

На правах рукописи

Н.В.

Шамилова Нияр Новруз кызы

**КЛИНИКО-ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ
РАЗЛИЧНЫХ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ
МАРКЕРОВ ПРИ ПРЕЖДЕВРЕМЕННОЙ
НЕДОСТАТОЧНОСТИ ЯИЧНИКОВ**

14.01.01 – акушерство и гинекология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2013

Ali Attestasiya Komissiyasi
Daxil olma № 384-2/3
14.06 2018 il

Работа выполнена в отделении гинекологической эндокринологии и лаборатории молекулярно-генетических методов исследования ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В. И. Кулакова» Минздрава России.

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор

Марченко Лариса Андреевна

Научный консультант:
доктор биологических наук

Трофимов Дмитрий Юрьевич

Официальные оппоненты:

Уварова Елена Витальевна – доктор медицинских наук, профессор, заведующий 2-м гинекологическим отделением Научного центра акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И.Кулакова

Зайдиева Янсият Зайдилаевна – доктор медицинских наук, профессор, руководитель отделения гинекологической эндокринологии Московского областного НИИ Акушерства и гинекологии

Ведущая организация: Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский университет дружбы народов»

Защита диссертации состоится «15» января 2013 года в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 208.125.01 при Научном центре акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И.Кулакова по адресу 117997, г.Москва, ул. Академика Опарина, д.4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Научного центра акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И.Кулакова.

Автореферат разослан «14» декабря 2012 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук



Калинина Елена Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Несмотря на существенный прорыв в сфере изучения процессов старения яичников остается ряд клинических и теоретических пробелов в фундаментальных знаниях по данному вопросу. В 2011г рабочая группа экспертов из 5 ведущих стран мира (STRAW), изучающая этапы старения репродуктивной системы, показала необходимость проведения дополнительных исследований и разработки современных биомаркеров, отражающих стадийность формирования преждевременной недостаточности яичников (Sioban D.Harlow,2012). В процессе фолликулогенеза большинство фолликулов находится на пути к дегенерации и апоптозу. Только не рекрутированные к данному моменту примордиальные фолликулы составляют истинный тотальный овариальный резерв. Однако клинико-лабораторные тесты для его оценки пока не разработаны. Функциональный овариальный резерв представляет собой пул растущих фолликулов, достигших определенной степени зрелости. Маркерами его оценки являются возраст женщины, регулярность ритма менструаций, уровни ФСГ, АМГ, объем яичников и число в них антральных фолликулов (Уварова Е.В.,2010;Ennis S., 2006). В основе патогенеза преждевременной недостаточности яичников (ПНЯ) лежит врожденное или приобретенное снижение тотального овариального резерва, которое манифестирует в возрасте до 40 лет. Патогенетической основой ПНЯ является либо генетически детерминированное нарушение процесса фолликулогенеза, либо гибель фолликулов за счет активации процесса их апоптоза (Nelson L.,2009). Гетерогенность данной патологии обусловлена разнообразием причин, вызывающих это заболевание. Согласно современной номенклатуре ПНЯ встречается как в изолированном виде (несиндромная форма), так и в сочетании с различными синдромами. При несиндромальных формах генетические дефекты обнаруживаются преимущественно на X хромосоме, а при синдромальных - на аутосомах. Ген *FMR1* на сегодняшний день рассматривается как один из X сцепленных генов, отвечающих за модель

старения яичников, т.к. закладка овариального пула и темпы его истощения определяются числом в этом гене CGG повторов (Gleicher N., 2010).

Нарушение нормального процесса инактивации X хромосомы может также приводить к яичниковой недостаточности (Sugawa F., 2009). Работами Табеевой Г.И. и соавт. также показана роль неслучайной инактивации X хромосомы и гена *AR* в генезе ПНЯ (Табеева Г.И., 2009).

Среди малонизученных генов кандидатов, способствующих развитию ПНЯ, заслуживает внимания ген, кодирующий ооцит специфический фактор BMP15, играющий ключевую роль в раннем фолликулогенезе и предотвращающий преждевременную лютеинизацию фолликулов (Juengel JL, 2005).

Исследованиями последних лет показано, что при наследственном гемохроматозе, обусловленном мутацией картированного на 6 хромосоме гена *HFE* патологическое накопление железа в паренхиматозных органах ассоциируется с дегенеративными изменениями клеточной паренхимы и прогрессирующим развитием фиброзной ткани за счет ускоренного процесса апоптоза, что ведет к необратимому нарушению функции органа. В литературе есть данные об атрофии яичек при наследственном гемохроматозе (Farina G, 1995; Tamanini C., 2003). Однако, работ, в которых на современном уровне анализировалось токсическое влияние избытка железа на фолликулярный аппарат женщин, практически нет.

Наряду с инновационными открытиями в области молекулярно-генетических причин ПНЯ, продолжается дискуссия о роли различных аутоиммунных нарушений, блокирующих физиологический процесс роста и созревания фолликулов с преантральной стадии, приводя к преждевременной недостаточности яичников.

В последние годы наряду с проведением традиционной ЗГТ (Зайдиева Я.З., 2011; Gelbaya T.A., 2010) появились работы о положительном влиянии дегидроэпиандростерона (ДГЭА) на различные звенья репродуктивной системы у больных с ПНЯ. Доказано положительное влияние на

нормализацию уровней эстрогенов, тестостерона и андростендиона, способствующих восстановлению самостоятельного ритма менструаций и наступлению беременности в естественном цикле в 30-60% случаев (Wiser A., 2010), в то время как на фоне проведения ЗГТ этот показатель не преодолевает 5-10% барьера. Механизм лечебного действия ДГЭА многообразен и требует дальнейшего изучения.

Цель исследования: Разработка прогностических критериев формирования различных форм преждевременной недостаточности яичников.

Задачи исследования:

1. На основании клинко-иммунологического скрининга расширить критерии диагностики аутоиммунной формы ПНЯ.
2. Выявить представленность числа CGG-повторов в гене *FMR1* у пациенток с преждевременной недостаточностью яичников и женщин с сохраненным ритмом менструаций.
3. Проанализировать связь числа CGG повторов в гене *FMR1* с клиническими формами преждевременной недостаточности яичников и установить их связь с уровнем АМГ.
4. Выявить частоту представленности у больных с ПНЯ полиморфизма гена, ответственного за рост и развитие первичных фолликулов - *BMP15*.
5. Изучить на системном и тканевом уровнях основные показатели обмена железа у больных с ПНЯ.
6. Оценить влияние дегидроэпиандростерона на гормональный профиль и фертильность у больных с преждевременной недостаточностью яичников.

Научная новизна

На основании использования современных молекулярно-генетических технологий расширены и дополнены представления о причинах истощения фолликулярного пула у больных с ПНЯ и разработаны прогностические критерии формирования различных форм этой патологии.

Пересмотрены и расширены диагностические критерии, подтверждающие аутоиммунный генез ПНЯ. Доказано, что диагностика

аутоиммунной формы ПНЯ основывается на выявлении органоспецифических (антиовариальные антитела -19,2%, анти тиреоидные антитела -19,2%) и неорганоспецифических аутоантител (антиядерные антитела-2,6%) и ассоциировано с аутоиммунной полиэндокринопатией (аутоиммунный тиреоидит-19,2%) и аутоиммунными заболеваниями неэндокринного генеза (6,4%).

Впервые для женщин с сохраненным ритмом менструаций российской популяции определена нормальная длина CGG повторов в гене *FMRI* равная 28-36. Доказано, что большее или меньшее их число может указывать на риск формирования молекулярно-генетической формы ПНЯ и быть использовано в качестве раннего прогностического фактора формирования данного клинического варианта патологии (ОШ=2,74; 95%ДИ=2,04-3,76). У больных с аутоиммунной формой ПНЯ длина CGG повторов находится в пределах популяционной нормы в связи с иным патогенетическим механизмом развития заболевания.

Сравнительный анализ числа CAG повторов гена *AR* с высокой степенью достоверности показал повышение частоты «короткого» CAG аллеля (≤ 24) у больных с ПНЯ в сравнении с женщинами с сохраненным ритмом менструаций. Риск развития ПНЯ в 2,67 раз выше при наличии в генотипе женщины «короткого» аллеля, что позволяет рассматривать этот маркер как предиктор молекулярно-генетической формы заболевания (ОШ=2,67; 95%ДИ=1,43-5,01).

Изучение основных биохимических параметров обмена железа при наличии мутаций в гене *HFE* и обнаружение у 40,9% пациенток с ПНЯ нетрансферрин-связанного железа (НТСЖ) на основании ЭПР спектроскопии позволило выявить депонирование в организме железа, включая его отложение в яичниковой ткани, что на клеточном уровне может способствовать запуску процесса ускоренного апоптоза в яичниках.

Подтверждено, что у больных с ПНЯ наряду с проведением ЗГТ, методом выбора может быть лечение на протяжении 6 и более месяцев ДГЭА

в суточной дозе 75 мг. При этом показано, у 20% больных через 3-4 месяца нивелируются проявления дефицита половых гормонов.

Практическая значимость

Ведущим предиктором формирования аутоиммунной формы ПНЯ является присутствие антиовариальных антител. Дополнительным независимым фактором риска является наличие сопутствующей аутоиммунной патологии как эндокринного, так и неэндокринного генеза, риск возникновения которой возрастает в 3,8 раз при наличии антиовариальных антител.

Несмотря на равнонаправленные изменения в гипоталамо-гипофизарно-яичниковой системе у больных с ПНЯ может встречаться как нормальное по отношению к овариальному резерву, так и аномальное число CGG повторов в гене *FMRI*. Определение большего или меньшего по отношению к нормальному диапазону числа CGG-повторов (28-36) в гене *FMRI* может быть одним из ранних, объективных предикторов, указывающих на риск развития молекулярно-генетической формы ПНЯ, на основе чего можно осуществлять долговременный прогноз развития заболевания.

Показана необходимость расширения группы риска по развитию гомохроматоза за счет введения в нее пациенток с ПНЯ.

Показана эффективность лечения пациенток с ПНЯ ДГЭА в суточной дозе 75 мг.

Положения, выносимые на защиту

1. Преждевременную недостаточность яичников следует рассматривать как мультифакторную патологию, в генезе которой в 63% случаев выявляются молекулярно-генетические и эпигенетические нарушения, преимущественно на хромосоме X. Любое отклонение числа CGG повторов в гене *FMRI* по отношению к его нормальному диапазону (28-36), наличие «короткого» аллеля (≤ 24 CAG повторов) в гене *AR*, наличие неслучайной инактивации X хромосомы являются ранними предикторами развития молекулярно-генетической формы ПНЯ. Аутоиммунная полиэндокринопатия

и определение органоспецифических и неорганоспецифических аутоантител свидетельствует об аутоиммунной форме заболевания, частота которой составляет 33,3%.

2. Перегрузка организма железом на системном и тканевом уровнях с последующим его отложением в ткани яичников, возможно, являются одними из дополнительных патогенетических механизмов ускоренного апоптоза фолликулов, приводящих к развитию преждевременной недостаточности яичников.

Пациенток с ПНЯ необходимо включать в группу риска по развитию гемохроматоза.

3. Помимо использования традиционной гормональной терапии больным с ПНЯ для нивелирования симптомов дефицита половых гормонов показано назначение монотерапии Дегидроэпиандростероном в суточной дозе 75 мг на протяжении 6 и более месяцев.

Личный вклад автора

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии на всех этапах исследования, анализе и обобщении полученных результатов. Автором лично проведено общеклиническое обследование, сбор коллекции биологического материала для проведения молекулярно-генетического исследования. Выполнена статистическая обработка, научное обоснование полученных результатов.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.01.01 - акушерство и гинекология. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 4 и 5 паспорта акушерства и гинекологии.

Апробация работы

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на межклинической конференции 29 марта 2012 года и на заседании апробационной комиссии ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и

перинатологии им. В. И. Кулакова» Минздравсоцразвития РФ 4 июня 2012 года, протокол № 11.

Материалы диссертации доложены на Всероссийских конгрессах с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая практика – новые горизонты», «Амбулаторно-поликлиническая практика: проблемы и перспективы», «Амбулаторно-поликлиническая практика – в эпицентре женского здоровья» (Москва, 2010, 2011, 2012 гг.), V и VI Международных конгрессах по репродуктивной медицине (Москва, 2011, 2012 гг.), Всероссийской Конференции по гинекологической эндокринологии и менопаузе «Гормонально-ассоциированные заболевания репродуктивной системы: от новых научных концепций к тактике ведения» (Москва, 2011), XIII Всемирном конгрессе по менопаузе (Рим, 2011 г.), VI региональном научном форуме «Мать и дитя» (Ростов-на-Дону, 2012 г.).

Внедрение результатов работы в практику

Результаты данного исследования легли в основу разработок образовательных программ, сертификационных циклов и лекций для врачей в области гинекологической эндокринологии. Полученные данные внедрены в клиническую практику отделения гинекологической эндокринологии и научно-поликлинического отделения НЦ АГиП им. В. И. Кулакова. По теме диссертации опубликовано 12 научных работ, в том числе 5 научных статей в журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 200 страницах компьютерного текста, включает 7 глав (введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, главы с результатами собственных исследований, обсуждение полученных результатов, выводы, практические рекомендации, список использованной литературы). Диссертация иллюстрирована 28 таблицами и 14 рисунками. Библиографический указатель включает 264 источников (32 отечественных и 232 зарубежных).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

В соответствии с поставленной целью и задачами исследования на базе отделения гинекологической эндокринологии обследовано 200 женщин с ПНЯ в возрасте от 18 до 40 лет. Проведено открытое проспективное исследование в течение 36 месяцев.

Критериями включения в основную группу исследования явились: возраст от 18 до 40 лет, отсутствие самостоятельных менструаций 6 и более месяцев, уровень ФСГ ≥ 40 МЕ/л в двух измерениях. Из исследования исключались пациентки с первичной гипергонадотропной аменореей, ятрогенными причинами ПНЯ (операции на яичниках, химиотерапия, лучевая терапия в анамнезе), тяжелыми наследственными заболеваниями (галактоземия, блефарофимоз).

В контрольные группы включены: 15 здоровых фертильных женщин репродуктивного возраста для оценки гормональных параметров и уровня антиовариальных антител; 15 женщин со своевременной менопаузой для оценки антиовариальных антител; 364 женщины репродуктивного возраста с сохраненным ритмом менструации для определения числа CGG повторов в гене *FMR1*; 101 женщина со своевременной менопаузой для изучения аллельных вариантов генов *BMP15* и *HFE*, аутопсийный материал яичниковой ткани 4 женщин, погибших при чрезвычайных обстоятельствах (средний возраст - $49,6 \pm 4,4$ года) и биопсийный материал яичниковой ткани 5 женщин, которым произведена экстирпация матки и придатков по поводу несостоятельности мышц тазового дна (средний возраст $49,6 \pm 17$ лет) для выявления гранул гемосидерина.

Пациенток обследовали с использованием комплекса современных и наиболее информативных методов исследования. Общеклиническое обследование проводили по стандартной схеме, используемой в НЦ АГиП. Уровни гормонов (ФСГ, ЛГ, ТТГ, E_2 , Т, ТЭСГ, АМГ, ТЭСГ, ДГЭА, $T_{\text{св}}$) определяли методом ИФА с помощью соответствующих тест-систем на автоматическом анализаторе «Cobar Core II».

Особую роль в развитии ПНЯ, как известно, имеют аутоиммунные нарушения. Учитывая, что ПНЯ может являться одной из составляющих аутоиммунного полигланулярного синдрома, нами было проведено исследование антиовариальных антител, а также уровней органоспецифических аутоантител к другим органам (щитовидной железе) и неорганоспецифических антител к фосфолипидам, к ядрам клеток и митохондриям. В литературе эта панель иммунологических тестов представлена как достаточная для определения аутоиммунных нарушений на субклиническом уровне (Gleicher N. 2009; Tsigkou A. 2008). В рамках тиреоидного скрининга проводилось определение АТ-ТПО и АТ-ТГ иммуноферментными методами набором «Roche diagnostics» (Германия). Для качественного определения суммарных уровней антиовариальных, антиядерных и антимитохондриальных антител (IgM, IgG, IgA) и количественного определения уровней антифосфолипидных антител классов IgG, IgM (антител к кардиолипину, фосфатидилсерину, кофакторам: β_2 -гликопротеину-I, протромбину, аннексину V) использовали метод непрямого иммуноферментного анализа (ELISA) с помощью наборов фирмы Orgentec Diagnostica GmbH (Германия). Уровни железа и общей железосвязывающей способности сыворотки крови определяли калориметрическим методом с бета - фенантралином по методу Генри с помощью стандартных наборов фирмы «Иммунотех». Насыщение трансферрина железом (НТЖ) – отношение концентрации сывороточного железа к общей железосвязывающей способности сыворотки, выраженное в процентах. Трансферрин сыворотки крови определяли методом радиальной иммунодиффузии в агаре. Ферритин сыворотки определяли стандартным радиоиммунологическим методом с использованием наборов ИРМО-ферритин. Трансвагинальное УЗ исследование органов малого таза и щитовидной железы проводили на аппарате Aloka SSD 1200, 2000 Toshiba SSA-240 (Япония) при помощи мультисекторного линейного датчика (8-10 МГц). Для определения интенсивности сигналов трансферрина,

церрулоплазмину, метгемоглобину и выявления спектров НТСЖ нами применен метод ЭПР – спектроскопии с помощью прибора фирмы «Брукер» 3-см диапазона ECS-106. Гистохимическое исследование ткани яичников проводилось по методу Перлса.

Картиотип в лимфоцитах периферической крови исследовали с помощью стандартной цитогенетической методики (G-окраска). Длину CAG-повтора 1 экзона гена *AR* и случайную инактивацию хромосомы X определяли с помощью метилчувствительной количественной флуоресцентной ПЦР. Для определения числа CGG повторов в гене *FMR1* использовали метод метил-специфической ПЦР. Определение замен одиночных нуклеотидов генов *BMP15* и *HFE* проводили модифицированным методом «примыкающих проб» полимеразной цепной реакции (adjacent probes, kissing probes), используя наборы реагентов и детектирующий амплификатор ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), согласно инструкции производителя. Секвенирование гена *BMP15* производили на автоматическом секвенаторе ABI 3130xl (Applied Biosystems, США) в соответствии с инструкцией к прибору.

Предварительно оформляли добровольное информированное согласие на забор биологического материала, лечение и обработку результатов исследования. Пациенткам с ПНЯ, подписавшим информированное согласие и не имеющим противопоказаний проводили ЗГТ в виде 2 мг эстрадиола валерата и 10 мг медроксипрогестерона ацетата в течение 12 месяцев, 25 женщинам с ПНЯ, не получающим ЗГТ в течение 3 месяцев для компенсации дефицита половых стероидов был назначен ДГЭА в суточной дозе 75 мг в течение 6 и более месяцев. Проводился динамический контроль уровней ФСГ, Е2, Т и АМГ на фоне 4 и 6 месяцев приема ДГЭА.

Статистический анализ полученных данных выполнен на компьютере PC IBM (США) с помощью электронных таблиц «Microsoft Excel», пакета прикладных программ «Statistica for Windows» v. 7.0, StatSoft Inc. (США), пакета SPSS (версия 10.0.7). Результаты исследования представлены как

среднее ± стандартное отклонение ($M \pm SD$). В зависимости от конкретных условий применялся парный критерий Вилкоксона при сравнении показателей в динамике, U-критерий Манна-Уитни для независимых групп, для оценки достоверности межгрупповых различий использован χ^2 (хи-квадрат). При статистической обработке данных, не подчиняющихся закону нормального распределения, в качестве меры центральной тенденции количественных признаков выбрана медиана (Me), а в качестве интервальной оценки – верхний (L) и нижний квартили (H). Результаты представлены в виде Me (L-H). Статистически значимые крайние точки вычисляли по формулам:

$$X_1 = \text{Max}[X_{\min}, X_{25} - 1,5 \times (X_{75} - X_{25})]$$

$$X_2 = \text{Min}[X_{\max}, X_{75} + 1,5 \times (X_{75} - X_{25})]$$

где $X_{\min}$ – минимальные значения числа CGG повторов в гене *FMR1*, $X_{\max}$ – максимальные значения числа CGG повторов в гене *FMR1*, X_{25} – 1-ая квартиль, X_{75} – 3-ая квартиль (Tukey J., 1977). Различия между группами считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

На первом этапе работы проведено клинико-лабораторное обследование 200 пациенток с ПНЯ (средний возраст – $32,72 \pm 6,17$ года, средняя продолжительность заболевания $4,1 \pm 1,01$ года, средний возраст наступления аменореи – $29,4 \pm 7,66$ года). Возраст менархе в среднем по группе составил $13,25 \pm 1,43$ года. Яичниковая недостаточность проявлялась вторичной аменореей после достаточно длительного периода регулярных менструаций у подавляющего числа пациенток (82,5%). В ходе представленной работы при гормональном обследовании было установлено достоверное повышение уровней ФСГ и ЛГ ($100,51 \pm 35,1$ МЕ/л и $72,3 \pm 33,8$ МЕ/л, соответственно) и снижение концентраций АМГ ($0,22 \pm 0,2$ нг/мл), Е2 ($85,4 \pm 62,25$ пмоль/л) и Т ($0,9 \pm 0,1$ нмоль/л) у обследуемых больных по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$), что подтверждает наличие у них ПНЯ. Уровни ТТГ ($1,95 \pm 1,31$ мМЕ/л) и Т_{св} ($14,93 \pm 3,61$ пмоль/л) на момент обследования по

группе не отличались от их средних значений в группе контроля ($p > 0,05$).

В группе больных с ПНЯ у 14,3% (15/105) женщин были выявлены положительные яичниковые антитела, концентрация которых находилась на уровне от 11,4 до 19,5 Ед/мл. Антитела к щитовидной железе были выше нормы у 26% (52/200) пациенток. На момент обследования манифестная форма аутоиммунного тиреоидита выявлена нами у 8 из 200 (4%), субклиническая (повышение уровня ТТГ в сочетании с нормальным уровнем $T_{св}$, наличие антитиреоидных антител в диагностически значимых титрах и ультразвуковые признаки аутоиммунной патологии) - у 7/200 (3,5%) пациенток. В исследуемой группе у 2 пациенток (2,6%) выявлены положительные антигнуклеарные антитела. Антимитохондриальные антитела у всех пациенток были отрицательными. Показатели средних уровней антител к фосфолипидам не выходили за пределы нормативных значений. ($IgG - 2,7 \pm 1,7$ Ед/мл; $IgM - 2,5 \pm 1,3$ Ед/мл). Показано, что относительный риск выявления сопутствующей аутоиммунной патологии у пациенток при наличии антиовариальных антител по сравнению с пациентками, не имеющими таковые, составил 3,82 (95% ДИ 2,57- 9,81) ($\chi^2 = 14,91$, $p = 0,0001$).

Известно, что в развитии ПНЯ большую роль играют генетические факторы. Генеалогический анализ показал, что семейная форма заболевания выявляется у 28,5% (57/200) обследованных нами пациенток с ПНЯ.

Экспериментально доказано, что нормальный диапазон CGG повторов в гене *FMR1* ассоциирован с адекватной продукцией FMRP, ответственного за функционирование яичников (Chen, 2003). Учитывая ассоциацию премутации гена *FMR1* с ПНЯ, мы сочли необходимым определить норму числа CGG повторов в нем для женщин российской популяции. Впервые на базе отделения гинекологической эндокринологии совместно с «Лабораторией молекулярной генетики» у 364 женщин репродуктивного возраста с сохраненным ритмом менструации (средний возраст $42,3 \pm 0,95$ года) проанализировано число CGG повторов в гене *FMR1* (рис.1). За норму по отношению к физиологическому тотальному овариальному резерву

принят статистически значимый диапазон 28-36 повторов, исключающий выбросы. Проведенный нами анализ показал, что anomальная аллель этого гена в генотипе женщин в 2,74 раз чаще встречается у пациенток с ПНЯ (ОШ=2,74; 95%ДИ=2,04-3,67). На основании всего выше изложенного anomальную длину CGG повторов в гене *FMR1* следует рассматривать как предиктор молекулярно-генетической формы ПНЯ, ассоциированной с нарушениями на хромосоме X.

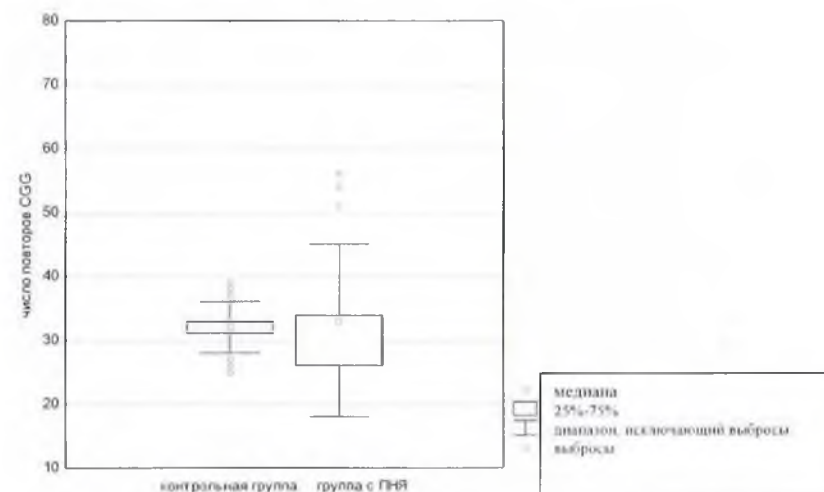


Рис 1. Распределение CGG повторов в гене *FMR1* в контрольной группе (n=364) и у пациенток с ПНЯ (n=129)

При распределении пациенток основной группы с учетом числа CGG повторов в обоих аллелях гена *FMR1* в группу А (аллель 1 < 28) были включены 40/129 (31,01%), в группу В (аллель 1 ≥ 28 , аллель 2 ≤ 36) - 62/129 (48,06%) и в группу С (аллель 2 > 34) - 27 женщин (20,93%). Таким образом, anomальная аллель CGG повторов в гене *FMR1* выявлена у 52% пациенток с ПНЯ.

Несмотря на равнонаправленные гормональные изменения у больных этих трех групп, практически с равной частотой у них выявлялось как нормальное в 48%, так и anomальное (в 52% случаев) число повторов, что

явилось основанием для углубленного клинико-лабораторного обследования с целью уточнения генеза преждевременного старения яичников у них. Для решения этой задачи из 200 обследованных больных было отобрано 78 пациенток, которым было проведено комплексное молекулярно-генетическое исследование и расширенный иммунологический скрининг. Пациентки по основным клинико-лабораторным характеристикам не отличались от основной группы и, следовательно, репрезентативны им.

На основании расширения диагностических критериев ПНЯ аутоиммунный генез заболевания был подтвержден нами у 33,3% обследованных больных. Сравнительный межгрупповой анализ числа CGG повторов у пациенток с разным генезом заболевания с высокой степенью статистической значимости показал, что в группе с нормальным числом CGG повторов в гене *FMR1* ($n=33$) чаще (в 75,8% (25/33) случаев) встречался аутоиммунный генез ПНЯ ($p<0,0001$), и доля больных с нормальной длиной повторов среди пациенток с аутоиммунным генезом составила 96,2% (25/26). В то время как в группах с аномальными длинами CGG повторов ($n=45$) аутоиммунный генез был выявлен у 1 пациентки, что составило 2,2% (ОШ=157,14; 95%ДИ=18,06-6587). В 3 из 78 случаев (3,8%) генез заболевания выявить не удалось (табл. I).

Таблица I

Генез развития ПНЯ у пациенток с различной длиной CGG повторов в гене *FMR1*

	Группа А ($n=24$)	Группа В ($n=33$)	Группа С ($n=21$)
Антиовариальные антитела	1 (4,2%)	14 (42,4%)*	-
Антияичниковые антитела	-	1 (3,03%)*	-
Аутоиммунная патология	-	10 (30,3%)*	-
SXCI	9 (37,5%)	6 (18,2%)	4 (19,04%)
Неясный генез	-	3 (9,09%)*	-

* $p<0,05$

Сравнение качественных показателей осуществлялось с помощью критерия Хи-квадрат, для 0% и 100% – двухсторонний t-критерий Стьюдента с поправкой на конечные точки

На основании всего выше представленного можно сделать вывод, что нормальная длина CGG повторов у больных с ПНЯ может указывать на вероятность аутоиммунной формы ПНЯ, т.к. в ее развитии в большей степени задействованы не молекулярно-генетические нарушения на хромосоме X, а аутоиммунные детерминанты. При проведении сравнительного анализа гормональных показателей было установлено, что у пациенток с аутоиммунным генезом ПНЯ уровень АМГ достоверно выше ($0,23\pm0,03$ нг/мл в сравнении с $0,06\pm0,01$ нг/мл, $p<0,05$), а уровень Т достоверно ниже ($0,83\pm0,7$ нмоль/л) в сравнении с пациентками с молекулярно-генетической и идиопатической формами заболевания ($1,41\pm0,9$ нмоль/мл, $p=0,0025$), что указывает на некую сохраненность примордиального пула при аутоиммунных поражениях и подтверждает выдвинутую в литературе гипотезу о селективном повреждении тека клеток яичников при интактности гранулезных в процессе формирования недостаточности яичников (Antonio La Marca, 2009) и, возможно, эта группа больных является наиболее перспективной в плане восстановления фертильности, что подтверждается нашими результатами (у 2 из 4 пациенток с миастенией наступила беременность на ЗГТ).

Проведенный нами анализ результатов молекулярно-генетического исследования гена *AR* позволил доказать, что «короткий» (≤ 24 CAG повторов) аллель достоверно чаще встречался среди пациенток с ПНЯ (ОШ=2,67; 95%ДИ=1,43-5,01), что позволяет рассматривать наличие «короткого» аллеля (≤ 24) в гене *AR* в качестве предиктора молекулярно-генетической формы ПНЯ. Подобные результаты были получены и в популяции японских женщин (Sugawa F., 2009) (рис.2).

SXCI, как эпигенетическая причина, косвенно свидетельствующая о молекулярно-генетических аномалиях на хромосоме X при $\geq 80\%$ -ном пороговом уровне была обнаружена с частотой 25,8% только у пациенток с ПНЯ. Показано, что наличие SXCI в генотипе женщин в 49,6 раз повышает риск развития преждевременной недостаточности яичников (ОШ=49,6; 95%

ДН=3,0-805), что подтверждает значимость выявления SXC1 как одного из предикторов формирования ПНЯ и может быть использовано как ранний диагностический скрининговый фактор в прогнозе развития данной патологии.

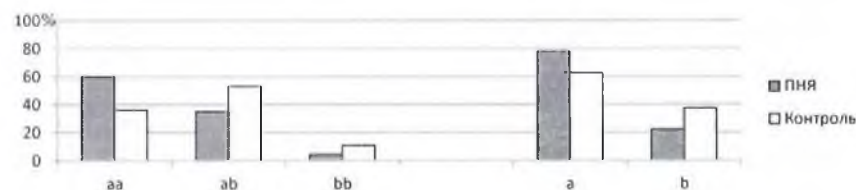


Рис 2. Представленность числа CAG повторов в гене андрогенового рецептора у пациенток с ПНЯ и в контрольной группе
а-«короткий» аллель AR с длиной CAG повтора ≤ 24 , б-«длинный» аллель с длиной ≥ 25

При проведении SNP анализа гена *BMP15* (202C>T, Arg68Trp, rs104894763; 538G>A, A180T, rs3897937; 905G>A, rs104894767) нуклеотидные замены выявлены у 5% пациенток с ПНЯ и у 4% женщин со своевременной менопаузой, что говорит об отсутствии значимости данных полиморфизмов в качестве предикторов ПНЯ для российской популяции. Секвенирование кодирующей последовательности гена *BMP15* показало, что различные аллельные варианты выявляются у 12% пациенток с ПНЯ, два из которых не описаны в литературе (730 C>T, 852 C>T), при этом в контрольной группе данные полиморфизмы выявлены не были. Однако для подтверждения значимости выявленных полиморфизмов необходимы дальнейшие исследования на большей выборке пациенток.

В связи с доказанной ролью ускоренного апоптоза как ведущей причины истощения фолликулярного пула нами предпринята попытка поиска новых его индукторов. При исследовании гена *HFE*, ответственного за формирование наследственного гемохроматоза у 22 из 102 (21,6%) обследованных пациенток с ПНЯ выявлены различные варианты нуклеотидных замен, при этом достоверных различий с контрольной группой

выявлено не было. Совместно с гематологами эти 22 пациентки были дообследованы. Уровень трансферрина в сыворотке крови этих пациенток составил $2,5 \pm 0,4$ г/л, СЖ - $21,7 \pm 12,5$ мкмоль/л, НТЖ - $37,7 \pm 25,0\%$, ферритина - $68,3 \pm 54,7$ мкг/л. При этом, у 31,8% пациентов уровень СЖ был выше верхнего допустимого предела, уровень НТЖ был выше у 50 % (11/22) обследованных пациенток при снижении его концентрации у 45,5% (10/22) пациенток, а уровень ферритина в крови превышал допустимую норму у 27,3 % (6/22) и составил у них в среднем $172 \pm 37,5$ мкг/л. Таким образом, у 15/22 (68,2%) отмечены отклонения от нормативных показателей обмена железа. Полученные данные доказывают выраженные изменения метаболизма железа как одного из пусковых механизмов активации процесса апоптоза. У 40,9% пациенток с ПНЯ, имеющих нуклеотидные замены, спектральным методом обнаруживалось парамагнитное НТСЖ (g среднее = 2,8), интенсивность которого в среднем составила $4,0 \pm 2,5$ отн.ед. Оно обнаруживалось также у пациенток без нуклеотидных замен в гене *HFE*, но в значительно меньшем количестве ($0,8 \pm 0,6$ отн.ед.). У женщин-доноров интенсивность ЭПР сигнала НТСЖ соответствует фоновому значению. На основании полученных результатов можно сделать вывод о перегрузке организма больных с ПНЯ железом на системном уровне.

Достоверное увеличение интенсивности сигнала трансферрина (в 1,5-1,7 раз) по отношению к контролю свидетельствует об увеличении количества атомов железа на молекулу трансферрина ($0,6 \pm 0,4$ против $0,2 \pm 0,1$, $p = 0,004$ и $0,7 \pm 0,4$ против $0,2 \pm 0,1$, $p < 0,001$). Отмечено незначительное повышение интенсивности ЭПР сигнала церулоплазмينا у больных с ПНЯ ($1,2 \pm 0,2$ отн.ед. против $1,0 \pm 0,2$, $p > 0,05$). При сравнении интенсивности ЭПР сигналов метгемоглобина (g=6,00) у пациенток с ПНЯ и контрольной группе выявлены достоверные отличия, при этом у пациенток, имеющих полиморфизмы в гене *HFE* она была выше в 4,7 раза, что свидетельствует о выраженном снижении у них антиоксидантной активности ($0,8 \pm 0,5$ против $0,2 \pm 0,1$, $p < 0,0001$ и $3,6 \pm 2,3$ против $0,2 \pm 0,1$, $p < 0,0001$).

Гистохимическое исследование яичниковой ткани показало, что у 6 из 8 образцов внутри и вне клеток в корковом, а также в периваскулярном пространстве мозгового слоя имеются единичные скопления гранул гемосидерина. Наличие этих гранул у 75% пациенток с ПНЯ, а также фиброза стромы и стенок сосудов в мозговом слое ткани яичников пациенток с ПНЯ могут свидетельствовать о перегрузке яичниковой ткани железом. В контрольных образцах яичниковой ткани отложений железа выявлено не было, что подтверждает выдвинутую нами гипотезу о возможном токсическом влиянии НТСЖ на фолликулярный аппарат пациенток с ПНЯ, что на клеточном уровне может способствовать запуску процесса ускоренного апоптоза в яичниках.



Рис. 3. Микропрепарат яичниковой ткани пациенток с ПНЯ (А) и контрольной группы (Б), реакция Перлса, х 200. Метод Стьюдента с поправкой на конечные точки, $p < 0,05$

На сегодняшний день известно, что у пациенток с ПНЯ наряду с гипозестрогенной формируется стойкое гипоандрогенное состояние.

Нами была отобрана группа из 60 женщин с ПНЯ. Уровень Т у них составлял $0,87 \pm 0,12$ нмоль/л, при этом у 58,3% из них составил $0,54 \pm 0,2$ нмоль/л, что явилось основанием для назначения этой категории больных заместительной гормональной терапией, гестагенный компонент которой был представлен медроксипрогестерон ацетатом с остаточной андрогенной активностью.

Полученные на фоне 12 месяцев лечения данные свидетельствовали об адекватном восполнении недостающих половых гормонов и подтверждались гормональными исследованиями (табл.2).

Таблица 2

Динамика гормонального статуса у пациенток с ПНЯ ($n=60$) на фоне 12 месяцев терапии эстрадиола ватерата + медроксипрогестерона ацетата ($M \pm SD$)

Показатель	До лечения	На фоне 12 месяцев лечения	p
ФСГ (МЕ/л)	$101,71 \pm 38,09$	$50,8 \pm 30,2$	0.00002
ЛГ (МЕ/л)	$59,35 \pm 39,82$	$29,7 \pm 9,35$	0.00006
E_2 (нмоль/л)	$87,33 \pm 70,25$	$218,3 \pm 17,25$	0.00022
Т (нмоль/л)	$0,87 \pm 0,12$	$1,25 \pm 0,38$	0.037
ТЭСТ (нмоль/л)	$81,56 \pm 40,74$	$121,1 \pm 24,78$	0.0027
НСА (%)	$1,85 \pm 0,63$	$1,37 \pm 0,71$	0.776

Парный критерий Вилкоксона

Таким образом, гестагенный компонент этого препарата адекватно восполняет имеющийся недостаток андрогенов у женщин, страдающих ПНЯ, и данный препарат должен быть рекомендован этой категории больных.

На смену традиционной длительно проводимой ЗГТ для восполнения уровня половых стероидов у больных с ПНЯ приходит инновационный и безопасный метод лечения, основанный на наличии механизмов самозащиты, за счет быстрого насыщения локальных ферментных систем, трансформирующих ДГЭА в половые стероиды.

В исследование включено 25 женщин с ПНЯ, которые на протяжении предыдущих 3 месяцев не получали ЗГТ. По клинко-лабораторным критериям эти пациентки не отличались от основной группы. Уровень тестостерона составил $0,54 \pm 0,3$ нмоль/л, Концентрация ДГЭА-С $3,75 \pm 2,15$, что свидетельствовало о стойком гипоандрогенном состоянии у этой группы больных. Больные получали препарат ДГЭА по 25 мг 3 раза в течение 6 месяцев. Все пациентки на втором месяце лечения отметили исчезновение приливов, значительное повышение качества жизни - снижение депрессии, тревоги, повышение самооценки, что подтверждалось снижением уровня ФСГ на фоне 4-6 месяцев лечения в 2,7 раза (с $97,3 \pm 23,5$ до $36,7 \pm 15,9$ ($p=0,00002$), повышением концентрации E_2 в 2,8 раза (с $66,03 \pm 16,21$ до $183,7 \pm 56,12$, $p=0,00002$), а тестостерона в 6,3 раза (с $0,54 \pm 0,3$ до

3,4±1,25нмоль/л, $p=0,00002$) и что особо значимо двукратное увеличение уровня АМГ (с 0,24±0,05 до 0,43±0,24, $p=0,0004$).

У 20% (5/25) пациенток на фоне 4-5 месяца приема ДГЭА возобновились самостоятельные менструации без использования традиционной ЗГТ. У двух пациенток уровень ФСГ снизился до нормативных значений, и они были включены в программу ЭКО. При этом в одном случае на фоне стимуляции сформировалась функциональная киста, больная была снята с программы, у второй была произведена пункция доминантных фолликулов, диагностирован синдром пустого фолликула.

Таким образом, в процессе проведенного исследования нами предложены предикторы формирования молекулярно-генетической формы ПНЯ, ассоциированной с дефектами на хромосоме X, расширены критерии диагностики аутоиммунной формы ПНЯ и предложен инновационный метод лечения. Однако мы категорически не утверждаем, что выявленные нами молекулярно-биологические маркеры являются основанием для доклинической постановки диагноза ПНЯ и детекции молекулярно-генетической или аутоиммунной формы заболевания. Эти биомаркеры указывают на высокий риск развития данной патологии. Для подтверждения наших данных необходимо проведение многоцентровых проспективных когортных исследований.

ВЫВОДЫ

1. Расширены критерии диагностики аутоиммунной формы преждевременной недостаточности яичников, в результате чего ставится не только на основании обязательного наличия антиовариальных антител (19,2%), но и присутствия органоспецифических (АТ-ТГ+АТ-ТПО-19,2%) и органонеспецифических (антиядерные антитела – 2,6%) антител, в сочетании с аутоиммунными заболеваниями эндокринного (19,2%) и неэндокринного генеза (6,4%). Аутоиммунные факторы выявлены у 33,3% больных с ПНЯ.

2. Норма числа CGG повторов в гене *FMR1* по отношению к тотальному овариальному резерву у женщины с сохраненным ритмом менструаций находится в диапазоне 28-36 повторов. Для больных с ПНЯ с одинаковой частотой характерна представленность как нормального, так и аномального числа CGG повторов в гене *FMR1* (48 и 52%, соответственно, $p>0,05$).

3. При аутоиммунной форме заболевания в 96,2% случаев число CGG повторов в гене *FMR1* находится в пределах нормативного диапазона (28-36).

4. Ранним прогностическим маркером развития молекулярно-генетической формы ПНЯ, выявляемой у 63% больных, является аномальное число CGG повторов в гене *FMR1* менее 28 и более 36 (ОШ=2,74; 95%ДИ 2,04-3,67), при этом в 19-37% случаев отмечено ее сочетание с неслучайной инактивацией X хромосомы.

5. Уровень АМГ - как объективный критерий оценки функционального овариального резерва, у больных с аутоиммунной формой ПНЯ в сравнении с молекулярно-генетической достоверно выше и составляет 0,23±0,03 нг/мл против 0,06 ±0,01 ($p<0,0001$), что подтверждает наличие ассоциативной связи между числом CGG повторов и овариальным резервом.

6. Прогностическим маркером развития молекулярно-генетической формы ПНЯ является наличие неслучайной инактивации хромосомы X, встречающейся в 26% случаев (ОШ=49,6; 95% ДИ=3,0-805). Достоверное превышение частоты встречаемости «короткого» аллеля гена *AR* (≤ 24 CAG повторов) у больных с ПНЯ позволяет рассматривать этот маркер в качестве предиктора развития ПНЯ (ОШ=2,67; 95%ДИ=1,43-5,01).

7. Нуклеотидные замены в гене наследственного гемохроматоза – *HFE* обнаружены у 21,6% пациенток с ПНЯ, при этом у каждой третьей пациентки отмечено повышение уровня сывороточного железа, ферритина в 27,3%, на фоне сниженного уровня трансферрина и увеличения его насыщенности железом в каждом втором случае.

8. Выявление нетрансферрин - связанного железа у 40,9% пациенток с ПНЯ методом ЭПР спектроскопии и гранул гемосидерина в

яичниковой ткани в 75% случаев свидетельствуют о перегрузке организма железом и его токсическом действии на фолликулярный аппарат.

9. Больным с ПНЯ помимо проведения традиционной ЗГТ, возможно назначение монотерапии дегидроэпиандростероном. При этом у всех больных повышается качество жизни, в 2,7 раза снижается уровень ФСГ, в 2,8 раза повышается концентрация эстрадиола, в 6,3 раза тестостерона и двукратно увеличивается уровень АМГ. Восстановление ритма менструаций на фоне приема ДГЭА без проведения традиционной ЗГТ отмечено в 20% случаев.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Во время диспансерного наблюдения молодых женщин с наличием факторов риска ПНЯ (олигоменорея с менархе, ПНЯ у матери, аутоиммунный тиреоидит, перенесенные эпидемический паротит и краснуха, носительство определенных фенотипов главного комплекса гистосовместимости II класса (DRB1*01, DRB1*03, DQB1*0501, DQB1*0302)) необходимо расширение алгоритма обследования с проведением молекулярно-генетического исследования, включающего определение числа CGG повторов в гене *FMRI*, выявление неслучайной инактивации X хромосомы с определением числа CAG повторов гена *AR*.

2. Учитывая, что у каждой третьей больной с ПНЯ встречается семейная форма заболевания, при наличии в семье девочек с целью построения прогноза в отношении репродуктивной функции показано раннее карiotипирование, определение числа CGG повторов в гене *FMRI* и наличие неслучайной инактивации X хромосомы.

3. Наличие нормального числа CGG повторов в гене *FMRI* в пределах 28-36 у больных с ПНЯ указывает на аутоиммунную форму заболевания, в связи с чем этой категории больных необходим расширенный иммунологический скрининг, включающий определение уровня не только антиовариальных, но и анти тиреоидных, антинуклеарных, антимитохондриальных и антифосфолипидных антител и проведение подробного сбора анамнеза с учетом возможного наличия аутоиммунной патологии эндокринного и

неэндокринного генеза. При наличии полигланулярной патологии больная должна наблюдаться совместно со смежными специалистами.

4. Выявление аномального числа CGG повторов в гене *FMRI* у больных с ПНЯ свидетельствует о молекулярно-генетической форме заболевания.

5. Пациенток с ПНЯ необходимо включать в группу риска по возможному развитию гемохроматоза. При выявлении значимых мутаций в гене *HFE* доказана необходимость направлять больных с ПНЯ к гематологам для углубленного обследования обмена железа и проведения специфического лечения.

6. При выявлении гипогонадотропного состояния у больных с ПНЯ при выборе препарата ЗГТ предпочтение следует отдавать гестагенам, обладающим частичной андрогенной активностью, что способствует достоверному повышению уровня Т, ИСА и улучшению качества жизни.

7. Пациенткам с ПНЯ в качестве альтернативного метода лечения для коррекции дефицита половых стероидов можно рекомендовать дегидроэпиандростерон в суточной дозе 75 мг на протяжении 6 и более месяцев.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Шамилова Н.Н., Марченко Л.А. Можно ли рассматривать ген *FMRI* как предиктор раннего старения яичников? // Мать и дитя: материалы XI Всероссийского научного форума.-М., 2010. С.554.
2. Шамилова Н.Н., Марченко Л.А. Аутоиммунные нарушения и преждевременная недостаточность яичников. // Мать и дитя : материалы XII Всероссийского научного форума.-М., 2011. С.446
3. Evaluation of Molecular-Genetic Predictors of Premature Ovarian Insufficiency. / V.P.Smetnik, N.N.Shamilova, L.A.Marchenko, L.B.Butareva, D.S. Mihaylenko, A.E.Donnikov // 13th World Congress on Menopause.- Roma, 2011. P.585
4. Особенности связывания железа в плазме крови при преждевременной недостаточности яичников. / Н.Н. Шамилова, Л.А. Марченко, Е.Н. Бургова В.А.Сереженков // Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека: материалы 7-ой национальной научно-практической конференции с международным участием. - Смоленск, 2011. С.298-301.

5. Шамилова Н.Н., Марченко Л.А. Перегрузка организма железом» как одна из причин преждевременной недостаточности яичников.// Материалы XXIV Международного конгресса с курсом эндоскопии.- М., 2011. С.206.

М₇
6. Шамилова Н.Н., Марченко Л.А. Ген *FMRI*: новые возможности оценки овариального резерва.//Акушерство и гинекология. 2011.№ 2.С.58-64

7. Шамилова Н.Н., Марченко Л.А. Можно ли рассматривать ген *FMRI* как предиктор раннего старения яичников?//Акушерство и гинекология. 2011.№4. С.11-15

М₂
8. Шамилова Н.Н., Марченко Л.А., Трофимов Д.Ю. BMP15 - внутрифолликулярный предиктор развития преждевременной недостаточности яичников.// Проблемы репродукции. 2011.№6. С.26-31.

9. Шамилова Н.Н., Марченко Л.А. Роль генетических и аутоиммунных нарушений в развитии преждевременной недостаточности яичников. //Амбулаторно-поликлиническая практика – в эпицентре женского здоровья: материалы форума.- М., 2012. С.387.

10. Шамилова Н.Н., Марченко Л.А. Новые лечебные подходы при преждевременной недостаточности яичников.//Материалы VI Международного конгресса по репродуктивной медицине. – М., 2012.С.167.

М₆
11. Роль генетических и аутоиммунных нарушений в развитии преждевременной недостаточности яичников. / Н.Н.Шамилова, Л.А. Марченко, Н.В. Долгушина, О.Б.Кузнецова, Д.В.Залетаев // Акушерство и гинекология. 2012. №4/2. С.67-72

М₂
12. Шамилова Н.Н., Марченко Л.А., Табеева Г.И. Дифференцированный подход к назначению заместительной гормональной терапии при преждевременной недостаточности яичников. // Проблемы репродукции. 2012.№4.С.126-130.

М₇
Периферия орг. методов как одна из возможностей

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

НТЖ-коэффициент насыщения трансферрина железом

НТСЖ-нетрансферрин-связанное железо

ОПН-отношение шансов

ПНЯ-преждевременная недостаточность яичников

ТССТ-тестостерон-эстрадиол связывающий глобулин

ЭПР-электронный парамагнитный резонанс

AR-андрогенный рецептор

BMP15- bone morphogenetic protein 15

CAG-цитозин-аденин-гуанин

CGG - цитозин-гуанин-гуанин

FMRI-fragile mental retardation I

HFE-ген наследственного гемохроматоза

SXCI-спонтанная инактивация X хромосомы

М₄
13. The role of genetic and autoimmune factors in
S.I. J Assist Reprod Genet. 13 n30

М₂
14.5. акушер и гинекология 13 n1

Подписано в печать: 14.12.2012

Объем: 1,0 п.л.

Тираж: 100 экз. Заказ № 721

Отпечатано в типографии «Реглет»

119526, г. Москва, пр-т Вернадского, д. 39

(495) 363-78-90; www.reglet.ru