov P.O., Sapozhnikov P.V., Kirillin G. B., Grossart H. P., Kalinina O.Y., Zalota A. K., Goncharenko I.V., Kurbaniyazov A. K. Present state of the Aral Sea: diverging physical and biological characteristics of the residual basins // *Sci Rep*. – 2016. Vol.6, №23906. – P. 1-9.
- 26 Crighto E.J., Barwin L., Small I., Upshu R. What have we learned? A review of the literature on children's health and the environment in the Aral Sea area // *Int J Public Health*. – 2011. – №56. – P.125–138.
- 27 Оракбай Л.Ж., Альназарова А.Ш. Влияние содержания остаточного количества пестицида пропанида в желудочном соке на структурно-функциональное состояние желудка больных Приаралья, страдающих хроническим гастритом // *Бюллетень ВШЦ СО РАМН*. – 2009. – №6 (65). – С.127-131.

28 Исатаева Н.М., Понамарева С.В.. Аналитический обзор основных медико-статистических показателей по Приаральскому региону // Денсаулықты сақтауды дамыту журналы. – 2012. – №3. – С.106-112.

29 Zhurabekova G.A., Bekhmuhambetov E., Rakhmanov S., Rakhmanov E. Ecologically unfavorable regions of Priaralye // II International Scientific-Practical conference “Medicine pressing questions”, April 20-21, Baku, Azerbaijan 2013. – P.53.

30 Калмакова Ж.А. Влияние внешней среды в зоне экологической катастрофы на формирование здоровья населения // Медицина. – 2013. – №4. – С.65-67.

31 Turdybekova Y.G., Dosmagambetova R. S, Zhanabayeva S.U., Bublik G.V., Kubayev A.B., Ibraibekov Zh.G., Kopobayeva I.L., Kultanov B.Zh.. The Health Status of the Reproductive System in Women Living In the Aral Sea Region // Macedonian Journal of Medical Sciences. – 2015. – №3(3). – P.474-477.

32 Никитин А.И. Гормоноподобные ксенобиотики и их роль в патологии репродуктивной функции человека // Экология человека. – 2006. – №1. – С.9-16.

33 Шепельская Н.Р., Проданчук М.Г., Иванова Л.П. Взаимосвязь системной и репродуктивной токсичности пестицидов // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2012. – №7. – С. 170.

34 Béranger R., Hoffmann P., Christin-Maitre S, Bonneterre V. Occupational exposures to chemicals as a possible etiology in premature ovarian failure: A critical analysis of the literature // Reproductive Toxicology. – 2012. – Vol.33. – P.269 – 279.

35 Балмагамбетова А.Д. Проблема воздействия пестицидов на репродуктивное здоровье женщин (обзор литературы) // Астана медицина журналы (Научно-практический журнал). – 2015. – №2. – С.11-18.

36 Mostafalou S., Abdollahi M. Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives // Toxicology and Applied Pharmacology. – 2013. – Vol. 268. – P.157–177.

37 Sutton P., Woodruff T.J., Perron J., Stotland N., Conry J.A., Miller M.D., Giudice L.C. Toxic environmental chemicals: the role of reproductive health professionals in preventing harmful exposures // American Journal of Obstetrics&Gynecology. – 2012. – Vol. 52. – P.164-173.

38 Изтлеуов М.К., Изтлеуов Е.М. Экология и здоровье // Батыс Қазақстан медицина журналы. – 2006. – №2(10). – С.8-15.

39 Балмагамбетова А.Д., Журабекова Г.А. Evaluation of morphological indices of women’s ovaries living in area of ecological crisis // Батыс Қазақстан медицина журналы. – 2014. – №1(41). – С.9.

40 Ситдыкова М.Э., Аллазов С.А., Саяпова Д.Р. Влияние хлорорганических пестицидов на некоторые урологические заболевания // Казанский медицинский журнал. – 2010. – № 3. – С. 372-374.

41 Schenk B., Weimer M., Bremer S., van der Burg B., Cortvrindt R., Freyberger A., Lazzari G., Pellizzer C., Piersma A., Schäfer W.R., Seiler A., Witters H., Schwarz M. The ReProTect Feasibility Study, a novel comprehensive in vitro

approach to detect reproductive toxicants // *Reproductive Toxicology*. – 2010. – Vol. 30. – P.200–218.

42 Ibrahim K.S. Reproductive outcome, hormone levels and liver enzymes in agricultural female workers // *Journal of Advanced Research*. – 2011. – Vol.2. – P. 185–189.

43 Бабанов С.А. Профессиональные поражения репродуктивной системы // *Гинекология*. – 2013. – № 17. – С.917-920.

44 Huen K., Bradman A, Harley K, Yousefi P, Boyd Barr D, Eskenazi B, Holland N. Organophosphate pesticide levels in blood and urine of women and newborns living in an agricultural community // *Environmental Research*. – 2012. – Vol. 117. – P. 8–16.

45 Bretveld R.W., Hooiveld M., Zielhuis G.A., Pellegrino A., van Rooij I.A., Roeleveld N. Reproductive disorders among male and female greenhouse workers // *Reproductive Toxicology*. – 2008. – Vol. 25. – P.107–114.

46 Tiemann U. In vivo and in vitro effects of the organochlorine pesticides DDT, TCPM, methoxychlor, and lindane on the female reproductive tract of mammals: A review // *Reproductive Toxicology*. – 2008. – Vol. 25. – P. 316–326.

47 El-Sharkawy E.E., Kames A.O., Sayed S.M., Nisr N.A., Wahba N.M., Elsherif W.M., Nafady A.M., Abdel-Hafeez M.M., Amer A.A. The ameliorative effect of propolis against methoxychlor induced ovarian toxicity in rat // *Experimental and Toxicologic Pathology*. – 2014. – Vol. 66. – P.415–421.

48 Guerra M.T., Fabíola C. de Toledo, Wilma De G. Kempinas. In utero and lactational exposure to fenvalerate disrupts reproductive function in female rats // *Reproductive Toxicology*. – 2011. – Vol.32. – P.298–303.

49 Foster W.G., Neal M.S., Young Lai E.V. Endocrine disrupters and ovarian function // *International Congress Series*. – 2004. – Vol.1266. – P.126–132.

50 Harvey C.N., Esmail M., Wang Q., Brooks A.I., Zachow R., Uzumcu M. Effect of the Methoxychlor Metabolite HPTE on the Rat Ovarian Granulosa Cell Transcriptome In Vitro // *Toxicological sciences*. – 2009. – Vol. 110(1). – P.95–106.

51 Takahashi N., Tarumi W., Ishizuka B. Acute reproductive toxicity of 3,3-iminodipropionitrile in female rats // *Reproductive Toxicology*. – 2012. – Vol.33. – P. 27–34.

52 Paro R., Tiboni G.M., Buccione R. The fungicide mancozeb induces toxic effects on mammalian granulosa cells // *Toxicology and Applied Pharmacology*. – 2012. – Vol. 260. – P.155–161.

53 Wu J., Tu D., Yuan Li-Yun. T-2 toxin exposure induces apoptosis in rat ovarian granulosa cells through oxidative stress // *Environmental toxicology and pharmacology*. – 2013. – Vol. 36. – P.493–500.

54 Gregoraszczyk E.L. Effect of PCB 126 and PCB 153 on incidence of apoptosis in cultured theca and granulosa cells collected from small, medium and large preovulatory follicles // *Reproductive Toxicology*. – 2003. – Vol.17. – P.465–471.

55 Kolesarova A. In vitro assessment of silver effect on porcine ovarian granulosa cells // *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. – 2011. – Vol. 25. – P.166–170.

56 Bell M.R. Endocrine-disrupting actions of PCBs on brain development and social and reproductive behaviors // *Current Opinion in Pharmacology*. – 2014. – Vol.19. – P.134–144.

57 Ковалева В.Н., Чечетин Г.М. Оценка токсического влияния диоксинов на репродуктивную систему человека // *Advances in current natural sciences*. – 2011. – №8. – С. 108.

58 Li N., Liu T., Zhou L. Di-(2-ethylhexyl) phthalate reduces progesterone levels and induces apoptosis of ovarian granulosa cell in adult female ICR mice // *Environmental toxicology and pharmacology*. – 2012. – Vol.34. – P.869–875.

59 Nishi K., Hundal S.S. Chlorpyrifos induced toxicity in reproductive organs of female Wistar rats // *Food and Chemical Toxicology*. – 2013. – Vol.62. – P.732–6

60 Stefansdottir A., Paul A. Fowler, N. Powles-Glover. Use of ovary culture techniques in reproductive toxicology // *Reproductive Toxicology*. – 2014. – Vol. 49. – P.117–135.

61 Rama E.M., Bortolan S., Vieira M.L. Reproductive and possible hormonal effects of carbendazim // *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. – 2014. – Vol. 69. – P.476–486.

62 Luderer U., Kesner J.S., Fuller J.M. Effects of gestational and lactational exposure to heptachlor epoxide on age at puberty and reproductive function in men and women // *Environmental Research*. – 2013. – Vol.121. – P.84–94.

63 Кановалова С.Г., Конкиева Н.А. Экологическая морфология фетоплацентарной системы // *Экология человека*. – 2005. – №2. – С.17-24.

64 Pathak R., Mustafa M., Ahmed R.S. Association between recurrent miscarriages and organochlorine pesticide levels // *Clinical Biochemistry*. – 2010. – Vol.43. – P.131–135.

65 Pathak R., Ahmed R.S. Maternal and cord blood levels of organochlorine pesticides: Association with preterm labor // *Clinical Biochemistry*. – 2009. – Vol.42. – P.746–749.

66 Rasier G., Toppari J., Parent A.S., Bourguignon J.P. Female sexual maturation and reproduction after prepubertal exposure to estrogens and endocrine disrupting chemicals: A review of rodent and human data // *Molecular and Cellular Endocrinology*. – 2006. – № 254–255. – P.187–201.

67 Калмакова Ж.А. Влияние внешней среды в зоне экологической катастрофы на формирование здоровья населения // *Медицина*. – 2013. – №4. – С.65-67.

68 Vijaya Padma V., Sowmya P., Arun Felix T., Baskaran R., Poornima P. Protective effect of gallic acid against lindane induced toxicity in experimental rats // *Food and Chemical Toxicology*. – 2011. – № 49. – P. 991–998.

69 Report on Carcinogens, Thirteenth Edition National Toxicology Program, Department of Health and Human Services For Table of Contents, see home page: <http://ntp.niehs.nih.gov/go/roc13>.

70 Chaurasia A. K., Adhya T.K., Apte Sh.K. Engineering bacteria for bioremediation of persistent organochlorine pesticide lindane (gamma-hexachlorocyclohexane) // *Bioresource Technology*. – 2013. – № 149. – P. 439–445.

71 Bhatt D.K., Bano M. Modulation of tricarboxylic acid cycle dehydrogenases during hepatocarcinogenesis induced by hexachlorocyclohexane in mice // *Experimental and Toxicologic Pathology*. – 2009. – № 61. – P.325–332.

72 Oliva M., Garrido C., Sales D., González de Canales M.L. Lindane toxicity on early life stages of gilthead seabream (*Sparus aurata*) with a note on its histopathological manifestations // *Environmental Toxicology and Pharmacology*. – 2008. – № 25. – P.94–102.

73 Zucchini N., de Sousa G., Bailly-Maitre B., Gugenheim J., Bars R., Lemaire G., Rahmani R. Regulation of Bcl-2 and Bcl-xL anti-apoptotic protein expression by nuclear receptor PXR in primary cultures of human and rat hepatocytes // *Biochim. Biophys.* – 2005. – №1745. – P.48 -58.

74 Caruso R.L., Upham B. L., Harris C., Trosko J.E. Biphasic Lindane-Induced Oxidation of Glutathione and Inhibition of Gap Junctions in Myometrial Cells // *Toxicological sciences*. – 2005. – № 86(2). – P. 417-426.

75 Kaminski R.M., Tochman A.M., Dekundy A., Turski W.A., Czuczwar S.J. Ethosuximide and valproate display high efficacy against lindane-induced seizures in mice // *Toxicology Letters*. – 2004. – №154. – P.55–60.

76 Zucchini-Pascal N., de Sousa G., Rahmani R. Lindane and cell death: At the crossroads between apoptosis, necrosis and autophagy // *Toxicology*. – 2009. – № 256. – P.32–41.

77 Яглова Н.В., Яглов В.В. Эндокринные дизрапторы – новое направление исследований в эндокринологии // *Вестник РАМН*. – 2012. – №3. – С. 56-61.

78 Шахназаров М.А., Шахназарова А.М., Расулов М.Т., Магомедгаджиев Б.Г., Меджидов А.О. Морфологические и гистохимические изменения печени при ацетатной язве желудка и хроническом воздействии пестицида – гексахлорциклогексана // *Журнал «Юг России: экология, развитие»*. – 2011. – №3. – С.112-117.

79 Khan A. J., Sharma A., Dinesh K., Parmar D. Similarities in lindane induced alteration in cytochrome P450s and associated signaling events in peripheral blood lymphocytes and brain // *Food and Chemical Toxicology*. – 2013. – № 60. – P.318–327.

80 Ronco A.M., Valdés K., Marcus D., Llanos M. The mechanism for lindane-induced inhibition of steroidogenesis in cultured rat Leydig cells // *Toxicology*. – 2001. – № 159. – P.99 – 106.

81 Kaushik P., Kaushik G. An assessment of structure and toxicity correlation in organochlorine pesticides // *Journal of Hazardous Materials*. – 2007. – №143. – P.102–111.

82 Международный фонд спасения Арала в РК. [www.ifas.kz](http://www.ifas.kz).

83 Никитина И.Л., Байрамов А.А. Формирование пола и репродуктивной системы человека – прошлое, настоящее, будущее // Лечение и профилактика. – 2014. – № 2(10). – P. 76-85.

84 Lee S.K., Kim Ch.J., Kim D-J., Kang J-h. Immune Cells in the Female Reproductive Tract // Immune network. – 2015. – Vol. 15, No.1. – P.16-26.

85 Обухова Ю.Д. Морфология яичников в различные периоды онтогенеза. Обзор литературы // Вестник новых медицинских технологий. – 2010. – Т. XVII, №2. – С.301-305.

86 Кузнецов С.Л., Мушкамбаров Н.Н. Гистология, цитология и эмбриология: Учебник для медицинских вузов. – М.:ООО «Медицинское информационное агенство». – 2007. – 600 с.; ил.,табл.

87 Boron W.F., Boulpaep E.L. The ovariancycle: folliculogenesis, ovulation, and formation of the corpus luteum // Medical Physiology. Elsevier Health Sciences. – 2008. – 1352 p.

88 Госсен В.А. Предикторы снижения овариального резерва в группах риска у девочек-подростков и женщин репродуктивного возраста: дис. ... канд. мед.наук:14.01.01. – Томск. – 2015. – 140с.

89 Khan D.R., Fournier É., Dufort I., Richard F.J., Sing J., Sirard M-A. Meta-analysis of gene expression profiles in granulosa cells during folliculogenesis // Reproduction. – 2016. – №151. – P.103–110.

90 Cakmak H., Franciosi F., Zamaha A. M., Cedars M. I., Conti M. Dynamic secretion during meiotic reentry integrates the function of the oocyte and cumulus cells // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2016. – №113(9). – P.2424-9.

91 Bhardwaj J.K., Saraf P. Influence of toxic chemicals on female reproduction: a review // Cell Biol:Res Ther. – 2014. – № 3. – P.1-6.

92 Пожиленкова Е. А. Особенности апоптоза гранулезных клеток доминантных фолликулов пациенток с гиперпролактинемией и гиперандрогенией // Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина. – 2014. – Том 12. – №1. – С.55-61.

93 Munakata Y., Kawahara-Miki R., Shiratsuki S., Tasaki H., Itami N., Shirasuna K., Kuwayama T., Iwata H. Gene expression patterns in granulosa cells and oocytes at various stages of follicle development as well as in in vitro grown oocyte-and-granulosa cell complexes // J Reprod Dev. – 2016. – №62(4). – P.359-66.

94 Bianchi S., Macchiarelli G., Micara G., Linari A., Boninsegna C., Aragona C., Rossi G., Cecconi S., Nottola S.A. Ultrastructural markers of quality are impaired in human metaphase II aged oocytes: a comparison between reproductive and in vitro aging // J Assist Reprod Genet. – 2015. – №32(9). – P.1343-58.

95 Chowdhury I., Thomas K., Zeleznik A., Thompson W.E. Prohibitin regulates the FSH signaling pathway in rat granulosa cell differentiation // J Mol Endocrinol. – 2016. – №56(4). – P.325-36.

96 Кузнецова И.В. Яичниковый и маточный менструальный цикл: функциональные нарушения и методы негормональной коррекции // Эндокринология. – 2012. – №6. – С.17-21.

97 Хасанов А. А., Журавлева В.И. Современные представления о регуляции менструальной функции //Акушерство и гинекология. – 2009. – №2. – С. 57-59.

98 Назаренко Т.А. Бесплодие и возраст: пути решения проблемы / Т.А. Назаренко, Н.Г. Мишиева. – М.: МЕДпресс-информ, 2010. – 208с.: ил.

99 Архипкина Т. Л. Оценка критериев овариального резерва в диагностике синдрома поликистозных яичников // Международный медицинский журнал. – 2012. – № 4. – С. 58-61.

100 Cecconi S., Rossi G. Mouse Antral Oocytes Regulate Preantral Granulosa Cell Ability to Stimulate Oocyte Growth in Vitro // Developmental Biology. – 2001. – № 233. – P. 186–191.

101 Cecconi S., Rossi G., Castellucci A., D'Andrea G., Maccarrone M. Endocannabinoid signaling in mammalian ovary // Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. – 2014. – №178. – P.6-11.

102 Canipari R. Oocyte-granulosa cell interactions // Human Reproduction Update. – 2000. – Vol. 6, No.3. – P.279-289.

103 Cecconi S., Ciccarelli C., Barberi M., Macchiarelli G., Canipari R. Granulosa cell-oocyte interactions // European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. – 2004. – № 115. – P.19–22.

104 Сапин М.Р., Белич Г.Л. Анатомия человека. 2-е изд. М.,1996. Т. 1–2., Анатомия человека: учебник: в двух томах / М. Р. Сапин, Д. Б. Никитюк, В. Н. Николенко, С. В. Чава; под ред. М. Р. Сапина. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. - Т. II. - 456 с.: ил.

105 Митькова В.В. Клиническое руководство по ультразвуковой диагностике / Под ред. Митькова В.В., Медведева М.Б.– М.: МЕДпресс-информ, 1997. – 105с.: ил.

106 Macchiarelli G., Jiang J.Y., Nottola S.A., Sato E.: Morphological patterns of angiogenesis in ovarian follicle capillary network. A scanning electron microscopy study of corriosio cast // Microscopy Research and Techniques. – 2006. – № 69. – P.459-68.

107 Jarvela I.Y., Sladkevicius P., Kelly S., Ojha K., Nargund G., Campbell S.. Three-dimensional sonographic and power Doppler characterization of ovaries in late follicular phase. Ultrasound Obstet Gynecol. – 2002. – №20. – P.281–285.

108 Спринджук М.В. Ангиогенез // Морфология. – 2010. – Т.IV, №2. – С.22-25.

109 Hope J.M., Long K., Kudla M., Arslan A., Tsymbal T., Strok I., Timor-Tritsch I.E. Three-Dimensional Power Doppler Angiography of Cyclic Ovarian Blood Flow // J. Ultrasound. Med. – 2009. – №28. – P.1043–1052.

110 Jokubkiene L., Sladkevicius P., Rovas L., Valentin L. Assessment of changes in volume and vascularity of the ovaries during the normal menstrual cycle using three-dimensional power Doppler ultrasound // Human Reproduction. – 2006. – №21(10). – P.2661–2668.

- 111 Ниаури Д. А., Джемлиханова Л. Х., Гзгзян А. М. Репродуктивное здоровье женщины и недостаточность функции яичников // Журнал акушерства и женских болезней. – 2010. – №1. – С. 84-91.
- 112 Смиренина И.В., Унжакова Р.Н., Шапиро Е.П. Биофизические методы оценки яичников женщин при ановуляторном бесплодии // Дальневосточный медицинский журнал. – 2002. – №4. – С. 18-22.
- 113 Petri Nahás E.A., Pontes A., Nahas-Neto J., Borges V.T., Dias R., Traiman P. Effect of Total Abdominal Hysterectomy on Ovarian Blood Supply in Women of Reproductive Age // J Ultrasound Med. – 2005. – №24. – P.169–174.
- 114 Ojha K., Barnes S.C., Boa F.G., Moody S., Sladkevicius P., Nargund G., Collinson P.O. Intraindividual Hormonal Variability in Ultrasonographically Timed Successive Ovulatory Menstrual Cycles is Detected Only in the Luteal Phase in Infertility Patients // Journal of Assisted Reproduction and Genetics. – 2002. – №19(8). – P.363-368.
- 115 Pellizzari P., Esposito C., Siliotti F., Marchiori S., Gangemi M. Colour Doppler analysis of ovarian and uterine arteries in women with hypoestrogenic amenorrhoea // Human Reproduction. – 2002. – №17(12). – P.3208–3212.
- 116 Kim S.H., Ku S.Y., Jee B.C., Suh C.S., Moon S.Y., Lee J.Y. Clinical Significance of Transvaginal Color Doppler Ultrasonography of the Ovarian Artery as a Predictor of Ovarian Response in Controlled Ovarian Hyperstimulation for In Vitro Fertilization and Embryo Transfer // Journal of Assisted Reproduction and Genetics. – 2002. – №19(3). – P.103-113.
- 117 Nakagawa K., Takahashi Y., Ito M., Horikawa T., Ohgi S., Irahara M., Saito H. Intraovarian arterial blood flow resistance in oligomenorrhoeal infertile women // Journal of Assisted Reproduction and Genetics. – 2006. – №23(3). – P.105-111.
- 118 Balmagambetova A., Abdelazim I.A., Bekmukhambetov E., Zhurabekova G., Yehia A.H., AbuFaza M. Ovarian parameters and ovarian blood flow of women living in the area of environmental crisis // European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology. – 2016. – №200. – P.68–71.
- 119 Costello M.F., Shrestha S.M., Sjoblom P., McNally G., Bennett M.J., Steigrad S.J., Hughes G.J. Power doppler ultrasound assessment of the relationship between age and ovarian perifollicular blood flow in women undergoing in vitro fertilization treatment // J. Assist. Reprod. Genet. – 2006. – №23. – P.359–365.
- 120 Çil A.P., Karabulut A.A., Koçak M. Assessment of ovarian stromal artery Doppler characteristics and serum hormone levels in patients with Behçet disease // Diagn. Interv. Radiol. – 2010. – №16. – P.288–292.
- 121 Mercé L.T., Bau S., Bajo J.M. Doppler study of arterial and venous intraovarian blood flow in stimulated cycles // Ultrasound Obstet Gynecol. – 2001. – №18. – P. 505– 510.
- 122 Sarwat J., Sadiqa S. Association of ovarian reserve with age, BMI and serum FSH level in subfertile women // J Pak Med Assoc. – 2016. – №4(66). – P.409-413.

123 Amanvermez R., Tosun M. An Update on Ovarian Aging and Ovarian Reserve Tests. *International Journal of Fertility and Sterility*. – 2016. – №4(9). – P.411-415.

124 Боярский К.Ю., Гайдуков С.Н., Чинчаладзе А.С.. Факторы определяющие овариальный резерв женщины // *Журнал акушерства и женских болезней*. – 2009. – №2. – С. 65-71.

125 Gokalp O., Pasa U., Ferhan E. Ovarian reserve markers in unexplained infertility patients treated with clomiphene citrate during intrauterine insemination // *Arch Med Sci*. – 2015. – Vol. 11, №6. – P.1250–1254.

126 Мишиева Н.Г. Бесплодие у женщин позднего репродуктивного возраста: принципы диагностики и лечения в зависимости от овариального резерва: автореф. ... докт. мед. наук:14.01.01. – Москва. – 2008.

127 Beltadze K., Barbakadze L. Ovarian reserve in women of late reproductive age by the method of treatment of PCOS // *Iran J Reprod Med*. – 2015. – Vol. 13, No. 5. – P.263-268.

128 Jehan S., Syed S. Association of ovarian reserve with age, BMI and serum FSH level in subfertile women // *J Pak Med Assoc*. – 2016. – Vol. 66, No. 4. – P.409-413.

129 de Carvalho B.R., Gomes Sobrinho D.B., Damasceno Vieira A. D., Silva Resende M.P., Paes Barbosa A.C., Silva A.A., Nakagava H.M. Ovarian Reserve Assessment for Infertility Investigation // *Obstetrics and Gynecology*. 2012. – Vol.10. – P.1-10.

130 Bukulmez O, Arici A. Assessment of ovarian reserve // *Curr Opin Obstet Gynaecol*. – 2004. – №16. – P.231-7, Zaidi S., Usmani A., Shokh I.S. Ovarian reserve and reproductive age // *Pak J Med Sci*. – 2007. – №23. – P.449-53.

131 Мишиева Н.Г., Назаренко Т.А., Волков Н.И., Соловьева Н.Г., Смирнова А.А. Оценка овариального резерва у женщин репродуктивного возраста и его значение в прогнозировании успеха лечения бесплодия // *Журнал Рос. общества акушеров-гинекологов*. – 2005. – № 1. – С. 36-39 .

132 Jung S.I. Ultrasonography of ovarian masses using a pattern recognition approach // *Ultrasonography*. – 2015. – №34. – P.173-182.

133 Абдуллаев Р. Я., Доленко О. В., Щербаков А. Ю., Тамм Т. И., Сенчук А. Я. Этиопатогенетические аспекты и ультразвуковая диагностика недостаточности лютеиновой фазы и синдрома лютеинизации неовулировавшего фолликула // *Международный медицинский журнал*. – 2010. – № 4. – С.78-81.

134 Бобрицкая В.В., Грищенко О.В., Абдуллаев Р.Я., Поздняков С.А. Трансвагинальная триплексная эхография в диагностике бесплодия // *Вестник Харьковського Национального университета имени В.Н. Каразіна. Серія «Медицина»*. – 2006. – №12(720). – С. 75-82.

135 Насникова И.Ю. Ультразвуковая диагностика: учеб.пособие / И.Ю. Насникова, Н.Ю. Маркина. – М. :ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 176с. :ил.

- 136 Смит Н.Ч., Смит Н.П.М. Ультразвуковая диагностика в акушерстве и гинекологии / Пер. с англ. Под ред. А.И. Гуса. – М.: Практическая медицина, 2010. – 304с.:ил.
- 137 Лукьянова Е.А., Силява В.Л.. Фолликулометрия в современной практике // Охрана материнства и детства. – 2010. – №1(13). – С.63-65.
- 138 Думанский Ю.В., Шкарбун К.Д., Шкарбун Л.И. Роль ультразвукового исследования в выборе тактики лечения рака яичника // Украинский журнал хирургий. – 2013. – №2(21). – С.8-13.
- 139 Desforges-Bullet V., Gallo C., Lefebvre C., Pigny P, Dewailly D., Catteau-Jonard S. Increased Anti-Mullerian hormone and decreased FSH levels in follicular fluid obtained in women with polycystic ovaries at the time of follicle puncture for in vitro fertilization // Fertility and Sterility. – 2010. – Vol. 94, No. 1. – P.345-350.
- 140 Wiweko B., Maidarti M., Priangga M.D., Shafira N., Fernando D., Sumapraja K., Natadisastra M., Hestiantoro A. Anti-mullerian hormone as a diagnostic and prognostic tool for PCOS patients // J Assist Reprod Genet. – 2014. – № 31. – P.1311–1316.
- 141 Elgindy E.A., El-Haieg D.O., Azza E-S. Anti-Mullerian hormone: correlation of early follicular, ovulatory and midluteal levels with ovarian response and cycle outcome in intracytoplasmic sperminjection patients // Fertility and Sterility. – 2008. – Vol. 89, No. 6. – P.112-115.
- 142 Камзаева Н.К. Уровень антимюллерова гормона в крови // Вестник Кыргызско-Российского Славянского университета. – 2011. – №7. – С. 81-84.
- 143 Venturella R., Lico D., Sarica A. OvAge: a new methodology to quantify ovarian reserve combining clinical, biochemical and 3D-ultrasonographic parameters // Journal of Ovarian Research. – 2015. – №8. – P.21-26.
- 144 Хасанов А.А., Журавлева В.И. Современные представления о регуляции менструальной функции // Акушерство и гинекология. – 2009. – 2(34). – С.57-59.
- 145 Дмитриева М.Л., Тихоновская О.А., Логвинов С.В., Тупицына Т.В., Невоструев С.А. Изучение уровня ингибина b и антимюллеровского гормона при аутоиммунном оофорите в эксперименте // Сибирский медицинский журнал. – 2012. – Том 27, № 1. – С.127-130.
- 146 Aboulghar M. Anti-mullerian hormone in the management of infertility // Middle East Fertility Society Journal. – 2014. – №19. – P.1-7.
- 147 Белоцерковцева Л.Д., Коваленко Л.В., Данилогорская В.В., Бондарева Е.В. Антимюллеров гормон как фактор, определяющий качество ооцита и исход программ вспомогательных репродуктивных технологий // Вестник Сургутского Государственного Университета. Медицина. – 2012. – № 12. – С.20-23.
- 148 Grøndahl M.L., Nielsen M.E., Dal Canto M.B., Fadini R., Rasmussen I.A., Westergaard L.G., Kristensen S.G., Yding Andersen C. Anti-Mu'llerian hormone remains highly expressed in human cumulus cells during the final stages of folliculogenesis // Reproductive BioMedicine Online. – 2011. – №22. – P.389–398.

149 Ivana Z., Tislarić-Medenjak D., Megla Z.B., Kucak I. Anti-Müllerian hormone: A unique biochemical marker of gonadal development and fertility in humans // *Biochemia Medica*. – 2011. – № 21(3). – P.219-30.

150 Гюльмамедова Е.А., Трофимова Е.А., Гюльмамедова И.Д.. Антимюллеров гормон как прогностический маркер контролируемой овариальной стимуляции у женщин с низким овариальным резервом // *Медико-социальные проблемы семьи*. – 2013. – Т.18, № 1. – С. 46-51.

151 Anderson R.A., Nelson S.M., Wallace W.H. Measuring anti-Müllerian hormone for the assessment of ovarian reserve: When and for whom is it indicated? // *Maturitas*. – 2012. – №28. – P.28-33.

152 Боярский К.Ю., Гайдуков С.Н., Машков Е.А. Роль антимюллерова гормона (АМГ) в норме и при различных гинекологических заболеваниях // *Журнал акушерства и женских болезней*. – 2009. – № 3. – С. 75-85.

153 Журабекова Г.А., Балмагамбетова А.Д., Саханова С.К., Жумагулова С.С. Гормональный статус женщин как показатель овариального резерва // *Медицина (Алматы)*. – 2016. – №2(164). – С.58-61.

154 Смирнова И.В. Влияние уровня антимюллерова гормона и аутоантител у женщин с ановуляторным бесплодием на ответ яичников в циклах индукции овуляции. // *Охрана материнства и детства*. – 2013. – №2. – С. 18-22.

155 Naeini E.H., Neyestanak M.Z., Berjis K., Shokoohi M. Association between individual ovarian dimensions with ovarian reserve indices // *Excli Journal*. – 2013. – №12. – P.616-624.

156 Писарева Е. В., Разумная А. Е., Борзенкова А. В. Изменения уровня антимюллерова и фолликулостимулирующего гормонов у женщин с различными нарушениями репродуктивной функции // *Вестник молодых ученых и специалистов Самарского государственного университета*. – 2013. – № 3. – С.25-31.

157 Болдонова Н.А., Дружинина Е.Б. Фолликуло- и оогенез: химические свойства и биологическое действие лютеинизирующего гормона // *Сибирский медицинский журнал (Иркутск)*. – 2014. – № 6. – С.28-32.

158 Zhurabekova G, Balmagambetova A., Abdelazim I., Macchiareli G. Ovarian reserve markers of women living in the Aral sea area // *Anatomy. An International Journal of Experimental and Clinical Anatomy. Special Issue includes abstract for the XXIV International Symposium Morphological Science (Istanbul, Turkey)*. – 2015. – №9. – P.83.

159 Rowe T. Fertility and a woman's age // *The Journal of Reproductive Medicine*. – 2006. – Vol. 51, No. 3. – P.157–163.

160 Филатова О.В., Томилова И.Н. Физиологическая антропология: методические указания. — Барнаул, 2010.

161 Луцай Е.Д., Железнов Л.М. Современные методы изучения прижизненной анатомии гортани человека // *Фундаментальные исследования*. – 2011. – №2. – С.11-15.

- 162 Каган И.И. Современные аспекты клинической анатомии. Оренбург. – 2012. – 108с.
- 163 Сапин М.Р. Сегодня и завтра морфологической науки // Морфология. – 2000. – №3. – Т.115. – С.6-8.
- 164 Гус А.И., Александрова Н.В., Марченко А.А. Диагностическая значимость современных методов визуализации у женщин с преждевременной недостаточностью яичников // Проблемы репродукции. – 2007. – №4. – С.22-27.
- 165 Жорданидзе Д. О., Назаренко Т. Л., Дуринян Э. Р., Иванец Т. Ю. Состояние овариального резерва при некоторых формах функционального бесплодия // Акушерство и гинекология. – 2010. – №5. С. 25–31.
- 166 Александрова Н.В., Марченко Л.А. Современные подходы к оценке овариального резерва у женщин с преждевременной недостаточностью яичников // Пробл. репрод. – 2007. – №2. – С. 22–29.
- 167 Lass A., Brinsden P. The role of ovarian volume in reproductive medicine // Human Reproduction. – 1999. – №3(5). – P.256-266.
- 168 Балмагамбетова А.Д., Пальмерини М.Г., Журабекова Г.А., Ноттолла С.А., Макиарелли Г. Морфологическая характеристика гранулезных клеток яичников мышей при воздействии линдана // Наука и Здравоохранение. – 2016. – №2. – С. 106-117.
- 169 Cecconi S., Rossi G., Coticchio G., Macchiarelli G., Borini A., Canipari R. Influence of thyroid hormone on mouse preantral follicle development in vitro // Fertil Steril. – 2004. – № 81. – P. 919–24.
- 170 Rossi G., Buccione R., Baldassarre M., Macchiarelli G., Palmerini M. G., Cecconi S. Mancozeb exposure in vivo impairs mouse oocyte fertilizability // Reprod Toxicol. – 2006. – №21(2). – P. 216-9.
- 171 Cecconi S., Rossi G., Santilli A., Stefano L.D., Hoshino Y., Sato E., Palmerini M.G., Macchiarelli G. Akt expression in mouse oocytes matured in vivo and in vitro // Reproductive BioMedicine Online. – 2010. – №20. – P. P.35–41.
- 172 Alm H., Torner H., Tiemann U., Kanitz W. Influence of organochlorine pesticides on maturation and postfertilization development of bovine oocytes in vitro // Reproductive Toxicology. – 1998. – №12. – P. 559-563.
- 173 Aleem F., Zeitoun K., Calame R. et al. The characterization of flow signals from tubal and ovarian arteries using intraoperative continuous wave Doppler // Utrasound Obstet. Gynecol. – 1995. – V.4, №4. – P.304-309.
- 174 Nelson S.M., Yates R.W., Lyall H., Jamieson M, Traynor I, Gaudoin M., Mitchell P., Ambrose P., Fleming R. Anti-Muüllerian hormone-based approach to controlled ovarian stimulation for assisted conception // Human Reproduction. – 2009. – Vol.24, No.4. – P.867–875.
- 175 Abdallah R., Kligman I., Davis O. Withholding gonadotropins until human chorionic gonadotropin administration // Semin. Reprod. Med. – 2010. – Vol.28, № 6. – P.486-492.

- 176 May-Panloup P., Chrétien M.F., Jacques C. Low oocyte mitochondrial DNA content in ovarian insufficiency // *Hum. Reprod.* – 2005. – Vol.20, № 3. – P.593-597.
- 177 Szafarowska M., Jerzak M. Ovarian aging and infertility // *Ginekol. Pol.* – 2013. – Vol.84, № 4. – P.298-304.
- 178 Balmagambetova A, Zhurabekova G, Abdelazim IA, Rakhmanov S. Effect of environmental factors on ovarian reserve of women living in Aral Sea area // *J Infertil Reprod Biol.* – 2015. – № 3(1). – P.145–9.
- 179 Seisebaeva R.Zh. Features defeat respiratory children Aral Sea region // *Astana Medical Journal.* – 2006. – №1. – P.123-124
- 180 Indoitu R., Orlovsky L., Orlovsky N. Dust storms in Central Asia: Spatial and temporal variations // *Journal of Arid Environments.* – 2012. – № 85. – P.62-70.
- 181 Roy S.B., Smith M., Morris L., Orlovsky N., Khalilov A. Impact of the desiccation of the Aral Sea on summertime surface air temperatures // *Journal of Arid Environments.* – 2014. – №110. – P.79-85.
- 182 Stulina G., Eshchanov O. Climate change impacts on hydrology and environment in the Pre-Aral region // *Quaternary International.* – 2013. – №311. – P.87-96.
- 183 Жуковец И.В. Состояние яичников у женщин с дисфункцией гипоталамуса в репродуктивном возрасте // *Дальневосточный медицинской журнал.* – 2011. – №3. – С. 41-43.
- 184 Wallace W.H., Thomas W.K. Ovarian reserve and reproductive age may be determined from measurement of ovarian volume by transvaginal sonography // *Hum Reprod.* – 2004. – №19(7). – P.1612–7.
- 185 Pavlik E., DePriest P.D., Gallion H.H. Ovarian volume related to age // *Gynecol Oncol.* – 2000. – №77. – P.410–2.
- 186 Macchiarelli G., Jiang J.Y., Tsang B. K., Sato E. Capillary angiogenesis and degeneration in bovine ovarian antral follicles // *Reproduction.* – 2003. – №125. – P. 211–223.
- 187 Ходжамуратова Д.А., Назаренко Т.А. Эндокринные формы бесплодия у женщин Таджикистана // *Гинекологическая эндокринология.* – 2012. – №1. – С.1-10.
- 188 Макухина Т.Б. Ультразвуковые особенности фолликулярного аппарата яичников у пациенток репродуктивного возраста с миомой матки после селективной эмболизации маточных артерий // *Кубанский научный медицинский журнал.* – 2010. – №6 (120). – С. 87-90.
- 189 Erdem M., Erdem A., Biberoglu K., Arslan M. Age-related changes in ovarian volume, antral follicle counts and basal follicle stimulating hormone levels: comparison between fertile and infertile women // *Gynecol Endocrinol.* – 2003. – №17. – P.199–205.
- 190 Guraya Sh.S. Prevalence and ultrasound features of polycystic ovaries in young unmarried Saudi females // *Journal of Microscopy and ultrastructure.* – 2013. – №1. – P. 30-34.

191 Begawy A. F. Anti-Mullerian hormone in polycystic ovary syndrome and normo-ovulatory women: Correlation with clinical, hormonal and ultrasonographic parameters // Middle East fertility Society Journal. – 2010. – №15. – P.253-258.

192 Клинышкова Т.В., Перфильева О.Н., Совеико Е.Е., Тодоренко В.Н., Шаталова С.Б., Результаты комплексной оценки маркеров овариального резерва у женщин с эндометриоз\_ассоциированным бесплодием // Мать и дитя в Кузбассе. – 2014. – №2(57). – С.45-51.

193 Камзаева Н.К. Уровень антимюллерового гормона в крови при трубно-перитонеальном факторе бесплодия // Вестник Кыргызско-Российского Славянского университета. – 2011. – Том 11, № 7. – С.81-85.

194 van Disseldorp J., Faddy M.J., Themmen A.P., de Jong F.H., Peeters P.H., van der Schouw Y.T., Broekmans F.J. Relationship of serum antimüllerian hormone concentration to age at menopause // J Clin Endocrinol Metab. – 2008. – №93(6). – P.2129-34.

195 Падруль М. М., Олина А. А., Садыкова Г. К., Сафаргалиева Е. Ю. Антимюллеров гормон как предиктор нарушений репродуктивного здоровья у девушек-подростков // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2014. – №4. – С.56-59.

196 Боярский К. Ю., Гайдуков С. Н., Машкова Е. А.. Роль антимюллерова гормона (АМГ) в норме и при различных гинекологических заболеваниях // Журнал акушерства и женских болезней. – 2009. – Том LVIII, №3. – С. 75-85.

197 Писарева Е.В., Разумная А. Е., Борзенкова А. В.. Изменения уровня антимюллерова и фолликулостимулирующего гормонов у женщин с различными нарушениями репродуктивной функции // Вестник молодых ученых и специалистов Самарского государственного университета. – 2013. – № 3. – С.25-32.

198 Scheffer G.J., Broekmans F.J.M., Looman C.W.N., Blankenstein M., Fauser B.C.J.M., de Jong F.H. The number of antral follicles in normal women with proven fertility is the best reflection of reproductive age // Hum Reprod. – 2003. – №18. – P.700–6.

199 Larsen E.C., Muller J., Schmiegelow K., Rechnitzer C., Andersen A.N. Diminished ovarian reserve in female childhood cancer survivors with regular menstrual cycles and basal FSH <10 IU/l // Hum Reprod. – 2003. – №18. – P.417–22.

200 Питько В.А., Логинова О.А., Ткачев А.И. Определение антимюллерова гормона и доплерометрические исследования кровоснабжения яичников в диагностике синдрома слабого ответа яичников // Международный медицинский журнал. – 2013. – № 2. – С. 72-76.

201 Obruca A., Fisch F., Feichtinger W. Predictive value of basal hormone levels for success of IVF treatment // Fertil Steril. – 1998. – Vol.70, № 3. – P. 855.

202 Lindenau A., Fisher B., Seiler P., Beier H. M. Effects of persistent chlorinated hydrocarbons on reproductive tissues in female rabbits // Hum.Reprod. – 1994. – №9. – P. 772-80.

- 203 Ackert C. L., Gittens J. E., O'Brien M. J., Eppig J. J., Kidder G. M. Intercellular communication via connexin 43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse // *Dev Biol.* – 2001. – №233. – P. 258-270.
- 204 Bhardwaj J.K., Saraf P. Influence Of Toxic Chemicals on Female Reproduction: A review // *Cell Biology: Research&Therapy.* – 2014. – №3(1). – P.211-15.
- 205 Nottola S.A., Heyn R., Camboni A., Correr S., Macchiarelli G. Ultrastructural characteristics of human granulosa cells in a coculture system for in vitro fertilization // *Microsc Res Tech.* – 2006. – №69(6). – P.508-16.
- 206 Keros V., Hultenby K, Borgstro B., Fridstro M., Jahnukainen K, Hovatta O. Methods of cryopreservation of testicular tissue with viable spermatogonia in pre-pubertal boys undergoing gonadotoxic cancer treatment // *Human Reproduction.* – 2007. – Vol.22, No.5. – P.1384–1395.
- 207 de la Torre J.C., Gonzalez-Carvajal M. Steady state drug or fluid delivery to injured or transected spinal cord of rats // *Lab Anim Sci.* – 1981. – №31(6). – P.701-3.
- 208 Ghosh A.K., Majumder M., Steele R, Liu T.J., Ray R.B. MBP-1 mediated apoptosis involves cytochrome c release from mitochondria // *J Biol Chem.* – 2015. – №290(1). – P.640-57.
- 209 Heimler I., Rawlins R.G., Owen H., Hutz R.J. Dioxin perturbs, in a dose- and time-dependent fashion, steroid secretion, and induces apoptosis of human luteinized granulosa cells // *Endocrinology.* – 1998. – 139(10). – P.4373-9.
- 210 Rossi G., Palmerini M.G., Macchiarelli G., Buccione R., Cecconi S. Mancozeb adversely affects meiotic spindle organization and fertilization in mouse oocytes. // *Reproductive Toxicology.* – 2006. – №22. – P.51–55.
- 211 Paro R., Tiboni G.M., Buccione R., Rossi G., Cellini V., Canipari R., Cecconi S. The fungicide mancozeb induces toxic effects on mammalian granulosa cells // *Toxicology and Applied Pharmacology.* – 2012. – №260. – P.155–161.
- 212 Campagna C., Sirard M. A., Ayotte P., Bailey J. L. Impaired maturation, fertilization, and embryonic development of porcine oocytes following exposure to an environmentally relevant organo- chlorine mixture // *Biol Reprod.* – 2001. – 65. – P. 554–560.
- 213 Foster W., Chan S., Platt L., Hughes C. Detection of endocrine disrupting chemicals in samples of second trimester human amniotic fluid // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* – 2000. – № 85. – P. 2954-2955.
- 214 Scascitelli M., Pacchierotti F. Effects of lindane on oocyte maturation and preimplantation embryonic development in the mouse // *Reproductive Toxicology.* – 2003. – №17. – P. 299–303.
- 215 Maranghi F., Rescia M., Macri C., Di Consiglio E., De Angelis G., Testai E. Lindane may modulate the female reproductive development through the interaction with ER-beta: an in vivo–in vitro approach // *ChemBiolInteract.* – 2007. – №169. – P.1–14.
- 216 Ke F-C., Fang S-H., Lee M-T., Sheu S-Y., Lai S-Y., Chen Y. J., Huang F-L., Wang P. S., Stocco D. M., Hwang J-J. Lindane, a gap junction blocker, suppresses

FSH and transforming growth factor  $\beta$ 1-induced connexin43 gap junction formation and steroidogenesis in rat granulosa cells // J. Endocrinol. – 2005. – №184. – P.555–566.

217 Usman M., Tascone O., Faure P., Hanna K. Chemical oxidation of hexachlorocyclohexanes (HCHs) in contaminated soils // Science of the Total Environment. – 2014. – №476–477. – P.434–439.

218 Li R., Mather J.P. Lindane, an inhibitor of gap junction formation, abolishes oocyte directed follicle organizing activity in vitro // Endocrinology. – 1997. – №138. – P. 4477-4480.

219 Tiemann U., Pohland R. Inhibitory effects of organochlorine pesticides on intercellular transfer of Lucifer Yellow in cultured bovine oviductal cells // Reprod Toxicol. – 1999. – №13. – P.123–130.

220 Tiemann U., Pohland R., Kuchenmeister U., Viergutz T. Influence of organochlorine pesticides on transmembrane potential, oxidative activity, and ATP-induced calcium release in cultured bovine oviductal cells // Reprod Toxicol. – 1998. – №12. – P.551–557.