

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Тихаева Ксения Юрьевна

**РОЛЬ ЖЕЛАТИНАЗЫ В И МАГНИЙ-КАЛЬЦИЕВОГО БАЛАНСА В
ПАТОГЕНЕЗЕ ХРОНИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ ЭНДОМЕТРИЯ
(КЛИНИКО-ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

14.03.03 – патологическая физиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор Л.Н. Рогова

Научный консультант:
доктор медицинских наук,
профессор Л.В. Ткаченко

Волгоград
2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	4
Глава 1. Обзор литературы.....	14
1.1. Принципы классификации и современное представление об этиопатогенезе и морфологических изменениях эндометрия на фоне хронического эндометрита.....	14
1.2. Роль внеклеточного матрикса в физиологии и патологии репродуктивной системы.....	21
1.3. Влияние матриксных металлопротеиназ на формирование внеклеточного матрикса тканей репродуктивных органов в норме и патологии.....	25
1.4. Магний-кальциевый гомеостаз, его регуляция и роль в патологии репродуктивной системы.....	35
Глава 2. Материалы и методы исследования.....	47
2.1. Материалы исследования.....	47
2.2. Методы исследования.....	51
2.3. Методы статистической обработки данных.....	57
Глава 3. Клинико-лабораторные, морфологические и иммуногистохимические параметры женщин с неоднократными неудачами имплантации при лечении бесплодия методами ВРТ и хроническим эндометритом.....	58
3.1. Клинико-лабораторная характеристика пациентов с хроническим эндометритом.....	58
3.2. Морфологические показатели в тканях эндометрия у женщин с хроническим эндометритом и повторяющимися неудачами имплантации.....	60
3.3. Желатиназа В в тканях эндометрия у женщин с хроническим эндометритом и повторяющимися неудачами имплантации	63
Глава 4. Баланс повреждающих и защитно-приспособительных механизмов при экспериментальном хроническом воспалении	

эндометрия у крыс.....	66
4.1. Морфологические признаки экспериментального хронического воспаления эндометрия у крыс.....	66
4.2. Роль желатиназы В в патогенезе экспериментального хронического воспаления эндометрия у крыс.....	67
4.3. Магний-кальциевый баланс в крови из разных регионов на фоне экспериментального хронического воспаления эндометрия.....	70
4.4. Показатели интенсивности пероксидации и антиоксидантной защиты у крыс на фоне экспериментального хронического воспаления эндометрия.....	72
Глава 5. Влияние магнийсодержащей композиции на баланс повреждающих и защитно-приспособительных механизмов в эксперименте и в клинике.....	74
5.1. Влияние магнийсодержащей композиции на магний-кальциевый баланс, интенсивность пероксидации и антиоксидантной защиты, морфологические и иммуногистохимические характеристики тканей эндометрия в условиях его экспериментального хронического воспаления у крыс.....	74
5.2. Влияние магнийсодержащей композиции на морфологические и иммуногистохимические характеристики тканей эндометрия у женщин с хроническим эндометритом.....	80
Глава 6. Обсуждение полученных результатов.....	84
Выводы.....	101
Практические рекомендации.....	103
Список сокращений.....	104
Литература.....	105
Приложения.....	129

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Хронический эндометрит (ХЭ) – клинико-морфологический синдром, который отличается высокой распространенностью в женской популяции и сопровождающийся различными симптомами нарушения репродуктивной функции (Шурашалина А.В., 2011; Плясунова М.П., 2013; Kitaya R., Yasuo T, 2015). Среди пациенток с ХЭ более 90% составляют женщины репродуктивного возраста. Очевидно, это подчеркивает особую социальную значимость данной нозологии. ХЭ встречается до 70% случаев в группе женщин с бесплодием, привычным невынашиванием беременности и повторяющимися неудачами имплантации при лечении бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) (Илизарова Н.А., 2009, Краснопольский В.И., 2007, Михнина Е.А., 2009, Петров Ю.А., 2012, Fatemi H.M.et all 2009).

ХЭ отличается вариабельной клинической симптоматикой. Возможен вариант бессимптомного течения до ярко выраженной картины, с такими проявлениями как: гнойные выделения из половых путей, боли, дисменорея, бесплодие, привычное невынашивание беременности (Мальцева Л. И., 2012; Цаллагова Л.В., 2014; Шурашалина А.В., 2011; Akopians, A, 2013)

Клиническая картина зависит от особенностей этиологического фактора и защитно-приспособительной реакции на первичный контакт с ним, что, вероятно, предопределяет дальнейшее течение заболевания. По современным данным, роль инфекционного фактора, как ведущего звена этиопатогенеза хронического эндометрита значительно переоценена. У большинства пациентов с ХЭ бактериологическое исследование материала, полученного из заднего свода влагалища, цервикального канала и полости матки не дает роста патогенной микрофлоры. В ряде случаев, определяется рост условно-патогенных микроорганизмов, в некоторых случаях посевы стерильны (Петров Ю. А..2012; Сковородникова Н.Г. 2011; Cicinelli E.I. et al,2009). Возможно, это является одним из объяснений низкой эффективности стандартной этиотропной терапии ХЭ

(Данусевич И.Н.,2013; Колесникова Л. И 2013; Лебедев В.А др,2012; Хашукоева А.З. и др.,2012).

Таким образом, с одной стороны, очевидна роль инфекционного агента, как инициирующего фактора ХЭ, с другой стороны, не вызывает сомнений значимость индивидуальных защитно-приспособительных реакций в патогенезе данной нозологии.

Согласно современным представлениям, межклеточный матрикс рассматривается как непосредственный компонент многих физиологических и патологических процессов, сопровождающихся ремоделированием ткани, а не только как опора для клеток и тканей (Рогова Л.Н. и др., 2011, Тепляков А.Т. и др., 2014). Открыты и изучены биологические функции матриксных металлопротеиназ (ММП), которые обеспечивают обмен белков межклеточного матрикса, а, следовательно, являются основным «орудием» ремоделирования ткани (Рогова Л. Н. и др., 2011; Тепляков А.Т. и др., 2014). Так, желатиназа В непосредственно принимает участие в процессах воспаления, репарации ремоделирования ткани. Патология матрикса и изменения активности ММП являются важным звеном патогенеза множества заболеваний, в том числе, сепсиса, плацентарной недостаточности, ишемической болезни сердца, инфаркта миокарда, диффузных заболеваниях соединительной ткани, синдрома поликистозных яичников, преждевременных родов, эндометриоза, привычного невынашивания беременности (Соловьева Н.И. 1998; Woessner F.J., 2001; Рогова Л. Н. и др., 2011; Тепляков А.Т. и др., 2014).

ММП отличаются разнонаправленностью действия, сложностью механизмов регуляции их активности (Плеханова О.С., 2006). Одним из таких механизмов регуляции, очевидно, является магний-кальциевый баланс. Кроме того, общеизвестна ведущая роль магния в биосинтезе белка, клеточной пролиферации, регуляции процессов энергообразования и энергопотребления (Есенова В.И.,2011; Zhang Z. et al.,2014). Известна роль кальция, как активатора, матриксных металлопротеиназ.

Степень разработанности темы. Роль внеклеточного матрикса и матриксных металлопротеиназ при хроническом эндометрите изучалась в работах Sukhikh, G.et al., (2007), Yoshii N., et al (2013), Кузнецова А.В., (2004). В этих исследованиях показаны противоречивые данные об изменении количественных показателей различных ММП в плазме крови и ткани эндометрия у пациентов с ХЭ. Помимо этого, в работе Sukhikh, G.et al., (2007) была предпринята попытка восстановить сниженное количество желатиназы В при помощи магнитотерапии. В работе Yoshii N., et al (2013), напротив, показано увеличение частоты имплантации при снижении содержания ММП в плазме крови пациенток с ХЭ после терапии глюкокортикоидами. В целом, можно отметить достаточно малое количество работ, в которых предметом исследования являлось изменение матрикса, активности ММП и особенности их регуляции на фоне ХЭ.

Одновременно с этим, нарушение магний-кальциевого баланса и эффективность патогенетической терапии препаратами магния доказаны при предменструальном синдроме, преждевременных родах, эклампсии, нарушениях стрессоустойчивости, эндометриозе, хроническом сальпингоофорите, ишемической болезни сердца и при патологии почек (Блинов Д.В., 2011; Громова О.А., 2013; Трисветова Е. Л., 2013). При этом, определенную роль в патогенезе каждой из перечисленных нозологий играют изменения матрикса и его компонентов. В частности, в работе Шестерниной Н.В., (2013), показано влияние внутриклеточного магния на показатели активности желатиназы В при экспериментальной язве желудка.

Однако, до сих пор остается не до конца изученной роль желатиназы В и магний-кальциевого баланса в патогенезе хронического эндометрита, а также, возможность применения препаратов магния при данной нозологии с позиции регуляции активности этого матриксина.

Цель исследования: установить роль желатиназы В и магний-кальциевого баланса в патогенезе хронического воспаления эндометрия, механизмы её активации в тканях эндометрия, в стадии хронизации экспериментального воспаления эндометрия и разработать способ коррекции развившихся изменений.

Задачи исследования:

1. Охарактеризовать морфологические показатели и оценить удельное число и интенсивность экспрессии желатиназа В позитивных клеток в тканях эндометрия на фоне хронического воспаления эндометрия в эксперименте и в образцах эндометрия, полученных у женщин с хроническим эндометритом и повторяющимися неудачами имплантации при лечении бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий.

2. Оценить показатели магний-кальциевого баланса, уровень диеновых конъюгатов, малонового диальдегида и активность каталазы в крови из нижней полой и подвздошной вен и их корреляцию с показателями активности желатиназы В в тканях эндометрия у крыс, на фоне экспериментального хронического воспаления эндометрия.

3. Оценить показатели магний-кальциевого баланса, уровень диеновых конъюгатов и малонового диальдегида, активность каталазы в крови из разных регионов, морфологические показатели, число и интенсивность экспрессии желатиназа-В позитивных клеток в тканях эндометрия, на фоне применения магнийсодержащей композиции, у крыс с экспериментальным хроническим воспалением эндометрия.

4. Сравнить показатели удельного числа, интенсивности экспрессии желатиназа-В позитивных клеток и морфологические показатели воспаления в образцах эндометрия у женщин с хроническим эндометритом и повторяющимися неудачами имплантации при стандартной терапии хронического эндометрита и терапии, в которую помимо стандартных назначений, включен электрофорез с 10% сульфатом магния.

Научная новизна:

1) Впервые выявлена роль желатиназы В в хронизации экспериментального воспаления эндометрия. Установлено, что на фоне морфологических признаков хронического воспаления эндометрия у крыс, удельное число и интенсивность экспрессии желатиназа-В позитивных клеток уменьшалось в клеточном компоненте стромы.

2) Выявлено, что у крыс, с экспериментальным хроническим воспалением эндометрия, на 51 сутки с момента моделирования, происходила интенсификация перекисного окисления липидов в крови из нижней полой вены, проявляющаяся увеличением содержания диеновых конъюгатов и малонового диальдегида, при неизменной активности каталазы.

3) Увеличение содержания малонового диальдегида находилось в умеренной отрицательной корреляционной связи с удельным числом желатиназа В- позитивных клеток в строме эндометрия у крыс.

4) Выявлено оптимизирующее влияние магниевого баланса, на число и интенсивность экспрессии желатиназа-В позитивных клеток в тканях эндометрия, а так же, выявлена положительная зависимость показателей активности желатиназы В от уровня магния в эритроцитарной массе крови из нижней полой вены.

5) Под влиянием магнийсодержащей композиции восстанавливалось до исходных показателей содержание магния внутри эритроцитов в крови из изучаемых регионов, сопровождавшееся восстановлением удельного числа, интенсивности экспрессии желатиназа В позитивных клеток, увеличением количества макрофагов, лимфоцитов, уменьшением числа плазмоцитов и эозинофилов в ткани эндометрия у крыс с экспериментальным хроническим воспалением эндометрия, что очевидно, отражает оптимизацию условий для завершения механизмов воспаления и активации пролиферации. Применение магнийсодержащей композиции приводило к снижению содержания диеновых конъюгатов и малонового диальдегида, на фоне увеличения активности каталазы, что создает предпосылки для уменьшения деструкции и, также, усиления пролиферации.

6) Установлено, что в образцах эндометрия полученных у женщин с хроническим эндометритом и повторяющимися неудачами имплантации, отмечалось снижение удельного числа и интенсивности экспрессии желатиназа В позитивных клеток, а в образцах, полученных у женщин после применения электрофореза с 10% сульфатом магния, отмечалось увеличение удельного числа

и интенсивности экспрессии желатиназа В позитивных клеток, количества макрофагов, а так же уменьшение показателей плазмоцитарно-лимфоцитарной инфильтрации.

Теоретическая значимость работы. Получены новые данные о механизмах хронизации воспаления эндометрия, выявлена значимая роль в поддержании воспаления неадекватного ремоделирования ткани. Установлена роль магния, как фактора, регулирующего активность желатиназы В в тканях эндометрия на фоне экспериментального хронического воспаления эндометрия у крыс. В условиях экспериментального хронического воспаления эндометрия, на фоне применения магнийсодержащей композиции, уменьшились показатели, отражающие интенсивность деструкции тканей: уровень первичных и вторичных продуктов пероксидации, морфофункциональные критерии воспаления в тканях эндометрия, при этом, увеличивался уровень магния в эритроцитарной массе крови из нижней полой и подключичной вен, в плазме крови из подключичной вены, а так же удельное число и интенсивность экспрессии желатиназа В позитивных клеток в строме эндометрия, создающие условия для усиления пролиферации. Полученные на лабораторных животных данные подтверждены в клиническом исследовании, при изучении образцов эндометрия, полученных у женщин с хроническим эндометритом и повторяющимися неудачами имплантации при лечении бесплодия методами ВРТ.

Практическая значимость работы. Полученные данные дополняют представления о роли матрикса и матриксных металлопротеиназ в патологии репродуктивной системы, показывают роль магния, как фактора, стимулирующего активность желатиназы В в тканях эндометрия, доказывают вовлеченность в патогенез хронического воспаления матки магния, особенно его внутриклеточное содержание. Материалы исследования выявляют тесную взаимосвязь морфологических признаков хронического воспаления с интенсивностью пероксидации, а также, уровнями системной и региональной гипомagneмистии. Значимость магния в патогенезе хронического воспаления эндометрия подтверждена как в эксперименте, так и в клиническом исследовании.

У животных на фоне экспериментального хронического воспаления эндометрия, введение ректально магнийсодержащих композиции (МСК), а у женщин с хроническим эндометритом применение наряду со стандартной терапией электрофореза 10% сульфата магния, приводит к нормализации уровня магния и формирует условия для увеличения активности желатиназы В, что дает основания рекомендовать включение магнийсодержащих препаратов в комплексную терапию хронического эндометрита.

Методология и методы исследования. Данное исследование носит клинико-экспериментальный характер. В работе использовались методы экспериментального моделирования, морфологические методы (гистологическое исследование биоптатов эндометрия, полуколичественная оценка воспалительного инфильтрата эндометрия), иммуногистохимические методы (изучение показателей активности желатиназы В в тканях эндометрия), биохимические методы (изучение магний-кальциевого баланса в крови из разных регионов, показателей интенсивности пероксидации и антиоксидантной защиты в крови из НПВ), статистические методы. Объект исследования – патогенетические механизмы нарушения баланса между повреждением ткани и ее репарацией у крыс на фоне экспериментального хронического воспаления эндометрия и в образцах эндометрия женщин с хроническим эндометритом и повторяющимися неудачами имплантации. Предмет исследования – биохимические, морфологические и иммуногистохимические параметры у животных в эксперименте, а также, морфологические и иммуногистохимические параметры образцов эндометрия женщин с бесплодием, ХЭ и повторяющимися неудачами имплантации при лечении бесплодия методами ВРТ.

Положения, выносимые на защиту:

1) В тканях эндометрия, у женщин с хроническим эндометритом и повторяющимися неудачами имплантации, и у подопытных животных на этапе хронизации экспериментального воспаления эндометрия, на фоне морфологических признаков хронического воспаления, проявляющихся дистрофическими явлениями в строме, эпителиоцитах и glanduloцитах желез,

полиморфно-клеточной воспалительной инфильтрацией, с преобладанием лимфо-плазмоцитарных инфильтратов, с незначительным увеличением макрофагальной инфильтрации, фиброзом, выявлялось снижение удельного числа желатиназа-В позитивных клеток и интенсивности их экспрессии в стромально-клеточном компоненте, при практически неизменном уровне указанных параметров в железистом эпителии.

2) При экспериментальном хроническом воспалении эндометрия в эритроцитарной массе крови из нижней полой и подвздошной вен, в плазме крови из подвздошной вены отмечалось снижение уровня магния, а также усиление перекисного окисления липидов, проявлявшееся увеличением содержания диеновых конъюгатов и малонового диальдегида, при неизменном уровне активности каталазы в крови из нижней полой вены.

3) Под влиянием магнийсодержащей композиции у крыс, на фоне экспериментального хронического воспаления эндометрия, восстанавливалось до исходных показателей удельное число, интенсивность экспрессии желатиназа В позитивных клеток, концентрация магния в эритроцитарной массе крови из разных регионов, снижалось содержание диеновых конъюгатов и малонового диальдегида в крови из нижней полой вены, при тенденции к увеличению активности каталазы, сопровождавшееся увеличением количества макрофагов и лимфоцитов и уменьшением числа плазмочитов.

4) В образцах эндометрия, полученных у женщин с хроническим эндометритом и повторяющимися неудачами имплантации, при проведении в комплексной терапии электрофореза с 10% сульфатом магния, отмечалась тенденция к восстановлению показателей активности желатиназы В с одновременным увеличением числа макрофагов, эозинофилов и уменьшением плазмочитарно-лимфоцитарной инфильтрации.

Степень достоверности и апробация работы. О достоверности полученных результатов и обоснованности выводов свидетельствуют личное участие соискателя в получении и анализе экспериментальных данных, корректная постановка опытов с использованием необходимых контрольных

групп, достаточное количество наблюдений, применение современных методов исследования и адекватных методов статистической оценки полученных результатов.

Основные положения работы представлялись и обсуждались на конференциях: 73-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины», 2015 г; 74-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины», 2016 г; XXVI международной конференция РАРЧ "Репродуктивные технологии сегодня и завтра", 2016 г; XIII съезде молодежных научных обществ медицинских и фармацевтических ВУЗОВ России и стран СНГ, 2016 г.

Внедрение результатов в практику. Результаты диссертации внедрены на кафедрах патофизиологии и клинической патофизиологии ФУВ ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, на кафедре акушерства и гинекологии ФУВ ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России.

Публикации результатов исследования. По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, из них 4 – в изданиях, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий или входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук и издания, приравненные к ним, в том числе получен патент.

Личный вклад автора в исследование. Анализ литературных данных, эксперименты на животных, забор материала, патоморфологическое, биохимические исследования, статистический анализ полученных данных проведен самостоятельно автором, что позволило выполнить поставленные задачи, обосновать выводы и практические рекомендации. Соискателем самостоятельно проведен аналитический обзор отечественной и зарубежной

литературы по изучаемой проблеме (100%). Автор непосредственно участвовал в проведении экспериментальных и клинических исследований (86%). Соискателем лично выполнены статистическая обработка и обобщение результатов исследований (90%), написан текст диссертации (90%). Личный вклад автора составляет 90% при получении результатов и 90% при оформлении публикаций по теме диссертации.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 132 страницах машинописного текста. Состоит из введения, обзора литературы, главы материалы и методы исследования, собственных результатов, а также обсуждения и выводов. Работа иллюстрирована 13 таблицами и 19 рисунками. Список литературы содержит 217 источников, из них 109 отечественных и 108 иностранных.

ГЛАВА 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Принципы классификации и современное представление об этиопатогенезе и морфологических изменениях эндометрия на фоне хронического эндометрита

ХЭ - клинико-морфологический синдром, который характеризуется совокупностью морфологических и функциональных изменений эндометрия воспалительного происхождения, которые приводят к нарушению нормальной физиологии этой высокоспециализированной ткани (Johnson-MacAnanny E.B. et al, 2010; Шурашалина А.В., 2011; Плясунова М.П., 2013; Боярский К.Ю, 2013, Казачков Е. Л., 2013; Кокабидзе Е.Г., 2014; Kitaya R.,2015; Tersoglio, A., 2015).

Основными клиническими симптомами ХЭ, являются маточные кровотечения и/или предменструальные кровянистые выделения из половых путей, болевой синдром, патологические выделения из половых путей. Все это в совокупности значительно снижает качество жизни женщин с этим заболеванием. Так же возможно длительное, малосимптомное или даже асимптомное течение ХЭ. Это приводит к нарушению репродуктивной функции в виде привычного невынашивания беременности и бесплодия. Особое значение ХЭ приобретает в аспекте неудач лечения бесплодия методами ВРТ. У пациенток с неудачами переноса эмбрионов более чем в половине случаев идентифицируют ХЭ по данным гистологического исследования (Краснопольский В.И., 2007; Илизарова Н.А., 2009; Михнина Е.А., 2009; Fatemi H.M.et all 2009; Шуршалина А.В., 2011; Петров Ю.А., 2012; Мальцева Л. И.,2012; Цаллагова Л.В., 2014; Akopians, A, 2013; Lebovitz, O.,2014).

Есть данные, показывающие ассоциацию ХЭ с инвазивными вмешательствами в полости матки и на органах малого таза. Часто ХЭ сочетается с хроническим сальпингоофоритом и спаечным процессом в малом тазе. Минимальные критерии для диагностики воспалительных заболеваний органов малого таза (ВЗОМТ), предложенные CDC (Centers for Disease Control and

Prevention, США, 2009), информативны в случае с хроническим эндометритом только в 33%. В целом почти у половины пациенток какие-либо клинические симптомы заболевания отсутствуют. Диагностика ХЭ основана на анализе клинических симптомов, данных анамнеза, инструментальных и лабораторных методах. Обязательным этапом диагностики заболевания является морфологическое исследование эндометрия (Green top guideline, 2009; руководство CDC STD Treatment Guidelines 2010; Сидельникова В.М., 2010; Гинекология: Национальное руководство, 2011; Петров Ю. А., 2012; Данусевич И.Н., 2013; RCOG).

Современная классификация ХЭ, основанная на этиологическом факторе, значительно видоизменилась за последнее десятилетие.

В основе современной классификации ХЭ лежат различные этиологические факторы этого заболевания. Принято выделять неспецифический и специфический ХЭ. Так же существуют вирусные, хламидийные, микоплазменные, грибковые, протозойные и паразитарные эндометриты (Дубницкая Л.В, Назаренко Т.А., 2007; Шуршалина А.В., 2007, 2011). В настоящий момент облигатным и факультативным анаэробным микроорганизмам в сочетании с микроаэрофилами принадлежит важная роль в развитии ХЭ (Гомболевская, Н. А., 2012; Озолия Л.А., и др., 2013) Так, при невынашивании беременности, ассоциированной с ХЭ, у 55,8% женщин определяется вирусно-бактериальная контаминация эндометрия, при этом практически не верифицируются чистая бактериальная обсемененность. Моновирусная контаминация эндометрия, преимущественно вирусом простого герпеса или цитомегаловирусом определяется — у 31,9% женщин.

С одной стороны необходима верификация микробного флорогена, ставшего основным этиологическим фактором, но сложность заключается в том, что в большинстве случаев бактериологическое исследование не дает роста патогенной флоры. Посевы стерильны (Glukhova E.V. et al, 2009). В том числе, и особенно, посевы материала, полученного из полости матки. Из чего можно сделать вывод о том, что инфекционный агент не является ведущим звеном

патогенеза данной патологии, хотя и является инициирующим фактором в большинстве случаев (Кузнецова А.В., 2000; Andrews W.W., 2005; Beruchashvili M. et al., 2010; Уткин Е.В., 2011; Озоллия Л.А., 2012).

По современным данным дисбаланс между гормональной и иммунной системами организма в сочетании с воздействием микробного агента являются основным звеном патогенеза ХЭ.

Есть два варианта патогенеза: заболевание может развиваться, как исход неадекватной терапии острого эндометрита или как первичная хронизация у женщин с нарушенным балансом между активностью процессов деструкции и пролиферации тканей, обусловленным первичными генетическими дефектами, иммунной системы (Решетникова Н.С., 2010; Петров Ю.А., 2012).

Хроническому течению воспалительного процесса, кроме патогенных микроорганизмов, также способствует нарушение иммунокомпетентной системы. Недостаточность клеточного и гуморального иммунитета, приобретенная или врожденная, так же, является важным патогенетическим фактором, способствующим возникновению ХЭ (Michimata, T., et al 2002; Kwak-Kim J.Y., 2005; Демидова Е.М., 2006; Matteo, M., et al, 2011;).

Одним из важных механизмов патогенеза ХЭ является нарушение ангиоархитектоники тканей эндометрия. Склерозы стенок сосудов и периваскулярного пространства вокруг спиральных артерий и в базальных слоях эндометрия, приводит к нарушению микроциркуляции, а именно: венозной гиперемии в зоне хронического воспаления, снижению напряжения кислорода. При этом активируется гликолиз, в результате которого накапливаются продукты липолиза, молочная, яблочная, янтарная, кетоглутаровая кислоты, отражающие метаболические нарушения в тканях на фоне их повреждения (Beruchashvili M. et al, 2008; Bessmertnaia V.S. et al 2010).

Возникают ишемия и гипоксии. Вырабатываются активные формы кислорода, которые инициируют перекисное окисление липидов и повреждение компонентов клеточных мембран.

Вопрос о роли баланса между агрессивными формами кислорода и антиоксидантными системами активно обсуждается. Определенно можно сказать, что хронический воспалительный процесс сочетается с типовыми расстройствами метаболизма (Силантьева Е.С., 2008; Колесникова Л. И. и др., 2013). Наблюдается недостаточность локальной фибринолитической активности под влиянием провоспалительных факторов, что усиливает ангиогенез в фибриновых сращениях, что усугубляет морфологические нарушения и способствует образованию внутриматочных синехий.

Нарушение микроциркуляции закономерно приводит к сдвигу в системе коагуляции в сторону хронической гиперкоагуляции. (Адамян Л.В. и др., 2006; Сапелкин С.В. и др., 2007; Гайдарова А.Х и др., 2015).

ХЭ соответствует определению хронического продуктивного интерстициального воспаления. При продуктивном воспалении сильно выражена стадия пролиферации клеточных элементов, при незначительных альтерации и экссудации. Хроническое воспаления можно определить, как длительный воспалительный процесс, при котором одновременно протекают и повреждение тканей, и их репарация.

Как известно, в патогенезе острого воспаления одну из ключевых ролей играют альтерация, экссудация, отек, выраженная инфильтрация нейтрофилами и сосудистые реакции. При хроническом воспалении стадия альтерации практически отсутствует или выражено очень слабо. Хроническое воспаление отличается инфильтрацией в первую очередь клетками мононуклеарного ряда: макрофагами, лимфоцитами, плазмócитами. Клетки воспалительного инфильтрата продуцируют провоспалительные цитокины и ряд других биологически активных веществ. Так же свойственна неполноценная репарация и ангиогенез, склероз ткани.

Многие хронические заболевания человека характеризуются именно развитием хронического воспаления в органах и тканях. Основными механизмами хронизации воспаления, без завершения его адекватной репарацией являются:

- 1) непрекращающееся воздействие этиологического фактора;

- 2) несостоятельность процессов репарации;
- 3) рецидивы острого воспаления;
- 4) изначально хроническое течение;
- 5) длительная малосимптомная персистенция некоторых инфекционных агентов;
- 6) длительное воздействие токсичных экзо- и эндогенных веществ;
- 7) аутоиммунные процессы.

В общем, патогенез любого хронического воспалительного процесса - это результат взаимодействия между патогеном и самим организмом. Исход определяется как патогенными, антигенными и другими биологическими особенностями флорогена и, с другой стороны исходным состоянием организма, подвергнувшегося патогенному влиянию флорогена, его индивидуальной специфической и неспецифической реактивностью и резистентностью, в том числе интенсивностью и адекватностью клеточного и гуморального иммунитета.

Морфологически хроническое воспаление имеет ряд особенностей:

- 1) Продуктивная тканевая реакция сочетается с альтерацией, экссудацией и склерозом.
- 2) Неэффективная пролиферация клеток в очаге воспаления;
- 3) Диффузная и мелкоочаговая мононуклеарная инфильтрация тканей;
- 4) Сопутствующее вторичное повреждение тканей индуцируется медиаторами воспаления плазменного и клеточного происхождения, которые длительно накапливаются в очаге хронического воспаления;
- 5) Незначительная выраженность экссудативных изменений, которые представлены эмиграцией клеточных элементов и незавершенным фагоцитозом;
- 6) Склероз и длительная деструкция ткани («Воспаление» Ф.И. Висмонт., 2006).

В развитии воспаления можно выделить 4 стадии. В начале реакция стромальных клеток, эндотелия и системы гемостаза. Затем, под воздействием флорогена, происходит миграция и активация нейтрофилов. Эти действия направлены на элиминацию флорогена. После чего начинается миграция

мононуклеаров – моноцитов и лимфоцитов – основных клеток хронического воспаления, которые являются доминирующими среди клеток воспалительного инфильтрата при хроническом воспалении. Моноциты дифференцируются в макрофаги. Полная элиминация флогогена и продуктов тканевого распада ознаменуют начало репарации. Правильно было бы сказать, что стерилизация очага воспаления является условием для начала репарации. Миграция в очаг фибробластов и формирование коллагеновых волокон равно как и других компонентов внеклеточного матрикса, завершают воспалительный процесс. Очевидно, что этот сложный процесс требует согласованности и механизмов регуляции. Центральное звено среди механизмов регуляции занимает цитокиновая система (Радзинский В.Е., 2004; Радзинский В.Е., 2005)

Активированные эндотелиоциты первыми включаются в секрецию цитокинов. Затем присоединяются мигрирующие лейкоциты. Цитокины оказывают главенствующее влияние на процесс воспаления и репарацию. Провоспалительные цитокины инициируют развитие поствоспалительной регенерации. При этом, для начала репарации в очаге воспаления должна быть относительно низкая концентрация цитокинов, таких как IL-1, TNF, IL-8, а также отсутствие деструкции со стороны свободных радикалов. Осуществление этого возможно после полной утилизации основной массы антигенного материала, которая осуществляется нейтрофилами и макрофагами. В условиях хронического воспаления эффекты цитокинов разноплановы. В эпицентре цитокины реализуют воспаление, а по периферии инициируют регенеративные процессы. Среди таких полифункциональных цитокинов, влияющих одновременно и на поддержание воспаления, и на процессы репарации выделяют:

IL-1 стимулирует пролиферацию эндотелиоцитов, кератиноцитов, астроцитов, пролиферацию и дифференцировку фибробластов. Регулирует синтез коллагена;

IL-4 стимулирует пролиферацию и дифференцировку мастоцитов;

IL-6 стимулирует пролиферацию и дифференцировку эндотелиоцитов, гепатоцитов, кератиноцитов, усиливает синтез коллагена фибробластами, регулирует синтез белков острофазного ответа;

IL-8 стимулирует пролиферацию кератиноцитов, обуславливает хемотаксический эффект;

TGF β способствует дифференцировке моноцитов в макрофаги, пролиферацию эндотелиоцитов, пролиферацию и дифференцировку фибробластов и синтеза ими коллагена;

В состав клеточного состава инфильтрата при хроническом воспалении входят: моноциты, макрофаги, лимфоциты, плазматические клетки, единичные нейтрофилы, эозинофилы и тучные клетки.

Макрофаг — основная клетка хронического воспаления. Макрофаги осуществляют фагоцитоз не только повреждающих агентов (например, микробов), но и тканевого детрита, подготавливая тем самым условия для репаративных процессов. В иммунных реакциях макрофаг принимает участие как антигенпредставляющая клетка (Черешнева М. В., 2011).

При хроническом воспалении в инфильтрации ткани принимают участие так же: лимфоциты, плазматические клетки, эозинофилы и тучные клетки. Лимфоциты выступают как компоненты реакций гиперчувствительности замедленного типа — тканевого ответа на вирусные инфекции, а также при не иммунном воспалении. Т и В-лимфоциты в нативном и активированном состоянии выделяют разные адгезивные молекулы и медиаторы, которые опосредуют связь с макрофагами при хроническом воспалении (Базина М.И., 2013). Активированные лимфоциты продуцируют лимфокины. Цитокины из активированных макрофагов -монокины, напротив, активируют лимфоциты, которые сами по себе являются продуцентами провоспалительных медиаторов. Таким образом обеспечивается продолжительность воспалительного ответа.

Очевидно, что нейтрофилы играют главную роль при остром воспалении, но при этом, многие формы хронического воспаления, сопровождаются накоплением больших количеств нейтрофилов.

Развитие склеротических изменений, длительная деструкция тканей - это принципиальный признак хронического воспаления, как и нарушения процессов репарации. Восстановление разрушенных тканей происходит путем замещения поврежденных клеток соединительной тканью. Результатом этого являются фиброз и склероз (Литвицкий П.Ф., 2006). Фиброз это универсальный процесс, основа которого - накопление компонентов внеклеточного матрикса и уплотнение соединительной ткани с появлением рубцовых изменений. Другим близким процессом является склероз, который представляет собой замену паренхимы органов плотной соединительной тканью. Это приводит к уплотнению органов. Патологический фиброз и склероз встречаются при хроническом воспалении и вызваны как инфекционными, так и неинфекционными факторами. (Скляр Л.Ф, 2004; K. Takahashi et al., 2013).

Необходимо отметить, что реакция воспаления – это универсальная защитная реакция организма, а хроническое воспаление, это сбой защиты. Так как хроническое воспаление утрачивается способность к уничтожению повреждающего агента и восстановлению ткани (Лебедев К.А. и др., 2005; Висмонт Ф.И., 2006).

Таким образом, хронический воспалительный процесс приводит к нарушению функции клеток и межклеточного вещества соединительной ткани и в итоге гиперплазии соединительной ткани. В этой связи, закономерным является изучение роли матриксных металлопротеиназ в формировании в патологии, при повреждении тканей, в том числе и при септическом, а также асептическом воспалении.

1.2 Роль внеклеточного матрикса в физиологии и патологии репродуктивной системы

В молекулярной биологии внеклеточный матрикс (ВКМ) - это сложная сеть, сформированная структурными молекулами: протеогликанами, коллагеном, и эластином, которые в совокупности поддерживают структурную целостность тканей (Alberts B., 2002).

По данным Lewin B. et al (2011), ВКМ обеспечивает организованную среду, для перемещения и взаимодействия клеток. Все макромолекулы, составляющие ВКМ, производятся клетками: фибробластами, хондробластами и остеобластами. ВКМ состоит из трех компонентов: гелеобразной среды, коллагеновых волокон и эластиновых волокон. Гелеобразная среда формируется протеогликанами: полипептидными цепями в сочетании с полисахаридными цепями глюкозаминогликанов, присоединенных посредством ковалентных связей. Цепи протеогликанов прикрепляются к особому виду глюкозаминогликана – полимеру гиалуроновой кислоты. Этот полимер скрепляет структуру геля. Что дает ему возможность противостоять сжатию и растяжению ВКМ и обеспечивать быструю диффузию различных веществ, структурных компонентов и гормонов между кровью и клетками соединительной ткани.

Механические свойства геля поддерживаются при помощи волокон трех типов: 1) коллагеновых волокон I типа, которые формируют скелет соединительной ткани; 2) гибких волокон, состоящих из эластина и фибриллин, придают эластичность всей структуре; 3) сетчатых волокон коллагена III типа, который образует множественные связи перекрестного характера между всеми волокнами и соединяет прочие компоненты внеклеточного матрикса.

В физиологических условиях существует равновесие между синтезом и распадом коллагена, предотвращающее развитие фиброза в ВКМ. Любое изменение структуры ВКМ означает, что нарушен баланс между синтезом и деградацией структурных белков (Nagase H, 1999; Evrosimovska B. et al., 2011; Raffetto J.D. et al., 2011). Содержание коллагена в ВКМ находится под влиянием ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС), компоненты которой циркулируют в крови и находятся в тканях. Ангиотензин II стимулирует фибробласты и синтез коллагена. Ангиотензин II связывается с рецепторами ангиотензина I на мембране фибробластов, что приводит к повышению уровня тканевого фактора роста (TGF- β), который стимулирует продукцию и депонирование структурных компонентов ВКМ (Brilla C.G. et al., 1995; Schnee J.M. et al., 2000).

Работы последних лет убедительно показывают, что внеклеточный матрикс, как составной элемент стромы, играет значимую роль в метаболических процессах, влияющих на клеточную пролиферацию, апоптоз, а также является депо биологически активных веществ, в том числе факторов роста (Гасанов А.Г., 2009; Extracellular Matrix: New Perspectives for Translational Medicine, 2016).

В дерматологии определена корреляция состояния основных компонентов матрикса со старением кожи. С возрастом уменьшается количество коллагена в коже. Это связано с увеличением активности колагеназ. В совокупности со снижением синтеза коллагена, это неизбежно приводит к нарушению регенерации дермы и формированию признаков старения кожи (Röck K., 2011).

Нарушения компонентных составляющих межклеточного матрикса наблюдаются и при таких инфекционных заболеваниях, как лепра, боррелиоз, имеющих дерматологические проявления (Lyubeznova O.N., 2012).

Синдром Марфана — еще один пример нарушения баланса между синтезом и распадом коллагена. Заболевание носит наследственный характер, финал его является полиорганным патологией. Клинические проявления характеризуются слабым развитием подкожной жировой клетчатки легкой растяжимостью кожи и образованием стрий, легкой ранимостью. Этиологическим фактором данного заболевания является мутация гена, который кодирует фибриллин-1 - обязательный компонент микрофибрилл.

Нарушение соотношения компонентов межклеточного матрикса, и особенно коллагена, является ведущим звеном формирования патологических рубцов. Считается, что ведущую роль в патологическом образовании соединительной ткани играют нарушения во взаимоотношениях между фибробластами и макрофагами (Vande Berg J.S., 2003).

Разрушение хряща и потеря его механических функций зависят от чрезмерной деградации его ВКМ. Это связано с дисбалансом между распадом и обновлением компонентов матрикса, как на молекулярном, так и на надмолекулярном уровне, несмотря на компенсаторную активность хондроцитов (Pavelka K. et al., 2002).

Дисфункция сердца сопровождается изменениями архитектуры миокарда, сопровождающейся увеличением содержания коллагена и фиброзной ткани во внеклеточном матриксе (Wilson E.M. et al.,2001; Francis G.S.,2007).

Отдельного интереса заслуживают ткани репродуктивных органов, которые претерпевают циклические изменения под влияние стероидных гормонов и ростовых факторов. Эндометрий принимает участие в имплантации эмбриона, лимитировании глубины инвазии и питании бластоцисты, защите эмбриона от иммунной системы матери. Качественный состав, взаимоотношения компонентов ВКМ, а также, клеток эндометрия играют ключевую роль в физиологии эндометрия, имплантации и протекании беременности (Соболева Г. М. Шуршалина А. В., Сухих Г. Т.,2007).

Предполагается, что секреция эстрогенов яичниками, вызывает интенсификацию пролиферации стромальных клеток эндометрия в пролиферативную фазу. Это приводит к увеличению плотности клеток и способствует синтезу коллагена I типа, преимущественно во время секреторной фазы и в течение первого триместра беременности, в результате длительного воздействия прогестина (Asgerally T. Fazleabas, 1997).

Известно, что под влиянием половых стероидов, происходят циклические изменениях коллагенов, гликопротеинов и протеогликанов в ВКМ эндометрия. Методом иммуногистохимии показано, что положительная реакция наблюдалась в строме эндометрия и в сосудистой стенке сосудов к коллагену типа I и типа III на протяжении менструального цикла. При этом в пролиферативную фазу коэффициент соотношения коллагена III типа к коллагену I типа был выше чем в секреторную фазу. Возможной причиной изменения состава внеклеточного матрикса является изменение стероидных влияний. Другой возможной причиной является изменение плотности клеток в эндометрии. Существует предположение, что плотность клеток модулирует биологический рост и синтез компонентов внеклеточного матрикса и синтез специальных белков (M. Iwahashi. et al.,1997).

По данным M. Iwahashi et al. (1997), VI тип коллагена оказался диффузно локализован в эндометрии. Реакция с антителами к коллагену VI типа была четко положительна также в строме. При этом полностью отсутствовала реакция к указанным коллагенам в железах эндометрия. Реакция с антителами к коллагену IV типа обнаруживалась исключительно в базальной мембране желез эндометрия и под слоем клеток эндотелия капилляров. На протяжении всего менструального цикла определяется положительная реакция на пролилгидроксилазу – ключевой фермент-катализатор процесса гидроксилирования пролина с целью стабилизации трехмерной структуры коллагена. Так же определялась положительная реакция на этот фермент и в клетках эндометриальных желез. Положительная реакция к ламинину определялась в базальной мембране эндометриальных желез и в нижних слоях эндотелия сосудов.

Патофизиология внеклеточного матрикса изучалась в аспекте многих нозологий. Так, например, показано наличие ингибирующего влияния гликозаминогликанов на свободнорадикальные процессы, усугубляющие альтерацию при воспалении (Albertini R. e.a., 2000), а также защитное действие гликозаминогликанов на активность внеклеточной супероксиддисмутазы (Kolset S.J., 2000). Кроме того, обнаружена способность продуктов перекисного окисления липидов влиять на синтез коллагена, посредством усиления экспрессии соответствующих генов (Poli G., Rapóla M., 1997), выявлен стимулирующий эффект супероксидного анион-радикала на пролиферацию фибробластов (Burch, H. B., 1997).

1.3 Влияние матриксных металлопротеиназ на формирование внеклеточного матрикса тканей репродуктивных органов в норме и патологии

Ремоделирование внеклеточного матрикса это один из основных механизмов нормальной и патологической физиологии любой ткани (Воронкина И. В., 2013).

Активность матриксных металлопротеиназ (ММП) - важнейший фактор определяющий интенсивность ремоделирования внеклеточного матрикса. (Page-McCaw A.P., 2007).

ММП активно участвуют в процессах ремоделирования ВКМ, разрушая такие его компоненты, как коллаген, эластин, фибронектин, гликозаминогликаны, что позволило считать эти ферменты эффекторами ремоделирования. Для нормальной физиологии ВКМ, должен поддерживаться баланс между активностью ММП и их ингибиторами. Нарушение этого равновесия приводит к глубоким изменениям состава внеклеточного матрикса и влиять на различные свойства клеток (Лайнен Г.Р.,2002).

ММП - семейство цинковых металлопротеиназ. Основная их функция - это обмен структурных компонентов ВКМ. Эти ферменты основа таких процессов как миграция, адгезия, пролиферация и дифференцировка клеток и ремоделирование тканей. Помимо этого, ММП непосредственные участники многих и патологических состояний (Рогова Л. Н.,2011; Ярмолинская М.И.,2012).

Все ММП имеют ионы цинка Zn^{2+} в активном центре и нуждаются в ионах Ca^{2+} для стабильности молекулы. Молекулы ММП содержат несколько различных компонентов - доменов, каждый из которых отвечает за определенную функцию: сохранение в неактивной форме, секрецию, специфичность и катализ.

ММП синтезируются и секретируются фибробластами, эпителиальными клетками, фагоцитами, лимфоцитами и онкогенно-трансформированными клетками. ММП синтезируются в виде профермента. Активация профермента происходит с участием специальных протеаз вне клетки, или на ее поверхности. Изучены и тканевые ингибиторы ММП - ТИМП (Протасов М.В.,2008).

В настоящее время известно более 30 ММП. Все ММП поделены на 6 групп

- коллагеназы;
- желатиназы;
- стромелизины;
- матрилизины;
- мембранно-связанные ММП.

Шестая группа - это ряд представителей ММП, которые недостаточно изучены и объединены в группу «другие ферменты».

ММП первых трех групп, а именно желатиназы, стромелизины и коллагеназы непосредственно участвуют в расщеплении компонентов матрикса. В свою очередь ММП мембранного типа являются рецепторами и активаторами других ММП и обеспечивают локальный протеолиз в околоклеточном пространстве. Группа «других» ММП это разные пептидазы, которые секретируются очень ограниченным числом клеток в особых случаях (Хасигов П.З., 2001).

Наиболее изученными являются группы коллагеназ и желатиназ.

Изучены четыре представителя семейства коллагеназ:

- 1) интерстициальная коллагеназа (ММП-1);
- 2) коллагеназа нейтрофилов (ММП-8);
- 3) коллагеназа 3 (ММП-13);
- 4) коллагеназа 4 (ММП-18).

ММП-1 – гидролизует спиральную область коллагена. ММП – 1 синтезируется рядом клеток: нормальными и трансформированными фибробластами, хондроцитами, эпителиальными клетками, макрофагами.

ММП-8 была открыта и изучена в нейтрофилах. ММП-3 обнаружена в клетках карциномы грудной железы, а также в клетках костной ткани грызунов. Своё название коллагеназы получили за способность гидролизовать нативный коллаген в спиральной области. Все четыре ММП гидролизуют интерстициальные коллагены (Лайнен Г.Р., 2002; Evrosimovska B. et al., 2011).

Второе подсемейство матриксинов представляют - желатиназа А (ММП-2) и желатиназа В (ММП-9).

ММП-2 синтезируется многими клетками и секретируется в виде проММП. ММП-9 синтезируется в нейтрофилах и макрофагах, а также в фибробластах, хондроцитах и стимулированных Т-лимфоцитах. Оба фермента разрушают желатину, получаемые при разрушении различных типов коллагенов. Помимо

этого, деградируют некоторые белки соединительнотканного матрикса, в том числе и эластин. Секреция ММП регулируется многими факторами:

- 1) факторами, действующими на поверхности клетки (интегрины, фибронектин);
- 2) рядом химических соединений (простагландины, липополисахариды);
- 3) цитокинами и факторами роста;
- 4) физическими факторами: тепловой шок, облучение (Рогова Л. Н. и др., 2011; Evrosimovska B, et al., 2011).

Множество исследований посвящено исследованию роли ММП в тканях, претерпевающих циклические изменения, в частности, в яичниках и в эндометрии. Ткань яичника, претерпевающая циклические изменения, особенно ярко выраженные в период овуляции и лютеолизиса, подвергается ремоделированию. Для выхода яйцеклетки из зрелого фолликула требуется разрушение собственной пластины фолликулярной оболочки, находящейся между клетками гранулезы и theca interna, равно как и сам ВКМ по всей площади «разрыва» должен подвергнуться ремоделированию. Это нарушение целостности оболочки фолликула также способствует ангиогенезу в будущем желтом теле. В дальнейшем сформировавшееся желтое тело, должно будет подвергнуто обратному развитию, так же путем деградации, подвергшихся лютеинизации клеток theca interna, и ВКМ. На примере ММП изучена роль матриксинов в физиологии овуляции. Экспрессия ММП-1 обнаружена на поверхности theca interna и theca externa. При приближении овуляции синтез ММП-1 интенсифицируется в зоне будущего разрыва фолликулярной оболочки. В период лютеолизиса локально возрастает активность ММП-2 и ММП-9 (Endo, T. et al., 1993)

Продукция ММП в матке изучалась *in vitro* и в образцах тканей, полученных из интактной матки. Эндометрий приматов и человека претерпевает значительные изменения на протяжении менструального цикла. ММП активно продуцируются в период менструаций, в связи с разрушением и деградацией ткани эндометрия. Всю оставшуюся часть менструального цикла экспрессия

ММП остается очень низкой и почти неопределима, за исключением периода перед возможной имплантацией эмбриона, когда происходит ремоделирование ткани и дифференциация ткани эндометрия. В образцах, взятых из интактной матки, изучено содержание ММП-1, ММП-2, ММП-9, ММП-7, ММП-11 на протяжении менструального цикла. ММП-2 остается практически неизменный на протяжении всего менструального цикла, в то время как экспрессия ММП-1 зависит от уровня эстрогенов. В раннюю и среднюю пролиферативную фазу несколько возрастает активность ММП-11 и ММП-7, в то время как активность ММП-1, ММП-3 и ММП-9, определяется на низких цифрах фокально. В целом, на протяжении, почти всей, секреторной фазы, активность ММП остается предельно низкой, вновь интенсифицируясь к концу фазы секреции. Иммуногистохимическое исследование локализации представителей семейства ММП в эндометрии показало, что секреция ММП-1 ограничена стромальными клетками в период менструации и слабо положительная реакция определялась в раннюю пролиферативную фазу. Так же мРНК ММП-1 определена вокруг сосудов, во фрагментах функционального слоя эндометрия, в менструальную фазу цикла. Таким образом, можно сделать заключение о ключевой роли ММП-1 в отторжении функционального слоя эндометрия при менструации. Распределение активности стромелизинов на протяжении менструального цикла, по-видимому, почти идентично: ММП-1, ММП-3, ММП-10 и ММП-11, также определяются в стромальном компоненте. Экспрессия ММП-3 в период менструаций также возрастает. Что говорит в пользу того, что коллагеназы и стромелизины играют роль в процессе деградации стромального компонента внеклеточного матрикса в период менструаций. В исследовании авторов активность ММП-9 была определена иммуногистохимически в полиморфноядерных нейтрофилах, моноцитах, макрофагах и эозинофилах в период менструации. Предполагается, что названные клетки, являются основным источником этой протеинкиназы в эндометрии в период менструации. ММП-7 в отличие от остальных представителей матриксинов является специфическим эпителиальным ферментом. мРНК ММП-7 локализована строго в железистом

эпителии эндометрия на протяжении всего менструального цикла. Соотношение интенсивности экспрессии ММП и их тканевых ингибиторов играет ключевую роль в регуляции активности деградации матрикса. Экспрессия ТИМП-1, в равной степени, определяется как в железистом эпителии эндометрия, так и в строме на протяжении всего менструального цикла, локализуясь преимущественно вокруг сосудов, по-видимому, играя роль «защиты» сосудистой стенки, от действия матриксинов. ТИМП-2 с постоянной интенсивностью экспрессируется на протяжении всего менструального цикла, но достоверные данные о его локализации пока отсутствуют. ТИМП 3 экспрессируется сугубо в стромальном компоненте преимущественно в средней-поздней секреторной фазе менструального цикла. Необходимым условием для успешной имплантации является ремоделирование эндометрия в секреторную фазу, которое обеспечивается влиянием ММП-2 и ММП-9. Клеточная культура образцов эндометрия, содержащая смешанный состав из эпителиальных и стромальных клеток, экспрессировала ММП-1, ММП-2, ММП-3, ММП-7, ММП-9 (Marbaix, E., et al., 1996). Физиологические концентрации прогестерона оказывают ингибирующее влияние на экспрессию указанных матриксинов. (D.L.Hulboy. et al., 1997).

К настоящему времени в геноме человека найдены 4 гена белков ТИМП. Полиморфизм гена ТИМП-1 (nt+434 и интрон-5g/t) ассоциированы с аневризмой брюшного отдела аорты, и с дегенерацией люмбальных дисков. Генетический полиморфизм- ТИМП-2 связан с прогрессирующим периодонтитом. Вариабельностью толщины интимы каротидной артерии и патогенез аневризмы брюшной аорты ассоциирован с полиморфизмом T-1296C гена ТИМП-3 (Соловьева Н.И. 1998; Woessner F.J., Nagase H., 2001; Ярмолинская М.И. и др., 2012).

Известно, что полиморфизм гена ММП-1, определяется при артериальной гипертензии. Мутации в генах коллагена IV типа приводят к болезни Элерса-Данло. С поражением межпозвоночных дисков связан полиморфизм- 1306C/T гена ММП-2 связан с (Dong, D. et al., 2007).

Одним из механизмов регуляции активности матриксинов в эндометрии являются циклические изменения в синтезе половых стероидов, цитокинов и факторов роста. Ключевую роль в регуляции большинства ММП промоуторов играет фактор транскрипции AP-1. Специфические «рецепторы» к этому фактору обнаружены почти на всех представителях семейства матриксинов, этот фактор является необходимым компонентом для экспрессии большинства ММП. Результат анализа литературных данных показывает, что прогестерон, в целом, оказывает ингибирующее действие на экспрессию ММП *in vitro* и *in vivo*. Гены ММП экспрессируются в период физиологического снижения содержания прогестерона во время пролиферативной фазы и менструации. В фазу секреторной фазы цикла, когда происходит подъем содержания прогестерона снижается интенсивность экспрессии генов большинства ММП. Исключение является только ММП-2 экспрессия которой повышается именно в фазу секреции. Механизм ингибирующего действия не до конца изучен. Было показано прямое ингибирующее действие прогестерона на экспрессию генов стероид-зависимого синтеза. На примере ММП-7 показано опосредованное ингибирующее действие через паракринную активность TGF- β . Во время лечения прогестероном в тканях эндометрия увеличивается содержание TGF- β . TGF- β ингибирует экспрессию ММП-7 в образцах клеточной культуры клеток эпителия. Также прогестерон регулирует активность ММП на посттрансляционном уровне, увеличивая локально синтез специфических тканевых ингибиторов ММП. На культуре клеток эндометрия показано стимулирующее влияние прогестерона на синтез м-РНК ТИМП. Ингибитор активатора плазминогена I (PAI I) ингибирует протеазную активность участников «плазминового каскада», прогестерон в свою очередь стимулирует выработку PAI I в культуре клеток эндометрия в эксперименте (Fazleabas, A., 1997).

Влияние эстрогенов на экспрессию ММП менее изучено. К настоящему моменту, очевидно, что влияние эстрогенов на экспрессию ММП, не так велико, как влияние прогестерона. В некоторых исследованиях показан синергизм в действии эстрогена и прогестерона в отношении ММП, так как эстрогены

интенсифицируют продукцию рецепторов к прогестерону. Эстрогены в свою очередь регулируют синтез компонентов AP-1- фактора транскрипции, который играет ключевую роль в индукции промоутеров ММП (D.L.Hulboy et al, 1997).

Роль ММП в патогенезе разнообразной патологии показана в исследованиях последних лет.

В сосудистой стенке в норме обнаруживается ММР-2, ТИМП-1 и -2, При другие ММП характерны для атеромы. Чем выше уровень ММР-9, тем больше объем атеросклеротического процесса. Выявлено, что ММР-9 и ТИМП-1 являются независимыми предвестниками сердечно-сосудистой патологии и ассоциированной с ней смертности.

Уровень ММР-9 и ТИМП-1 при атеросклерозе значительно выше по сравнению с больными стенокардией напряжения и здоровыми людьми. Эти два белка могут быть рассмотрены в качестве маркеров острой фазы разрыва бляшки, а повышенный уровень ММР-9 предиктор в отношении развития рестенозов.

Помимо этого, в некоторых исследованиях выявлено повышение уровня ММР-2 у больных с острой коронарной патологией - инфарктом миокарда. У пациентов с сердечной недостаточностью, выявлена сильная корреляционная связь между уровнями катехоламинов и активностью желатиназы А. (Rosenberg G. A., 2003)

Показано увеличение показателей активности желатиназы В на этапе формирования экспериментальной язвы желудка у крыс (Рогова Л. Н., Шестернина Н. В., 2011).

Матриксины играют ключевую роль в процессе ангиогенеза. Этот процесс требует отделения эндотелиальных клеток от базальных мембран и их миграции через соединительно-тканый барьер. Во время такой миграции клетки эндотелия продуцируют МПП с целью облегчения процесса передвижения. Ряд факторов ангиогенеза, таких как фактор роста фибробластов, эндотелиальный фактор роста стимулирует и продукцию ММП.

Экспрессия ММП-9 /ТИМП-1 одновременно возрастают в сыворотке крови пациентов с карциномой легкого. Установлено что ММР-2 и ММР-9 играют

важную роль в процессе метастазирования при плоскоклеточном раке легкого и раке шейки матки, опухолях молочной железы. Матриксины принимают участие в метастазировании на этапах интравазации и экстравазации, а также взаимодействии с клеточным окружением. В процессе метастазирования опухолевые клетки взаимодействуют с внеклеточным матриксом и непосредственно с его компонентами. Возможно поэтому ММП могут быть оценены как молекулы, которые поддерживают опухолевые клетки на протяжении всего процесса метастазирования (Egeblad M, Werb Z., 2002; Raffetto J.D., Khalil R.A., 2007).

Относительный дефицит ТИМП – тканевого ингибитора ММП, способствует протеолизу хрящевой ткани при остеоартрозах.

Есть данные о роли ММП в патогенезе сепсиса. В настоящее время, в патогенезе сепсиса большое значение придается хемоаттрактантам. К ним относятся цитокининдуцируемый хемоаттрактант нейтрофилов, а также, ММП-2 и ММП-9 (Endo, T. et al., 1997).

Роль матриксных металлопротеиназ широко исследуется в аспекте патогенеза нарушения репродуктивной функции человека. Показано статистически значимое повышение экспрессии желатиназы В у пациенток с синдромом поликистозных яичников и нарушением овуляторной функции.

Есть пилотные данные о снижении ММП-2 и ММП-9 в ткани эндометрия и в сыворотке женщин на фоне хронического эндометрита. В исследовании Sukhikh, G. et al., 2007, проводили оценку содержания ММП-2 и ММП-9 в сыворотке крови у женщин с хроническим эндометритом до и после курса магнитотерапии.

Как известно, адекватная инвазия трофобласта является определяющим фактором нормального прогрессирования беременности. Неадекватная инвазия трофобласта является рассматривается как одно из ведущих звеньев патогенеза таких осложнений беременности как преэклампсия, эклампсия. В работе показана роль низкой активности ММП-9 в патогенезе преэклампсии (Rahat. B. et al., 2016).

Одним из распространенных заболеваний у женщин репродуктивного возраста является эндометриоз. Патогенез этого заболевания сложен и не до конца изучен. Одним из механизмов формирования эндометриодных гетеротопий является миграция и затем имплантация клеток эндометрия. Показана роль ММП-9 в патогенезе эндометриоза, посредством прямого влияние на процессы миграции и дальнейшей инвазии эндометриальных клеток на поверхности органов и тканей. Носительство мутаций в гене кодирующих продукцию ММП-3 и -9 ассоциировано с наружным генитальным эндометриозом и глубоким инфильтрирующим эндометриозом (Yarmolinskaya, M. et al., 2014).

В работе Perez N., (2012), показана роль полиморфизма металлопротеиназ в патогенезе привычного невынашивания беременности. В работе Ranjbaran J, (2016), взаимосвязь активности ММП и синдрома поликистозных яичников и хронической ановуляцией.

Повышенная экспрессия ММП-2 и ММП-9 была установлена в группе пациентов с ановуляторными маточными кровотечениями и гиперплазией эндометрия (Zhang, X., et al., 2010).

Выявлена интенсификация экспрессии ММП-2 и ММП-9 при большинстве злокачественных заболеваний в гинекологии: шейки матки, эндометрия, яичников. В свою очередь, уровень активности ММП – (коррелирует с началом клинической стадии и наличием отдаленных метастазов. Кроме того, ММП-2 значительно ассоциирован со степенью малигнизации. ММП-7 может стать полезным маркером в диагностике рака яичников и метастазирования в лимфатические узлы при раке эндометрия. При диагностике рака шейки матки, может быть полезно определение ММП-11 и ММП-12, которые в принципе отсутствуют в здоровой ткани. Цервикальная интраэпителиальная неоплазия (CIN) и ее степень коррелируют с интенсивность экспрессии ММП-9 и ММП-2, так как обе протеиназы принимают участие в ремоделировании ткани шейки матки (Ghosh, A. et al., 2012).

Отдельного внимания авторов заслуживает вопрос о роли матриксных металлопротеиназ в патогенезе преждевременных родов. В амниотической

жидкости женщин с преждевременными родами в сроке менее 34 недель были определены значительно большие количества ММП-1, ММП-3, ММП-8 и ММП-9. Также, у этих женщин было более выражено расширение цервикального канала. В исследовании авторов показано значительное увеличение содержания ММП-8 в амниотической жидкости при инфицировании околоплодных вод. Причем эта закономерность была выявлена как при сохранности плодного пузыря, так и преждевременном его разрыве, в сравнении с женщинами, которые родоразрешились в срок. Авторами был разработан быстрый тест для оценки риска преждевременных родов именно на основании определения ММП-8 в околоплодной жидкости (Lee, S. et al., 2016).

1.4 Магний-кальциевый гомеостаз, его регуляция и роль в патологии репродуктивной системы

Среди катионов, присутствующих в организме человека одно из первых мест по распространенности занимают ионы магния и кальция.

В организме содержится около 24-28 г магния, большая часть из которого, концентрируется в костной и мышечной тканях. Около 20% в тканях с высокой скоростью метаболизма (мозг, мышцы, надпочечники, почки, печень, надпочечники). 90% всего магния содержится внутриклеточно и всего 10% внеклеточно. У здорового человека концентрация магния в плазме крови находится в диапазоне 0.7-1.1 ммоль/л. Этот внеклеточный магний находится в постоянном динамичном обмене с магниевыми запасами костей и мышц. Около 60% сывороточного магния ионизированы – это форма магния, которая может быть воспринята клетками. Остальная часть распределяется на фракции, связанные с протеинами (Авцин А.П., 1991; Дадак К., 2014).

Внутри клетки магний преимущественно распределен в матриксе и межмембранном пространстве в митохондриях, эндоплазматическом ретикулуме и в ядре. Повышение содержания магния в крови одновременно со снижением в тканях свидетельствует о внутриклеточной недостаточности этого иона. До тех пор, пока внутриклеточный компартмент магния не восполнится, почки будут

задерживать экскрецию магния с мочой. Эти процессы в свою очередь регулируются рядом эндокринных механизмов включая регулирующую функцию антидиуретического гормона, глюкагона кальцитонина, паратгормона и инсулина. Сочетание мобилизации внутриклеточного пула магния и увеличение его реабсорбции в почках являются основными путями регуляции уровня магния в крови. Несмотря на то, что до сих пор нет ясности в понимании закономерностей движения магния через клеточную мембрану (при некоторых физиологических процессах имеют место одновременно как выход, так и накопление магния в клетке), тем не менее, изучены механизмы регуляции вытеснения магния из клетки в межклеточное пространство и наоборот его вхождения внутрь клетки. Мобилизация магния из клетки регулируется адренергическим влиянием. При действии агонистов β -адренорецепторов происходит активация аденилатциклазы А и повышение концентрации цАМФ. Мобилизация клеточного магния также происходит при стимуляции α -адренорецепторов. Повышение содержания внутриклеточного магния, происходит под влиянием инсулина, ацетилхолина, вазопрессина, ангиотензина II. Все эти гормоны ингибируют протеинкиназу, что приводит к снижению концентрации цАМФ.

Биодоступность и гомеостаз магния регулируется с помощью специализированных белков transient receptor potential. Белок TRPM-6 – регулирует обмен магния на организменном, а TRPM-7 - на клеточном уровне (Rubin H., 2003). TRPM-6 экспрессируется преимущественно в почках, кишечнике, лёгких. Белок TRPM7 – диффузно во всех органах и тканях. TRPM-6 и TRPM-7 являются одновременно и каналом для магния, и киназой. Активаторами TRPM-6 являются ангиотензин II и брадикинин.

Белок TRPM-6, является ионным каналом, транспортирующим двухвалентные катионы. TRPM-6, взаимодействуя с TRPM-7 каналом, приводит к формированию активного комплекса на клеточной поверхности, который осуществляет поток ионов магния через мембрану. Мутации и полиморфизмы генов, кодирующих синтез TRPM-6 и TRPM-7, могут приводить к гипомagneзиемии и вторичной гипокальциемии. Возможный механизм

гипомагниемии, в условиях стресса, определяется влиянием катехоламинов, на функционирование TRPM-7. TRPM-6.

При снижении поступления магния в организм с пищей, интенсифицируется экспрессия гена TRPM-6 в почках, а это повышает реабсорбцию магния в восходящем колоне петли Генле. TRPM-7 оказывает регулирующее влияние на движение магния и кальция внутрь клетки, в зависимости от состояния ее активности.

Активность TRPM-7 определяется уровнем магния внутри клетки. При дефиците магния в клетке проницаемость TRPM-7 значительно возрастает, но преимущественно для ионов кальция. Известно, что TRPM-7 принимает участие в регуляции многих процессов, включая рост, клеточную адгезию, пролиферацию клеток и т.д. Кроме того, белки TRPM 6/7 ответственны за возникновение магниевых дефицита при стрессе. Под влиянием катехоламинов происходит цАМФ-зависимая интенсификация обменных процессов и магний высвобождается из комплексов с внутриклеточными лигандами, что приводит к увеличению уровня свободного магния в клетке повышается. В свою очередь, это приводит к снижению входа магния через ионные каналы. Под влиянием цАМФ и протеинкиназы А, чувствительность TRPM-7 к ионам магния возрастает, что в еще более препятствует входу магния в клетку и приводит к повышению уровня внеклеточного магния.

На фоне стресса наблюдается гипермагниемия. Это вызывает логичное снижение активности TRPM-6, затем снижает реабсорбцию магния и его всасывание в желудочно-кишечном тракте. При этом, хронический стресс ведет к постоянным потерям ионов магния почками с мочой, в сочетании со сниженной абсорбцией в ЖКТ. В свою очередь длительное снижение уровня магния в клетке приводит к бесконтрольному повышению активности TRPM-7. На фоне этого кальциевый ток превосходит магниевый и вызывает срыв механизмов компенсации (Schlingmann K.P, Gudermann T A., 2004; Трошин И.Ю., Громова О.А. 2008; Поветкина В. Н., Рогова Л. Н. 2011;)

Другой белок - транспортер магния - *paracellin* обнаружен в канальцах нефрона, в тех его участках, где происходит реабсорбция магния. В работе (Aassheim et al, 2003) идентифицирован SLC41A – магниевый транспортер, равномерно представленный в клетках, преимущественно в сердце и яичках. Этот белок имеет три изоформы A1, A2 и A3, которые помимо транспорта магния осуществляют транспортировку других двухвалентных ионов. Низкая внеклеточная концентрация магния приводит к усилению экспрессии гена, кодирующего SLC 41 A. Идентифицированы еще две разновидности генов, кодирующих переносчики магния: MagT1 и ACDP2. Первый особенно широко представлен в эпителиоцитах, его экспрессия так же регулируется внеклеточным содержанием магния. Клаудины – трансмембранные белки, обнаруженные в плотных соединениях клеток, обеспечивающие перемещение ионов поперек листа эпителиальных клеток.

Обмен магния и кальция регулируется геном CASR. Это Ca/Mg чувствительный – G-белок- связанный рецептор плазматической мембраны. Этот пептид экспрессируется в тканях паращитовидной железы, а так же в клетках канальцев почек. CASR работает по принципу сенсора, реагируя на колебания в концентрации кальция и магния. Экспрессия гена CASR уменьшает активность белковой киназы A, что приводит к уменьшению реабсорбции магния в почечных канальцах. Врожденные повреждения этого гена приводят к гиперкальциемии или гипокальциемии: семейной гипокальциурической гиперкальциемии, острому первичному гиперпаратиреозу новорожденных, аутосомно-доминантной гипокальциемической гиперкальциурии.

При этом ген CASR является и регулятором роста, дифференцировки и выживания остеобластов и остеокластов. Известно, что экспрессия этого рецептора в ткани хряща и кости, непосредственно регулирует кальциевый гомеостаз костей и метаболизм соединительной ткани.

Существует почти 300 генов белковых продуктов, в функционировании которых магний участвует как кофактор. В связи с этим биологические эффекты магния являются чрезвычайно разноплановыми. Таким образом, магний один из

ключевых факторов синтеза белка. Ионы Mg^{2+} необходимы для стабилизации некодирующих РНК. Большинство ферментов, которые вовлечены в репарацию ДНК зависят от иона магния. Дефицит магния приведет к увеличению числа дисфункций в структуре молекулы тРНК, таким образом, влияя на общую скорость биосинтеза протеинов. Магний выступает стабилизатором РНК, ДНК, рибосом, является регулятором клеточного путем поддержания необходимых концентрация пуриновых и пиримидиновых оснований.

Таким образом магний вовлечен в синтез белка на всех его этапах. Соответственно, магниевый дефицит неизбежно приводит к замедлению биосинтеза всех структурных молекул, таких как протеоглики, глюкозаминогликаны, коллагены и эластин. Известно, что синтез структурных молекул, является необходимым компонентом для ремоделирования и репарации поврежденной ткани, страдает восстановление ткани, а это, в свою очередь приводит к ухудшению механических свойств любой ткани.

Синтез глутатиона зависит от функционирования глутатионсинтетазы, которая в свою очередь является магний-зависимым ферментом. Глутатион играет важную роль в антиоксидантной защите. Магний вовлечен во все виды обмена веществ. Ион магния обеспечивает все реакции, связанные с переносом фосфатных групп на нуклеотидфосфаты и с нуклеотидфосфатов. Являясь специфическим кофактором или активатором киназ, таких как гексокиназа, кретинокиназа, АТФазы (Na^+ , K^+ , АТФаза), синтазы, магний является одним из регуляторов углеводного обмена.

Магний является ведущим звеном в процессах энергообмена (энергообразование и энергопотребление), участвует во всех АТФ-зависимых реакциях, регулирует активность некоторых дегидрогеназ. Внутриклеточное содержание магния обеспечивает биоэнергетику, митохондриальное дыхание.

Регуляция клеточной пролиферации сложный многокомпонентный процесс, включающий множество каскадов внутриклеточной сигнализации. Магний-зависимые белки, которые связаны с пролиферативными процессами, относятся к некоторым из этих молекулярных каскадов. Дефицит магния

приводит к менее интенсивной пролиферации. Часть магниевых-зависимых белков входят в состав сигнальных путей TGF- β .

TGF- β - трансформирующий фактор роста, который играет роль в пролиферации, регенерации тканей, клеточной дифференциации, эмбриональном развитии и регулировании иммунной системы. Воздействие TGF- β на клетки в культуре приводит к сверхпролиферации клеток и к их перерастанию (Rubin H., 2003; Дадак К., 2014).

По данным разных авторов дефицит магния встречается от 14 до 34 % в популяции. Дефицит магния диагностировать непросто в связи. Исследование магния сыворотки, не дает достоверной информации о содержании магния в внутри клетки. Но при обнаружении его концентрации ниже 0,8 ммоль/л в плазме крови обосновано поставить диагноз дефицита магния (И.С. Чекман и др., 1992; T. Fazekas et al., 1993).

Гипомагниемия может быть алиментарной, связанной со снижением всасывания Mg^{2+} в тонком кишечнике и с увеличением выделения через почки. Уменьшение уровня магния может быть компенсировано возрастанием реабсорбции в кишечнике, уменьшением его потерь с мочой. Также дефицит магния может быть генетически обусловлен и связан с внешними факторами. Врожденные дефекты утилизации магния сравнительно редки (1:50000). Есть работы, которые показывают взаимосвязь обострения этих заболеваний с декомпенсацией дефицита магния.

Клиническое значение дефицита магния как фактора патогенеза рассматривается при многих нозологиях. Проведенные исследования свидетельствуют о том, что уровень магния в сыворотке связан с патогенезом заболеваний, таких как артериальная гипертензия, сахарный диабет 2-го типа, метаболический синдром, а также с наличием ишемической болезни сердца бронхиальная астма.

Данные, полученные в ходе клинических исследований, аутопсий, свидетельствуют о том, что адекватное содержания уровня магния профилактирует сердечно-сосудистую патологию. Взаимосвязь уровня магния и

частоты внезапной сердечной смерти показало достоверно снижение этих рисков на фоне адекватно высоких уровней магния в сыворотке.

В отношении артериальной гипертензии и ишемической болезни сердца установлена связь с сывороточной концентрацией магния. Возможным механизмом участия магния в патогенезе гипертонической болезни является его участие в активации Na–K–АТФазы, и регуляция уровня внутриклеточного калия, таким образом дефицит магния может приводить к изменению внутриклеточного содержания натрия и кальция и как следствие повышению общего периферического сопротивления. Выявлено, что сниженное содержание магния в питьевой воде повышает риск развития сердечно–сосудистых заболеваний в том числе внезапной смерти. В ряде исследований была установлена связь с потреблением некоторых макроэлементов, в том числе магния, и артериальной гипертензией.

Дефицит магния имеет значение в патогенезе развития диабета, в связи с вовлеченностью магния в работу многих ферментов, участвующих в процессе гликолиза. Сахарный диабет первого и второго типов сопровождается снижением внутриклеточного магния и повышенной магниурией.

Роль магния, его дефицита и терапевтической эффективности, достаточно долго изучается в аспекте физиологии и патологии репродуктивной системы (Дадак К., 2014).

Распространенность дефицита магния среди женского населения выше в 1,3 раза. Среди патологий элементного статуса у женщин недостаточность магния занимает лидирующую позицию. Женщины более чувствительны к дефициту магния и в норме имеют более высокие депонированные концентрации данного элемента.

Снижение содержания магния одно из звеньев патогенеза преждевременных родов. У беременных с дефицитом магния достоверно повышен уровень спонтанных выкидышей (В.М. Сидельникова, 2001; Н.Г. Кошелева, 1999, 2006). Одним из критических состояний беременности, ассоциированным с дефицитом магния является эклампсия, при которой уровень магния может снижаться в

несколько раз. Эклампсия, по определению, это состояние, соответствующее пику гипомagneмии (Duley L., 1998). Многочисленные клинические исследования показали, что дефицит магния у беременных связан с такими состояниями, как тромботические осложнения, плацентарная недостаточность, дисплазия соединительной ткани, судороги мышц.

Накоплены данные о снижении уровня магния при предменструальном синдроме, климактерическом синдроме, приеме комбинированных оральных контрацептивов и заместительной гормональной терапии. В связи с тем, что уровень эстрогенов связан с уровнем магния в организме, в группу интереса по изучению магниевой недостаточности должны быть отнесены все женщины с гормонально зависимыми состояниями (Макацария А.Д. и др 2012).

У здоровых женщин накануне менструации количество магния внутри эритроцитов значительно увеличивается. У женщин, которые страдают ПМС, количество магния в эритроцитах снижается на 30% по сравнению с женщинами без этого нейроэндокринного синдрома.

Известно, что одним из ключевых факторов процессов ремоделирования и резорбции ткани, является функциональная активность матриксных металлопротеиназ. В связи с этим, влияние ионов магния на активность ММП, представляет отдельный интерес. При этом сами ионы Mg^{2+} не взаимодействуют с молекулами коллагена и с ТИМП белками. Есть экспериментальные исследования, которые показывают влияние ионов магния на активность ММП. В культуре клеток гладкой мускулатуры сосудов у экспериментальных животных, добавление магния уменьшало общую активность желатиназы А. Выше приведенные данные указывают, что дефицит Mg^{2+} повидимому приводит к повышению активности ММП, которые активно разрушают структурные компоненты ВКМ, особенно коллаген. Но с другой стороны, микрофибриллы и эластин – основные компоненты гибких волокон ВКМ, также вовлечены в деградацию в норме и патологии. Деградация волокон эластина наоборот значительно возрастает (в 2–3 раза) в присутствии Mg^{2+} . Дефицит

Mg^{2+} соответствует более низкой активности эластаз и большей концентрации гибких волокон (Rabaud M. et al., 1985, Pages N. et al., 2003).

Ионы кальция Ca^{2+} участвуют в передаче нервных сигналов, сократительной активности скелетной и гладкой мускулатуры, так же оказывает влияние на свертываемость крови, чувствительность сосудов к вазопрессорным веществам, регулирует проницаемость стенок кровеносных сосудов и мембран клеток, является важнейшим компонентом скелета. Ca^{2+} - это универсальный регулятор живой клетки (Левицкий, Д. О., 1990, Поветкина В.Н.2011).

В цитоплазме клетки концентрация ионов кальция чрезвычайно мала, а точнее в 4 раза меньше чем во внеклеточном пространстве. Поддержание этой разницы концентрации осуществляется посредством Са-АТФаз. Одним из механизмов нарушения работы этого энергозависимого процесса является повреждение «поршня» и «клапанов» Са-АТФазы, что приводит к беспрепятственному току Ca^{2+} в направлении меньшей концентрации, т.е. в клетку. Внутриклеточно ионы кальция, выполняя роль посланников, дают приказы включить ту, или иную функцию.

Ведущую роль в регуляции обмена и гомеостаза Ca^{2+} и Mg^{2+} , играют три основных гомона:

- 1) паратиреоидный гормон (ПТГ) синтезируется в околощитовидных (паратиреоидных) железах;
- 2) кальцитонин (КТ) вырабатывается парафолликулярными клетками, или С-клетками щитовидной железы;
- 3) D-гормон.

D-гормон – кальцитриол - образуется из экзогенного и/или эндогенного витамина D путем его последовательного гидроксилирования сначала в печени и после этого в почках. Основные органы мишени этих гомонов это: почки, костная ткань и кишечник. ПТГ - центральное звено эндокринной регуляции кальций -магниевого обмена. Ведущим звеном регуляции секреции ПТГ является уровень Ca^{2+} в крови. Снижение уровня кальция стимулирует, а повышение – подавляет секрецию ПТГ. Помимо этого, важное значение в регуляции

активности ПТГ имеет ион Mg^{2+} . Дефицит ионов магния уменьшает секрецию ПТГ и его биологические эффекты. Именно поэтому снижение уровня гипомagneзиемия сопровождается гипокальциемией.

В физиологических условиях концентрация кальция в крови очень постоянна. Ее среднесуточные колебания составляют не более $\pm 5\%$, в то же время как секреция кальцитонина и отличается большими колебаниями, с очень большой амплитудой. Кроме того, установлен тот факт, что основным механизмом усиления секреции кальцитонина является резкая гиперкальциемия, в то время как медленная и длительно существующая не усиливает секреции кальцитонина.

Известно, что СТГ, пролактин, гонадотропные, половые стероидные гормоны и кальцитонин стимулируют 1-альфа-гидроксилирование. В то время как ТТГ, Т3, Т4, повышенный уровень в крови Ca^{2+} , Mg^{2+} и собственно 1,25(OH) $2D_3$ - подавляют этот процесс. Особенно выражено действие половых стероидов на биологическую активность гормона Д. К примеру, присущие беременности и менопаузе изменения функции гипоталамо- гипофизарно-гонадной оси сопровождаются нарушениями кальций-фосфор- магниевых обмена, с тенденцией к остеомалации и остеопорозу (Авцин А.П. и др., 1991; Пигарова Е. А., 2011; Лукьянчиков В. С., 2012).

Достаточный уровень синтеза структурных компонентов матрикса, в том числе коллагена, является важнейшим показателем нормального обмена соединительной ткани. Исследования показали, что уровни кальция во внеклеточной среде регулируют синтез и секрецию коллагена клетками ВКМ. Недостаточное потребление кальция сказывается на состоянии биосинтеза коллагена в костной ткани. Известно, в частности, что так называемые блокаторы кальциевых каналов ингибируют синтез коллагена первого типа фибробластами.

Фибриллы коллагена являются структурной основой соединительной ткани многих органов. Коллаген I типа образует важнейший компонент коллагеновой сети, так называемый протяженные фибриллы. В экспериментальных работах

было показано, что активируемый ионами кальция рецептор активирует пролиферацию фибробластов и следовательно, синтез MMP -3 и MMP -9.

Выше указано, что ММП осуществляют протеолиз тройных спиралей коллагенов разных типов и принимают непосредственное участие в процессе заживления ран, репарации, ремоделировании ткани, развитии и минерализации кости образовании костных мозолей при заживлении переломов кости. В структурах ММП содержатся кальций-связывающие сайты, так что достаточные уровни кальция необходимы для деградации коллагена посредством ММП (Ahvazi B. et al., 2003).

Роль внеклеточного матрикса и матриксных металлопротеиназ при хроническом эндометрите изучалась в работах Sukhikh, G. et al., (2007), Yoshii N., et al (2013), Кузнецова А.В., (2004). В этих исследованиях показаны противоречивые данные об изменении количественных показателей различных ММП в плазме крови и ткани эндометрия у пациентов с ХЭ. Помимо этого, в работе Sukhikh, G. et al., (2007) была предпринята попытка восстановить сниженное количество желатиназы В при помощи магнитотерапии. В работе Yoshii N., et al (2013), напротив, показано увеличение частоты имплантации при снижении содержания ММП в плазме крови пациенток с ХЭ после терапии глюкокортикоидами. В целом, можно отметить достаточно малое количество работ, в которых основным предметом исследования являются изменения матрикса, активности ММП и особенности их регуляции, на фоне ХЭ.

Одновременно с этим, нарушение магний-кальциевого баланса и эффективность патогенетической терапии препаратами магния, доказаны при предменструальном синдроме, преждевременных родах, эклампсии, нарушениях стрессоустойчивости, эндометриозе, хроническом сальпингоофорите, ишемической болезни сердца и при патологии почек (Блинов Д.В., 2011; Громова О.А., 2013; Трисветова Е. Л., 2013). При этом, определенную роль в патогенезе каждой из перечисленных нозологий играют изменения матрикса и его компонентов. В частности, в работе Шестерниной Н.В. (2013), показано влияние

внутриклеточного магния на показатели активности желатиназы В при экспериментальной язве желудка.

Однако, до сих пор остается не до конца изученной роль желатиназы В и магний-кальциевого баланса в патогенезе хронического эндометрита, а также, возможность применения препаратов магния при данной нозологии с позиции регуляции активности этого матриксина.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы исследования

Работа включала клиническую и экспериментальную части. Как показано на рисунке 2.1, клиническая часть представляет собой ретроспективное исследование, в которое включено 45 образцов биопсийного материала – образцы эндометрия, полученного ранее в ходе плановых лечебно-диагностических манипуляций при лечении и обследовании по поводу бесплодия.



Рисунок 2.1 – Схема клинического этапа исследования

В результате анализа первичной медицинской документации, в исследование было включено 45 образцов биопсийного материала (эндометрий), полученного у женщин с бесплодием, в ходе гистероскопии или пайпель-биопсии эндометрия, выполненных на 5-9 день менструального цикла (Гайдуков С.Н., 2004; Савельева Г.М., 2013). Отбор материала осуществлен таким образом, что сформировалось 4 группы образцов. В первой группе (n=10) образцы эндометрия без гистологических признаков ХЭ, полученные у женщин с бесплодием без другой органической патологии матки. Вторая группа (n=20) образцы эндометрия, полученные у женщин с впервые выявленным хроническим эндометритом, как возможной причиной повторяющихся неудач имплантации при лечении бесплодия методами ВРТ. В третью группу (n=10) включены образцы эндометрия

с гистологическими признаками ХЭ, полученные у женщин с хроническим эндометритом и повторяющимися неудачами имплантации, после ранее проведенной терапии в соответствии с приказом N 572н "Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи по профилю "акушерство и гинекология». В четвертую группу (n=5) - вошли образцы тканей эндометрия, полученные у женщин с хроническим эндометритом и повторяющимися неудачами имплантации, которым помимо стандартных назначений выполнялся электрофорез с 10% сульфатом магния на проекцию матки по стандартной методике. Продолжительность курса 7-8 процедур (Стругацкий В.М., 2005).

Биопсийный материал, включенный во вторую, третью и четвертую группы соответствовал следующим критериям:

1. Гистероскопическая картина и результаты гистологического исследования свидетельствовали в пользу наличия у пациента хронического эндометрита.
2. Возраст женщины на момент переноса бластоцист до 40 лет, включительно.
3. В анамнезе пациентки присутствовали факторы риска развития хронического эндометрита (аборты, внутриматочные вмешательства, оперативные вмешательства по поводу tuboовариальных образований в анамнезе, раннее начало половой жизни).
4. В анамнезе две и более неудачи имплантации при переносах бластоцист хорошего-отличного качества по классификации Д.Гарднера, при условии подготовки эндометрия к криопереносу в соответствии с существующими рекомендациями Российской ассоциации репродукции человека (РАРЧ).
5. Исключена сопутствующая гинекологическая и экстрагенитальная патология, которая могла бы быть причиной неудач имплантации (клинически значимая миома матки, наружный генитальный эндометриоз выраженной и тяжелой степени, ВИЧ, носительство гепатитов В и С и другая патология при которой снижается эффективность лечение бесплодия методами ВРТ).

По данным первичной медицинской документации, нами были отобраны образцы, пригодные для проведения иммуногистохимического исследования эндометрия. Образцы тканей фиксированы в нейтральном забуференном

формалине и после обезвоживания в серии спиртов возрастающей концентрации заливали парафином по общепринятой методике, с последующей окраской гематоксилин-эозином.

У всех 45 женщин, чьи образцы были включены в исследование, проводилось обследование, направленное на выявление этиологического фактора хронического эндометрита: бактериологическое исследование отделяемого влагалища из заднего свода, микроскопия мазка из средней трети влагалища, обследование на инфекции, передаваемые половым путем, методом ПЦР, исследование на носительство вируса папилломы человека 16 и 18 типов, ЦМВ, герпеса 1 и 2 типов. Обследование пациента соответствовало положениям Хельсинской декларации GСC Международной конференции по гармонизации (Good clinical practice) и включало в себя сбор анамнеза, анализ симптомов, жалоб пациента (в соответствии с приказом N 572н "Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи по профилю "акушерство и гинекология»).

Для изучения морфологической картины эндометрия проведена полуколичественная оценка клеточного инфильтрата эндометрия (Казачкова Э.А., 1985; О.А. Алимова и др., 2011), для изучения роли желатиназы В проведено исследование удельного числа клеток и интенсивности экспрессии желатиназы В иммуногистохимическим исследованием тканей эндометрия.

Полученные результаты клинического этапа исследования, показали значимую роль желатиназы В в механизмах развития, поддержания и хронизации воспаления эндометрия. Для подтверждения универсальности этого механизма и участия желатиназы В в хронизации воспаления эндометрия, а также выявлении механизмов регулирующих ее активность с целью разработки способа патогенетической коррекции выявленных нарушений, был проведен экспериментальный этап исследования.

На данном этапе проводили моделирование экспериментального хронического воспаления эндометрия (эХВЭ) и проводили исследования в соответствии с запланированным объемом и дизайном. Для моделирования эХВЭ

использовалась взвесь аутокала 1:10, вводимая в маточный рог в объеме 0,1 мл (Пат. №2580986, авт. Тихаева К.Ю., 2016)

Как показано на рисунке 2.2, экспериментальная часть выполнена на 60 самках крыс линии Вистар массой $198 \pm 3,8$ г. Экспериментальные животные содержались в стандартных условиях, с соблюдением требований Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964 г), этических принципов Европейского научного фонда (ESF), Приказом МЗ СССР №755 от 12.08.77 «О мерах по дальнейшему совершенствованию форм работы с использованием экспериментальных животных», правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (Шалимов, 1990г., Березовская, 1993г., Зуффин, 1993г.); Федерального закона от 24.04.1995 г. № 52-ФЗ «О животном мире», стандартов GLP – правила лабораторной практики (Приказ министерства здравоохранения Российской Федерации от 19.06.2003 г. №266). Проведение экспериментального этапа было согласовано с региональным комитетом по биоэтике.



Рисунок 2.2 – Схема экспериментальной части исследования

Животные всех экспериментальных групп получали полноценное сбалансированное питание. Крысы перед экспериментом были разбиты на четыре группы. Перед началом эксперимента крыс взвешивали, наркотизировали препаратом Рометар в сочетании с местной анестезией раствором лидокаина, в

соответствии с весом животного. В первой группе (n=10) определяли изучаемые параметры в исходном состоянии, вторая - контрольная серия (n=10, в третьей (n=20) моделировали хроническое воспаление эндометрия, в четвертой группе (n=20) моделировали хроническое воспаление эндометрия с применением магнийсодержащей композиции в течение 10 суток.

На 51 сутки животных 2, 3 и 4 групп выводили из эксперимента, путем введения летальной дозы рометара. Предварительно получив кровь из подключичной (ПКВ) и нижней полой (НПВ) вен, осуществляли забор ткани для гистологического и иммуногистохимического исследования. С целью оценки роли магний-кальциевого баланса в патогенезе хронического воспаления эндометрия в полученных образцах крови исследовали содержание магния в эритроцитарной массе крови из НПВ и ПКВ и содержание кальция в плазме крови из ПКВ. С целью оценки интенсивности перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты нами изучалось содержание малонового диальдегида, диеновых конъюгатов и активность каталазы в крови из НПВ у экспериментальных животных. Для оценки выраженности хронического воспаления эндометрия проводили полуколичественную оценку клеточного инфильтрата тканей эндометрия в указанных группах (Алимова О.А. и др., 2011). Иммуногистохимическое исследование, позволило оценить активность желатиназы В путем определения удельного числа экспрессирующих желатиназу В, а так же интенсивность их экспрессии в строме и железистом эпителии тканей эндометрия на фоне экспериментального хронического воспаления эндометрия.

2.2. Методы исследования

2.2.1 Метод моделирования хронического воспаления эндометрия у крыс

У крыс, под общей анестезией Рометаром (2-3мг/кг), проводили нижнесрединную лапаротомию в асептических условиях. Матку выводили в рану и тщательно обкладывали стерильными салфетками. Стенку яйцевода прокалывали тонкой инъекционной иглой и с помощью инсулинового шприца вводили каловую взвесь в полость матки. Брюшную полость ушивали наглухо

послойно. С 3 суток после операции проводили антибактериальную терапию препаратом широкого спектра действия - Цефтриаксон в соответствии с весом животного в течение 7 дней. Данная методика приводит к формированию гистологической картины хронизации воспаления эндометрия начиная с 41 суток после моделирования (Тихаева К.Ю., 2016)/

2.2.2 Морфологические методы оценки тканей эндометрия

Для морфологического исследования получали ткани эндометрия. Полученный препарат фиксировали в нейтральном забуференном формалине и после обезвоживания в серии спиртов возрастающей концентрации заливали парафином по общепринятой методике, с последующей окраской гематоксилин-эозином.

Для оценки картины тканей эндометрия проводили патогистологическое исследование и применяли полуколичественный метод оценки степени выраженности нейтрофильной, макрофагальной, лимфоцитарной, плазматитарной инфильтрации стромы эндометрия в биопсийном материале, разработанный (Алимова О.А. и др., 2011) для чего при 400-кратном увеличении оценивали в процентах (%) удельное число макрофагов, нейтрофилов, лимфоцитов, плазматических клеток и эозинофилов в 5-ти случайно выбранных полях зрения (≥ 500 клеток). Отсутствие клеток в полях зрения оценивалось в 0 баллов, единичные клетки в полях зрения оценивались в 1 балл, рассеянное расположение по 3-4 клетки в полях зрения оценивались в 2 балла, образование скоплений оценивалось в 3 балла.

2.2.3 Метод определения желатиназы В в тканях эндометрия

Исследование экспрессии ММП-9, было проведено иммуногистохимическим методом по стандартной методике с использованием антител фирмы «Новокастра» ММП-9 (NCL-MMP-9, для парафиновых блоков, рабочее разведение 1:40).

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

Иммунореактивные клетки обозначались как ММП-9-позитивные. Оценку экспрессии желатиназы В проводили полуколичественным методом с учетом интенсивности окрашивания и количества желатиназа В-позитивных клеток в железистом эпителии и клеточном компоненте стромы. В препаратах при 400-кратном увеличении оценивали удельное число (в %) положительно окрашенных клеток в 5-ти случайно выбранных полях зрения (≥ 500 клеток). Реакция окрашивания оценивалась как негативная – 0 балла, слабая – 1 балл, средняя (умеренная) – 2 балла и выраженная – 3 балла.

2.2.4 Метод определения диеновых конъюгатов в сыворотке крови

Принцип метода основан на установлении содержания первичных продуктов ПОЛ по поглощению липидным экстрактом монохроматического светового потока в ультрафиолетовой области спектра (233нм).

0,1 мл сыворотки крови добавляли в смесь гептан и изопропанол (1:1= 5 мл гептана: 5 мл изопропанола) и встряхивали 1 мин. Пробу центрифугировали в

течение 10 мин при 1500 об/мин на клинической центрифуге (типа ОПН-3). Осадок отбрасывали, а к экстракту добавляли 1,5 мл дистиллированной воды для разделения фаз. Гептановую фазу аккуратно отбирали и использовали для последующего анализа.

В целях удаления из нижней водноспиртовой фазы воды и водорастворимых соединений к ней добавляли 1,5 г NaCl и интенсивно встряхивали. После разделения изопропилового спирта и воды отбирали верхнюю спиртовую фазу и спектрометрировали напротив аналогичной фазы из контрольной пробы, не содержащей биологический материал.

Расчет содержания первичных продуктов перекисного окисления липидов производили в относительных единицах (ед А/м) по формуле:

$$A_{233} \text{ на 1 мл плазмы} = A_{233} \times VЭ:V_{пл} = (A_{233} \times 4):0,2 = A_{233} \times 206.$$

A_{233} — значение оптической плотности опытной пробы при λ – 233 нм

$VЭ = 4$ мл — конечный объем гептанового экстракта (в мл)

$U_{пл} = 0,2$ мл — объем взятой плазмы крови. (Стальная И.Д., 1997).

2.2.5 Метод определения малонового диальдегида в плазме крови

Принцип метода основан на образовании окрашенного комплекса при взаимодействии МДА с тиобарбитуровой кислотой.

К 0,3 мл свежей плазмы (без ЭДТА) добавляли 3 мл 1% ортофосфорной кислоты (удельный вес 1,004г/мл), 1 мл 0,6% ТБК (хранение в темной банке) и 0,1 мл $FeSO_4 \times 7H_2O$ в 10 мкМоль в пробе). Пробу помещали в кипящую баню на 1 час, после чего добавляли по 4мл бутанола и аккуратно перемешивали. Пробирки с пробами центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин. Верхнюю фазу измеряли при волне флюоресценции 535 нм против бутанола.

Результат рассчитывали по формуле:

$$A = (E_{оп} \times 10000 \times 4_{мл}): (1,56 \times 100000 \times 0,3_{мл}) = E_{оп} \times 85,47 \text{ (мкмоль/л)}.$$

(Стальная И.Д., 1997).

2.2.6 Метод определения активности каталазы в гемолизате эритроцитов

Принцип метода основан на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс.

Реактивы: 4% раствор молибдата аммония и 0,03% раствор перекиси водорода.

Реакция запускается добавлением 0,1 мл гемолизата эритроцитов (100мкл на 1 мл трис-HCl- буфера, 0,05M, pH 7,8) к 2 мл 0,03% раствора перекиси водорода. В холостую пробу вместо гемолизата эритроцитов вносили 0,1 мл дистиллированной воды. Реакцию останавливали через 10 мин добавлением 1 мл 4% молибдата аммония. Интенсивность развившейся окраски измеряли на спектрофотометре при длине волны 410 нм против контрольной пробы, в которую вместо перекиси водорода вносили 2 мл воды.

Активность каталазы рассчитывали по формуле:

Активность каталазы рассчитывали по формуле:

$$E = (A_{\text{хол}} - A_{\text{оп}}) \times V \times t \times K \text{ (мкат/л)},$$

где E – активность каталазы (в мкат/л), $A_{\text{хол}}$ и $A_{\text{оп}}$ – экстинкция холостой и опытной проб, V- объём вносимой пробы 0,1 мл, t – время инкубации 600с, K – коэффициент миллимолярной экстинкции перекиси водорода, равный 22,2 1000 мМ/10 см/10 (Королук М.А., Иванова Л.И., 1988). По литературным данным максимальная концентрация каталазы обнаружена в эритроцитах. В связи с этим уровень каталазы в плазме крови нами не определялся (Чеснокова Н.П., 2006).

2.2.7 Метод определения содержания магния в биологических средах

Эритроцит является универсальной моделью клетки. Концентрацию магния в эритроците измеряли на спектрофотометре мраки СФ -46 с титановым желтым. Принцип метода основывается на способности магния в щелочной среде образовывать комплекс красного цвета с титановым желтым. Окраска стабилизируется гидроксиламином. Пробы фотометрировали на спектрофотометре на кювете с длиной оптического пути 1 см при длине волны 500-560 нм. Расчет: $y = a \cdot x$; где y – концентрация Mg^{2+} в образце; x – оптическая

плотность; $a=14,286$. Референтные величины: 1,4-2,14 ммоль/л (Камышников В.С., 2000; Борзенко, 2006)

Для определения концентрации магния плазмы крови использовали набор фирмы «Lachema» (Чехия). Смесь перемешивали, инкубировали 10 минут при температуре 18 – 25°C. Измеряли оптическую плотность опытной и калибровочной проб против контрольной пробы в кюветах с толщиной поглощающего слоя 1 см при длине волны 520 – 540 нм. Рассчитывали значение концентрации магния в образце.

Магний дает с магоном (ксилидиновый синий II) яркое окрашивание, белки сыворотки не препятствуют его развитию. В кислой среде это вещество существует в виде окрашенного в красный цвет недиссоциированного соединения, в слабощелочной – в виде однозарядного иона синего цвета, а в сильнощелочной – в виде двухзарядного иона красного цвета. С ионом магния образуют устойчивый окрашенный в красный цвет комплекс два однозарядных иона. В связи с тем, что на интенсивность окраски влияет присутствие других катионов, использовали комплексный калибровочный раствор (Камышников В.С., 2004).

2.2.8 Метод определения кальция в плазме крови

Для определения концентрации кальция в плазмы крови использовали набор фирмы «Ольвекс диагностикум» (Россия). Принцип метода основан на том, что кальций в щелочной среде образует окрашенный комплекс с о-крезолфталеин комплексом. Интенсивность окраски пропорциональна концентрации кальция в пробе. Реакционную смесь перемешивали, затем инкубировали 5 минут при комнатной температуре. Измеряли оптическую плотность опытной и калибровочной проб против контрольной пробы в кюветах с толщиной поглощающего слоя 1 см при длине волны 570 (540 – 590) нм. Окраска стабильна не более 30 минут. Рассчитывали значение концентрации кальция в образце по формуле:

$C = (E_{\text{пробы}}/E_{\text{калибр.}}) \times 2,5$ ммоль/л, где

$E_{\text{пробы}}$ – оптическая плотность опытной пробы;

$E_{\text{калибр.}}$ – оптическая плотность калибровочной пробы;

2,5 ммоль/л – концентрация кальция в калибраторе.

2.2.9 Метод коррекции магниевого баланса у крыс

С терапевтической целью, экспериментальным животным, назначалась магнийсодержащая композиция в виде ректальных суппозиторий, содержащих препарат Бишофит представляющий собой полиминерал, содержащий шестиводный хлорид магния. По данным авторов хлорид магния обладает более выраженными фармакологическими эффектами и меньшей токсичностью в сравнении с сульфатом магния (Рогов В.А., 2007). У крыс на фоне сформировавшегося хронического воспаления эндометрия с 41 суток применяли ректально свечи, содержащие полиминерал Бишофит в количестве равном 6,25 мг в течение 10 дней и затем выводили животных из эксперимента.

2.3 Методы статистической обработки данных

При нормальном распределении использовали методы параметрической статистики. Для статистической обработки применяли критерий Стьюдента, среднее выражали как $M \pm m$ и корреляционный анализ Пирсона. При распределении отличном от нормального, а также при малой выборке использовали критерий Манна-Уитни, средние величины отражали как Me [25 и 75 перцентиль] и корреляцию по Спирмену. Проверка рядов на нормальность проводилась методами Колмогорова-Смирнова, Шапиро-Уилки. Нулевые гипотезы отвергались при достигнутом уровне значимости $P < 0,05$ и $Q < 0,05$ соответственно (Лапач С.Н. с соавт., 2002 год).

ГЛАВА 3

КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫЕ, МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ЖЕНЩИН С НЕОДНОКРАТНЫМИ НЕУДАЧАМИ ИМПЛАНТАЦИИ ПРИ ЛЕЧЕНИИ БЕСПЛОДИЯ МЕТОДАМИ ВРТ И ХРОНИЧЕСКИМ ЭНДОМЕТРИТОМ

3.1 Клинико-лабораторная характеристика пациентов с хроническим эндометритом

В ходе отбора образцов эндометрия для последующего морфологического и иммуногистохимического исследования, нами был проведен анализ первичной медицинской документации пациенток с диагнозом ХЭ, для проведения общей клинико-лабораторной оценки указанной группы пациентов.

По данным первичной медицинской документации (рисунок 3.1), среди пациенток с хроническим эндометритом, чьи образцы были включены в исследование в структуре бесплодия ведущим фактором бесплодия был трубный фактор- 40% (18 женщин), наружный генитальный эндометриоз -16% (7 женщин), нарушение овуляции - 16% (7 женщин), необъяснимое бесплодие - 9% (4 женщины), мужской фактор - 9% (4 женщины), бесплодие смешанного генеза 10% (5 женщин). У большинства женщин с хроническим эндометритом в анамнезе было внутриматочное вмешательство: прерывание беременности в малом сроке по собственному желанию, в связи с самопроизвольным выкидышем или при неразвивающейся беременности, потребовавшими инструментального контроля полости матки, в связи с патологией эндометрия в анамнезе.

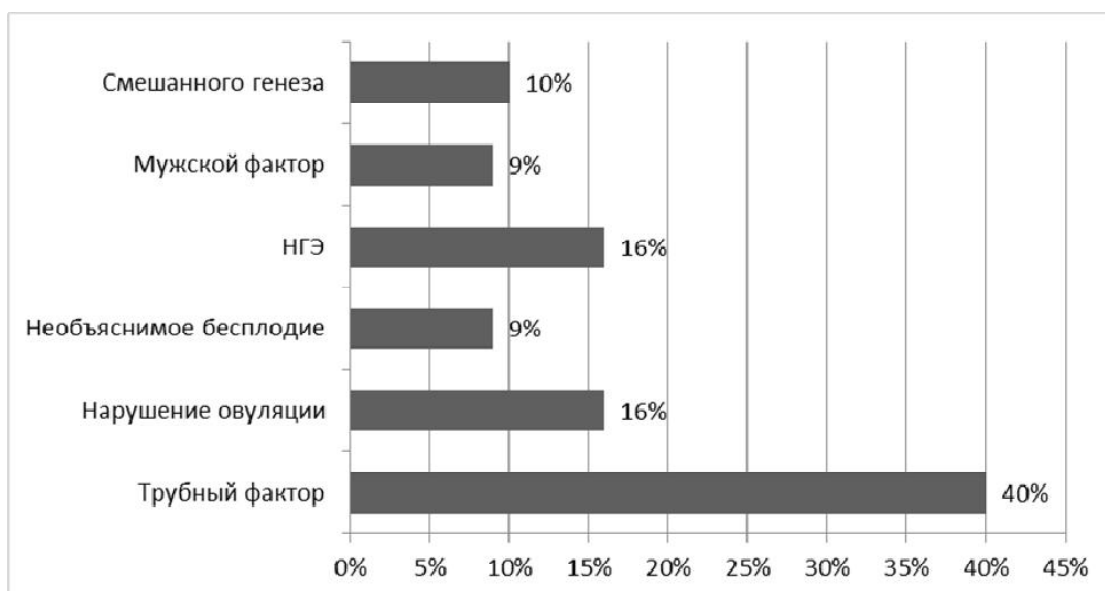


Рисунок 3.1 – Структура причин бесплодия среди женщин с хроническим эндометритом и повторяющимися неудачами имплантации

При проведении обследования в 70% (30 женщин) случаев бактериологическое исследование, а также исследование методом ПЦР не выявило специфического возбудителя. В 30 % (15 женщин) случаев в качестве этиологического фактора выявлен специфический моновозбудитель или их комбинация. На первом месте среди выявленных микроорганизмов *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum*, *Candida albicans*, *Cryptococcus glabratus*, *Escherichia coli*, *Gardnerella vaginalis*, герпес 1 и 2 типов, цитомегаловирус, вирус папилломы человека 16, 18, 31, 56 типов. Отсутствие по нашим данным таких патогенов возбудителей, как *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhea* вполне объяснимо тем фактом, что пациенты с бесплодием в ходе неоднократного и длительного обследования и лечения получали ранее антибактериальную терапию. Поэтому специфических классических патогенов мы не верифицировали. В отношении выявленных инфекционных факторов была проведена антибактериальная и/или противовирусная терапия в соответствии с чувствительностью выявленных патогенов к антибактериальным препаратам

3.2 Морфологические показатели в тканях эндометрия у женщин с хроническим эндометритом и повторяющимися неудачами имплантации

В группе образцов эндометрия без признаков хронического эндометрита были обнаружены железы, имеющие вид прямых или слегка извитых трубочек, на срезе с узким просветом округлой или слегка овальной формы. Железы выстланы многорядным эпителием с крупными ядрами, в некоторых образцах эпителий имеет однорядную структуру, определялись единичные макрофаги, лимфоциты, эозинофилы. В группе образцов с хроническим эндометритом до и после стандартной терапии определялись дистрофические явления разной степени выраженности в строме, эпителиоцитах и glanduloцитах желез. Регистрировалась полиморфно-клеточная воспалительная инфильтрация, преимущественно лимфо-плазмоцитарная, умеренного характера. Во всех образцах второй и третьей группы присутствует фиброзирование стромы в виде очагов или разрозненных фибробластов.

Таблица 3.1 – Показатели клеточного инфильтрата в образцах эндометрия у женщин с хроническим эндометритом и повторяющимися неудачами имплантации (в баллах) (Me [25 и 75 перцентили]).

Группа/ показатель	Нейтрофил	Макрофаг	Лимфоцит	Плазмоцит	Эозинофил
Группа 1 (образцы без ХЭ)	1[1;2]	1[1;2]	1[1;1]	1[0;1]	1[1;1]
Группа 2 (ХЭ)	1 [0,5;1]	1[1;2]	3[2;3]	3[2;3]	1[1;0]
Q	>0,1	>0,1	<0,001	<0,001	>0,1
Группа 3 (ст. терапия)	1 [0;1]	1 [1;2]	2,5[2;3]	2[2;3]	1 [1;2]
Q ¹	>0,1	>0,1	>0,1	>0,1	>0,1

Примечание: Q - достоверность различий между группой в исходном состоянии и с ХЭ; Q¹- достоверность различий между группой с ХЭ до лечения и после стандартной терапии ХЭ.

Как показано в таблице 3.1 в первой группе в образцах эндометрия клеточный состав представлен единичными нейтрофилами 1[1;2] баллов, макрофагами 1[1;2] балла, лимфоцитами 1[1;1] балла, плазмócитами 1[0;1] балла

и эозинофилами 1[1;2] балла, расположенными отдельно друг от друга без образования скоплений. Определялись сосуды обычного строения без признаков склероза (рисунок 3.1).

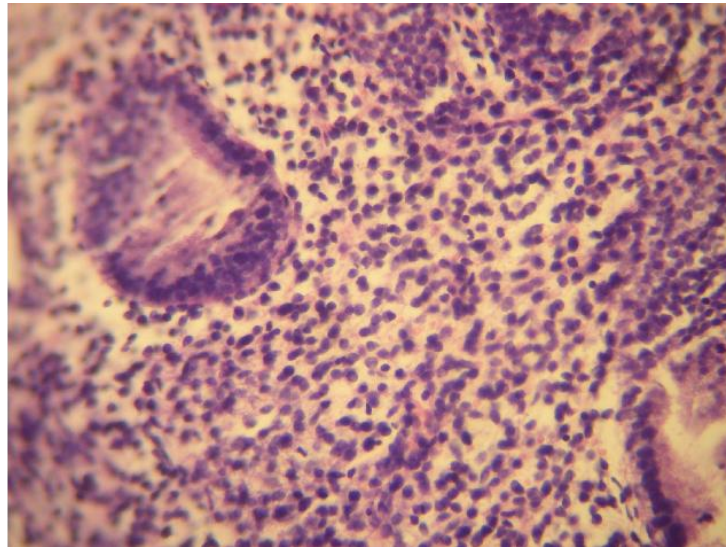


Рисунок 3.1 – Фрагмент эндометрия женщины без ХЭ. Окрашивание гематоксилин-эозином. Увел. $\times 400$.

Клеточный состав образцов второй группы представлен нейтрофилами 1[1;2] балла, макрофагами 1[0;1] балла, лимфоцитами 3[2;3] балла, плазмócитами 3[2;3] балла и эозинофилами 1[1;0] балла. Помимо этого, в клетках стромы эндометрия выявлена фибробластическая трансформация. В большинстве образцов фибробласты формировали крупные поля, расположенные вокруг желез и/или сосудов. Иногда обнаруживались разрозненные фибробласты (рисунок 3.2).

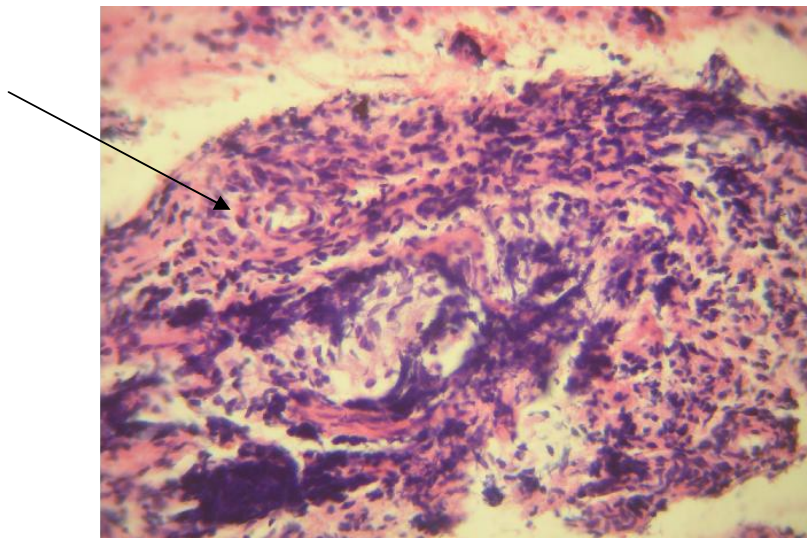


Рисунок 3.2 – Фрагмент эндометрия женщины с ХЭ до лечения. Окрашивание гематоксилин-эозином. Увел. $\times 400$.

В третьей группе, клеточный состав представлен нейтрофилами 1[0;1], макрофагами 1[1;2] балла, лимфоцитами 2,5[2;3] балла, плазмócитами 2[2;3] балла и эозинофилами 1 [1;2] баллов. Так же определялись дистрофические явления разной степени выраженности в строме, эпителиоцитах и glanduloцитах желез (рисунок 3.3). Статистически достоверной разницы в указанных показателях клеточного инфильтрата между второй и третьей группами обнаружено не было ($p>0,1$). Исходя из этих данных, можно сделать вывод о низкой эффективности стандартной антибактериальной терапии на показатели клеточной инфильтрации эндометрия.

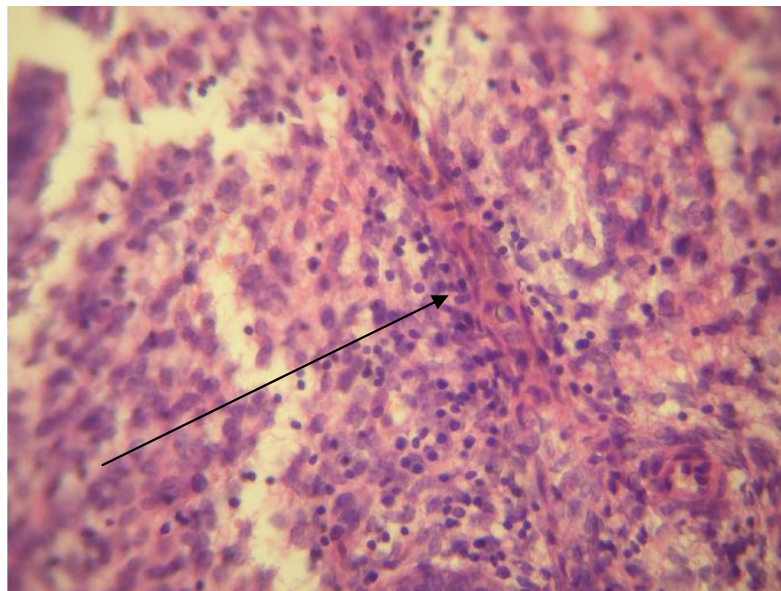


Рисунок 3.3 – Фрагмент эндометрия женщины с ХЭ после лечения.

Инфильтрация лимфоцитами стромы эндометрия
Окрашивание гематоксилин-эозином. Увел. $\times 400$.

Учитывая данные о значимости ремоделирования матрикса и роли матриксных металлопротеиназ в физиологии и патологии репродуктивной системы, нами проведено иммуногистохимическое исследование удельного числа и интенсивности экспрессии желатиназа В позитивных клеток в образцах эндометрия.

3.3 Желатиназа В в тканях эндометрия у женщин с хроническим эндометритом и повторяющимися неудачами имплантации

Как показано в таблице 3.2, удельное число желатиназа-В позитивных клеток в группе образцов эндометрия с ХЭ достоверно ниже в сравнении с группой без ХЭ: 10[7;13] % и 28[22,5;43] % соответственно, $Q < 0,01$. Также, достоверно отличается интенсивность экспрессии желатиназы В, в первой и второй группах 0[0;1] и 2[1;3] баллов соответственно, $Q < 0,05$. При этом, не отмечалось статистически достоверной разницы в указанных показателях активности желатиназы В в железистом эпителии в обеих группах (рисунок 3.4, 3.5).

Таблица 3.2 – Удельное число, интенсивность экспрессии желатиназа В-позитивных клеток в строме и в железистом эпителии эндометрия у женщин с хроническим эндометритом и повторяющимися неудачами имплантации (в баллах) (Ме [25 и 75 перцентили])

Группа/ показатель	Стромально-клеточный компонент		Железистый эпителий эндометрия	
	Удельное число (в %)	Интенсивность экспрессии (в баллах)	Удельное число (в %)	Интенсивность экспрессии (в баллах)
Группа 1 (образцы без ХЭ)	28[22,5;43]	2[1;3]	15[13;26]	1[0;1]
Группа 2 (ХЭ)	10[7;13]	0[0;1]	12[8;21]	0[0;1]
Q	<0,01	<0,05	>0,1	>0,1
Группа 3 (стандартная терапия)	12[10;12,5]	1[0;1]	9[12;15,5]	1[0;1]
Q ¹	>0,1	>0,1	>0,1	>0,1

Примечание: Q - достоверность различий между показателями 1 и 2 групп, Q¹ - достоверность различий между показателями 2 и 3 групп

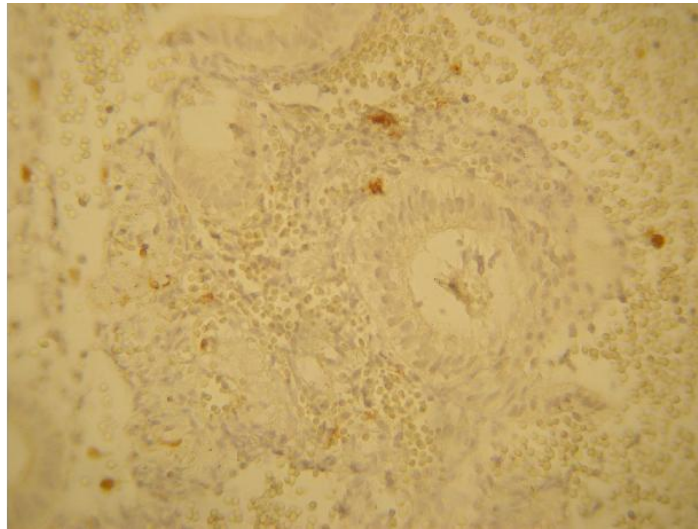


Рисунок 3.4 – Фрагмент эндометрия женщины без ХЭ. Окрашивание с использованием моноклональных антител к ММП-9, подкрашивание гематоксилин-эозином. Увел. $\times 100$.

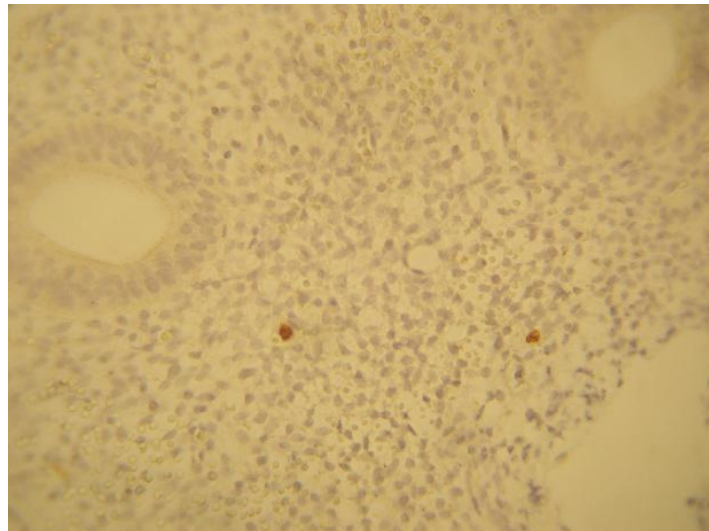


Рисунок 3.5 – Фрагмент эндометрия женщины с ХЭ. Окрашивание с использованием моноклональных антител к ММП-9, подкрашивание гематоксилин-эозином. Увел. $\times 100$.

Помимо этого, корреляционный анализ показал умеренную отрицательную связь, между показателем плазмоцитарной инфильтрации и удельным числом желатиназа-В позитивных клеток в стромально-клеточном компоненте тканей эндометрия у женщин с ХЭ ($r = 0,68$).

В третьей группе (рисунок 3.6), материал получен у женщин после проведения стандартной терапии по данным первичной медицинской документации.

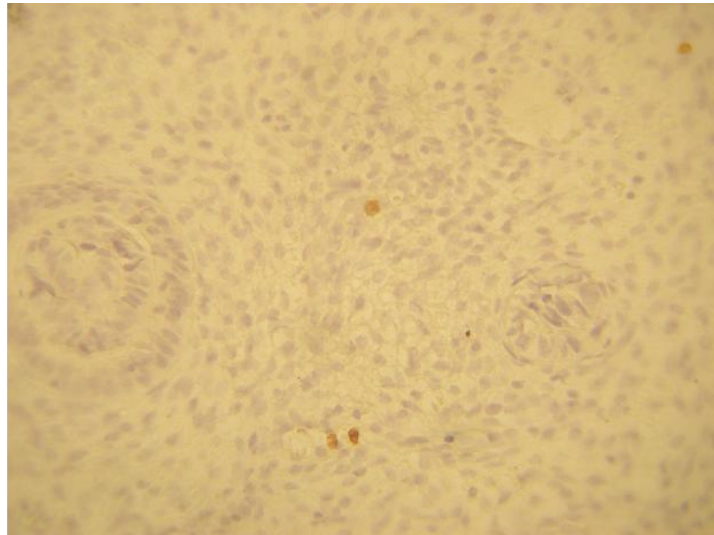


Рисунок 3.6 – Фрагмент эндометрия женщины с ХЭ после стандартной терапии. Окрашивание с использованием моноклональных антител к ММП-9, подкрашивание гематоксилин-эозином. Увел. $\times 100$.

Как следует из данных, приведенных в таблице 3.2 в группе после стандартной терапии не обнаружено статистически значимой разницы в показателях активности желатиназы В. В стромальном компоненте удельное число клеток составило 12[10;12,5] %, интенсивность экспрессии 1[0;1] баллов ($Q > 0,1$); в железистом эпителии удельное число 7[12;15,5] %, интенсивность экспрессии 1[0;1] баллов, ($Q > 0,1$).

Таким образом, иммуногистохимические показатели активности желатиназы В так же не восстановились до исходного уровня на фоне стандартной терапии хронического эндометрита.

Полученные результаты создают предпосылки для поиска возможных механизмов вовлечения желатиназы В в патогенез хронического эндометрита, а также определения активаторов и ингибиторов этой протеиназы в норме и патологии, что позволит разработать более эффективный патогенетический подход в терапии ХЭ с последующим улучшением репродуктивного прогноза у пациенток с данной нозологией.

ГЛАВА 4

БАЛАНС ПОВРЕЖДАЮЩИХ И ЗАЩИТНО-ПРИСПОСОБИТЕЛЬНЫХ МЕХАНИЗМОВ, ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ХРОНИЧЕСКОМ ВОСПАЛЕНИИ ЭНДОМЕТРИЯ У КРЫС

Известно, что воспалительный процесс, аутохтонный, т.е. на каждой стадии развития выделяются биологически активные вещества, предопределяющие дальнейшее развитие процесса и переход к новой стадии патологического процесса. В этой связи баланс между повреждающими и защитными механизмами играет существенную роль в регуляции воспаления.

4.1 Морфологические признаки экспериментального хронического воспаления эндометрия у крыс

Для оценки морфологической картины эндометрия при его экспериментальном хроническом воспалении нами проведена полуколичественная оценка клеточного инфильтрата тканей эндометрия.

При морфологическом исследовании тканей эндометрия у крыс первой группы, отражающие морфологические и гистологические параметры в исходном состоянии, наблюдались единичные нейтрофилы, лимфоциты, округлые железы нормального строения, артерии без особенностей. Во второй, контрольной, группе, на сроке наблюдения морфологическая картина была практически идентична показателям в исходном состоянии.

Как видно из таблицы 4.1, статистически достоверных различий в показателях клеточной инфильтрации эндометрия между первой и второй группами, не выявлено: число нейтрофилов, макрофагов, лимфоцитов, плазмочитов и эозинофилов в исходном состоянии в баллах: 1[0;1]1; 1[0;1]; 1[1;1]; 1[0;1]; 0[0;1]; 1[1;2] баллов, в контроле: 1[1;2], ($Q > 0,1$); 1[0;1], ($Q > 0,1$); 1[0,25;1], ($Q > 0,1$); 0[0;1], ($Q > 0,1$); 1[1;0], ($Q > 0,1$), соответственно.

Таблица 4.1 – Показатели клеточного инфильтрата в эндометрии у крыс с экспериментальным хроническим воспалением эндометрия (в баллах) (Ме [25 и 75 перцентили])

Группа/ показатель	Нейтрофил	Макрофаг	Лимфоцит	Плазмоцит	Эозинофил
Группа 1	1[0;1]	1[0;1]	1[1;1]	0[0;1]	1[1;2]
Группа 2 (контроль)	1 [1;2]	1[0;1]	1[0,5;1]	0[0;1]	1[1;0]
Q	>0,1	>0,1	>0,1	>0,1	>0,1
Группа 3 (эХВЭ)	1 [0;1]	1,5[1,5;2]	2,5[1,5;3]	2[1;3]	1,5[1,5;2]
Q ¹	>0,1	<0,05	<0,01	<0,001	<0,01

Примечание: Q – достоверность различий между исходным состоянием и контролем; Q¹ – достоверность различий между группой с экспериментальным хроническим воспалением эндометрия и контролем

В третьей группе в гистологическом материале обнаружены: воспалительные инфильтраты из лимфоидных элементов, расположенных вокруг желез и кровеносных сосудов, а также диффузно. Обнаружены плазматические клетки, единичные макрофаги. Помимо этого слабовыраженный фиброз стромы, незначительный склероз стенок артерий эндометрия.

Показатели клеточной инфильтрации в баллах в третьей групп составили: нейтрофилов 1 [0;1] баллов, (Q>0,1), макрофагов 1,5[1,5;2] баллов, (Q<0,05), лимфоцитов 2,5[1,5;3] баллов, (Q<0,01), плазмоцитов 2[1;3] баллов, (Q<0,001), эозинофилов 1,5[1,5;2] баллов, (Q<0,01). Обращает на себя внимание, что величина названных показателей воспалительного инфильтрата, достоверно отличается от таковых в контроле.

4.2 Роль желатиназы В в патогенезе экспериментального хронического воспаления эндометрия у крыс

Учитывая результаты клинического этапа нашего исследования, в котором были получены данные, указывающие на значимую роль желатиназы В в

хронизации воспаления эндометрия, нами было проведено иммуногистохимическое исследование в эксперименте (таблица 4.2).

Таблица 4.2 – Удельное число желатиназа В-позитивных клеток (в%) и интенсивность экспрессии (в баллах) в тканях эндометрия на фоне экспериментального хронического воспаления эндометрия (Ме [25 и 75 перцентили])

Группа/ показатель	Стромально-клеточный компонент		Железистый эпителий эндометрия	
	Удельное число (в %)	Интенсивность экспрессии (в баллах)	Удельное число (в %)	Интенсивность экспрессии (в баллах)
Группа 1 (исходное состояние)	28[26;30]	2[0;1]	29 [28;30]	2[0;1]
Группа 2 (контроль)	28[20;30]	0[0;1]	30[28;30]	2[0;1]
Q	>0,1	>0,1	>0,1	>0,1
Группа 3 (эХВЭ)	18[17;20]	0[1;2]		1[1;2]
Q ¹	<0,05	<0,05	>0,1	<0,05

Примечание: Q – достоверность различий между исходным состоянием и контролем; Q¹ – достоверность различий между группой с экспериментальным хроническим воспалением эндометрия и контролем

В клеточном компоненте стромы и эпителии желез эндометрия удельное число и интенсивность экспрессии желатиназа В позитивных клеток в группах контроля и в исходном состоянии значимо не отличалось. Высокие уровни указанных показателей в первой и второй группах (таблица 4.1, рисунок 4.1), указывают на важную роль желатиназы В в гомеостазе эндометрия. В группе с эХВЭ в клеточном компоненте стромы число клеток, положительно реагирующих на антитела уменьшилось (в %) с 28[26;30] до 18[17;20] % Q<0,05, интенсивность экспрессии резко снизилась с 2[0;2] до 0[1;2] баллов; Q<0,05 (рисунок 4.2). В эпителии желез удельное число желатиназа-В положительных клеток значимо не изменилось 29 [28;30] в исходном состоянии и 27[23,5;29] в группе с эХВЭ, Q>0,1, но отмечалась тенденция к уменьшению интенсивности экспрессии желатиназы В с 2[0;1] баллов в контрольной группе до 1[1;2] балла в группе с экспериментальным хроническим воспалением эндометрия, Q<0,05.

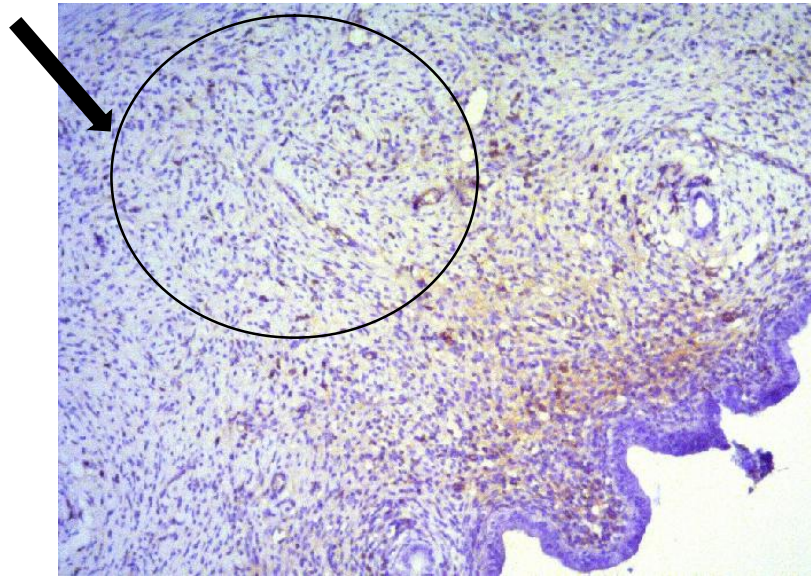


Рисунок 4.1 – Фрагмент эндометрия крысы в исходном состоянии. Показано большое количество желатиназа-В позитивных клеток. Окрашивание с использованием моноклональных антител к ММП-9, подкрашивание гематоксилин-эозином. Увел. $\times 100$.

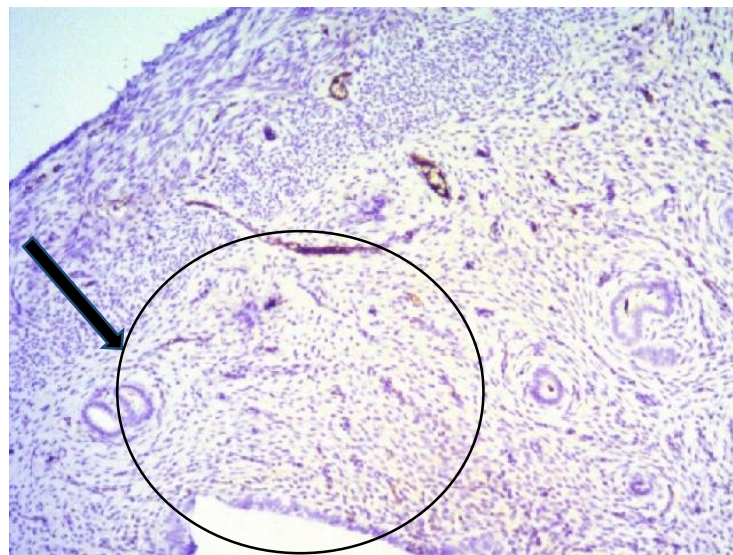


Рисунок 4.2 – Фрагмент эндометрия крысы на фоне экспериментального хронического воспаления эндометрия. Показано уменьшение числа желатиназа В позитивных клеток в стромально-клеточном компоненте эндометрия. Окрашивание с использованием моноклональных антител к ММП-9, подкрашивание гематоксилин-эозином. Увел. $\times 100$

При проведении корреляционного анализа выявлена умеренная отрицательная корреляция между плазмоцитарной инфильтрацией и удельным числом желатиназа-В позитивных клеток в стромально-клеточном компоненте эндометрия $r=0,48$. Не обнаружено значимой корреляции между плазмоцитарной,

лимфоцитарной инфильтрацией и удельным числом экспрессии желатиназа В позитивных клеток в железистом эпителии.

Исходя из данных о возможной роли ионов магния, кальция, а также интенсивности пероксидации в патогенезе воспаления, было проведено исследование магний-кальциевого баланса, а также интенсивности ПОЛ и активности ферментов антиоксидантной защиты у экспериментальных животных.

4.3 Магний-кальциевый баланс в крови из разных регионов на фоне экспериментального хронического воспаления эндометрия

Для изучения изменений магний-кальциевого баланса нами была определено содержание магния в эритроцитарной массе крови НПВ и ПКВ, а также магния и кальция в плазме крови ПКВ у подопытных животных (таблица 4.3).

Таблица 4.3 – Содержание магния в эритроцитарной массе НПВ и ПКВ, в плазме из подключичной вены у крыс на фоне хронического воспаления эндометрия (в ммоль/л)

Группа/сосуд	Группа 1 (исходное состояние)	Группа 2 (контроль)	p	Группа 3 (эХВЭ)	p ¹
НПВ эр. масса (ммоль/л)	1,91±0.07	1,871±0.09	>0,1	1,63±0,06	<0,01
ПКВ эр. масса (ммоль/л)	1,78±0.12	1,73±0.12	>0,1	1,49±0,06	<0,05
ПКВ плазма (ммоль/л)	1,31±0.33	1,2±0.19	>0,1	0,87±0,23	<0,05

Примечание: p - достоверность различий между исходным состоянием и контролем; p¹ - достоверность различий между группой с экспериментальным хроническим воспалением эндометрия и контролем;

При исследовании содержания магния, не обнаружено достоверной разницы между группами контроля и исходным состоянием. Как показано в таблице 4.3, содержание магния в эритроцитарной массе в крови из НПВ у крыс первой во второй групп составило в ммоль/л: 1,91±0.26 и 1,871±0.21 соответственно, в эритроцитарной массе в крови из подключичной вены в исходном состоянии составило в ммоль/л: 1,78±0.52 в группе контроля 1,73±0.31. На фоне эХВЭ в

эритроцитарной массе крови из НПВ и ПКВ отмечалась тенденция к снижению уровня магния до $1,63 \pm 0,19$ ммоль/л, ($p < 0,01$), до $1,49 \pm 0,18$ ммоль/л, ($p < 0,05$) на 18% и 14% соответственно. В сыворотке крови из подключичной вены содержание магния было в ммоль/л: $1,31 \pm 0,33$ в исходном состоянии, $1,2 \pm 0,19$ в группе контроля, ($p > 0,05$). В группе с ЭХВЭ отмечалось статистически достоверное снижение содержания магния до $0,87 \pm 0,23$ ммоль/л.

При проведении корреляционного анализа выявлена прямая сильная взаимосвязь между показателями содержания внутриклеточного магния в крови из НПВ и удельным числом желатиназа В позитивных клеток в тканях эндометрия ($r = 0,65$).

В связи со значимой ролью кальция в регулировании активности матриксных металлопротеиназ нами было изучено содержание Ca^{2+} в сыворотке подопытных животных.

Как видно из таблицы 4.4, достоверной разницы в содержании кальция между группами не выявлено, что видимо, связано со значимой ролью кальция как вторичного мессенджера, множество механизмов принимают участие в поддержании гомеостаза кальциевого обмена, поэтому колебания кальция в периферической крови чрезвычайно малы.

Таблица 4.4 – Содержание кальция в плазме у крыс на фоне экспериментального хронического воспаления эндометрия (в ммоль/л).

Группа/сосуд	Группа 1 (исходное состояние)	Группа 2 (контроль)	p	Группа 3 (ЭХВЭ)	p ¹
НПВ (ммоль/л)	$2,43 \pm 0,04$	$2,28 \pm 0,04$	$> 0,1$	$2,18 \pm 0,06$	$> 0,1$
ПКВ (ммоль/л)	$2,35 \pm 0,05$	$2,48 \pm 0,09$	$> 0,1$	$2,49 \pm 0,06$	$> 0,1$

Примечание: p - достоверность различий между исходным состоянием и контролем; p¹-достоверность различий между группой с экспериментальным хроническим воспалением эндометрия и контролем;

В настоящее время установлено, что возникновение и развитие широкого круга воспалительных заболеваний сопровождается активацией перекисного

окисления липидов (ПОЛ). Активность процессов ПОЛ является важным патогенетическим фактором, отрицательно влияющим на течение, эффективность лечения и прогноз, в том числе воспалительных заболеваний.

4.4 Показатели интенсивности пероксидации и антиоксидантной защиты у крыс на фоне экспериментального хронического воспаления эндометрия

Состояние системы пероксидации и антиоксидантной защиты оценивалось по уровню ДК, МДА и активности каталазы.

Как видно из таблицы 4.5, содержание ДК в эритроцитарной массе крови из НПВ у крыс контрольной и исходной групп с практически не отличается. У животных группы контроля $0,029 \pm 0,008$ едА/мл и в исходном состоянии $0,029 \pm 0,012$ едА/мл, ($p > 0,1$). Не обнаружено значимых различий между этими группами в величине показателей МДА и активностью КА. При этом содержание МДА было $4,86 \pm 0,29$ мкмоль/л в контрольной группе и $4,22 \pm 0,36$ мкмоль/л в исходном состоянии, ($p > 0,1$), активность КА - $61,68 \pm 2,5$ мкатал/л у крыс в контрольной группе и $60,98 \pm 1,5$ мкатал/л у крыс в исходном состоянии ($p > 0,1$).

Таблица 4.5 –Содержание ДК, МДА, активность КА в эритроцитах крови из НПВ у крыс с экспериментальным хроническим воспалением эндометрия.

Группа/ показатель	Группа 1 (исходное состояние)	Группа 2 (контроль)	p	Группа 3 (ЭХВЭ)	p ¹
ДК едА/мл (сыворотка)	$0,029 \pm 0,0012$	$0,029 \pm 0,008$	$>0,1$	$0,049 \pm 0,009$	$<0,01$
МДА, мкмоль/л (плазма)	$4,22 \pm 0,36$	$4,86 \pm 0,29$	$>0,1$	$6,09 \pm 0,64$	$<0,01$
КА, мкатал/л (гемолизат)	$60,98 \pm 1,5$	$61,68 \pm 2,5$	$>0,1$	$60,6 \pm 2,7$	$>0,1$

Примечание: p – достоверность различий между исходным состоянием и контролем; p¹ – достоверность различий между группой с экспериментальным хроническим воспалением эндометрия и контролем.

Как видно из таблицы 4.5, на фоне развившегося хронического воспаления эндометрия на сроке 51 сутки увеличилось содержание ДК по отношению к контролю с 0.029 ± 0.008 едА/мл в контрольной группе до 0.049 ± 0.009 едА/мл у крыс с эндометритом ($p < 0.01$). Содержание МДА увеличилось с 4.86 ± 0.29 мкмоль/л до 6.09 ± 0.64 мкмоль/л, соответственно, ($p < 0.001$). При этом активность каталазы оставалась практически без изменений: 61.68 ± 2.5 мкатал/л в контрольной группе и 60.6 ± 2.7 мкатал/л в группе с экспериментальным хроническим эндометритом, ($p > 0.1$).

Помимо этого, обнаружена умеренная отрицательная корреляционная связь ($r = 0.5$) между показателем содержания МДА в крови из НПВ и удельным числом желатиназа В позитивных клеток в строме эндометрия.

Анализ полученных данных показывает, что в крови у животных с экспериментальным хроническим воспалением эндометрия наблюдается дисбалансом между интенсивностью перекисидации и активностью антиоксидантной защиты, который проявляется значительной интенсификацией процесса перекисного окисления липидов, при отсутствии ожидаемого увеличения активности антиоксидантных ферментов, которое в данной ситуации могло быть оценено, как защитно-приспособительная реакция. Учитывая данные об изменении содержания магния у крыс в эксперименте, данные его роли в процессах энергообразования и энергопотребления, пролиферации тканей и регуляции активности желатиназы для коррекции развившихся нарушений применяли МСК у крыс с экспериментальным ХВЭ.

ГЛАВА 5

ВЛИЯНИЕ МАГНИЙСОДЕРЖАЩЕЙ КОМПОЗИЦИИ НА БАЛАНС ПОВРЕЖДАЮЩИХ И ЗАЩИТНО-ПРИСПОСОБИТЕЛЬНЫХ МЕХАНИЗМОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ И В КЛИНИКЕ

5.1 Влияние магнийсодержащей композиции на магний-кальцевый баланс, интенсивность пероксидации и антиоксидантной защиты, морфологические и иммуногистохимические характеристики тканей эндометрия в условиях его экспериментального хронического воспаления у крыс

После применения МСК уровень магния в эритроцитарной массе в крови и нижней полой вены вырос на 26%, ($p < 0,01$), в эритроцитарной массе в крови из подключичной вены на 21%, ($p < 0,05$) в сравнении с группой крыс на фоне экспериментального хронического воспаления эндометрия (таблица 5.1, рисунок 5.1).

Таблица 5.1 – Содержание магния в эритроцитарной массе нижней полой и подключичной вен, в плазме из подключичной вены у крыс без применения МСК и с применением МСК (в ммоль/л, $M \pm m$).

Группа/ сосуд	Группа 1 (исходное состояние)	Группа 2 (контроль)	p	Группа 3 (эХВЭ)	p ¹	Группа 4 (применение МСК)	p ²
НПВ эр. масса (ммоль/л)	1,91±0.07	1,871±0.09	>0,1	1,63±0,06	<0,01	2,05±0,09	<0,05
ПКВ эр. масса (ммоль/л)	1,78±0.12	1,73±0.12	>0,1	1,49±0,06	<0,05	1,77±0.19	<0,05
ПКВ плазма (ммоль/л)	1,31±0.33	1,2±0.19	>0,1	0,87±0,23	<0,05	1,1±0.2	<0,05

Примечание: p - достоверность различий между исходным состоянием и контролем; P¹ – достоверность различий между группой с экспериментальным хроническим воспалением эндометрия и контролем; P² – достоверность различий между группами с экспериментальным хроническим воспалением эндометрия без применения МСК и с применением МСК.

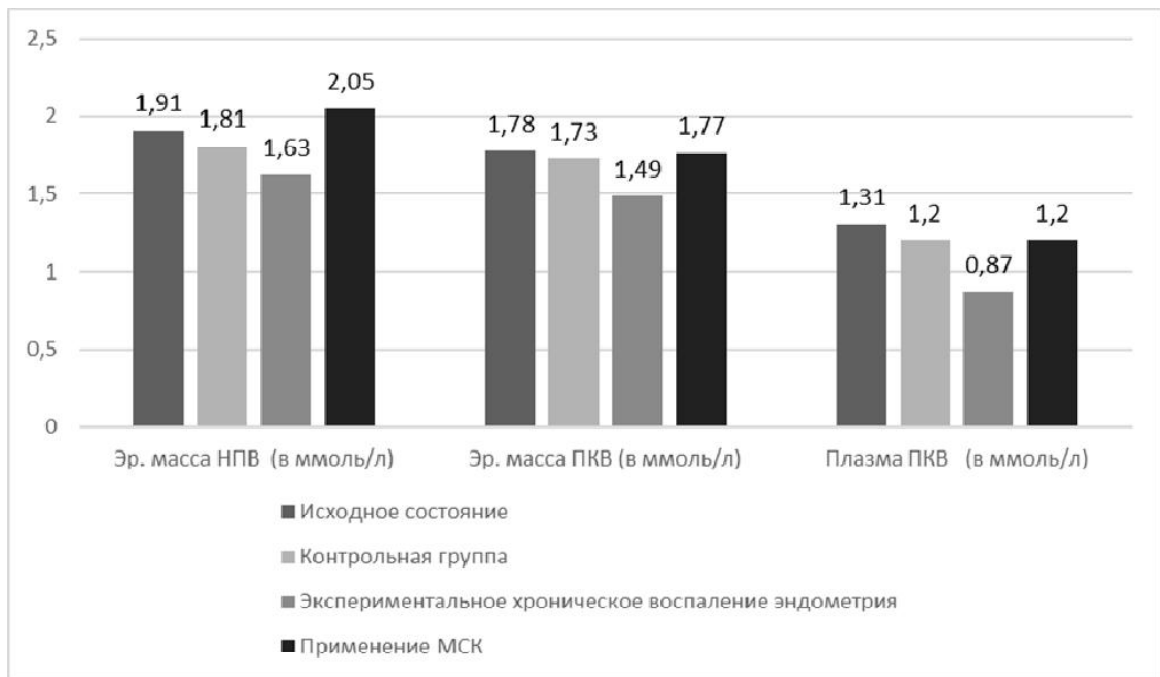


Рисунок 5.1 – Показатели содержание магния в эритроцитарной массе в крови у крыс с экспериментальным хроническим воспалением эндометрия без применения МСК и с применением МСК.

Обращает на себя внимание, более интенсивное увеличение содержания магния в эритроцитарной массе из НПВ в сравнении с приростом этого показателя в эритроцитарной массе в крови из ПКВ. Видимо, это связано с формированием большего числа TRAMP-7 магний-транспортных каналов в клетках в зоне хронического воспаления и перераспределением магния в пользу ткани, в которой требуется интенсификация пролиферативных процессов. Помимо вышеуказанных изменений в показателях обмена магния, нами были выявлены изменения в интенсивности пероксидации и антиоксидантной защиты.

Как показано в таблице 5.2, после применения МСК снижается интенсивность пероксидации у крыс с экспериментальным эндометритом о чем свидетельствует уменьшение содержания ДК на 21 %, ($p < 0,01$), а МДА на 25%, ($p < 0,01$), при этом активность каталазы выросла на 12%, ($p < 0,05$) (рисунок 5.2).

Таблица 5.2 – Содержание ДК, МДА, активность КА в крови из НПВ вены у крыс с экспериментальным хроническим воспалением эндометрия без применения МСК и с применением МСК ($M \pm m$).

Группа/ показатель	Группа 1 (исходное состояние)	Группа 2 (контроль)	p	Группа 3 (ЭХВЭ)	p ¹	Группа 4 (применение МСК)	p ²
ДК едА/мл (сыворотка)	0,029±0,0012	0,029±0,008	>0,1	0,049±0,009	<0,01	0,039±0,007	<0,05
МДА, мкмоль/л (плазма)	4,22±0,36	4,86±0,29	>0,1	6,09±0,64	<0,01	4,57±0,43	<0,01
КА, мкатал/л (гемолиза)	60,98±1,5	61,68±2,5	>0,1	60,6±2,7	>0,05	68,86±3,4	<0,05

Примечание: p – достоверность различий между исходным состоянием и контролем; p¹ – достоверность различий между группой с экспериментальным хроническим воспалением эндометрия и контролем; p² – достоверность различий между группами с экспериментальным хроническим воспалением эндометрия без применения МСК и с применением МСК.

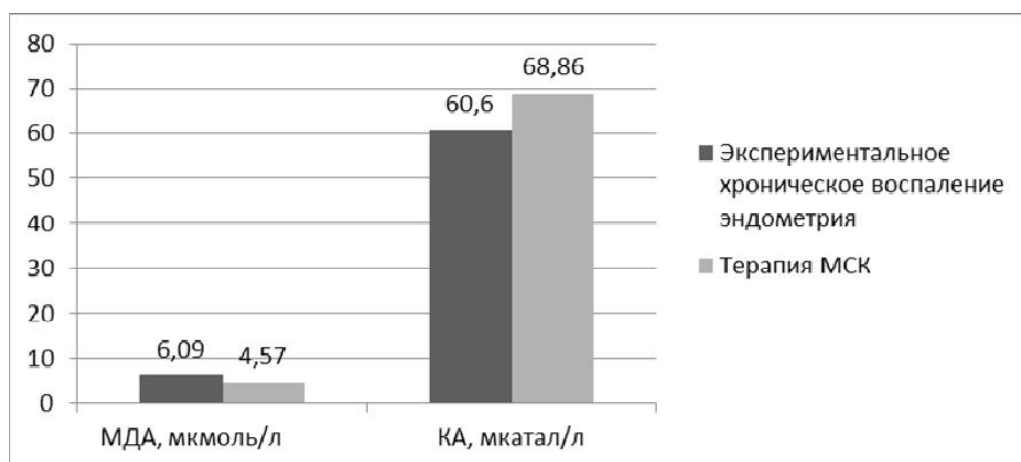


Рисунок 5.2 – Показатели содержания МДА и активности каталазы в эритроцитарной массе в крови из НПВ у крыс с экспериментальным хроническим воспалением эндометрия без применения МСК и с применением МСК.

Одновременно с изменениями в показателях обмена магния, интенсивности пероксидации и активности антиоксидантной защиты наблюдалось изменение показателей клеточной инфильтрации тканей эндометрия.

Как видно, после применения магнийсодержащей композиции у крыс четвертой группы, по отношению к группе без применения МСК увеличилось

число макрофагов до 2[1,5;2,5] ($Q < 0,05$), лимфоцитов до 3[1,5;2] ($Q < 0,01$), число нейтрофилов осталось практически неизменным 1[1;2] ($Q > 0,1$), число плазмоцитов и эозинофилов уменьшилось до 1[1;2], ($Q < 0,05$) и 1[0;1], ($Q < 0,05$) соответственно (таблица 5.3, рисунок 5.3, 5.4).

Таблица 5.3 – Показатели клеточного инфильтрата в эндометрии у крыс на фоне экспериментального хронического воспаления эндометрия без применения МСК и после применения МСК (в баллах) (Ме [25 и 75 перцентили]).

Показатель/ группа	Нейтрофил	Макрофаг	Лимфоцит	Плазмоцит	Эозинофил
Группа 1 (исходное состояние)	1[0;1]	1[0;1]	1[1;1]	0[0;1]	1[1;2]
Группа 2 (контроль)	1 [1;2]	1[0;1]	1[0,5;1]	0[0;1]	1[1;0]
Q	$>0,1$	$>0,1$	$>0,1$	$>0,1$	$>0,1$
Группа 3 (эХВЭ)	1 [0;1]	1,5[1,5;2]	2,5[1,5;3]	2[1;3]	1,5[1,5;2]
Q ¹	$>0,1$	$<0,05$	$<0,01$	$<0,001$	$<0,01$
Группа 4 (МСК)	1 [1;2]	2[1,5;2,5]	3[1,5;2]	1[1;2]	1[0;1]
Q ²	$>0,1$	$<0,05$	$<0,01$	$<0,05$	$<0,01$

Примечание: Q – достоверность различий между исходным состоянием и контролем; Q¹ – достоверность различий между группой с экспериментальным хроническим воспалением эндометрия и контролем; Q² – достоверность различий между группами с экспериментальным хроническим воспалением эндометрия до и после лечения МСК.

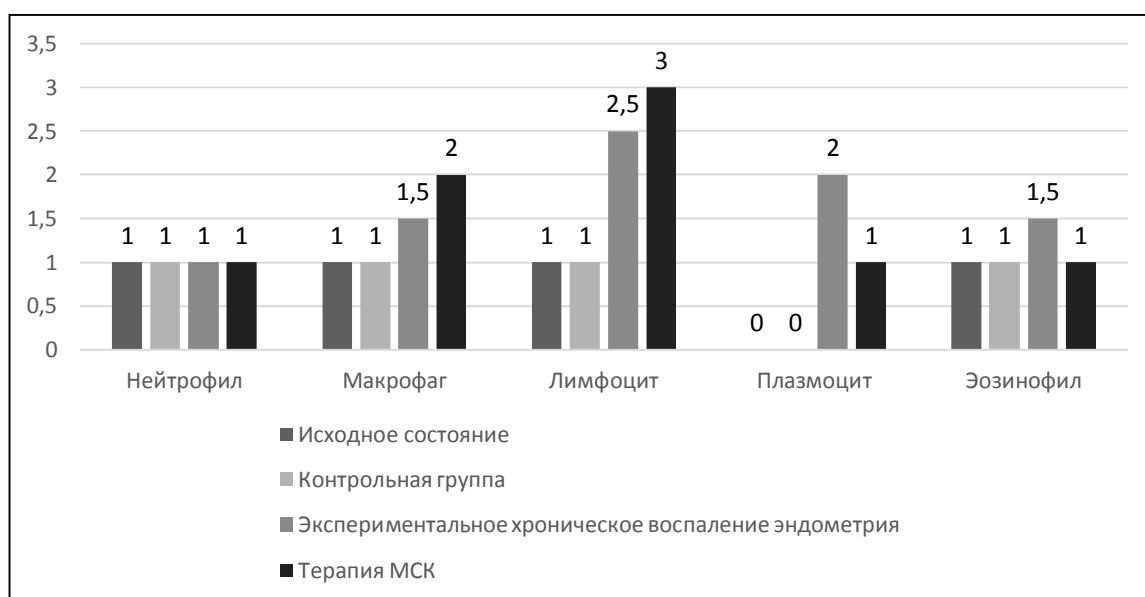


Рисунок 5.3 – Показатели клеточного инфильтрата в эндометрии у крыс на фоне экспериментального хронического воспаления без применения МСК и после применения МСК

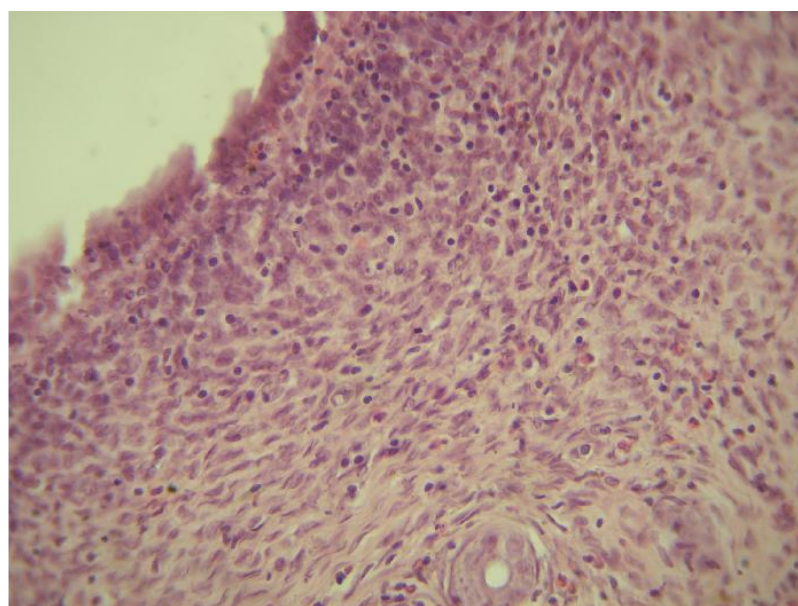


Рисунок 5.4 – Фрагмент эндометрия крысы на фоне экспериментального хронического воспаления эндометрия после терапии МСК. Окрашивание гематоксилин-эозином. Увел. $\times 400$.

Как показано в таблице 5.4, на фоне применения магнийсодержащей композиции в тканях эндометрия у крыс с эХВЭ определялось увеличение удельного числа желатиназа В позитивных клеток (в %) до 35[31;39], ($Q < 0,01$) и интенсивности экспрессии до 1[2;3] баллов, ($Q < 0,05$) в элементах стромы (рис. 5.3 и 5.4), на фоне незначительных изменений указанных показателей в железистом эпителии ($Q > 0,1$) (рисунок 5.5).

Таблица 5.4 – Удельное число и интенсивность экспрессии желатиназа В-позитивных клеток в тканях эндометрия на фоне коррекции экспериментального хронического воспаления эндометрия магнийсодержащей композицией (в баллах) (Ме [25 и 75 перцентили]).

Показатель/ группа	Стромально-клеточный компонент эндометрия		Железистый эпителий эндометрия	
	Удельное число (в %)	Интенсивность экспрессии (в баллах)	Удельное число (в %)	Интенсивность экспрессии (в баллах)
Группа 1 (исходное состояние)	28[26;30]	2[0;1]	29 [28;30]	2[0;1]
Группа 2 (контроль)	28[20;30]	0[0;1]	30[28;30]	2[0;1]
Q	>0,1	>0,1	>0,1	>0,1
Группа 3 (эХВЭ)	18[17;20]	0[1;2]	27[23,5;29]	1[1;2]
Q1	<0,05	<0,05	>0,05	<0,05
Группа 4 (применение МСК)	35[31;39]	1[2;3]	24,5[28;30]	1[1,5;2]
Q2	<0,01	<0,05	>0,05	>0,05

Примечание: p – достоверность различий между исходным состоянием и контролем; p^1 – достоверность различий между группой с экспериментальным хроническим воспалением эндометрия и контролем; p^2 – достоверность различий между группами с экспериментальным хроническим воспалением эндометрия до и после лечения МСК.

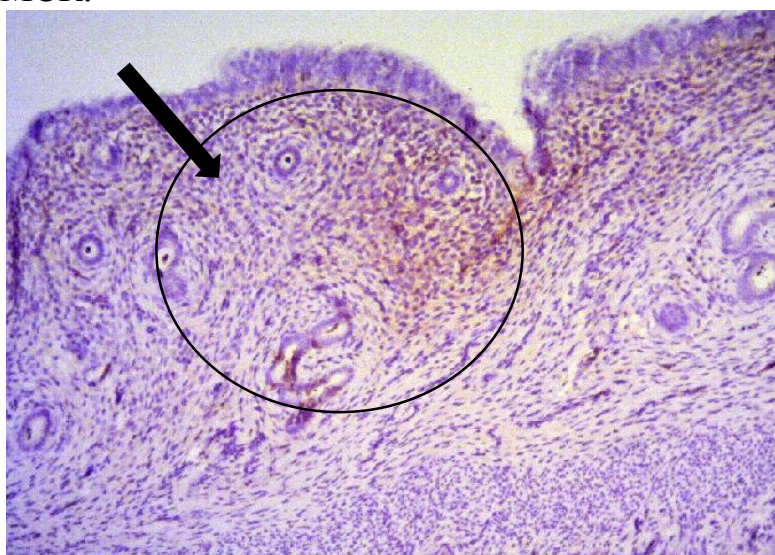


Рисунок 5.5 – Фрагмент эндометрия крысы на фоне экспериментального хронического воспаления эндометрия после терапии МСК. Показано увеличение удельного числа желатиназа В-позитивных клеток в стромально-клеточном компоненте эндометрия. Окрашивание с использованием моноклональных антител к ММП-9, подкрашивание гематоксилин-эозином. Увел. $\times 100$.

5.2 Влияние магнийсодержащей композиции на морфологические и иммуногистохимические характеристики тканей эндометрия у женщин с хроническим эндометритом

Для оценки эффективности терапии, включающей помимо стандартных назначений, электрофорез с сульфатом магния проведено иммуногистохимическое и гистологическое исследование образцов эндометрия полученных у женщин с ХЭ и неоднократными неудачами ВРТ.

Как видно из таблицы 5.5, на фоне проведения курса электрофореза с 10% сульфатом магния, наметилась тенденция к увеличению показателей активности желатиназы В. В группе с хроническим эндометритом удельное число желатиназа В позитивных клеток в строме (в %) составило 10[7;13], после проведения терапии сульфатом магния 20[17;25,5].

Таблица 5.5 – Удельное число (в%) и интенсивность экспрессии (в баллах) желатиназа В-позитивных клеток в тканях эндометрия без и после терапии с включением электрофореза с 10% сульфатом магния

Показатель/ Группа	Стромально-клеточный компонент		Железистый эпителий эндометрия	
	Удельное число (в %)	Интенсивность экспрессии (в баллах)	Удельное число (в %)	Интенсивность экспрессии (в баллах)
Группа 1 (без ХЭ)	28[22,5;43]	2[1;3]	15[13;26]	1[0;1]
Группа 2 (ХЭ)	10[7;13]	0[0;1]	12[8;21]	0[0;1]
Q	<0,01	<0,05	>0,1	>0,1
Группа 3 (стандартная терапия)	12[10;12,5]	1[0;1]	9[12;15,5]	1[0;1]
Q1	>0,1	>0,1	>0,1	>0,1
Группа 4 (с включением сульфата магния)	20[17;25,5:]	1[1;2]	10,5 [8;13]	1[0;1.5]
Q ²	<0,01	<0,05	>0,1	>0,1

Примечание: Q - достоверность различий между исходным состоянием и хроническим эндометритом; Q¹ -достоверность различий между группой с ХЭ до терапии и группой с ХЭ и стандартной терапией; Q² -достоверность различий между группой с ХЭ со стандартной терапией и после терапии электрофорезом с 10% сульфатом магния.

Прирост удельного числа, по нашим данным составил 50%. Интенсивность экспрессии в стромально-клеточном компоненте также имела тенденцию к росту до 1[1;2] балла. В железистом эпителии мы не наблюдали статистически значимых изменений в указанных параметрах (рисунок 5.6).



Рисунок 5.6 – Динамика показателей активности желатиназы В в тканях эндометрия у женщин с ХЭ без и после терапии электрофорезом с 10% сульфатом магния.

В образцах эндометрия у женщин после терапии с включением электрофореза с 10 % сульфатом магния обнаружено, что количество нейтрофилов осталось практически неизменным. Количество макрофагов в тканях эндометрия увеличилось с 1[1;2] баллов в группе образцов до терапии ХЭ, до 3[2;3] баллов. В группе образцов после терапии сульфатом магния. Количество плазмócитов уменьшилось до 1 [0,5;1] ($Q < 0,001$), но не вернулось к показателям практически здоровых женщин. Количество эозинофилов выросло с 1[1;0] в группе с ХЭ без терапии, до 2[1;2] в группе после терапии сульфатом магния, ($Q < 0,001$) (рисунок 5.7, 5.8).

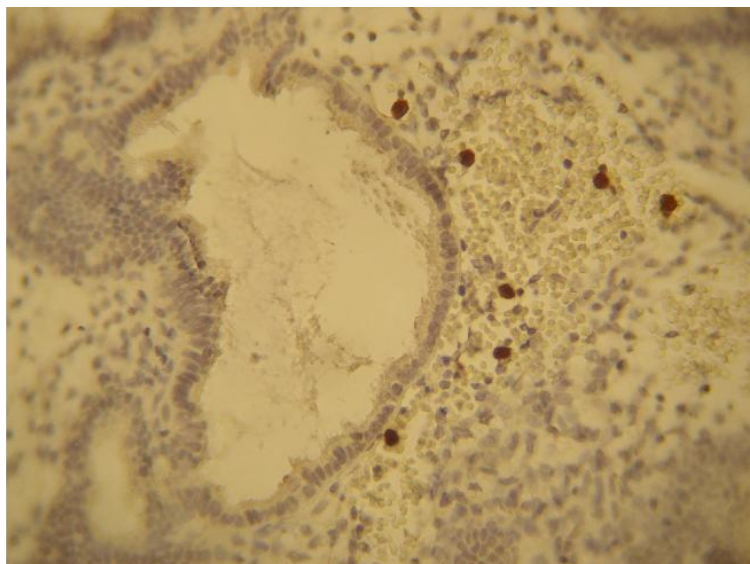


Рисунок 5.7 – Фрагмент эндометрия женщины с ХЭ после электрофореза сульфата магния. Окрашивание с использованием моноклональных антител к ММП-9, подкрашивание гематоксилин-эозином. Увел. $\times 400$.

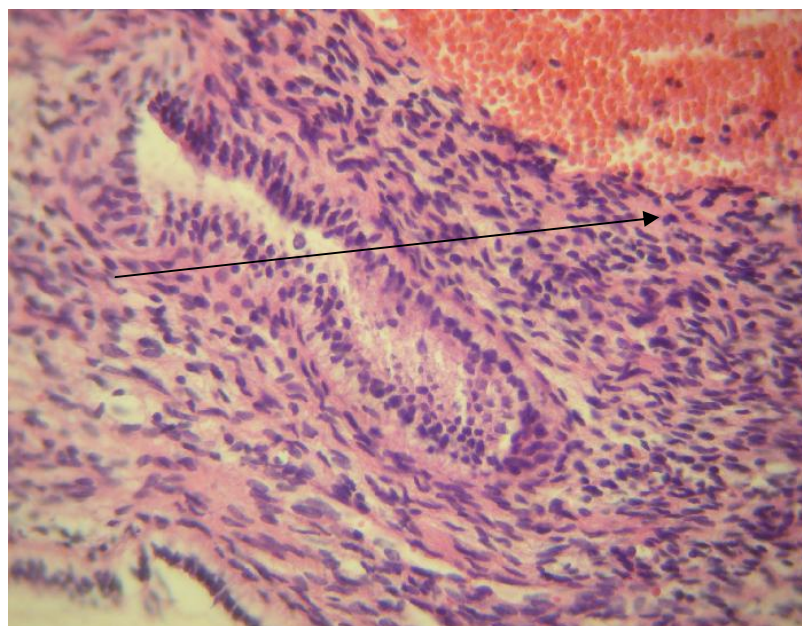


Рисунок 5.8 – Фрагмент эндометрия женщины с ХЭ после электрофореза сульфата магния. Окрашивание гематоксилин-эозином. Увел. $\times 400$.

Одновременно с изменением показателей активности желатиназы В в тканях эндометрия, изменялся и состав клеточного инфильтрата (таблица 5.6, рисунок 5.9).

Таблица 5.6 – Показатели клеточного инфильтрата в образцах эндометрия (в баллах) (Ме [25 и 75 перцентили]) на фоне ХЭ без и после терапии электрофорезом с 10% сульфатом магния.

Клетки/ группа	Нейтрофил	Макрофаг	Лимфоцит	Плазмоцит	Эозинофил
Группа 1 (без ХЭ)	1[1;2]	1[1;2]	1[1;1]	1[0;1]	1[1;1]
Группа 2 (ХЭ)	1 [0,5;1]	1[1;2]	3[2;3]	3[2;3]	1[1;0]
Q	>0,1	>0,1	<0,001	<0,001	>0,1
Группа 3 (стандартная терапия)	1 [0;1]	1 [1;2]	2,5[2;3]	2[2;3]	1 [1;2]
Q ¹	>0,1	>0,1	>0,1	>0,1	>0,1
Группа 4 (с включением сульфата магния)	0,5[1;2]	3[2;3]	1[0,5;1]	1 [0,5;1]	2[1;2]
Q ²	>0,1	<0,05	<0,05	<0,001	<0,001

Примечание: Q – достоверность различий между группами в исходном состоянии и группой с ХЭ; Q¹ – достоверность различий между группой с ХЭ до лечения и группой с ХЭ после стандартной терапии; Q² – достоверность различий между группой с ХЭ после терапии электрофорезом с 10% сульфатом магния и группой с ХЭ без терапии.

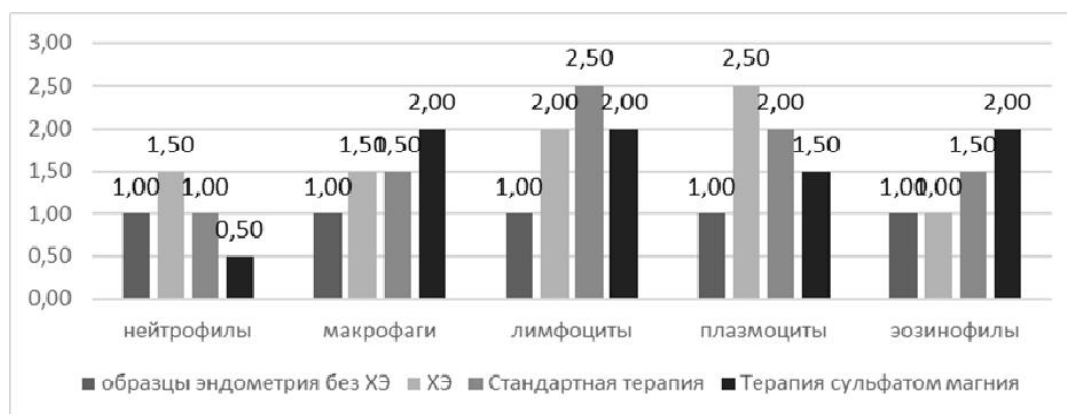


Рисунок 5.9 – Динамика показателей клеточного инфильтрата в образцах эндометрия у женщин с ХЭ и повторяющимися неудачами имплантации без и после терапии с включением электрофореза с 10% сульфатом магния.

ГЛАВА 6

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Анализ литературных данных показал, что ни одна из теорий патогенеза хронического эндометрита не раскрывает всей многогранности этого хронического воспалительного процесса. Длительное время постулировалась роль инфекционного фактора, как ведущего звена этиопатогенеза данной нозологии. Показано, что исследование с целью верификации инфекционного агента у женщин, страдающих ХЭ, не дает ожидаемого результата. В ряде случаев, бактериологическое, культуральное исследования и ПЦР диагностика показывают отсутствие патогенных микроорганизмов или определяется условно-патогенная флора (Cicinelli E.I. et al, 2009; Сковородникова Н.Г. 2011; Петров Ю. А. 2012). Учитывая данные о широкой распространенности ХЭ среди женщин репродуктивного возраста, а также данные о роли ХЭ в патогенезе бесплодия и привычного невынашивания, представляет большой интерес изучение этиопатогенеза данной нозологии (Шурашалина А.В., 2011; Лебедев В.А, 2012; Плясунова М.П., 2013; Kitaya R., Yasuo T, 2015). И.И. Мечников, И.В. Давыдовский отмечали несовершенство воспаления как защитной реакции организма и подчеркивали возможность развития хронического процесса в результате дефекта иммунных механизмов и невозможности полноценного завершения репаративного процесса. Вследствие длительной персистенции и стимуляции иммунокомпетентных клеток в ткани не происходит заключительной фазы воспаления — регенерации, нарушаются регуляторные механизмы локального гомеостаза и формируется каскад вторичных повреждений. Угнетение Т-зависимых иммунных реакций, селективная недостаточность количества В-лимфоцитов, торможение поглотительной и метаболической активности фагоцитов.

Хронизирующими фактором воспаления выступают продолжающаяся деструкция тканей, неэффективность механизмов воспаления и его завершающей стадии – пролиферации.

Клиническая картина зависит от особенностей этиологического фактора, явившегося иницирующим, а также, от индивидуальной реактивности и, в первую очередь иммунной системы. Выраженность защитно-приспособительной реакции на первичный контакт с этиологическим фактором предопределяет дальнейшее течение заболевания (Шуршалина А.В., 2011; Лебедев В.А, 2012; Мотовилова Т.М.и др., 2013; Мальцева Л. И.,2012; Цаллагова Л.В., 2014; Akopians, A, 2013) .

Возможен вариант перехода острого эндометрита в хронический, как осложнение внутриматочных вмешательств. Так же возможен и первично-хронический вариант, развитие которого зависит от антигенных свойств флорогена и особенностей иммунного и гормонального ответа, таких как: высокий процент незавершенного фагоцитоза, дефицит и дефект молекул адгезии, дефицит и дефект фаго-лизосомальной системы, избыток глюкокортикоидов и др.

Очевидно, существует анатомо-функциональный комплекс факторов, определяющих индивидуальные реактивность и резистентность организма пациента. Недостаточность первичного ответа способствует переходу заболевания в хроническую форму (Лебедев В.А.и др., 2012; Хашукоева А.З.и др., 2012; Данусевич И.Н., 2013; Колесникова Л. И 2013).

Хроническая форма, в свою очередь, сложно диагностируется, протекает малосимптомно, длительно и отличается низкой эффективностью стандартной терапии. Хроническое воспаление теряет свою защитную сущность, направленную на элиминацию патогена, деструкцию поврежденных тканей и клеток организма и дальнейшую репарацию.

Общепризнано, что одним из наиболее достоверных методов верификации хронического эндометрита является гистологическое исследование тканей эндометрия (Михнина Е.А., 2009; Гомболевская, Н. А., 2012). В группе образцов без признаков хронического эндометрита железы имеют вид прямых или слегка извитых трубочек, с узким просветом округлой или слегка овальной формы. Железы выстланы многорядным эпителием с крупными ядрами, в некоторых образцах эпителий имеет однорядную структуру. Клеточный состав представлен

единичными нейтрофилами, макрофагами, лимфоцитами, плазмócитами и эозинофилами, расположенными отдельно друг от друга без образования скоплений. Сосуды имели обычное строение без признаков склероза.

В образцах эндометрия, полученных у женщин с хроническим эндометритом, определялись дистрофические явления разной степени выраженности в строме, эпителиоцитах и glanduloцитах желез. Регистрировалась полиморфно-клеточная воспалительная инфильтрация по интенсивности скорее имеющая характер слабой-умеренной, с преобладанием лимфо-плазмóцитарных инфильтратов. Плазмóциты располагались рассеянно, имелись мелкие очаговые скопления плазмóцитов. Помимо лимфоцитарно-плазмóцитарной инфильтрации также определялись единичные нейтрофилы. Эти данные согласуются с данными Кузнецовой А.В., 2000; Шуршалиной А.В., 2009; Алимовой О.А. и др., 2011.

В образцах тканей, полученных у женщин с хроническим эндометритом, после проведения стандартного курса терапии хронического эндометрита (в соответствии с Приказом Министерства здравоохранения РФ от 1 ноября 2012 г. N 572н), обнаружена полиморфно-клеточная воспалительная инфильтрация низкой-умеренной интенсивности, с преобладанием лимфо-плазмóцитарных инфильтратов. При этом, при сопоставлении показателей клеточной воспалительной инфильтрации в группах без лечения хронического эндометрита, и после стандартной терапии хронического эндометрита, не определялось статистически достоверной разницы. Исходя из этих данных, можно сделать вывод о низкой эффективности стандартной антибактериальной терапии на показатели клеточной инфильтрации эндометрия. В работах Шуршалиной А.В, 2011г., Сковородникова Н. Г. (2001), Решетникова Н.С, (2010) и в работе Петров Ю. А.и др., (2011), так же, показана низкая эффективность «этиотропной» терапии.

Учитывая приведенные современные данные, о весьма неоднозначном вкладе инфекционного фактора в патогенез ХЭ становится объяснима низкая эффективности стандартной эрадикационной терапии.

Согласно современным представлениям, межклеточный матрикс рассматривается не только как элемент опоры и взаимодействия клеток, но и как непосредственный участник и регулятор многих физиологических и патологических процессов ремоделирования ткани (Рогова Л. Н. и др., 2011, Тепляков А.Т. и др., 2014). Матриксных металлопротеиназ (ММП), которые обеспечивают обмен белков межклеточного матрикса, а следовательно, являются основным «орудием» ремоделирования ткани. В свою очередь, желатиназа В, непосредственно принимает участие в процессах воспаления, ремоделирования ткани, репарации, мобилизации матрикссвязанных факторов роста и процессинга цитокинов. Доказано роль ММП при таких патологических процессах как артриты, язвенная болезнь желудка, пролапс митрального клапана, эндометриоз, острый и ХЭ, преждевременные роды (Sukhikh, G.et al., 2007; Рогова Л. Н., Шестернина Н. В., 2011; Perez, N.et al., 2012; Тепляков А.Т. и др., 2014; Yarmolinskaya, M.et al., 2014; Rahat, B.et al., 2016;).

Представляет интерес принципиальное отличие изменений матрикса при сравнении острого и хронического воспаления проявляющееся. В ответ на острое повреждение, межклеточный матрикс реагирует дезорганизацией структурных компонентов соединительной ткани. Это проявляется лизисом гиалуроновой кислоты и протеогликанов. Это приводит к ослаблению скелетных и механических свойства структурных компонентов, на фоне чего увеличивается дисперсность и гидрофильность коллоидов. Так же увеличивается проницаемость основного вещества. Подобные изменения происходят и с коллагеновыми и эластическими волокнами. При этом принципиальное значение имеют ферменты, которые вырабатывают фагоциты и активированные фибробласты. Сериновые протеазы деградируют коллаген. Особенно, явно воздействие цинк-зависимых металлопротеаз: коллагеназ, расщепляющих волокнистый коллаген, желатиназ, разрушающих желатин (аморфный коллаген) и стромелизины, деградирующие аморфные коллагены, коллаген-ассоциированные адгезивные белки и протеогликаны.

Несколько иначе выглядят изменения матрикса на фоне хронического воспаления. В отсутствии явной клинической картины на этапе формирования хронического воспаления, в поле внимания исследователей чаще оказываются длительносуществующие процессы. Под влиянием длительной вторичной альтерации постоянно поддерживается процесс воспаления. Нарушается баланс между альтерирующими факторами и противовоспалительными механизмами. На примере хронического панкреатита, сальпингоофорита, эндометрита показано преобладание процессов синтеза коллагена, при абсолютной или относительной недостаточности ферментов деградации и обмена матрикса, что приводит к избыточному накоплению структурных белков матрикса, последующему фиброзу, усугублению гипоксии и ишемии ткани и вновь поддержанию вторичной альтерации (Никитин П.Н, 2010; Гиниатуллин Р.У., 2012; Хамадьянова А. У., 2013).

Для изучения роли желатиназы В в развитии хронического эндометрита у женщин репродуктивного возраста проведено иммуногистохимическое исследование показателей активности желатиназы В по стандартной методике. Обнаружено, что показатели удельного числа и интенсивности экспрессии желатиназа-В позитивных клеток, в группе с хроническим эндометритом ниже, по отношению к указанным показателям, в группе образцов эндометрия без хронического воспаления. Достоверной разницы в указанных показателях активности желатиназы В в железистом эпителии в образцах эндометрия с хроническим эндометритом и без него не обнаружено.

В литературе излагаются противоречивые данные о роли активности ММП и желатиназы В, в частности, в патогенезе ХЭ. В работе Sukhikh, G.et al., (2007), так же получены данные о снижении показателей активности ММП в ткани эндометрия на фоне хронического эндометрита. Yoshii N., et al (2013), напротив, показали положительный эффект при терапии направленной на снижение активности ММП в сыворотке крови у женщин с ХЭ. В данной работе оценка количества ММП оценивалось в крови методом зимографии. В работе Кузнецова А.В., (2004) показано увеличение частоты живорождения при высоком уровне в

тканях желатиназы В, в то время как низкий уровень желатиназы В у пациентов с ХЭ коррелировал со снижением частоты живорождения. Наши данные не вступают в противоречие с данными этих авторов. Возможно, существует какой-то локальный механизм, не позволяющий должным образом активизировать экспрессию желатиназы В в поврежденной ткани, что отражается на компенсаторной интенсификации экспрессии ММП на системном уровне, как показано в работе Yoshii N., et al (2013). Другим возможным объяснением может быть общеизвестный факт, что кровь является отражением не только локальных, но и системных процессов. И высокое содержание ММП в периферической крови является результатом накопления эндогенных активаторов протеиназ или системным дефицитом их ингибиторов (Auf dem Keller, U, 2015).

В образцах, полученных у женщин, после проведения стандартной терапии с целью эрадикации «инфекционного агента» не обнаружено статистически достоверной разницы в показателях активности желатиназы В в сравнении с образцами эндометрия до стандартной терапии. Анализ показал, что иммуногистохимические показатели активности желатиназы В не восстановились до исходного уровня, на фоне стандартной терапии хронического эндометрита.

Коррелирование морфологических показателей хронического воспаления эндометрия со снижением удельного числа ремоделирования тканей диктует необходимость поиска механизмов регулирования, активации желатиназы В в тканях, для чего проведено экспериментальное исследование.

На первом этапе экспериментального фрагмента исследования была разработана модель хронического воспаления эндометрия у крыс. Учитывая приведенные данные о роли условно-патогенной микст-флоры как этиологического фактора воспалительных заболеваний малого таза, для воспроизведения ХЭ в эксперименте нами был использован фильтрат раствора аутокала крыс. На 41 сутки от момента моделирования в тканях эндометрия у экспериментальных животных наблюдались: воспалительные инфильтраты из лимфоидных элементов, в меньшей степени лейкоцитов, расположенных, чаще вокруг желез и кровеносных сосудов, реже диффузно, плазматические клетки,

единичные макрофаги, слабовыраженный фиброз стромы, незначительный склероз стенок артерий эндометрия. Данная картина типичная для хронизации воспаления эндометрия (Кузнецова А.В., 2000г).

Выявленные морфологические изменения, согласуются с данными полученными в ходе клинического исследования на образцах тканей эндометрия женщин.

Умеренный характер клеточной инфильтрации, видимо, отражает «слабость» ответа иммунной системы на воздействие флогогена, поскольку в норме результатом миграции клеточных элементов является их участие в воспалении как киллеров, антигенпрезентирующих клеток, макрофагов, продуцирующих хемоаттрактанты и цитокины, регулирующие согласованность и достаточность воспаления и активизирующих ремоделирование и пролиферацию в зоне воспаления. Это вполне отражает высказывание о «потере хроническим воспалением его биологической функции защиты» (Висмонт Ф.И., 2006).

Таким образом, на фоне экспериментального хронического воспаления эндометрия у крыс и в образцах эндометрия у женщин с хроническим эндометритом наблюдается нарушение морфологии тканей проявляющееся: дистрофическими явлениями в строме, эпителиоцитах и glanduloцитах желез, полиморфно-клеточной воспалительной инфильтрацией, с преобладанием лимфо-плазмочитарных инфильтратов, с незначительной тенденцией к макрофагально-эозинофильной инфильтрации, а так же фиброз, представляющий собой избыточную продукцию и накопление белковых компонентов внеклеточного матрикса.

Учитывая результаты клинического этапа исследования, в котором были получены данные, указывающие на участие желатиназы В в хронизации воспаления эндометрия, были определены показатели активности желатиназы В в тканях эндометрия у крыс в эксперименте.

В экспериментальных группах у крыс в исходном состоянии и в группе контроля обращают на себя внимание достаточно высокие уровни удельного числа желатиназа-В позитивных клеток и интенсивности их экспрессии, что

указывает на важную роль желатиназы В в гомеостазе эндометрия. В группе животных на фоне экспериментального хронического эндометрия: в клеточном компоненте стромы число клеток, положительно реагирующих на антитела к желатиназе В, уменьшилось и интенсивность экспрессии достоверно снизились. При этом, в эпителии желез удельное число желатиназа -В положительных клеток значимо не изменилось, но отмечалась тенденция к уменьшению интенсивности экспрессии желатиназы В.

Известно, что железистый эпителий эндометрия секретирует гликоген и мукополисахариды, необходимые для предимплантационного периода жизнедеятельности эмбриона. Периодическое усиление пролиферации и репарации в эндометрии, очевидно реализуется за счет активности металлопротеиназ, в том числе желатиназы В, принимающей участие в remodelировании тканей. В связи с тем, что удельное число и интенсивность экспрессии это два показателя, суммарно отражающие активность желатиназы В в тканях, можно полагать, что обнаруженное снижение уровней этих величин на фоне морфологических признаков воспаления, могут быть показателями нарушения механизмов деструкции и элиминации поврежденных тканей, remodelирования, что приводит к нарушению пролиферации в зоне воспаления пролиферации в зоне воспаления и свидетельствовать о его хронизации.

Проведение корреляционного анализа показало умеренную положительную корреляционную связь между параметрами лимфо-плазматической инфильтрации и удельным числом желатиназа-В позитивных клеток в тканях эндометрия.

Известно, что необходимым условием для окончания процесса воспаления необходимо «очищение» раны: деструкция и удаление флоггена, продуктов метаболизма, необратимо поврежденных клеток и тканей. В этих процессах играют значимую роль ферменты лизосом, гидролазы и, конечно, металлопротеиназы. Учитывая приведенные данные об участии желатиназы В в обмене белков внеклеточного матрикса можно предположить, что обнаруженная недостаточность показателей активности этого матриксина отражает неадекватность финальных этапов воспаления, непосредственно

предшествующих началу пролиферации и репарации зоны повреждения (Гиниатуллина Е. Р., 2011).

Полученные в эксперименте и клинике данные об умеренном характере инфильтрации, проявляющимся низким содержанием нейтрофилов эозинофилов (как киллеров), макрофагов (как антигенпрезентирующих клеток) отражает несовершенство механизмов воспаления. Выявленная «умеренность» инфильтрации, как отражение недостаточности клеточного иммунитета, приводит в свою очередь к недостаточности гуморального звена иммунного ответа, значимыми звеньями которого являются: недостаточность синтеза цитокинов, хемоаттрактантов, молекул адгезии и др. Это не противоречит, а согласуется с данными о том, что при хроническом воспалении над фазой альтерации превалирует фаза экссудации. Фаза экссудации значительная по своей продолжительности, длительно поддерживающая воспаление, при этом недостаточна по своей силе для логичного завершения процесса воспаления. Хроническая активация провоспалительных реакций сопровождается длительной выработкой цитокинов и биологически активных веществ, обуславливающих нарушения микроциркуляции и поддержание воспаления. Поскольку желатиназа В является ферментом клеточного происхождения, очевидно, количественная недостаточность воспалительного инфильтрата приводит к недостаточности показателей активности показателей этого матриксина в зоне хронического воспаления, что, очевидно, не позволяет провести окончательную «санацию» очага, последующую пролиферацию. При этом, реализуется длительная активация цитокинами клеток, которые пролиферируют, синтезируют и секретируют компоненты матрикса, что приводит к фиброзу.

Таким образом, на этапе хронизации экспериментального воспаления эндометрия у крыс наблюдается снижение удельного числа желатиназа-В позитивных клеток и интенсивности их экспрессии в стромально-клеточном компоненте, при практически неизменном уровне указанных параметров в железистом эпителии. Данные показатели на фоне морфологическим признаков

воспаления свидетельствуют об участии изучаемого фермента в хронизации воспаления.

Значимую роль в сдвиге баланса между провоспалительными, деструктивными факторами и противовоспалительными, усиливающими, в первую очередь, пролиферацию являются факторы пероксидации и антиоксидантной защиты. Доказано изменение баланса между процессом пероксидации и активность антиоксидантной защиты в патогенезе многих заболеваний (Зенков Н.К. и др., 2001).

Активный кислород и его производные играют двоякую роль. Они одновременно способны быть, как фактором, направленным на репарацию ткани, так и фактором агрессии. Активные формы кислорода в норме, регулируют рост клеток, пролиферацию, регенерацию, при этом и апоптоз, а также, стимулируют фагоциты для элиминации микробных агентов (C. Esquivel-Chirino, et al., 2013). В том числе активные формы кислорода способны как активировать ММП, так и одновременно с этим активизировать синтез коллагена способствуя фиброзированию ткани (Скляр Л.Ф., 2004; Степанькова Е.А. и др., 2014). Активные формы кислорода принципиально важны для осуществления клеточных функций и их выживания, что достигается активацией таких факторов транскрипции как HIF-1 α . Так же активные формы кислорода играют роль в регуляции активности иммунной системы, активируя синтез и выделение таких цитокинов как TNF- α и интерлейкин1 β (IL-1 β) (B. Poljsak, 2011; Z. Durackova, 2010). Тем не менее чрезмерная продукция активных форм кислорода приводит к срыву в работе антиоксидантной системы и приводит к оксидативному стрессу, проявляющемуся повреждением ДНК, липидов и инициируя развитие многих заболеваний. Ассоциированные с оксидативным стрессом заболевания в настоящее время относятся к малоизученным, но доказана связь пероксидации с нейродегенеративными заболеваниями, клеточным старением, гиперхолестеринемией, гипертензией, атеросклерозом, хроническим воспалением (W. Dröge and H. M. Schipper, 2007; Pinzani, M. 2008; B. Uttara et al., 2009; R. Hutcheson and P. Rocic, 2012; S. A. Noeman et al., 2011).

При этом, активные формы кислорода, могут напрямую изменять посттрансляционную модификацию ионных каналов. Свободные радикалы отвечают за такие специфические стимулы как мембранный потенциал, связывание лигандов, температурные и механические воздействия, которые, в свою очередь воздействуют на сигнальные пути, контролирующие транскрипцию генов и трансляцию, а также пролиферацию (L. Annunziato, A. et al., 2002; Akbarali H., 2014). Ассоциация между изменениями в работе ионных каналов при оксидативном стрессе в основном изучена при кардиоваскулярной и нейродегенеративной патологии (K. Takahashi et al., 2013). Помимо этого, оксидативный стресс непосредственно влияет на интенсивность процессов фиброзирования, морфологические признаки которого наблюдались, как в образцах эндометрия у женщин репродуктивного возраста на фоне хронического эндометрита, так и у крыс с экспериментальным хроническим воспалением эндометрия (Ramírez A.H. et al., 2016).

Проведенные экспериментальные исследования, показывают, что система «перекисное окисление липидов – антиоксидантная защита» в крови у животных с экспериментальным хроническим воспалением эндометрия отличается выраженным дисбалансом, проявляющимся значительной интенсификацией процесса перекисного окисления липидов, при отсутствии ожидаемого увеличения активности антиоксидантных ферментов, которое в данной ситуации могло быть оценено, как защитно-приспособительная реакция. Полученные результаты согласуются с результатами работы Колесниковой Л. И. (2013), Городецкая О.С. Чандра-Д'Мелло Р (2012), в которых так же показавших увеличение интенсивности пероксидации у пациентов с хроническим эндометритом, в работе Степанькова Е.А. и др., (2004), показано увеличение интенсивности пероксидации у пациентов с острыми воспалительными заболеваниями органов малого таза

Данные о взаимосвязи между интенсивностью пероксидации и активностью матриксинов при различной патологии неоднозначны. Так в работе S.C Tyagi H. et al., (1996), показано стимулирующее влияние пероксидации на экспрессию ММП

нетрансформированными фибробластами миокарда и отсутствие усиления экспрессии трансформированными фибробластами на фоне сердечной недостаточности. В работе Шестерниной Н.В. (2011), показано увеличение активности желатиназы В в острую фазу формирования экспериментальной язвы желудка, которое сопровождалось увеличением количества продуктов пероксидации. В работе Sagrario M, Paloma B., Juana B. (2006), показана отрицательная корреляция между уровнем ММП и малоновым диальдегидом у пациентов с болезнью Альцгеймера и когнитивными расстройствами, в работе Peter J. (2010), показано увеличение показателей активности желатиназы В и их корреляция с показателями оксидативного стресса у пациентов на фоне инсульта. Анализ литературных данных показал, что установлены неоднозначные корреляции между уровнем продуктов пероксидации и показателями активности ММП (Viappiani S et al, 2009; Okamoto T et al., 2001). В большинстве случаев, оксидативный стресс оказывает активизирующее влияние на интенсивность экспрессии матриксинов, что является проявлением защитно-приспособительной реакции организма. В случае хронического воспаления эндометрия этот защитный механизм, также оказывается несостоятельным, при этом реализуется порочный патогенетический круг. В частности, лимфоциты, включенные в воспалительный процесс, меняют свои функции и начинают активно продуцировать фактор роста фибробластов, благодаря которому происходит усиленная пролиферация фибробластов, активируется продукция коллагена, что способствует фиброзированию ткани, прогрессированию гипоксии и дальнейшему усугублению оксидативного стресса (Степанькова Е.А., 2004).

Подобные изменения наблюдали в своей работе Никитин П.Н. и др.,(2010) в тканях поджелудочной железы на фоне хронического панкреатита. Авторы обнаружили изменения в соотношении, между металлопротеиназами и их ингибиторами в матриксе поджелудочной железы на фоне ХП способствующие отложению и смене типов коллагена в строме и связали их с выраженным увеличением экспрессии TGF- β 1 - цитокина, который принимает активное участие в фиброгенезе, стимулируя синтез коллагена миофибробластами и

фибробластами (Завалишина Л.Э. и др., 2005) , а также ингибируя активность металлопротеиназ (Shek F.W-T et al., 2002). В отношении TGF- β 1 помимо этого, изучены его прооксидантные влияния (Gabrielli A et al., 2012). TGF- β 1 активирует NOX-4 энзим, который в свою очередь является мощным генератором оксидативного стресса. В ответ на это модулируется синтез белков матрикса, посредством активации специфических киназ таких как JNK, MAPKs, JAKs, c-Src, или экстрацеллюлярных сигнальных регулирующих киназ – ERK. Это приводит к фосфорилированию и увеличению экспрессии соответствующих «генов фиброобразования», которые в свою очередь вновь увеличивают синтез TGF- β 1 (Babalola O et al., 2013). Помимо этого в сигнальном пути, который реализует TGF- β 1 принимает участие ингибитор активатора плазминогена - PAI-1, вовлеченный в свою очередь в фиброгенез, путем супрессии деградации матрикса металлопротеиназами (Samarakoon R et al., 2013). Таким образом, оксидативный стресс способен усиливать пролиферацию и дифференцировку фибробластов, и синтез коллагена, а также снижать интенсивность деградации матрикса.

Известно, что желатиназа В является Са-зависимым ферментом. Помимо этого, в отдельных работах высказывается предположение о влиянии магния на активность желатиназы В (Громова О.А. и др., 2008; Старовойтов В.А. и др., 2011, Шестернина Н.В. др., 2011).

В целом, можно обозначить 3 пути посредством которых магнийзависимые белки, а следовательно, и сам магний, могут влиять на физиологические и патологические процессы:

- 1) сдвиг баланса между процессами деструкции и пролиферации в тканях;
- 2 энергетический метаболизм и обмен веществ;
- 3) состояние конкретных физиологических систем (костной, мышечной, соединительной);
- 4) пролиферация клеток и апоптоз;
- 5) стабильность генома (Rubin H., 2003; Дадак К. и др., 2014).

Большинство ферментов, которые вовлечены в репарацию ДНК являются магний-зависимыми. Дефицит магния приводит к увеличению числа

дисфункциональных молекул тРНК, снижая и замедляя общую скорость белкового синтеза, таким образом с одной стороны замедляя процессы деструкции поврежденных тканей, с другой стороны, создавая неблагоприятные условия для пролиферации (Feig A.L., 2001; Рогова Л.Н, 2001; J.R. Moll et al., 2002; Трошин И.Ю.,2008). Усиление пролиферации является энергозависимым процессом и в свою очередь сопряжено с формированием специализированных магниевых TRPM-6, TRPM-7 ионных каналов. TRPM-6 регулирует содержание магния на организменном уровне, влияя на реабсорбцию магния почками. TRPM-7 регулирует содержание магния на клеточном уровне, а так же селективен по отношению к ионам кальция. Работа этих каналов прям связана с процессом пролиферации, а также, фиброзом. Увеличение числа и активности этих каналов способствует синтезу белковых компонентов матрикса под влиянием цитокинов. А «молчание» этих каналов способствует деградации коллагена ВКМ при помощи матриксных металлопротеиназ, посредством активизации ММП и подавления их тканевых ингибиторов (Ramírez, A. et al., 2016). Между тем, известно, что нарушение баланса между деградацией матрикса металлопротеиназами и синтезом коллагена фибробластами приводит к нарушению морфологии тканей. Преобладания активности матриксинов приводит к чрезмерной деградации ткани, в то время как преобладание синтеза коллагена приводит к фиброзу.

В литературе есть единичные сведения, в которых приводятся данные, указывающие, что оптимальное содержание магния в ткани, с одной стороны, усиливает энергообразование, необходимое для усиления пролиферации, с другой стороны, может являться одним из механизмов регуляции активности металлопротеиназ (Рогова Л.Н. и др.,2011).

В связи со значимой ролью магния в активации ферментов энергообразования, энергопотребления и регулирования синтеза белков, включая ферменты антиоксидантной защиты, нами была определено содержание магния в эритроцитарной массе крови из НПВ и ПКВ и плазме крови из ПКВ у подопытных животных. На фоне хронического экспериментального хронического воспаления эндометрия в эритроцитарной массе крови из НПВ и ПКВ, плазме крови

ПКВ отмечалось достоверное снижение уровня магния. При проведении корреляционного анализа выявлена прямая сильная взаимосвязь между показателями содержания внутриэритроцитарного магния в крови из НПВ и ПКВ и удельным числом желатиназа В-позитивных клеток в тканях эндометрия.

При этом не обнаружено достоверной разницы в содержании кальция в указанных группах. Это объяснимо тем фактом, что в связи со значимой ролью кальция как вторичного мессенджера, множество механизмов принимают участие в поддержании гомеостаза кальциевого обмена, поэтому колебания кальция в периферической крови чрезвычайно малы.

Обнаруженные нами уменьшение удельного числа и интенсивности экспрессии желатиназа В-позитивных клеток в структурах эндометрия, гипомagneстия, гипомagneзиемия, очевидно, выступают как факторы хронизации экспериментального воспаления и фиброзирования.

Учитывая выявленные изменения в магниевом гомеостазе, литературные данные о значимом участии магния в регуляции процессов репарации и тот факт, что в литературе неоднократно описан положительный эффект магнийсодержащих препаратов и композиций при различной патологии (Рогова Л.Н., 2001; Спасов А.А., 2003; Трошин И.Ю. и др., 2008).

В эксперименте, и затем в клинике, проведена оценка эффективности патогенетической терапии хронического воспаления эндометрия магнийсодержащими препаратами.

После применения МСК уровень магния в эритроцитарной массе в крови из НПВ вырос на 26%, , в эритроцитарной массе в крови из подключичной вены на 21%,. Обращает на себя внимание, более интенсивное увеличение содержания магния в эритроцитарной массе из НПВ, в сравнении с приростом этого показателя в эритроцитарной массе в крови из ПКВ. Видимо, это связано с формированием большего числа TRPM-7 транспортных каналов в клетках в зоне хронического воспаления и перераспределением магния в пользу ткани, в которой требуется интенсификация процессов завершения воспаления.

На фоне применения магнийсодержащей композиции у крыс с эХВЭ по отношению к группе без применения МСК увеличилось число макрофагов, лимфоцитов, число нейтрофилов осталось практически неизменным, появилась тенденция к уменьшению числа плазмоцитов. Нормализация уровня эозинофилов, отражающая функциональное состояние надпочечников, в частности уровень глюкокортикоидов, высокое содержание плазмоцитов, увеличение макрофагальной и лимфоцитарной инфильтрации, видимо, создает предпосылки для активизации иммунных защитных реакций, оптимизации уровня стрессовых гормонов, уровня гуморальных и клеточных антител, эффективности фагоцитоза и, как следствие, усиления репарации тканей эндометрия.

Установлено, что после применения МСК снижается интенсивность пероксидации у крыс с экспериментальным эндометритом, о чем свидетельствует уменьшение содержания ДК на 21 %, а МДА на 25%, при этом активность каталазы выросла на 12%.

На фоне использования МСК отмечалось не только увеличение содержания внутриэритроцитарного магния, но и статистически значимое увеличение удельного числа и интенсивности экспрессии желатиназа-В позитивных клеток в элементах стромы на фоне незначительных изменений указанных показателей в железистом эпителии.

В клинике, при иммуногистохимическом исследовании в образцах эндометрия, полученных у женщин после проведения курса электрофореза с 10% сульфатом магния наметилась тенденция к увеличению показателей активности желатиназы В. Прирост удельного числа по нашим данным составил 25%. Интенсивность экспрессии в стромально-клеточном компоненте имела тенденцию к росту, но в железистом эпителии мы не наблюдали статистически значимых изменений в указанных параметрах. При этом, сохранялась статистически достоверная разница по показателям активности желатиназы В в группе после лечения в сравнении с исходным состоянием. Увеличение количества макрофагов и эозинофилов при сохранении слабой лимфо-плазмоцитарной инфильтрации эндометрия может быть расценено, как продолжающийся процесс воспаления, но

с тенденцией к интенсификации защитных механизмов. А в совокупности с интенсификацией экспрессии желатиназы В появилась тенденция к нормализации морфологии тканей. Это, очевидно, опосредованно усилением обмена белков межклеточного матрикса в противовес длительносуществующему накоплению структурных компонентов матрикса, приводящих к фиброзу.

Полученные на клиническом этапе исследования данные о низкой эффективности стандартной терапии в клинике, согласуются с работами Fedorova T.A., Moskvina S. V. (2009); Дубницкая Л.В., (2007); Хашукоева А.З., (2012), в которых, так же, показана низкая эффективность антибактериальной терапии ХЭ. Необходимо признать несостоятельной практику терапии хронического эндометрита преимущественно антибактериальными препаратами, поскольку, учитывая современные данные, о спорной роли микробных агентов, как об этиологическом факторе хронического эндометрита, становится ясной причина низкой эффективности стандартной антибактериальной терапии.

Таким образом, под влиянием магнийсодержащей композиции восстанавливается до исходных показателей удельное число, интенсивность экспрессии желатиназы В позитивных клеток, содержание магния в эритроцитах крови из разных регионов, сопровождающееся восстановлением эозинофильно-лимфоплазмочитарной и увеличением макрофагально-лимфоцитарной инфильтрации.

Исходя из литературных данных о роли желатиназы В, магния, пероксидации в ремоделировании ткани можно сделать вывод, что восстановление исходных показателей активности экспрессии желатиназы В внутриклеточного магния, снижение интенсивности пероксидации, увеличение активности каталазы являются фактором способствующим репарации ткани после повреждения. Нормализация уровня эозинофилов и плазмочитов, увеличение макрофагальной и тенденция к уменьшению лимфоцитарной инфильтрации, можно расценивать как предпосылки для активизации иммунных защитных реакций, оптимизации уровня стрессовых гормонов, уровня гуморальных и клеточных механизмов регенерации.

ВЫВОДЫ

1. В тканях эндометрия на этапе хронизации экспериментального воспаления у крыс и в образцах, полученных у женщин с повторяющимися неудачами имплантации, на фоне морфологических признаков хронического эндометрита, наблюдается снижение удельного числа желатиназа-В позитивных клеток и интенсивности их экспрессии в стромально-клеточном компоненте, при практически неизменном уровне указанных параметров в железистом эпителии. При этом показатели плазмоцитарной инфильтрации отрицательно коррелируют с удельным числом желатиназа В-позитивных клеток в стромально-клеточном компоненте эндометрия.
2. На этапе хронизации экспериментального воспаления эндометрия в крови, оттекающей от поврежденных тканей, отмечается активизация перекисного окисления липидов, проявляющаяся возрастанием содержания диеновых конъюгатов и малонового диальдегида, на фоне практически неизменной активности каталазы в крови из нижней полой вены. Содержание малонового диальдегида отрицательно коррелирует с удельным числом желатиназа В-позитивных клеток в стромально-клеточном компоненте эндометрия.
3. При экспериментальном хроническом воспалении эндометрия снижается содержание магния в эритроцитарной массе и плазме крови из нижней полой и подключичной вены, с более интенсивным снижением уровня внутриэритроцитарного магния в эритроцитарной массе крови нижней полой вены, при неизменном содержании кальция в плазме крови. Содержание магния в эритроцитарной массе крови из нижней полой вены положительно коррелирует с удельным числом желатиназа В-позитивных клеток в стромально-клеточном компоненте эндометрия.
4. Применение у крыс при экспериментальном хроническом воспалении эндометрия магнийсодержащей композиции приводит к увеличению содержания магния в эритроцитарной массе крови из разных регионов, уменьшению содержания диеновых конъюгатов и малонового диальдегида, и увеличению

активности каталазы в крови из нижней полой вены. А так же, увеличению удельного числа, интенсивности экспрессии желатиназа В-позитивных клеток, числа макрофагов, лимфоцитов, и уменьшению числа плазмоцитов и эозинофилов в стромально-клеточном компоненте эндометрия, что отражает активацию более эффективных механизмов воспаления.

5. В образцах эндометрия, полученных у женщин с хроническим эндометритом после применения стандартной терапии, удельное число и интенсивность экспрессии желатиназы В оставались неизменными, в то время, как в образцах, полученных у женщин после проведения в комплексе со стандартной терапией электрофореза 10% сульфата магния увеличивается удельное число и интенсивность экспрессии желатиназы В в стромально-клеточном компоненте эндометрия, а также увеличивается количество макрофагов и уменьшаются показатели плазмocитарно-лимфоцитарной инфильтрации.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Пациентам с ХЭ рекомендовано назначение препаратов магния в комплексе со стандартной терапией, с целью увеличения эффективности механизмов репарации ткани.
2. У пациентов групп риска по возникновению ХЭ рекомендовано определять содержание магния внутри эритроцитов периферической крови, для своевременного выявления его дефицита и соответствующей коррекции, как метода профилактики возникновения ХЭ.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ВЗОМТ – воспалительные заболевания малого таза
- ВКМ – внеклеточный матрикс
- ДК – диеновые конъюгаты
- КА – каталаза
- МДА – малоновый диальдегид
- ММП-9 – матриксная металлопротеиназа 9, желатиназа В
- МСК – магнийсодержащая лекарственная композиция
- НПВ - нижняя полая вена
- ПКВ – подключичная вена
- ПОЛ – перекисное окисление липидов
- ПТГ – паратиреоидный гормон
- ТИМП – тканевый ингибитор металлопротеиназы
- ХЭ – хронический эндометрит
- эХВЭ - экспериментальное хроническое воспаление эндометрия
- Ca^{2+} – ионы кальция
- Mg^{2+} – ионы магния

ЛИТЕРАТУРА

1. Активаторы плазминогена и матриксные металлопротеиназы в экспериментальном ремоделировании артерий / О.С.Плеханова [и др.] // Кардиология. - 2006. – Т. 46, № 9. - С. 47-56.
2. Балханов, Ю. С. Возможности восстановления морфофункциональной способности эндометрия у женщин с невынашиванием беременности : автореф. дис. ... канд. мед. наук / Ю. С. Балханов. - Пермь, 2009. - 23 с.
3. Барановский, А. Ю. Дисбактериоз и дисбиоз кишечника / А. Ю. Барановский, Э. А. Кондрашина. – СПб.: Питер. – 2000. - С. 17.
4. Берк, Б. С. Акт в экспериментальном ремоделировании артерий / Б. С. Берк // Кардиология. - 2006. - Т. 46, № 9. - С. 47-56.
5. Биологическая, роль магния в акушерстве и гинекологии: научные данные и клиническое исследование / А. Н. Стрижаков [и др.] // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2009. - Т. 8, № 3. - С. 5-18.
6. Бойчук, Н. В. Особенности предгравидарной подготовки, течение беременности и родов у женщин с привычным невынашиванием на фоне хронического эндометрита: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Н. В. Бойчук. - Иркутск, 2008. - 25 с.
7. Владимиров, Ю. А. Свободные радикалы в биологических системах / Ю. А. Владимиров // Соровский образовательный журнал. - 2000. - Т. 6, вып. 12. - С. 1319.
8. Возможности лазерной доплеровской флоуметрии в оценке расстройств микроциркуляции при ангиодисплазиях / [С. В. Сапелкин и др.] // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2007. - № 4. – С. 46-50.
9. Воронкина, И. В. Модуляция функциональ регенерации тканей под действием матриксных металлопротеиназ: дис. ... канд. биол. наук / И. В. Воронкина. – СПб., 2003. - 135 с.

10. Воспаление (патофизиологические аспекты) : уч. метод. пособие / Ф. И. Висмонт. – Мн.: БГМУ, 2006. – 48 с.
11. Гайдуков, С. Н. Гинекология : учебник для вузов / под ред. Г. М. Савельевой, В. Г. Бреусенко. - М. : ГЭОТАР. - Медиа, 2004. - 480 с
12. Гиниатуллин, Р. У. Морфофункциональная характеристика компонентов экстрацеллюлярного матрикса эндометрия при его хроническом воспалении у пациенток с бесплодием / Р. У. Гиниатуллин // Медицинская наука и образование Урала. – 2012. – Т. 13, № 3-1(71). – С. 63-65.
13. Гомболевская, Н. А. Современные критерии диагностики хронического эндометрита: (обзор литературы) / Н. А. Гомболевская, Л. А. Марченко // Проблемы репродукции. - 2012. - Т. 18, № 1. - С. 426.
14. Гончаренко, М. С. Простаноиды и лейкотриены как факторы, приводящие к изменению сосудов / М. С. Гончаренко, Ю. В. Сидорова, С. В. Сидоренко // Дерматология: респ. сборник. - Киев. - 1983. - Вып. 18. - С. 36 - 40.
15. Городецкая, О. С. Влияние общей магнитотерапии на перекисное окисление липидов и антиоксидантную систему защиты у больных с хроническим эндометритом / О. С. Городецкая, Р. Чандра- Д'Мелло // Медицинский альманах. - 2012. – С. 4.
16. Громова, О. А. Дефицит магния как проблема современного питания у детей и подростков / О. А. Громова // Педиатрическая фармакология. – 2014. - № 1. - С. 20-30.
17. Данусевич, И. Н. основных звеньев иммунной системы у женщин с репродуктивными нарушениями на фоне хронического эндометрита и при его отсутствии // И. Н. Данусевич, Л. С. Козлова // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. - 2012. - № 3-2.
18. Дисбаланс в системе «Матриксные металлопротеиназы - тканевой ингибитор матриксных металлопротеиназ» и характер течения постинфарктного

ремоделирования миокарда левого желудочка / Н. Н. Нестерова [и др.] // Здоровье—основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения. - 2013. - № 1. - С. 420-424.

19. Доценко, О. И. Актуальность супероксиддисмутазы и каталазы в эритроцитах и некоторых тканях мышц в условиях низкочастотной вибрации / О. И. Доценко, В. А. Доценко, А. М. Мищенко // Физика живого. - 2010. - Т. 8. - № 1. - С. 107-113.

20. Дубницкая, Л. В. Хронический эндометрит: возможности диагностики и лечения / Л. В. Дубницкая, Т. А. Назаренко // Репродуктивное здоровье женщины. - 2007. - Т. 9, № 6. С. 7-10.

21. Духин, А. М. Хронические воспалительные заболевания органов малого таза: контраверсии сегодняшнего дня / А. М. Духин, В. А. Любешкина, Е. В. Тараскина // Вестник РУДН. Серия: Медицина. - 2013. - № 5. - С. 201-209.

22. Есенова, И. И. В центре внимания препараты магния / И. И. Есенова // РФК. - 2011. - № 4.

23. Завалишина, Л. Э., Петров А. Н., Андреева Ю. Ю. // Архив патологии. - 2005. - Т. 67, № 6. - С. 21-24.

24. Зенков, Н. К. Окислительный стресс: Биохимические и патофизиологические аспекты / Н. К. Зенков, Е. Б. Меньшикова, Р. Ш. Шершин. - М.: Наука, 2001. - 343 с.

25. Изменение состояния микроциркуляторного русла у пациенток с хроническим эндометритом под влиянием контрастного массажа / А. Х. Гайдарова [и др.] // Физиотерапия, бальнеология и реабилитация. - 2015. - № 2. - С. 36-40.

26. Изменения показателей иммунитета у пациенток с невынашиванием беременности инфекционного генеза в I триместре / О. В. Макаров [и др.] // Российский вестник акушера-гинеколога. - 2008. - № 6. - С. 29-32.

27. Илизарова, Н. А. Привычное невынашивание беременности : патоморфологический анализ эндометрия, клинические особенности и обоснование стратегии терапии: автореф. дис ... д-ра мед. наук / Н. А. Илизарова. - Новосибирск, 2009. - 29 с.
28. Иммуноморфологические особенности эндометрия у женщин с нарушением репродуктивной функции (обзор литературы) / [М. И. Бязина [и др] // Сибирское медицинское обозрение. - 2013. - № 2 (80). - С. 62-66.
29. Иммуноморфологическое исследование внеклеточного матрикса при хроническом панкреатите / П. Н. Никитин [и др.] // Вестник РГМУ. - 2010. - № 4.
30. Ищенко, Л. С. Клинико-морфологические аспекты и пути оптимизации терапии хронического эндометрита : автореф. дис. ... канд. мед. наук / Л. С. Ищенко. - Челябинск, 2007. - 25 с.
31. Карпищенко, А. И. Особенности перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты системы свободнорадикального окисления и антиоксидантной защиты как индикаторы активности пролиферации кератиноцитов при псориазе / А. И. Карпищенко, В. Г. Антонов, Р. А. Грашин // Клиническая лабораторная диагностика. - 2010. - № 1. - С. 18-24.
32. Кирпичникова, К. М., Смагина Л. В., Гамалей И. А // Цитология. - 2008. - Т. 50, № 10. - С. 877-881.
33. Клинические и биохимические аспекты применения препаратов магния в акушерстве, гинекологии и перинатологии / К. Дадак [и др.] // Акушерство, гинекология и репродукция. - 2014. - № 2.
34. Кобаидзе, Е. Г. Нарушение функции эндометрия при хронических воспалениях матки / Е. Г. Кобаидзе, М. М. Падруль // Пермский медицинский журнал. - 2014. - № 5.
35. Метод определения активности каталазы / М. А. Королук [и др.] // Лаб. дело. - 1988. - № 1. - С. 16-41.

36. Костюк, В. А. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина / В. А. Костюк, А. И. Потапович, Ж. В. Ковалева // Вопр. мед. химии. - 1990. - Т. 36, № 2. - С. 88-91
37. Кулаков, В. И. Хронический эндометрит / В. И. Кулаков, А. В. Шуршалина // Гинекология. - 2005. - Т. 7, № 5. - С. 7-10.
38. Лазерная доплеровская флоуметрия в изучении состояния микроциркуляторного русла у гинекологических больных / Л. В. Адамян [и др.] // Проблемы репродукции. – 2006. - № 1. - С. 21-30.
39. Лайнен, Г. Р. Матричные металлопротеиназы и фибринолитическая активность клеток. (Обзор) / Г. Р. Лайнен // Биохимия. - 2002. - Т. 67, № 1. - С. 107-115.
40. Лапач, С. Н. Статистика в науке и бизнесе / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. - Киев.: «МОРИОН», 2002. - 640 с.
41. Лебедев, В. А. Современные принципы терапии больных с хроническим эндометритом / В. А. Лебедев, В. М. Пашков, И. А. Клиндухов // Трудный пациент. - 2012. - № 5.
42. Лебедев, К. А. Физиология воспалительных процессов и их лечение // К. А. Лебедев, И. Д. Понякина, Н. В. Козаченко // Физиология человека. - 2005. - Т. 31, № 1. - С. 100-113.
43. Лебедева, С. А. Фармакологическое изучение комплексного препарата на основе магнийсодержащего минерала бишофит с добавлением солей железа, цинка и меди : дис. ... канд. биол. наук / С. А. Лебедева. - М.:ПроСофт, 2005. - 246с.
44. Левицкий, Д. О. Кальций и биологические мембраны: монография / Д. О. Левицкий. – М.: Высш. школа, 1990. - 124 с.

45. Лечение хронического эндометрита в предгравидарной подготовке женщин с невынашиванием беременности: пособие для врачей / В. И. Краснопольский [и др.]. - М., 2007. - С. 25.
46. Литвицкий, П. Ф. Воспаление / П. Ф. Литвицкий // Вопросы современной педиатрии. - 2006. – Т. 5, № 4. – С. 75-81.
47. Лузин, А. А. Оптимизация врачебной тактики у женщин с аномальными маточными кровотечениями, ассоциированными с хроническим эндометритом: автореф. дис. ... канд. мед. наук / А. А. Лузин. - Омск, 2009. - 23 с.
48. Лукьянчиков, В. С. Кальций: физиология. Онтогенетический и клинический аспект/ В. С. Лукьянчиков // Новые исследования. - 2012. - № 2 (31).
49. Любезнова, О. Н. Лайм-боррелиоз: ожидания и прогнозы. Паллиативная медицина и реабилитация / О. Н. Любезнова, А. Л. Бондаренко. - 2012. - № 4. - С. 47-50.
50. Мальцева, Л. И. Хронический эндометрит и тазовая боль / Л. И. Мальцева, Г. Р. Смолина, Е. Ю. Юпатов // Акушерство, гинекология и репродукция. - 2012. - № 3.
51. Маматиева, М. А. Оценка метаболического резерва фагоцитов и антиоксидантной активности крови при привычном невынашивании беременности в I триместре: автореф. дис. ... канд. мед. наук / М. А. Маматиева. - М., 2009. - 28 с.
52. Микроэлементозы человека: этиология, классификация, органопатология / А. П. Авцин [и др.]. - М., 1991. – 496 с.
53. Морфофункциональная характеристика рецептивности слизистой оболочки матки при хроническом эндометрите / Е. Л. Казачков [и др.] // Научные ведомости БелГУ. Сер.: Медицина. Фармация. - 2013. - № 25. – С. 168.

54. Михнина, Е. А. Морфофункциональное состояние эндометрия у женщин с бесплодием и невынашиванием беременности : автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Е. А. Михнина. – СПб., 2009. - 40 с.
55. Молекулярные механизмы регуляции магнием плацентарных белков / О. А. Громова [и др.] // Рос. вестн. акушера-гинеколога. – 2008. - № 6. – С. 9-17.
56. Мотовилова, Т. М. Альтернативный подход к лечению больных с хроническим неспецифическим эндометритом / Т. М. Мотовилова, Т. С. Качалина, Т. А. Аникина // РМЖ. - 2013. - № 14. - С. 751
57. Рогова, Л. Н. Роль магния и желатиназы в формировании / В. М. Никонов. - М., 1988.
58. Ноздрачев, А. Д. Анатомия крысы (лабораторные животные) /А. Д. Ноздрачев, Е. Л. Поляков; под ред. акад. А. Д. Ноздрачева. - СПб.: Лань, 2001. - 464 с.
59. Озолия, Л. А. Выбор метода лечения воспалительных заболеваний органов малого таза у женщин / Л. А. Озолия, Н. Н. Праведников // Лечение и профилактика. - 2012. - № 1 (2). - С. 65-69.
60. Озолия, Л. А. Современный взгляд на этиологию, патогенез, клинику и лечение воспалительных заболеваний органов малого таза у женщин (обзор литературы) / Л. А. Озолия, Н. Н. Праведников, Н. Р. Овсепян // Вестник РГМУ. - 2013. - № 2. - С. 47-52.
61. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты / Е. Б. Меншикова [и др.] - М. : «Слово», 2006. - 503 с.
62. Пат. №2580986. Российская Федерация. Способ моделирования экспериментального хронического воспаления эндометрия у крыс / К. Ю. Тихаева, Л. Н. Рогова, Л. В.Ткаченко; заявитель и патентообладатель: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального

образования "Волгоградский государственный медицинский университет"
Министерства здравоохранения Российской Федерации

(RU). – 2015105650 / 14; заявл.18.02.2015; опубл. 10.04.2016. Бюл. № 10. – 9 с.

63. Петров, Ю. А. Реализация репродуктивной функции после лечения хронического эндометрита / Ю. А. Петров // Материалы VI Международного конгресса по репродуктивной медицине. - М., 2012. - С. 140-141.

64. Петров, Ю. А. Современные аспекты лечения хронического эндометрита / Ю. А. Петров // Фундаментальные исследования. – 2011. - № 11 (часть3). - С. 563-565.

65. Петров, Ю. А. Эффективность комплексной терапии в лечении женщин с хроническими воспалительными заболеваниями гениталий / Ю. А. Петров, Н. Х. Синдеропулос // Материалы V Международного конгресса по репродуктивной медицине. - М., 2011. - С. 149.

66. Пигарова, Е. А. Физиология обмена кальция в почках / П. Е. Пигарова // Ожирение и метаболизм. - 2011. - № 4.

67. Поветкина, В. Н. Особенности магниевого баланса у стрессустойчивых стресснеустойчивых крыс и его роль в механизмах формирования ацетатной и стрессовой язвы желудка / В. Н. Поветкина, Л. Н. Рогова // ВНМТ. - 2011. - № 2

68. Показатели крови и лейкоцитарного индекса интоксикации в оценке тяжести и определении прогноза при воспалительных, гнойных и гнойно-деструктивных заболеваниях / В. К. Островский [и др.] // Клин. лаб. диагностика. - 2006. - № 6. - С. 50–53

69. Полуколичественная морфологическая оценка активности воспалительного процесса при хроническом эндометрите / О. А. Алимова, Е. Е. Воропаева Э. А. Казачкова, Е. Л. Казачков // Матер. Всерос. науч.-практ конф. «Актуальные проблемы патологоанатомической службы муниципальных учреждений здравоохранения». - Челябинск, 2008. - С. 198-201.

70. Потеряева, О. Н. Матриксные металлопротеиназы: строение, регуляция, роль в развитии патологических состояний обзор литературы) / О. Н. Потеряева // Медицина и образование в Сибири. - 2010. - № 5. - С. 7.
71. Плясунова, М. П. Хронический эндометрит как одна из актуальных проблем в современной гинекологии / М. П. Плясунова, С. В. Хлыбова // Вятский медицинский вестник. - 2013. - № 1.
72. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 1 ноября 2012 г. N 572 н "Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи по профилю акушерство и гинекология» (за исключением использования вспомогательных репродуктивных технологий с изменениями и дополнениями).
73. Применение антиоксидантной терапии для коррекции оксидативно-антиоксидантного дисбаланса у женщин с острыми воспалительными заболеваниями органов малого таза / Е. А. Степанькова [и др.] // Журнал акушерских и женских болезней. - 2006. - № 4.
74. Протасов, М. В. Зависимость активности ММП в раневом экссудате крыс от состояния тканей раны на начальных этапах раневого процесса / М. В. Протасов [и др.] // Цитология. - 2008. - Т. 50, № 10. - С. 882-886.
75. Пчелинцев, В. П. Перекисное окисление липидов и вариабельность сердечного ритма у больных ишемической болезнью сердца с пароксизмальной формой фибрилляции предсердий / В. П. Пчелинцев, И. В. Симагин // Успехи современного естествознания. - 2008. № 5. - С. 48-50.
76. Радзинский, В. Е. Прогестеронобусловленные изменения провоспалительных цитокинов при привычном невынашивании беременности / В. Е. Радзинский, Е. Ю. Запертова // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. - 2004. - № 13. - С. 764-766.
77. Распространенность дефицита магния у беременных женщин, наблюдающихся в условиях амбулаторной практики / А. Д. Макацария [и др.] // Вопросы гинекологии акушерства и перинатологии. – 2012. - № 11. - С. 25-34.

78. Решетникова, Н. С. Современные аспекты этиопатогенеза воспалительных заболеваний органов малого таза / Н. С. Решетникова // Вестник БГУ. - 2010. - № 12. - С. 260-263.
79. Рогов, В. А. Определение стабильности суппозитория с бишофитом : дипломная / В. А. Рогов. - Волгоград, 2007. - 95 с.
80. Рогова, Л. Н. Влияние бишофита на макроэлементный баланс в тканях желудка крыс при его эрозивно-язвенных повреждениях / Л. Н. Рогова //
81. Рогова, Л. Н. Макро- и микроэлементы в патогенезе экспериментальных эрозивно-язвенных повреждений желудка и их коррекция: дис. ... д-ра мед. наук : 14.00.16 / Л. Н. Рогова. - Ростов-н / Д., 2001. - 271 с.
82. Роль дефицита магния в акушерстве и гинекологии (позиция экспертов) // Акушерство и гинекология. – 2014. - № 1.
83. Рыбакова, Л. П. Состояние оксидантной–антиоксидантной системы при базальной и скрытой гипергомоцистеинемии у больных атеросклерозом нижних конечностей / Л. П. Рыбакова, Л. П. Папаян, Н. Б. Салтыкова // Вестн. хирургии им. И. И. Грекова. - 2008. - № 6. - С.48-51.
84. Самородинова, Л. А. Методика создания экспериментального инфекционного сальпингита / Л. А. Самородинова //Бюлл. эксперим. биол. и медицины. - 1966. - № 2. - С. 123-124.
85. Серова, О. Ф. Лечение пациенток с хроническим эндометритом перед проведением экстракорпорального оплодотворения / О. Ф. Серова, Н. В. Зароченцева, М. В. Капустина // Рос. вестн. акушера-гинеколога. – 2008. - № 5. - С. 80-82.
86. Сидельникова, В. М. Подготовка и ведение беременности у женщин с привычным невынашиванием / В. М. Синельникова. - М.: МЕДпресс-информ, 2010. - 224 с.

87. Силантьева, Е. С. Физические методы структурно-функционального ремоделирования эндометрия у женщин с нарушением репродуктивной функции: автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Е. С. Силантьева. – М., 2008. – 48 с.
88. Скляр, Л. Ф. Цитокиновый профиль и фиброгенез при хроническом вирусном гепатите С / Л. Ф. Скляр // Фундаментальные исследования. – 2004. – № 1. – С. 85-85.
89. Сковородникова, Н. Г. Клинические аспекты хронического эндометрита / Н. Г. Сковородникова // Сборник статей по материалам 70-й юбилейной итоговой научной студенческой конференции им. Н. И. Пирогова / под ред. В. В. Новицкого, Л. М. Огородовой. - Томск, 2011. - 430 с .
90. Соболева, Г. М. Активность матриксных металлопротеиназ-2 и 9 в сыворотке крови / Г. М. Соболева, А. В. Шуршалина, Г. Т. Сухих // Бюл. эксперимент. биологии и медицины: ежемесячный межд. научно-теоретический журнал / РАМН. – 2006. –Т. 141, № 2 . – С. 210-213.
91. Соловьева, Н. И. Матриксные металлопротеиназы и их биологические функции (обзор) / Н. И. Соловьева // Биоорганическая химия. – 1998. - Т. 24, № 4. - С. 245-255.
92. Спасов, А. А. Местная терапия бишофитом: монография / А. А. Спасов; под ред. проф. А. А. Спасова. - Волгоград, 2003 – 160 с.
93. Старавойтов, В. А. Патогенетическое обоснование применения магнийсодержащей лекарственной композиции при лечении экспериментальной язвы желудка / В. А. Старавойтов, Л. Н. Рогова, А. В. Смирнов // ВНМТ. - 2009. - № 2.
94. Степанькова, Е. А. Коррекция оксидативно-антиоксидантного дисбаланса при острых воспалительных заболеваниях органов малого таза у женщин / Е. А. Степанькова, Н. К. Никифоровский, В. Г. Подпригорова // Вопр. гинекол., акуш. и перинат. - 2004. - Т. 3, № 6. - С. 17-23.

95. Стругацкий, В. М. Физиотерапия в практике акушера-гинеколога: Клинические аспекты и рецептура / В. М. Стругацкий, Т. Б. Маланова, К. Н. Арсланян. – М.: МЕД пресс-информ, 2005. – 208 с.
96. Тихоновская, О. А. Моделирование острого и хронического воспаления придатков матки / О. А. Тихоновская // Молодежь и научно-технический прогресс: тез. докл. - Томск, 1986. - С. 76.
97. Тканевой ингибитор матриксных металлопротеиназ-1 (TIMP-1) как независимый маркер ишемического ремоделирования миокарда при хронической сердечной недостаточности / А. Т. Тепляков [и др.] // СМЖ. - 2014. - № 2. – С. 28-34.
98. Трисветова, Е. Л. Стратегия и тактика лечения пациентов с наследственными нарушениями соединительной ткани / Е. Л. Трисветова // Международные обзоры: клиническая практика и здоровье. - 2015. - № 2 (14). - С. 80-92.
99. Трошин, И. Ю. Дисплазия соединительной ткани, магний и нуклеотидные полиморфизмы / И. Ю. Трошин, О. А. Громова // Кардиология. - 2008. - № 10. - С. 14-21.
100. Уткин, Е. В. Воспалительные заболевания органов малого таза у женщин: современные особенности клиники, диагностики и терапии / Е. В. Уткин // МиД. - 2009. - № 3.
101. Файзуллина, Р. А. Влияние микроэлементных нарушений на состояние перекисного окисления липидов при хронических гастроуденитах у детей / Р. А. Файзулина // Педиатрия. - 2002. - № 3. - С. 44-48.
102. Хасигов, П. З. Металлопротеиназы матрикса нормальных тканей человека (обзор) / П. З. Хасигов, О. В. Подобед // Биохимия. – 2001. – Т. 66. –
103. Хронический эндометрит – проблема и решения / А. З. Хашукоева [и др.] // Гинекология. Коллоквиум. - 2012. - № 3. - С. 34–38.

104. Цаллагова, Л. В. Роль хронического эндометрита в генезе бесплодия / Л. В. Цаллагова, И. В. Кабулова, И. А. Золоева // Кубанский научный медицинский вестник. - 2014. - № 4. – С. 131-133
105. Черешнева, М. В. Иммунологические механизмы локального воспаления / М. В. Черешнева, В. А. Черешнев // Медицинская иммунология. - 2011. - № 6. – С 557-568.
106. Чеснокова, Н. П. Молекулярно-клеточные механизмы инактивации свободных радикалов в биологических системах / Н. П. Чеснокова, Е. В. Понукалина, М. Н. Безинкова // Успехи современного естествознания. - 2006. - № 7. - С. 29-36.
107. Шуршалина, А. В. Хронический эндометрит: современные взгляды на проблему /А. В. Шуршалина // Consilium Medicum. Женское здоровье. - 2011. – Т. 13, № 6. - С. 36–39.
108. Экспрессия рецепторов эндометрия к эстрогенам и прогестерону при бесплодии, обусловленном хроническим эндометритом / А. Р. Котиков [и др.] // Проблемы репродукции. - 2006. - № 2. - С. 7-10.
109. Ярмолинская, М. И. Матриксные металлопротеиназы и ингибиторы: классификация, механизм действия / М. И. Ярмолинская, А. С. Молотков В. М. Денисова // Журнал акушерства и женских болезней. - 2012. - № 1.
110. Molecular Biology of the Cell / B. Alberts , A. Johnson, J. Lewis [et al.] - 4th edition. - Garland Science, 2002.
111. The effect of glycosaminoglycans and proteoglycans on lipid peroxidation / R. Albertini, A. Passi, P. M.Abuja [et. al.] // Int. J. Mol. Med. - 2000. –
112. Andrews, W.W. Endometrial microbial colonization and plasma cell endometritis after spontaneous or indicated preterm versus term delivery / W.W Andrews., R. L.Goldenberg, J. C. Hauth // Am. J. Obstet. Gynecol, 2005. – Vol. 193, N 3. - Pt. 1. - P. 739-745.

113. Matrix metalloproteinases in impaired wound healing / U. Keller, F. Sabino // *Metalloproteinases In Medicine*. - 2015. - P. 1.
114. Modulation of ion channels by reactive oxygen and nitrogen species: a pathophysiological role in brain aging? / L. Annuziato, A. Pannaccione, M. Cataldi [et al.] // *Neurobiology of Aging*. –2002. - Vol. 23, N 5. – P. 819-834.
115. Akbarali, H. “Oxidative stress and ion channels,” in *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants* / H. Akbarali. - Springer, Germany, Berlin, 2014. - P. 353-373
116. Adgeboeva, P. A. Relationship between eosinophils and chronic endometritis / P. A. Adgeboeva. Y. Pey, J. McLarty // *Hum Pathol*. - 2010. - Vol. 41. - P. 33-37.
117. Akopians, A. The Role of Inflammatory Pathways in Implantation Failure: Chronic Endometritis and Hydrosalpinges / A. Akopians, M. Pisarska, E. Wang // *Seminars in Reproductive Medicine*. – 2015. - Vol. 33, N 4. - P. 298-304.
118. Alterations in distribution and composition of the extracellular matrix during decidualization of the human endometrium / M. Iwahashi, Y. Muragaki, A. Ooshima, M. Yamoto [et al.] // *Reproduction*. - 1996. - Vol. 108, N 1. - P. 147-155.
119. Ahvazi, B. Roles of calcium ions in the activation and activity of the transglutaminase 3 enzyme / B. Ahvazi [et al.] // *J Biol Chem*. - 2003 –Vol. 278, № 26. – P. 23834–23841.
120. NADPH oxidase enzymes in skin fibrosis: molecular targets and therapeutic agents / O. Babalola, A.Mamalis, H. Lev-Tov, J. Jagdeo // *Arch Dermatol Res*. - 2013
121. Morphological peculiarities of endometrium in chronic endometritis associated with bacterial vaginosis / M. Beruchashvili, L. Gogiashvili, E. Datunashvili [et al.] // *Georgian Med. News*. - 2010. - № 181. - P. 59-63
122. Endometrial morphological and immunohistochemical features in females with primary and secondary infertility / V. S. Bessmertnaia, M.V. Samoilov, K. G. Serebrennikova [et al.] // *Arkh. Patol*. – 2008. - Vol. 70, № 4. - P. 31-34.

123. Fertility-enhancing hysteroscopy surgery / S. Bettocchi, M. T. Achillarre, O. Ceci, S. Luigi // *Semin Reprod Med.* - 2011. - Vol. 29. - P. 75-82.
124. Endometrial morphological and immunohistochemical features in females with primary and secondary infertility / V. S. Bessmertnaia, M. V. Samoilov, K. G. Serebrennikova [et al.] // *Arkh. Patol.* - 2008. - Vol. 70, № 4. - P. 31-34.
125. Superoxide radical production stimulates retroocular fibroblast proliferation in graves' ophthalmopathy / H. B Burch, S. Lahiri, R. S. Bahn, S. Barnes // *Experimental Eye Research.* - 1997. - Vol. 65, N 2. – P. 311-316.
126. CDC. Sexually Transmitted Disease Treatment Guidelines // *Pelvic Inflammatory Disease. MMWR.* - 2010. – Vol. 59. - P-12.
127. Disruption of TRPM6/TRPM7 complex formation by a mutation in the TRPM6 gene causes hypomagnesemia with secondary hypocalcemia / V. Chubanov, S. Waldegger, M. Schnitzler [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* - 2004. –Vol. 101, N 9. – P. 2894-2899.
128. Poor reliability of vaginal and endocervical cultures for evaluating microbiology of endometrial cavity in women with chronic endometritis / E. Cicinelli E., D. De Ziegler [et al.] // *Gynecol. Obstet. Invest.* - 2009. - Vol. 68, N 2. - P. 108-115.
129. Matrix metalloproteinases and metastatic cancer / M. I. Cockett, G. Murphy, M. L. Birch [et. al.] // *Biochem.Sjc.Symp.* - 1998. -Vol. 63. - P. 295-313.
130. Association between the -1306C/T polymorphism of matrix metalloproteinase-2 gene and lumbar disc disease in Chinese young adults / D. Dong, M. Yao, B. Liu [et al.] // *European Spine Journal.*- 2007. - Vol. 16, N 11. - P. 1958-1961.
131. Dröge, W. Oxidative stress and aberrant signaling in aging and cognitive decline / W. Dröge, H. Schipper // *Aging Cell.* - 2007. - Vol. 6, N 3. – P. 361-370.
132. Duley, L. Magnesium sulphate in eclampsia / L. Duley // *Lancet.* -1998. Vol. 352. - P. 67— 68.
133. Egeblad, M. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progressi

134. "Inflammatory environmental, oxidative stress in tumoral progression," in Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases-A Role for Antioxidants, chapter 8 / C. Esquivel-Chirino, J. Esquivel-Soto , J. A. Morales-González [et al.]. - InTech, Rijeka, Croatia, 2013.
135. Matrix metalloproteinases (with accent to collage-nases) / B. Evrosimovska, B. Velickovski [et al.] // Journal of Cell and Animal Biology. - 2011. - Vol. 5, № 7. - P. 113-120.
136. Extracellular Matrix: New Perspectives for Translational Medicine // Matrix Biology. - 2016. –Vol. 49. - P.144.
137. In vitro fertilization pregnancy in a patient with proven chronic endometritis / H. M. Fatemi, B. Popovic-Todorovic [et al.] // Fertil Steril. – 2009. - P. 9-11.
138. Fazleabas, A. Distribution of integrins and the extracellular matrix proteins in the baboon endometrium during the menstrual cycle and early pregnancy / A. Fazleabas // Biology of Reproduction. – 1997. - Vol. 56, N 2. – P. 348-356.
139. Role of genetic polymorphisms of ion channels in the pathophysiology of coronary microvascular dysfunction and ischemic heart disease? / F. Fedele, M. Mancone, W. Chilian [et al.] // Basic Research in Cardiology. - 2013. - Vol. 108, N 6.
140. Feig, A. L. The role of metal ions in RNA biochemistry /A. L. Feig, O. C. Uhlenbeck // The RNA World. - 2nd. ed. - Dublin, 1999. - 709 p.
141. New insights into the role of oxidative stress in scleroderma fibrosis / A. Gabrielli, S. Svegliati, G. Moroncini, D, Amico // Open Rheumatol J. - 2012. - Vol. 6. – P. 87–95.
142. Expression of matrix metalloproteinase-2 and 9 in cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma among different age groups of premenopausal and postmenopausal women / A. Ghosh, A. Moirangthem, R. Dalui [et al.] // Journal of Cancer Research and Clinical Oncology. - 2014. - Vol. 140, N 9. – P. 1585-1593.

143. Characteristics of microecological disturbances during endometritis / E. V. Glukhova, S. V. Cherkasov, A. V. Sgibnev [et al.] // Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. - 2009. - № 4. - P. 93-96.
144. Hartwig, A. Role of magnesium in genomic stability / A. Hartwig // Mutat Res. - 2001. - Vol. 475, N 1-2. - P. 113-121.
145. Tissue inhibitors of metalloproteinases in endometrium of ovariectomized steroid-treated ewes and during the estrous cycle and early pregnancy / A. L. Hampton, A.R. Butt, S. C. Riley [et al.] // Biol. Reprod. - 1995. -
146. Induction of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene expression during in vitro decidualization of human endometrial stromal cells / T. Higuchi, H. Kanzaki, H. Nakayama [et al.] // Endocrinology. - 1995. - Vol. 136. - P.4973-4981.
147. Hughes, R. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of glucosamine sulphate as an analgesic in osteoarthritis of the knee / R. Hughes, A. Carr // Rheumatology. - 2002. - Vol. 41, N 3. - P. 279—284.
148. Hulboy, D. L. Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. Mol / D. L. Hulboy, L. A. Rudolph, L. M. Matrisian // Human Reprod. - 1997. - Vol. 3, N 1. - P. 27-45.
149. Hutcheson, R. The Metabolic Syndrome, Oxidative Stress, Environment, and Cardiovascular Disease: The Great Exploration / R. Hutcheson, P. Rocic // Experimental Diabetes Research. - 2012. - P. 1-13.
150. High levels of expression of collagenase-3(MMP-13) in pathological conditions associated with a foreign-body reaction / S. Imai, Y. T Kontinen, M. Junttunen, O. Lindy // British Editorial Society of Bone and Joint Surgery. -1998. - Vol. 80, № 4.
151. Chronic endometritis is a frequent finding in women with recurrent implantation failure after in vitro fertilization / E. B. Johnston-MacAnanny, J. Hartnett [et al.] // Fertil Steril, 2010. - Vol. 93. - C. 437-441.

152. Keane, M. Medical management of Marfan syndrome / M. Keane, R. Pyeritz // Curr Probl Cardiol. – 1982. – Vol. 7, N 1. - P. 48.
153. Kitaya, R. Aberrant expression of selectin E, CXCL1, and CXCL13 in chronic endometritis / R. Kitaya, T. Yasuo // Mod Pathol. – 2010. – Vol. 23. - P. 1136-1146.
154. Kitaya, R. Immunohistochemical and clinicopathological haracterization of chronic endometritis / R. Kitaya, T. Yasuo // Am J Reprod Immunol. - 2011. - Vol. 66. - P. 405-410.
155. Kitaya, K. Prevalence of chronic endometritis in recurrent miscarriages / K. Kitaya // Fertil. Steril. - 2011. - Vol. 95, № 3. - P. 1156-1158.
156. The association of chronic endometritis with preterm birth [Text] / E. J. Knudston, C. Shellhaas [et. al.] // Am J Obstet Gynecol. - 2007. - P. 1-4.
157. The characteristics of the epithelium and endometrial extracellular matrix in miscarriage during early pregnancy associated with chronic endometritis / V. L. Kovalenko , E. L. Kazachkov [et al.] // Arkh Patol. - 2009. - Vol. 71. - P. 40-43.
158. Endometrial pathomorphology in bacterial vaginosis associated with chronic endometritis / V. L. Kovalenko, E. E. Voropaeva, E. L. Kazachkov [et al.] // Arkh. Patol. - 2008. - Vol. 70, № 2. - P. 6-8.
159. Kuznetsova, A.V. Changes in the components of the extracellular matrix and its regulators in the endometrium of women with habitual abortion / A. V. Kuznetsova, V. S. Paukov, I. N. Voloshchuk // Arkh. Patol. - 2002. - Vol. 64, № 1. - P. 18-22.
160. T-helper 1 and 2 immune responses in relationship to pregnancy, nonpregnancy, recurrent spontaneous abortions and infertility of repeated implantation failures / J. Y. Kwak-Kim, A. Gilman-Sachs, C. E. Kim // Chem. Immunol. Allergy. - 2005. - № 88. - P. 64-79.
161. Kong, Q. A threshold concept for cancer therapy / Q. Kong, J.A Beel, K.O. Lillehei // Med Hypotheses. - 2000. - Vol. 5, №1. - P. 29-35.

162. Prediction of spontaneous preterm birth in women with cervical insufficiency: Comprehensive analysis of multiple proteins in amniotic fluid / S. Lee, K. Park, E. Jung, S.Cho, and A. Ryu // Journal of Obstetrics and Gynaecology Research. – 2016. – Vol. 42, N 7. – P.776-783.
163. Magnesium is required for specific DNA binding of the CREB B-ZIP domain / J. R. Moll [et al.] // Nucleic acids res. – 2002. - Vol. 30, № 5. - P. 1240-1246.
164. Menstrual breakdown of human endometrium can be mimicked in vitro and is selectively and reversibly blocked by inhibitors of matrix metalloproteinases / E. Marbaix, I. Kokorine, P. Moulinet [et.al.] //Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1996. – Vol. 93. – P. 9120–9125.
165. Abnormal pattern of lymphocyte subpopulations in the endometrium of infertile women with chronic endometritis / M. Matteo, E. Cicinelli, P. Greco. [et al.] // Am. J. Reprod. Immunol. - 2009. - Vol. 61, № 5. - P. 322-329.
166. Distributions of endometrial NK cells, B cells, T cells, and Th2/Tc2 cells fail to predict pregnancy outcome following recurrent abortion // T. Michimata, M. S. Ogasawara., H. Tsuda [et al.] // Am. J. Reprod. Immunol. - 2002. - Vol. 47, № 4. - P. 196-202.
167. Michou, V. I. Fraction of the peripheral blood concentration of D56+/CD16-/ CD3-cells in total natural killer cells as an indication of fertility and infertility / V. I. Michou, P. Kanavaros, V. Athanassiou // Fertil. Steril. - 2003. - Vol. 80, Suppl. 2. - P. 691-697.
168. Human neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase 8) in parturition, premature rupture of the membranes, and intrauterine infection / E. Maymon, R. Romero, P. Pacora [et al.] // American Journal of Obstetrics and Gynecology. – 2000. - Vol. 183, N 1. - P. 94 -99.
169. Lever's Histopathology of the skin / Ed. D. Elder. – 9 th ed. - Philadelphia, 2005. - P. 597-600.

170. Li, L. Abnormal expression of MMP-9 and imbalance of MMP-9/TIMP-1 is associated with prolonged uterine bleeding after a medical abortion with mifepristone and misoprostol / L. Li, Z. Zhou, L. Huang // *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*. – 2009. – Vol. 88, N 6. – P. 673-679.
171. Manuel, J. A. Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) is upregulated during scarless wound healing in athymic nude mice / J. A. Manuel, B. Gawronska-Kozak // *Matrix Biology*. - 2006. - Vol. 25, № 8. - P. 505-514.
172. Maskos, K. Structural Basis of Matrix Metallopro W Bode // *Molecular Biotechnology*. – 2003. - Vol. 25, N 3. – P. 241-266.
173. Michael, O. G. Reduction of myocardial infarct size by doxycycline: A role for plasmin inhibition / O. G. Michael, M. Jinno, L. A. Miles // *Molecular and Cell. Biochemistry*. - 2005. - Vol. 270. - P. 1-11.
174. Expression and regulation of collagenase-2 (MMP-8) in head and neck squamous cell carcinoma // *J. Pathol.* - 2002. - Vol. 197, N 1. - P. 72-81.
175. Monea, S. Plasmin activates pro-matrixmetalloproteinase-2 with a membrane-type 1 matrix metalloproteinase-dependent mechanism / S. Monea, K. Lehti, J. Keski-Oja // *Cell Physiol* . - 2002. - Vol. 192, N 2. - P. 160-170.
176. Moss, S. F. Mechanisms of disease: Inflammation and the origins of cancer / S. F. Moss, M. J. Blaser // *Nat. Clin. Pract. Oncol.* – 2005. – Vol. 2, № 2. - P. 90-97.
177. Nagase, H. Matrix metalloproteinases / H. Nagase, J. F. Woessner // *The Journal of Biological Chemistry*. - 1999. - Vol. 274, N 31. - P. 21491-21494.
178. Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite-induced protein S-glutathiolation via disulfide S-oxide formation / T. Okamoto, T. Akaike, T. Sawa, Y oto Miyam, A. van der Vliet // *J Biol Chem*. - 2001.
179. Page-McCaw, A. P. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling / A. P. Page-McCaw, A. J. Ewald, Z. Werb // *Nat Rev Mol Cell Biol*. - 2007. – Vol. 8. - P. 221 - 233.

180. Structural alterations of the vascular wall in magnesium-deficient mice. A possible role of gelatinases A (MMP-2) and B (MMP-9)/ B. Gogly, Godeau, S. Igondjo-Tchen, P. Mauroi // *Magnes Res.* – 2003. - Vol. 16, N. 1. – P. 43–48.
181. Glucosamine sulfate use and delay of progression of knee osteoarthritis: a 3-year, randomized, placebo-controlled, doubleblind study / K. Pavelka, J. Gatterova, M. Olejarova [et al.] // *Arch Intern Med.* – 2002. –Vol. 162, N 18. – P. 2113
182. Matrix metalloproteinases 1, 2, 3 and 9 functional single-nucleotide polymorphisms in idiopathic recurrent spontaneous abortion / N. Perez, S. Ostojić, M. Volk, M. Kapović and B. Peterlin // *Reproductive Bio-Medicine Online.* – 2012. - Vol. 24, N 5. – P. 567-575.
183. Piccinni, M. P. T cells in normal pregnancy and recurrent pregnancy loss / M. P. Piccinni // *Reprod. Bio-med. Online.* - 2006. - Vol. 13, № 6. - P. 840-844.
184. Pinzani, M. Welcome to Fibrogenesis & Tissue Repair / M. Pinzani . – 2008. – Vol. 1. - P. 1.
185. Poli, G. Oxidative damage and fibrogenesis / G. Poli, M. Parola // *Free Radical Biology and Medicine.* - 1997. - Vol. 22, N 1-2. - P. 287-305.
186. Poljsak, B. Strategies for Reducing or Preventing the Generation of Oxidative Stress / B. Poljsak // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity,* - 2011. - P. 1-15.
187. Imbalance between matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in preeclampsia and gestational trophoblastic diseases / B. Rahat, R. Sharma, R. Bagga, A. Hamid, J. Kaur // *Reproduction.* - 2016. – Vol. 15, N 1. - P. 11-22.
188. Ion Channels and Oxidative Stress as a Potential Link for the Diagnosis or Treatment of Liver Diseases / A. Ramírez, A. Vázquez-Sánchez, N. Carrión-Robalino, J. Camacho // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* - 2016. - P.1-17.
189. Matrix metalloproteinases 2 and 9 and MMP9/NGAL complex activity in women with PCOS / J. Ranjbaran, M. Farimani, H. Tavalani, M. Ghorbani, J. Karimi, F. Poormonsefi // *Reproduction.* – 2016. - Vol. 151, N 4. – P. 305-311.

190. Raffetto, J. D. Matrix Metalloproteinases and their Inhibitors in Vascular Remodeling and Vascular Disease / J. D. Raffetto, R. A. Khalil // Biochemical Pharmacology. - 2008. - Vol. 75, № 2. - P. 346-359.
191. RCOG Green Top Guidelines-Management of Pelvic Inflammatory Disease. - (2003, 2009) (www.rcog.org.uk)
192. Rosenberg, G. A. Matrix Metalloproteinases and Neuroinflammation in Multiple Sclerosis / G. A. Rosenberg // Neuroscientist. - 2002. - № 8. - P. 586-595.
193. Röck, K. Role of the extracellular matrix in extrinsic skin aging / K. Röck K., J.W. Fischer // Hautarzt. – 2011. – Vol. 62, N 8. – P. 591-597.
194. Roxana, B. Oxidative stress & NADPH; an important marker in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer / B. Roxana // Frontiers in Behavioral Neuroscience. - 2006. - № 3.
195. Rubin, H. The logic of the Membrane, Magnesium, Mitosis (MMM) model for the regulation of animal cell proliferation / H. Rubin // Science. - 2003. - Vol. 261. - P. 1280-1281.
196. Samarakoon, R. TGF- β signaling in tissue fibrosis: redox controls, target genes and therapeutic opportunities / R. Samarakoon, J. M. Overstreet, P. J. Higgins // Cell Signal. - 2013. – Vol. 25, N 1. – P. 264 – 268.
197. Schnee, J. M., Hsueh, W. A. // Cardiovasc. Res. – 2000.- Vol. 6. – P. 264-268.
198. Brilla C.G., Maisch B., Rupp H., Funck R., Zhou G., Weber K.T. // Herz. – 1995. - Vol. 20. - P. 127-134.
199. Expression of transforming growth factor-1 by pancreatic stellate cells and its implications for matrix secretion and turnover in chronic pancreatitis. / F.W-T. Shek R. C. Benyon, F. M.Walker [et al.] // Am J. Pathol. - 2002.-Vol. 160, N. 5. - P. 1787-1798.
200. Siwik, D. A. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts / D. A. Siwik // Am. J. Physiol. - 2001. - Vol. 280. - P. 53-60.

201. Schlingmann, K. P. A critical role of TRPM channel-kinase for human magnesium transport / K. P. Schlingmann, T. Gudermann// J Physiol. – 2005. – Vol. 566, Pt. 2. –P. 301-308.
202. Heterogeneity of serum activities of matrix metalloproteinases in chronic endometritis / G. Sukhikh, G.Soboleva, E. Silantyeva [et al.]// Bulletin of Experimental Biology and Medicine. - 2007. – Vol. 143, N 4. - P. 476-478.
203. Sternlicht, M. D. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior / M. D. Sternlicht, Z. Werb // Annu.Rev. Cell.Dev.Biol. - 2001.- Vol. 17. - P. 463-516.
204. Mechanobiology in cardiac physiology and diseases/ K. Takahashi, Y. Kakimoto, K. Toda, K. Naruse // Journal of Cellular and Molecular Medicine. - 2013. - Vol. 17, N 2, - P. 225-232.
205. Tyagi, S. C. Reduction-oxidation (redox) state regulation of extracellular matrix metalloproteinases and tissue inhibitors in cardiac normal and transformed fibroblast cells / S. C. Tyagi, S. Kuma, S. Borders // J. Cell. Biochem. – 1996. - Vol. 61. - P. 139–151.
206. Do short-term markers oft ? / G. M. Trautmann, K. E. [et al.] // Am J Obstet Gynecol. - 2008. - P. 1-7.
207. Turco, L. The matrix tetrameric code: hormones, cytokines, neuropeptides,melatonin / L. Turco // Physiologic regulating medicine. - 2006. - № 1. - P. 35-39.
208. Ursini, F. Membrane hydroperoxides. In: Oxidative Stress, II: Oxidants and Antioxidants / F. Ursini, M. Maiorino, A. Sevanian // Ed. by H. Sies. New York: Academic Press. - 2004. - P. 379 - 386.
209. Uttara, B., Singh, A., Zamboni, P. and Mahajan, R. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options / B. Uttara, A. Singh, P. Zamboni, R. Mahajan // Current Neuropharmacology. – 2009. – Vol. 7, N 1. - P. 65-74.

210. Vande Berg, J. S. Arresting cell cycles and the effect on wound healing / J. S. Vande Berg, M. C. Robson M.C // Surg Clin North Am. – 2003. - Vol. 83, N 3. - P. 509-520.
211. Activation and modulation of 72 kDa matrix metalloproteinase-2 by peroxynitrite and glutathione / S. Viappiani S, A. C. Nicolescu , A. Holt, G. Sawicki, B. D. Crawford, H. Leon, [et al] // Biochem Pharmacol. – 2009. - Vol. 77, P. 826-834.
212. Woessner, F. J. Matrix metalloproteinases and TIMPs / F. J Woessner , H. Nagase. - New York: Oxford Univ. Press, 2001. – 223 p.
213. Prognostic significance of MMP-9 / Wu Z. S. , Wu Q., Yang J
214. The involvement of osteopontin and matrix metalloproteinase -9 in the migration of endometrial epithelial cells in patients with endometriosis / M. Yang, C. Jiang, H. Chen, Y. Nian, Bai // Reproductive Biology and Endocrinology. – 2015. –Vol. 13, N 1.
215. Successful implantation after reducing matrix metalloproteinase activity in the uterine cavity / N. Yoshii, T. Hamatani, N. Inagaki, T. Hosaka, O. Inoue // Reprod Biol Endocrinol. – 2013. - № 11. - P. 37.
216. N-Myc-induced up-regulation of TRPM6 / TRPM7 channels promotes neuroblastoma cell proliferation / Z. Zhang, M. Faouzi, J. Huang, D. Geerts, H. Yu, A. Fleig // Oncotarget. – 2014. - Vol. 5, N 17. – P. 7625-7634.
217. Zhang, X. Enhanced expressions of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and -9 and vascular endothelial growth factors (VEGF) and increased microvascular density in the endometrial -hyperplasia of women with anovulatory dysfunctional uterine bleeding / X. Zhang, C. Qi, J. Lin // Fertility and Sterility. - 2010. - Vol. 93, N 7. - P. 2362-2367.

ПРИЛОЖЕНИЯ

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ
НА ИЗОБРЕТЕНИЕ
№ 2580986

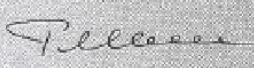
**СПОСОБ МОДЕЛИРОВАНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО
ХРОНИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ ЭНДОМЕТРИЯ У КРЫС**

Патентообладатель(и): *Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Волгоградский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2015105650
Приоритет изобретения 18 февраля 2015 г.
Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 21 марта 2016 г.
Срок действия патента истекает 18 февраля 2035 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

 Т.М. Налиев



«УТВЕРЖДАЮ»

Руководитель учреждения

Проректор д.т.н., профессор

В.Б. Мандрыков

«___» _____ 200__ г.



АКТ О ВНЕДРЕНИИ

Предмет внедрения: данные о значении показателей активности желатиназы В и внутриэритроцитарного магния в патогенезе хронического эндометрита.

Кем предложен: ассистентом кафедры патофизиологии и клинической патофизиологии Волгоградского Государственного Медицинского Университета Тихаевой К.Ю.

Источник информации: Rogova, L., Tikhayeva, K., Tkachenko, L. Role of gelatinase B and intraerythrocytic magnesium in formation of the chronic endometrium inflammation in rat // Медицинский вестник Северного Кавказа. 2016. №2 Тихаева К.Ю., Рогова Л.Н., Ткаченко Л.В., "Показатели активности желатиназы в в тканях эндометрия у женщин с хроническим эндометритом и неоднократными неудачами имплантации". Материалы XXVI Международной конференции РАРЧ "Репродуктивные технологии сегодня и завтра". Москва, 2016. Рогова Л.Н., Тихаева Ксения Юрьевна, Григорьева Н.В., Ермилов В.В. Влияние магнийсодержащей композиции на интенсивность пероксидации, магниевый баланс и показатели воспалительной клеточной инфильтрации у крыс с экспериментальным хроническим воспалением эндометрия // Вестник ВолГМУ. 2015. №2 (54).

Где и кем внедрено: кафедра акушерства и гинекологии ФУВ Волгоградского Государственного Медицинского Университета

Цель внедрения: усовершенствование образовательного процесса по вопросам воспалительных заболеваний органов малого таза, хронического эндометрита как причины нарушений репродуктивной функции.

Ответственные за внедрение: доцент кафедры акушерства и гинекологии ФУВ ВолгГМУ, д.м.н. Свиридова Н.И.

Результаты внедрения: предоставленные материалы позволили оптимизировать образовательный процесс для интернов и ординаторов, так как использованы новые данные о механизмах патогенеза хронического эндометрита, а также увеличить эффективность терапии данной нозологии

Эффективность внедрения: выявленные закономерности патогенеза хронического эндометрита позволили увеличить эффективность образовательного процесса и изучить новые подходы к терапии и профилактике данной нозологии

Подпись лица,
ответственного за
внедрение



«УТВЕРЖДАЮ»
 Руководитель учреждения
 Проректор, д.м.н., профессор
 В.Б. Мандриков

«___» _____ 200__ г.



АКТ О ВНЕДРЕНИИ

Предмет внедрения: данные о значении показателей активности желатиназы В и внутриэритроцитарного магния в патогенеза хронического эндометрита.

Кем предложен: ассистентом кафедры патофизиологии и клинической патофизиологии Волгоградского Государственного Медицинского Университета Тихаевой К.Ю.

Источник информации: Rogova, L., Tikhaeva, K., Tkachenko, L. Role of gelatinase B and intraerythrocytic magnesium in formation of the chronic endometrium inflammation in rat // Медицинский вестник Северного Кавказа. 2016. №2

Где и кем внедрено: кафедра патофизиологии и клинической патофизиологии Волгоградского Государственного Медицинского Университета

Цель внедрения: усовершенствование образовательного процесса по теме патогенеза хронического воспаления, в том числе репродуктивной системы.

Ответственные за внедрение: старший преподаватель кафедры патофизиологии и клинической патофизиологии Волгоградского Государственного Медицинского Университета к.м.н. Шестернина Н.В.

Результаты внедрения: материалы предоставленные кафедрой патофизиологии и клинической патофизиологии ВолгГМУ позволили оптимизировать образовательный процесс для студентов, интернов и ординаторов, так как использованы новые данные о механизмах патогенеза хронического эндометрита, а следовательно подходов к патогенетической терапии

Эффективность внедрения: выявленные на кафедре патофизиологии и клинической патофизиологии ВолгГМУ закономерности патогенеза хронического эндометрита позволили повысить эффективность образовательного процесса по теме патогенеза хронического воспаления, в том числе репродуктивной системы

Подпись лица,
 ответственного за
 внедрение

Шестернина

Н.В. Шестернина

