

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Объект авторского права
УДК 618.177-089.888.11

МОТОЛЯНЕЦ
Павел Михайлович

**МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
ГРАНУЛЕЗНЫХ КЛЕТОК ЯИЧНИКОВ ПАЦИЕНТОК
С БЕСПЛОДИЕМ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ
ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

по специальности: 14.03.02 – патологическая анатомия

Минск 2026

Научная работа выполнена в учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет»

Научный руководитель: **Юдина Ольга Анатольевна**, кандидат медицинских наук, доцент, врач-патологоанатом патологоанатомического отделения государственного учреждения «Республиканский клинический медицинский центр» Управления делами Президента Республики Беларусь

Официальные оппоненты: **Басинский Виктор Анатольевич**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии учреждения образования «Гродненский государственный медицинский университет»

Михалевич Станислава Иосифовна, доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры репродуктивного здоровья, перинатологии и медицинской генетики учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет»

Оппонирующая организация: учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

Защита состоится 28 октября 2026 года в 11.00 на заседании совета по защите диссертаций Д 03.18.03 при учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет» по адресу: 220083, г. Минск, пр-т Дзержинского, 83; e-mail: uchsovet@bsmu.by; телефон 8 (017) 302 16 21.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет».

Автореферат разослан 25 сентября 2026 года.

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций Д 03.18.03
кандидат медицинских наук, доцент



В.В. Савош

ВВЕДЕНИЕ

Бесплодие имеет не только медицинскую, но и социальную значимость, а причины и механизмы его развития разнообразны [Sun et al., 2019]. До 14–15% супружеских пар в Республике Беларусь бесплодны. Число женщин, страдающих бесплодием, составляет 750–780 на 100 тыс. женского населения в возрасте 18–49 лет, а мужчин — около 100–200 на 100 тыс. мужского населения в возрасте 18 лет и старше [Пост. Сов. Мин. РБ № 28 от 19.01.2021]. Вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) открывают пути для решения данной проблемы. В Республике Беларусь уделяется особое внимание проблеме бесплодия, затрачиваются значительные ресурсы для ее решения, бесплодным парам предоставляется бесплатная попытка экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) [Указ Президента РБ № 171 от 18.05.2022]. Определены жесткие показания и противопоказания для обеспечения высокой результативности ЭКО [Пост. Мин. здрав. РБ № 124 от 24.12.2019]. Однако эффективность ВРТ по разным данным составляет 25–43% [Пост. Сов. Мин. РБ № 28 от 19.01.2021; Регистр ВРТ РФ, 2022; Farquhar et al., 2018]. Существует потребность в разработке эффективных инструментов оценки репродуктивной функции и прогнозирования результатов ЭКО.

Состояние клеточного окружения яйцеклетки, в частности качественный и количественный профиль его рецепторов, наряду с другими факторами, влияют на успешность ЭКО [Alam et al., 2019]. Структурная и функциональная состоятельность гранулезных клеток определяет развитие ооцита, а также влияет на овуляцию, оплодотворение, имплантацию и раннее развитие эмбриона [Da Broi et al., 2018]. Опыт применения морфологических методов для сопровождения ВРТ практически не представлен в научных публикациях. Биопсия яичника не дает представления о причинах бесплодия и применяется редко [Vital-Reyes et al., 2006; Kwok et al., 2012]. Морфологическое исследование гранулезных клеток фолликулярной жидкости, полученной при пункции фолликулов стимулированных яичников, стало возможным в связи с повышением доступности ЭКО. Важно достичь качественной визуализации для изучения морфологических характеристик и оценки гормонорецепторного профиля гранулезных клеток, что требует соответствующего метода изготовления препаратов. В литературе описаны методы выделения гранулезных клеток из фолликулярной жидкости, однако отсутствуют унифицированные и валидированные подходы к пробоподготовке материала для морфологической оценки, что ограничивает сопоставимость результатов и их интерпретацию [Poulsen et al., 2020].

Цитологические характеристики клеток фолликулярной жидкости и состояние их рецепторов представляют интерес для изучения. Данные

о взаимосвязи рецепторного статуса гранулезных клеток с клиническими проявлениями бесплодия у женщин в литературе ограничены [Hanifah et al., 2021]. Активно обсуждаются клинические и лабораторные предикторы для моделей прогнозирования успешной имплантации эмбриона [Mehrjerd et al., 2022; Zeng et al., 2025]. Единичные прогностические модели, учитывающие характеристики гранулезных клеток, описанные в литературе, имеют низкую диагностическую ценность [Jiang et al., 2025; Neal et al., 2004]. Настоящее исследование направлено на изучение структурных и иммуноцитоморфологических характеристик гранулезных клеток с целью выявления наиболее информативных критериев для прогнозирования исходов имплантации эмбрионов при ЭКО.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с научными программами, темами

Диссертационная работа выполнена в рамках НИОК(Т)Р «Разработать и внедрить метод медицинской профилактики осложнений, связанных с имплантацией эмбрионов у женщин после экстракорпорального оплодотворения, основанный на оценке фолликулярной жидкости» ГНТП «Научно-техническое обеспечение качества и доступности медицинских услуг», 2021–2025 годы, подпрограмма «Здоровье матери и ребенка», № государственной регистрации 20221386, срок выполнения — 01.01.2022–31.12.2024. Диссертационная работа соответствует приоритетному направлению научной, научно-технической и инновационной деятельности на 2021–2025 гг. (Указ Президента Республики Беларусь от 7 мая 2020 г. №156, коды тематических рубрик по ГРНТИ 76.29.48 и 76.29.46).

Цель и задачи исследования

Цель работы: выявить морфологические характеристики гранулезных клеток яичников для прогнозирования успешности имплантации эмбрионов при ЭКО.

Задачи исследования:

1. Определить возможности и преимущества методов жидкостной цитологии и клеточных блоков в исследовании гранулезных клеток фолликулярной жидкости при ЭКО.
2. Изучить морфологические особенности гранулезных клеток фолликулов стимулированных яичников при ЭКО.
3. Оценить статус рецепторов половых гормонов гранулезных клеток стимулированных яичников при ЭКО.
4. Определить критерии для прогнозирования имплантации эмбрионов при ЭКО.

Объект исследования: гранулезные клетки фолликулярной жидкости.

Предмет исследования: морфологические характеристики гранулезных клеток фолликулярной жидкости.

Научная новизна

1. Впервые в Республике Беларусь проведено морфологическое исследование гранулезных клеток стимулированных яичников с применением методов жидкостной цитологии и клеточных блоков. Установлено, что фолликулярная жидкость, полученная при пункции фолликулов стимулированных яичников при ЭКО, пригодна для микроскопической оценки и иммуноцитоморфологического исследования гранулезных клеток.

2. Определены основные морфологические характеристики гранулезных клеток стимулированных яичников при ЭКО. Впервые получены данные о размерных характеристиках ядер гранулезных клеток. Установлена связь между успешной имплантацией эмбриона и характеристиками гранулезных клеток стимулированных яичников, включающими количество клеток в препаратах, средний размер и вариабельность размера их ядер.

3. Новыми являются сведения об иммуноморфологических характеристиках рецепторов половых гормонов (FSHR, ER β , PR) гранулезных клеток стимулированных яичников человека при ЭКО. Установлена связь между успешной имплантацией эмбриона и интенсивностью экспрессии белков FSHR, ER β , PR в гранулезных клетках стимулированных яичников. Впервые в париетальных гранулезных клетках человека выявлена комбинированная экспрессия белка PR в виде сочетания ядерного и цитоплазматического окрашивания при иммуногистохимической реакции (ИГХ-реакции).

4. Впервые на основе морфологических характеристик гранулезных клеток стимулированных яичников определены критерии для прогнозирования успешной имплантации эмбриона при ЭКО. Разработана и проверена на пригодность использования математическая модель, которая включает средний размер ядер гранулезных клеток и интенсивность экспрессии белков FSHR, ER β . Диагностическая эффективность полученной модели составила 81,3%.

Положения, выносимые на защиту

1. Оптимальные визуализация и оценка морфологических, морфометрических и иммуноцитоморфологических характеристик гранулезных клеток фолликулярной жидкости, полученной из стимулированных яичников при ЭКО, достигнуты с помощью метода клеточных блоков.

2. Фолликулярная жидкость стимулированных яичников при успешной имплантации эмбриона по сравнению со случаями отсутствия имплантации характеризуется увеличением числа гранулезных клеток на 26,8%.

Морфологическими особенностями этих клеток являются увеличенный на 5,9% средний размер и сниженная на 10,9% вариабельность размеров их ядер.

3. Гранулезные клетки стимулированных яичников при успешной имплантации эмбриона по сравнению со случаями отсутствия имплантации характеризуются высокой гетерогенностью экспрессии белков ER β и FSHR и увеличением интенсивности экспрессии белков FSHR (на 6,6%), ER β (на 7,3%), PR (на 5,6%).

4. Морфологические характеристики гранулезных клеток, такие как средний размер ядер и интенсивность экспрессии белков FSHR и ER β , являются прогностическими факторами успешной имплантации эмбриона при ЭКО. Многофакторная модель, включающая данные предикторы, позволяет прогнозировать наступление имплантации эмбриона с чувствительностью 80,0% и специфичностью 82,4%.

Личный вклад соискателя ученой степени

Автор совместно с научным руководителем сформулировал научную проблему, цель, задачи и положения, выносимые на защиту. Автором лично выполнены: анализ научной литературы по теме; определение методологии и методики исследования; информационный поиск; анализ медицинской документации (медицинские карты стационарного больного); макроскопическая оценка проб фолликулярной жидкости; вырезка клеточных блоков; оценка результатов световой микроскопии, иммуноцитоморфологического исследования и морфометрического анализа; разработка протокола морфологического исследования; создание компьютерной базы данных; статистическая обработка и анализ полученных результатов; подготовка иллюстраций и написание диссертации. Результаты исследования отражены в публикациях в соавторстве, вклад соискателя — 90% [1-A–7-A]. «Способ изготовления препаратов гранулезных клеток фолликулярной жидкости методом клеточных блоков» признан учреждением образования «Белорусский государственный медицинский университет» рационализаторским предложением (удостоверение №11 от 24.07.2023), вклад соискателя — 90%. Разработана и внедрена инструкция по применению: «Метод иммуноцитоморфологического исследования фолликулярной жидкости» (рег. № 105–1124, утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь 13.12.2024), вклад соискателя — 80% [8-A].

Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов

Результаты диссертации представлены в виде 5 устных докладов: на научной сессии учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет» (секция «Медико-биологические науки № 1»,

Минск, 26 января 2023 г.), научно-практической конференции с международным участием, посвященной белорусской школе патологоанатомов «Современная патологическая анатомия: достижения вызовы и тренды» (приуроченная к 100-летию кафедры патологической анатомии БГМУ, Минск, 27 октября 2023 г.), XI съезде педиатров и II перинатальном Конгрессе Республики Беларусь (приуроченные к 60-летию педиатрического факультета БГМУ, Минск, 14–15 ноября 2024 г.), научной сессии учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет» (секция «Медико-биологические науки № 1», Минск, 30 января 2025.), международной научно-практической on-line конференции «Актуальные проблемы патологической анатомии» (Ташкент, 15 мая 2025 г.).

Метод иммуноцитоморфологического исследования фолликулярной жидкости внедрен в практическую деятельность государственных учреждений «Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя»», «Республиканский клинический медицинский центр» Управления делами Президента Республики Беларусь, учебный процесс кафедр акушерства и гинекологии с курсом повышения квалификации и переподготовки, патологической анатомии и судебной медицины с курсом повышения квалификации и переподготовки учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет», что подтверждено 4 актами внедрения.

Опубликованность результатов диссертации

По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ, из них 5 статей в рецензируемых научных журналах в соответствии с пунктом 19 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь, 2 тезисов докладов на международных, республиканских съездах и конференциях, 1 инструкция по применению. Общий объем публикаций составил (3,82 авторских листа).

Структура и объем диссертации

Текст диссертации изложен на 125 страницах машинописного текста и состоит из введения, общей характеристики работы, аналитического обзора литературы, описания материала и методов исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения (3 главы), заключения, списка использованных источников (15 русскоязычных и 178 иностранных использованных источников, 8 печатных работ соискателя по теме диссертации), 3 приложений. Работа иллюстрирована 28 таблицами и 24 рисунками, составляющими 21 страницу.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Материалы исследования. Исследовали гранулезные клетки (ГК) фолликулярной жидкости (ФЖ), полученной при аспирации ооцит-кумулюсных комплексов у 170 женщин с бесплодием после их обследования в общепринятом объеме и индукции суперовуляции в соответствии с клиническим протоколом, утвержденным Министерством здравоохранения Республики Беларусь в области ВРТ [Пост. Мин. здрав. РБ № 124 от 24.12.2019; Пост. Мин. здрав. РБ № 115 от 24.12.2020]. Забор материала выполнен на базе отделения ВРТ ГУ Республиканский научно-практический центр «Мать и дитя».

Дизайн исследования. Проспективное аналитическое обсервационное исследование включало следующие этапы: забор ФЖ, $n=170$; исключение образцов по макроскопическим критериям, $n=10$; подготовка проб методами жидкостной цитологии (ЖЦ) и клеточных блоков (КБ) с визуализацией ГК, $n=160$; сравнение методов пробоподготовки, $n=160$; исключение образцов по микроскопическим критериям, $n=36$; иммуноморфологическая визуализация рецепторов гормонов (FSHR, ER β , PR), $n=124$; морфометрическая оценка, $n=124$; разделение образцов на исследуемые группы (ИГ) на основании результатов ЭКО: ИГ1 — отсутствие имплантации эмбриона (ИЭ) ($n=61$), ИГ2 — успешная ИЭ ($n=54$), криоконсервация эмбриона ($n=9$) — исключены из исследования; клинико-морфологические корреляции; прогнозирование наступления ИЭ; проверка прогностической модели на дополнительно полученных образцах ФЖ ($n=32$).

Методы исследования. Использовали авторскую инструкцию «Метод иммуноцитоморфологического исследования фолликулярной жидкости» для пробоподготовки ФЖ, иммуноморфологической визуализации рецепторов гормонов и морфометрического анализа [8–А].

Цитологические препараты получили методом фильтрации в автоматическом процессоре ЖЦ. КБ изготовили модифицированным нами методом с применением агар-агара (П-900, E406) в качестве промежуточной среды. Гистологическую проводку КБ выполнили по стандартной методике. Толщина срезов составила 3 мкм. Препараты окрасили гематоксилином и эозином. Разработали пятибалльную шкалу (от 0 до 4) для оценки препаратов по качеству визуализации ГК. Баллы по пяти признакам (клеточность, пласты клеток, примеси, сохранность ядер, сохранность цитоплазмы) суммировали. Выполнили иммуноцитохимическое (ИЦХ) исследование с антителами FineTest (Китай) и ScyTek Laboratories (США): анти-PR Rabbit pAb (FNab09774), анти-FSHR Rabbit pAb (FNab10096), Анти-

ER β (ERb455). Использовали полимерную систему детекции в соответствии с рекомендациями производителя для визуализации результата реакции.

Сканировали препараты с использованием цифрового слайд-сканера MoticEasyScan Pro 6 с разрешением до 400 крат для морфометрического анализа. Сканы препаратов импортировали в среду компьютерной программы Aperio Image Scope v12.4.3.5008 для подсчета количества ГК и измерения диаметра их ядер. Рассчитали средние значения диаметра ядер. Количественную оценку экспрессии белков рецепторов с ядерной локализацией (ER β , PR) провели путем подсчета количества окрашенных и неокрашенных ядер на 100 ГК в случайном поле зрения. Качественную оценку результатов ИЦХ-реакции выполнили с помощью компьютерной программы Aperio Image Scope v12.4.3.5008, где подсчет позитивных пикселей произведен в 3 полях зрения сканов при увеличении $\times 40$ по алгоритму «Positive Pixel Count v9». Среднюю интенсивность всех пикселей (Iavg) рассчитали по шкале от 0 до 255 единиц. Гетерогенность экспрессии белков рецепторов оценили по трехбалльной визуально-аналоговой шкале.

Полученные данные обработали на персональной ЭВМ с использованием статистических пакетов Excel (Microsoft inc., США), Statistica 13.0 (StatSoft inc., США), SPSS Statistics 26. Методы параметрической статистики использовали при нормальном распределении признака. Достоверность различий сравниваемых величин оценивали на основании критерия Стьюдента (t-критерий), а также критерия Фишера (F-критерий, при сравнении двух независимых групп). С этой целью рассчитывали частоту встречаемости признака, средние значения, ошибки репрезентативности, а также дисперсии групп. Методы непараметрической статистики использовали для обработки данных, если гипотезу о нормальности распределения признака в совокупности отвергали. Сравнение двух независимых выборок осуществляли с помощью критерия Манна–Уитни (U). Парный критерий Уилкоксона использовали при сравнении зависимых групп. Методы описательной статистики использовали для анализа выбранных переменных. ROC-анализ применяли для математической оценки прогностической значимости. Корреляционный анализ полученных данных проводили при помощи непараметрического двустороннего коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r_s) для оценки тесноты взаимосвязи между независимыми переменными. Метод бинарной логистической регрессии («логит-модель») использовали для построения прогностической модели. Общую оценку согласия модели и реальных данных проводили с использованием теста согласия Хосмера–Лемешова. Оценку эффективности созданной модели выполняли с помощью ROC-анализа с построением характеристических кривых. Диагностическую

ценность анализируемых показателей определили на основании расчета чувствительности, специфичности, а также диагностической эффективности теста. Результаты исследования считали достоверными при вероятности безошибочного прогноза не менее 95%.

Визуализация гранулезных клеток.

Исключили из исследования 10 образцов ФЖ при визуальной оценке по макроскопическим признакам. Двумя методами из 160 образцов ФЖ изготовили микроскопические препараты. Применили разработанную нами шкалу для оценки качества визуализации (таблица 1).

Таблица 1 – Сравнительная характеристика препаратов по качеству визуализации гранулезных клеток (n=160)

Параметр	Метод (n=160)	Среднее значение± стандартное отклонение, баллы	Медиана [Q1:Q3]	p*	z-статистики	r*** (размер эффекта)	p**
Клеточность	ЖЦ	1,84±0,79	2 [1:2]	0,0001	-9,960	0,787	0,0001
	КБ	2,74±1,03	3 [2:3]				
Пласты клеток	ЖЦ	1,17±0,71	1 [1:2]	0,0001	-11,368	0,899	0,0001
	КБ	3,06±1,01	3 [3:4]				
Примеси	ЖЦ	3,35±0,67	3 [3:4]	0,0001	-10,771	0,852	0,0001
	КБ	1,97±0,87	2 [1:3]				
Сохранность ядер	ЖЦ	2,16±0,87	2 [2:3]	0,0001	-9,373	0,741	0,0001
	КБ	2,88±1,13	3 [2:4]				
Сохранность цитоплазмы	ЖЦ	2,35±0,92	2 [2:3]	0,0001	-8,592	0,679	0,0001
	КБ	1,68±0,92	2 [1:2]				
Суммарная оценка	ЖЦ	10,87±2,66	12 [9:13]	0,0001	-8,142	0,644	0,0001
	КБ	12,35±3,84	13 [11:15]				

Примечание: * $p < 0,05$ при использовании непараметрических тестов на первом этапе для скрининговой оценки различий в распределениях; ** $p < 0,05$ при использовании критерия Уилкоксона для сравнения зависимых групп и оценки величины эффекта при обнаружении различий на втором этапе; *** размер эффекта оценён с применением корреляционного анализа на основе статистики Уилкоксона.

Критерии исключения по микроскопическим параметрам (0 баллов по шкале оценки препаратов) применили в 36 случаях.

Установили, что препараты из КБ по сравнению с ЖЦ имеют высокую оценку по наиболее значимым параметрам: «клеточность» ($p=0,0001$), «пласты клеток» ($p=0,0001$), «сохранность ядер» ($p=0,0001$), которые необходимы для оценки цитоморфологических особенностей ГК. Препараты из КБ по сравнению с ЖЦ имели лучшую суммарную оценку качества визуализации ($p=0,0001$), что определило выбор метода КБ как оптимального

для пробоподготовки ФЖ. Установили, что ЖЦ по сравнению с КБ дает оптимальную визуализацию цитоплазмы ГК ($p=0,0001$), и лучшую оценку по параметру «примеси» ($p=0,0001$).

Цитоморфологическая характеристика гранулезных клеток.

Установлено, что ИГ не отличались по возрасту ($p=0,826$), длительности бесплодия ($p=0,360$), ИМТ ($p=0,551$), объему образцов ФЖ ($p=0,968$) и количеству пунктированных фолликулов ($p=0,057$). Однако ИГ1 и ИГ2 имели статистически значимые различия по количеству полученных ооцитов ($p=0,043$). ИГ2 (с успешной имплантацией) характеризовалась статистически значимым большим количеством ооцитов при сравнимо одинаковом количестве пунктированных фолликулов по сравнению с ИГ1, что, вероятно, связано с наличием кистозных атретичных фолликулов в ИГ1.

Установлены статистически значимые различия между ИГ1 и ИГ2 по количеству ГК в препаратах ($p=0,005$). В ИГ2 по сравнению с ИГ1 имело место большее количество ядер ГК (рисунок 1А). ИГ1 и ИГ2 имели статистически значимые различия на высоком уровне значимости по средним размерам ядер ГК ФЖ ($p=0,0001$). В ИГ2 (с успешной имплантацией эмбриона) ядра гранулезных клеток ФЖ имели значимо больший размер (рисунок 1Б).

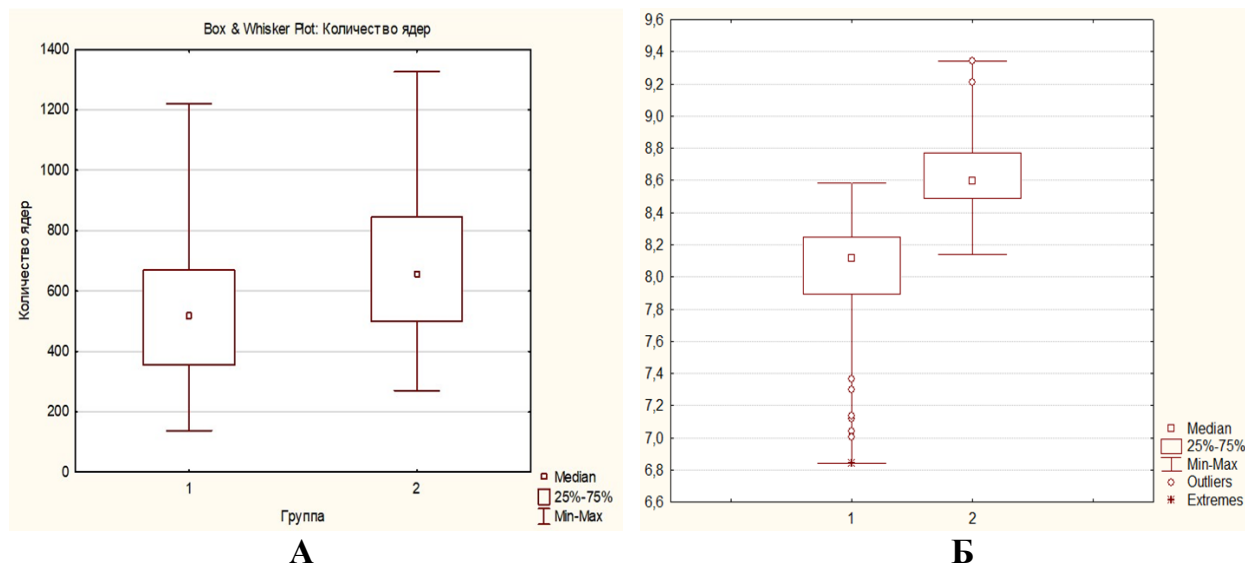


Рисунок 1 – Сравнение групп по распределению количества ядер ГК в препаратах (А) и среднего размера ядер ГК (Б)

Произведен подсчет количества ядер в каждом случае для объективной оценки гетерогенности их размеров в диапазонах диаметра: до 6 мкм, от 6 до 9 мкм, 9 мкм и более. Рассчитано процентное соотношение ядер в выбранных диапазонах. Распределение ядер ГК в ИГ по размеру представлено на рисунке 2. Выявленные нами статистически значимые различия на высоком

уровне значимости по доле ядер с диаметром до 6 мкм ($p=0,001$) и более 9 мкм ($p=0,001$) между ИГ1 и ИГ2 основаны на гетерогенности ГК, которые разделяются на кумулюсные, внутренние париетальные и наружные париетальные. Однако, в диапазоне 6–9 мкм исследуемые группы не имели статистически значимых различий ($p=0,601$).

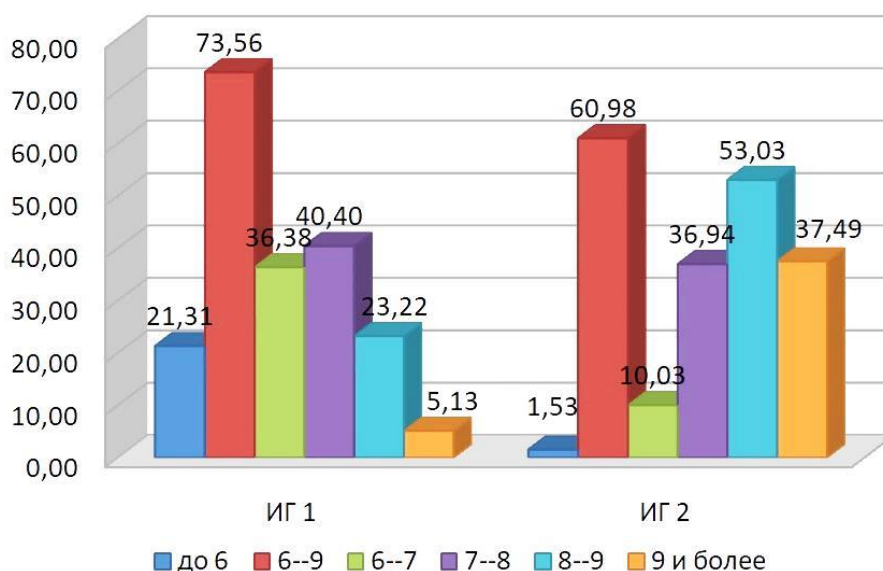


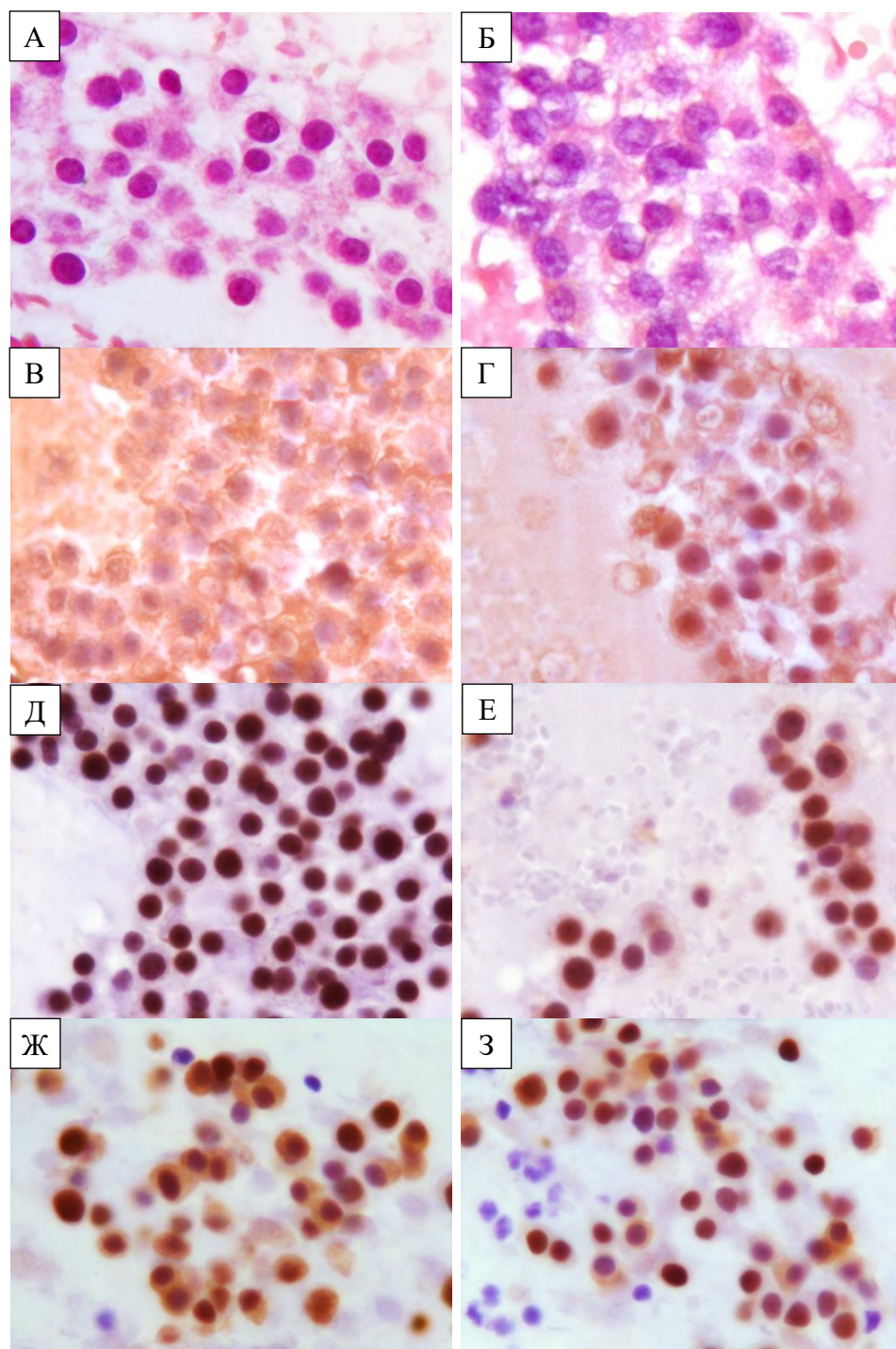
Рисунок 2– Распределение ядер гранулезных клеток в исследуемых группах по размеру (мкм), %

Установлены особенности вариативности (K_v) диаметра ядер ГК в ИГ1 и ИГ2 (16,5% и 14,7% соответственно), что свидетельствует об однородности (меньшей гетерогенности на 10,9%) размеров ядер ГК в случаях успешной ИЭ. Подобные различия между группами выявлены в диапазонах сравнения.

Характеристика гормонорецепторного статуса гранулезных клеток.

Визуальная оценка ИЦХ-препаратов выявила мембранно-цитоплазматическую экспрессию FSHR, ядерную экспрессию ER β и комбинированную (ядерную и цитоплазматическую) экспрессию PR. Интенсивность окрашивания варьировала от негативного до высокоинтенсивного. Результаты визуализации ГК и характер экспрессии белков FSHR, ER β , PR представлены на рисунке 3.

Установлены статистически значимые различия между ИГ на основании морфометрической качественной оценки экспрессии белков рецепторов в ГК. Интенсивность экспрессии белков FSHR ($p=0,001$), ER β ($p=0,031$) и PR ($p=0,024$) выше в группе с успешной ИЭ, что представлено на рисунке 4.



А — высокая гетерогенность размеров ядер; Б — низкая гетерогенность размеров ядер с преобладанием крупных; В — равномерная выраженная экспрессия FSHR; Г — гетерогенная умеренная экспрессия FSHR; Д — равномерная выраженная экспрессия ER β ; Е — гетерогенная умеренная экспрессия ER β ; Ж — равномерная выраженная ядерная и цитоплазматическая экспрессия PR; З — гетерогенная умеренная экспрессия PR

Рисунок 3 – Гетерогенность ядер гранулезных клеток фолликулярной жидкости и характер экспрессии рецепторов гормонов (А, Б — окраска гематоксилином и эозином, ув. $\times 400$; В, Г, Д, Е, Ж, З — хромоген — ДАБ, контрокрашивание гематоксилином Майера, ув. $\times 200$)

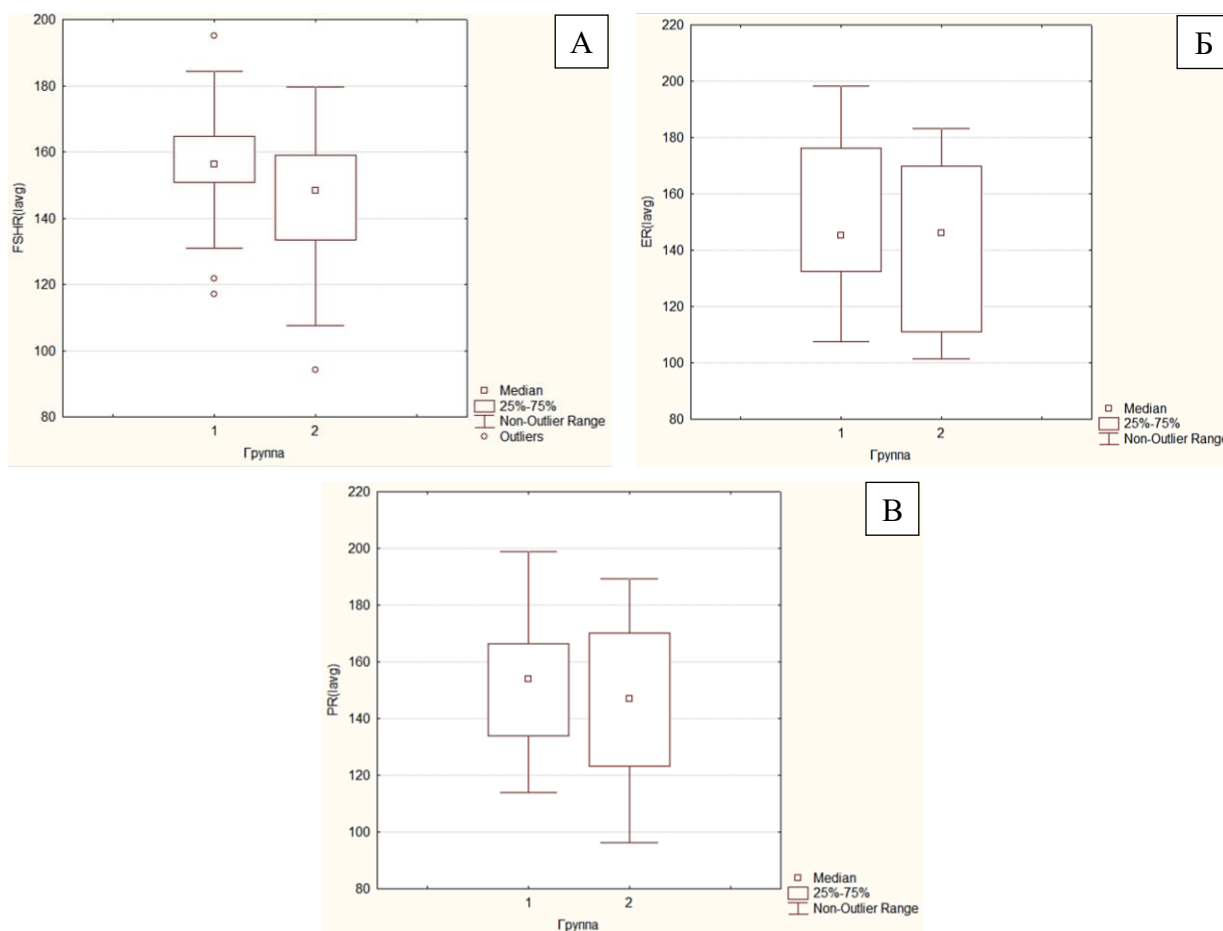


Рисунок 4 – Дисперсионный анализ интенсивности экспрессии FSHR (А), ERβ (Б), PR (В) в гранулезных клетках ФЖ

Прогнозирование успешной имплантации эмбриона при ЭКО.

Первым этапом проведен корреляционный анализ данных для исключения из дальнейшего рассмотрения признаков, которые имеют высокий коэффициент парной корреляции. Результаты показали, что выбранные предикторы умеренно коррелируют между собой и могут быть использованы в дальнейшем. Представлены результаты ROC-анализа для оценки прогностической значимости количества ГК в препаратах, среднего размера ядер ГК и показателей интенсивности экспрессии белков рецепторов в таблице 2.

Таблица 2 – Диагностическая значимость характеристик гранулезных клеток при оценке вероятности наступления имплантации эмбриона

Показатель	ПЗ	ДЧ %	ДС %	ДЭ %	AUC	p (против AUC=0,5)
FSHR lavg	<152,37	78,6	80,95	79,78	0,827 (от 0,727 до 0,903)	0,001
ER-β lavg	<118,33	77,19	83,33	80,26	0,801 (от 0,717 до 0,896)	0,001
PR lavg	<124,11	52,38	75,89	64,14	0,689 (от 0,583 до 0,770)	0,001

Окончание таблицы 2

Количество гранулезных клеток в препарате, шт.	>637	55,6	73,8	64,4	0,654 (от 0,559 до 0,740)	0,001
Средний размер ядра, мкм	>8,37	86,4	77,4	81,9	0,812 (от 0,715 до 0,895)	0,001

Примечание – ПЗ — пороговое значение; ДЧ — диагностическая чувствительность; ДС — диагностическая специфичность; ДЭ — диагностическая эффективность; AUC — площадь под ROC-кривой; p (против AUC=0,5) — уровень значимости, при котором оцениваемая AUC статистически значимо отличается от неинформативного значения 0,5.

Параметры с большей диагностической эффективностью (FSHR lavg — 79,78%, ER-β lavg — 80,26%, средний размер ядра — 81,9%) использованы при проведении регрессионного анализа. Пошаговое включение предикторов в статистическую модель привело к уравнению 1.

$$P\left\{Y = \frac{1}{\bar{X}_i}\right\} = \frac{1}{1+e^{-z_i}} = \frac{1}{1+2,718^{-(-139,27 - 0,052x_1 - 0,002x_2 + 17,602x_3)}}, \quad (1)$$

где P — вероятность наступления/ненаступления ИЭ;

X_1 — FSHR lavg; X_2 — ERβ lavg; X_3 — средний размер ядра;

–139,27 — константа регрессионного уравнения;

–0,052, –0,002, 17,602 — коэффициенты регрессии.

Площадь под ROC-кривой для модели составила 0,879 (рисунок 5).

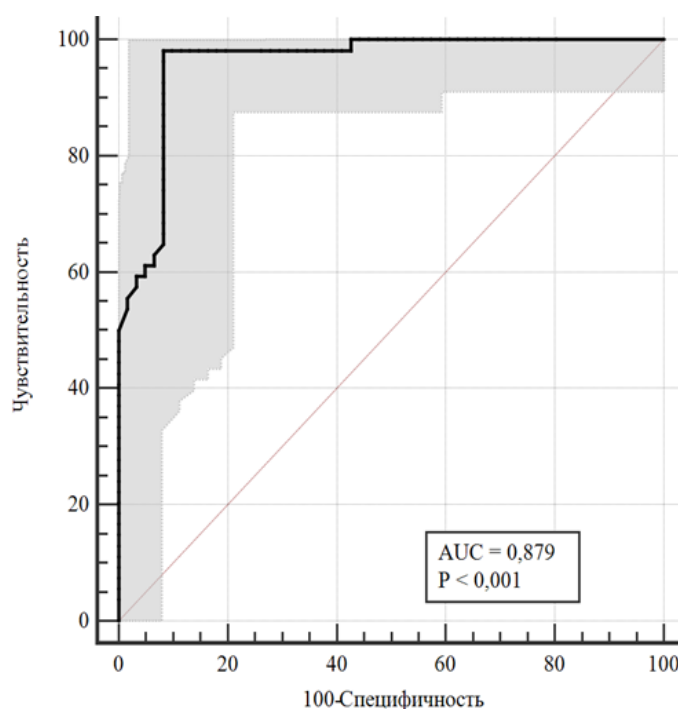


Рисунок 5 – ROC-кривая для логистической регрессионной модели P

Были получены: чувствительность модели — 94,4%, специфичность модели — 93,4%, общая эффективность — 93,9%. Оптимальное пороговое значение вероятности для чувствительности и специфичности данной модели — 0,610 (если $P > 0,610$ — высокая вероятность наступления ИЭ, а если $P \leq 0,610$ — низкая вероятность наступления ИЭ).

Проведено испытание прогностической модели. Группу валидации составили дополнительно полученные образцы ФЖ от 32 пациенток. Успешная ИЭ предсказана у 15 пациенток, а у 17 — отсутствие имплантации. Прогноз был верным для 26 пациенток группы валидации. Доля правильно классифицированных случаев составила 81,3%. Правильно отнесены к группе с успешной ИЭ 80% пациенток (чувствительность), а к группе с отсутствием ИЭ — 82,4% (специфичность).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Суммарная оценка качества препаратов из клеточных блоков (КБ) выше, чем изготовленных методом жидкостной цитологии (ЖЦ) ($12,35 \pm 3,84$ и $10,87 \pm 2,66$ соответственно; $p=0,0001$). Различия методов статистически значимы по параметрам: «клеточность» ($p=0,0001$), «пласты клеток» ($p=0,0001$), «сохранность ядер» ($p=0,0001$), «примеси» ($p=0,0001$) и «сохранность цитоплазмы» ($p=0,0001$). Выявлено, что клеточность препаратов из КБ ($2,74 \pm 1,03$) значительно выше, чем препаратов, изготовленных методом ЖЦ ($1,84 \pm 0,79$). Низкая оценка ($1,17 \pm 0,71$) препаратов по параметру «пласты клеток» в сравнении с методом КБ ($3,06 \pm 1,01$) обусловлена применением мембранного фильтра при ЖЦ. Оценка параметра «сохранность ядер» в препаратах из КБ ($2,88 \pm 1,13$) превышает таковую при применении ЖЦ ($2,16 \pm 0,87$). Препараты, приготовленные методом ЖЦ, имели минимальный фон и более высокую оценку по параметру «примеси» ($3,35 \pm 0,67$) по сравнению с препаратами из КБ ($1,97 \pm 0,87$). Отсутствие этапа центрифугирования при пробоподготовке фолликулярной жидкости (ФЖ) методом ЖЦ определяет более высокую оценку препаратов, полученных данным методом по сохранности цитоплазмы ($2,35 \pm 0,92$) по сравнению с препаратами из КБ ($1,68 \pm 0,92$) [1-А, 3-А, 6-А].

2. Установлены статистически значимые различия между исследуемыми группами (ИГ) по количеству гранулезных клеток (ГК) в препаратах: в ИГ2 по сравнению с ИГ1 количество ГК больше (Ме [Q1:Q3]: 657 [498:845] и 518 [351:671] соответственно; $p=0,005$). ИГ1 и ИГ2 имеют статистически значимые различия по средним размерам ядер ГК ФЖ ($p=0,0001$). В ИГ2 (с успешной имплантацией эмбриона (ИЭ)) ядра ГК имеют

увеличенный размер. Выявленные статистически значимые различия между ИГ1 и ИГ2 по доле ядер с диаметром до 6 мкм ($p=0,001$) и более 9 мкм ($p=0,001$) обусловлены гетерогенностью ГК, которые разделяются на кумулюсные, внутренние париетальные и наружные париетальные. Однако в диапазоне 6–9 мкм исследуемые группы не имели статистически значимых различий ($p=0,601$). Дополнительное разделение диапазона 6–менее 9 мкм выявило статистически значимые различия между ИГ1 и ИГ2: по доле ядер с диаметром 6–менее 7 мкм ($p=0,001$) и 8–менее 9 мкм ($p=0,001$). В диапазоне 7–менее 8 мкм ИГ не имели различий ($p=0,4$). В ИГ1 определена высокая гетерогенность размеров ядер ГК, что выражается в относительно равномерном распределении ядер в диапазоне от 6 до 9 мкм (6–менее 7 мкм — 36,38%, 7–менее 8 мкм — 40,40%, 8–менее 9 мкм — 23,22%,). В ИГ2 в диапазоне от 6 до 9 мкм преобладают ядра крупного размера с неравномерным распределением ядер по размеру (6 –менее 7 мкм — 10,03%, 7–менее 8 мкм — 36,94%, 8–менее 9 мкм — 53,03%), что указывает на низкую гетерогенность размеров. Также низкая гетерогенность размеров ядер ГК в ИГ2 подтверждается снижением коэффициента вариации на 10,9% как во всей совокупности, так и в выделенных диапазонах (до 6 мкм — на 26,7%, 6–9 мкм — на 12,5%, более 9 — на 4,5%) [5-А].

3. Анализ результатов визуальной количественной оценки экспрессии белков ядерных рецепторов в ГК показал отсутствие статистически значимых различий между ИГ по позитивности ER β ($p=0,064$), коэффициенту ядерной экспрессии (КЯЭ) ER β ($p=0,268$), позитивности PR ($p=0,950$), КЯЭ PR ($p=0,254$). Визуальная оценка гетерогенности экспрессии белков рецепторов в ГК позволила установить статистически значимые различия между ИГ1 и ИГ2: в группе с успешной имплантацией выше гетерогенность экспрессии FSHR и ER β ($p=0,02$ и $p=0,034$ соответственно). ИГ1 и ИГ2 схожи по гетерогенности экспрессии PR ($p=0,098$). Установлены статистически значимые различия между ИГ на основании морфометрической качественной оценки экспрессии белков рецепторов в ГК. Интенсивность экспрессии белков FSHR, ER β и PR выше в группе с успешной ИЭ ($p=0,001$, $p=0,031$ и $p=0,024$ соответственно). Кроме того, статистический анализ показал особенности вариативности ($K_{V(FSHR)}$) среднего значения интенсивности в ИГ1 и ИГ2 (9,7% и 11,5% соответственно), что свидетельствует о более разнородной совокупности рецепторов FSHR в цитоплазме ГК в случаях успешной имплантации. При этом в ИГ1 и ИГ2 коэффициенты вариации среднего значения интенсивности ER β ($K_{V(ER\beta)}$) и PR ($K_{V(PR)}$) существенно не различались (18,8% и 19%, 15,8% и 16,9% соответственно). Впервые в париетальных ГК человека выявлена комбинированная (ядерная и цитоплазматическая) экспрессия белка PR при ИГХ-реакции [2-А, 4-А, 7-А].

4. Определение интенсивности экспрессии белков FSHR (пороговое значение (ПЗ) <152,37, диагностическая чувствительность (ДЧ) — 78,6%, диагностическая специфичность (ДС) — 80,95%, диагностическая эффективность (ДЭ) — 79,78%, площадь под ROC-кривой (AUC) — 0,827), ER- β (ПЗ <118,33, ДЧ — 77,19%, ДС — 83,33%, ДЭ — 80,26%, AUC — 0,801) и среднего размера ядер (ПЗ >8,37 мкм, ДЧ — 86,4%, ДС — 77,4%, ДЭ — 81,9%, AUC — 0,812) имеют лучшую диагностическую ценность при прогнозировании успешной ИЭ при проведении ЭКО по сравнению с определением интенсивности экспрессии белка PR (ПЗ <124,11, ДЧ — 52,38%, ДС — 75,89%, ДЭ — 64,14%, AUC — 0,689) и количества гранулезных клеток в препаратах (ПЗ >637, ДЧ — 55,6%, ДС — 73,8%, ДЭ — 64,4%, AUC — 0,654). Предложенная математическая модель прогнозирования успешной ИЭ при проведении ЭКО включает результаты одновременного определения интенсивности экспрессии белков FSHR, ER- β и среднего размера ядер ГК. При выборе оптимального порогового значения результативной переменной P (0,610) достигнуты ДЧ — 94,4%, ДС — 93,4%, ДЭ — 93,9% (AUC — 0,879), что указывает на «очень хорошее» качество созданной модели согласно экспертной шкале. При испытании прогностической модели на группе валидации из 32 пациенток получены ДЧ — 80%, ДС — 82,4%, ДЭ — 81,3% [4-А, 7-А, 8-А].

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. Для оптимальной визуализации ГК ФЖ при проведении ЭКО следует использовать метод КБ [3-А].

2. Исследование ГК ФЖ при проведении ЭКО должно включать морфологическую, морфометрическую и иммуноцитоморфологическую оценку [1-А, 2-А, 3-А, 4-А, 5-А, 6-А].

3. Рекомендуется включать результаты одновременного определения среднего размера ядер, интенсивности экспрессии белков FSHR и ER β ГК в разработанную математическую модель для прогнозирования успешной ИЭ [4-А, 7-А, 8-А].

4. Специалистам отделений ВРТ при проведении ЭКО рекомендуется использовать разработанную и утвержденную Министерством здравоохранения Республики Беларусь инструкцию по применению «Метод иммуноцитоморфологического исследования фолликулярной жидкости» [8-А].

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ

Статьи в рецензируемых журналах

1-А. Первый опыт применения жидкостной цитологии в исследовании фолликулярной жидкости при применении вспомогательных репродуктивных технологий / **П. М. Мотолянец**, О. А. Юдина, А. И. Герасимович, Т. П. Ващилина, И. В. Курлович // Репродуктивное здоровье. Восточная Европа. – 2021. – Т. 11, № 4. – С. 513–518.

2-А. **Мотолянец, П. М.** Иммуноцитоморфологические характеристики гранулезных клеток фолликулярной жидкости при экстракорпоральном оплодотворении / П. М. Мотолянец, О. А. Юдина, А. З. Смоленский // Новости медико-биологических наук. – 2025. – Т. 25, № 1. – С. 55–63.

3-А. **Мотолянец, П. М.** Сравнительный анализ методов жидкостной цитологии и клеточных блоков для визуализации гранулезных клеток фолликулярной жидкости / П. М. Мотолянец, О. А. Юдина, А. З. Смоленский // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2025. – Т. 24, № 2. – С. 20–28.

4-А. Прогнозирование успешной имплантации эмбриона при экстракорпоральном оплодотворении, основанное на морфологической и иммуноцитохимической оценке гранулезных клеток фолликулярной жидкости / **П. М. Мотолянец**, О. А. Юдина, А. З. Смоленский, О. В. Хилько // Проблемы здоровья и экологии. – 2025. – Т. 22, № 2. – С. 18–25.

5-А. **Мотолянец, П. М.** Цитоморфологические особенности гранулезных клеток фолликулярной жидкости при экстракорпоральном оплодотворении / П. М. Мотолянец, О. А. Юдина, А. З. Смоленский // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2025. – Т. 23, № 3. – С. 247–253.

Тезисы докладов и материалы научных конференций

6-А. **Мотолянец, П. М.** Новые возможности в патоморфологической диагностике бесплодия у женщин / П. М. Мотолянец, О. А. Юдина // Современная патологическая анатомия: научно-практический опыт, пути совершенствования и инновационные технологии морфологической диагностики, роль в клинической практике, актуальные проблемы и перспективы развития : сб. материалов IV съезда патологоанатомов Респ. Беларусь с междунар. участием, Минск, 24–25 марта 2022 г. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Белорус. гос. мед. ун-т ; редкол.: Е. А. Анфиногенова [и др.]. – Минск, 2022. – С. 227–230.

7-А. **Мотолянец, П. М.** Выбор предикторов успешной имплантации эмбриона на основании оценки гранулезных клеток фолликулярной

жидкости / П. М. Мотолянец, О. А. Юдина // Актуальные проблемы патологической анатомии : сб. тез. докл. междунар. науч.-практ. on-line конф., Ташкент, 15 мая 2025 г. / М-во здравоохранения Респ. Узбекистан [и др.] ; редкол.: Г. А. Франк [и др.]. – Ташкент, 2025. – С. 24–26.

Инструкция по применению

8-А. Метод иммуноцитоморфологического исследования фолликулярной жидкости : инструкция по применению № 105-1124 : утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 13.12.2024 / Государственное учреждение «Республиканский клинический медицинский центр» Управления делами Президента Республики Беларусь ; И. С. Абельская, О. А. Юдина, **П. М. Мотолянец**, С. С. Галицкая. – Минск, 2024. – 10 с.

РЭЗІЮМЭ

Маталянец Павел Міхайлавіч

Марфалагічная характарыстыка гранулёзных клетак яечнікаў пацыентак з бесплоднасцю пры правядзенні экстракарпаральнага апладнення

Ключавыя словы: гранулёзныя клеткі, фалікулярная вадкасць, рэцэптары гармонаў, клетачны блок, вадкасная цыталогія, экстракарпаральнае апладненне, бесплоднасць

Мэта даследавання: выявіць марфалагічныя характарыстыкі гранулёзных клетак яечнікаў для прагназавання паспяховасці імплантацыі эмбрыёнаў пры экстракарпаральным апладненні.

Аб'ект і метады даследавання. Гранулёзныя клеткі фалікулярнай вадкасці, атрыманай пры экстракарпаральным апладненні, даследавалі з прымяненнем метадаў вадкаснай цыталогіі, клетачных блокаў, імунацытахімічнага даследавання, марфаметрыі і статыстычнага аналізу.

Атрыманыя вынікі і іх навізна. Упершыню вызначаны асноўныя марфалагічныя характарыстыкі гранулёзных клетак стымуляваных яечнікаў пры правядзенні экстракарпаральнага апладнення, уключаючы варыябельнасць памераў іх ядраў і асаблівасці экспрэсіі бялкоў рэцэптараў палавых гармонаў у іх. Упершыню ў парыятальных гранулёзных клетках чалавека выяўлена камбінаваная экспрэсія бялку PR у выглядзе спалучэння ядзернага і цытаплазматычнага афарбоўвання пры ІГХ-рэакцыі. Упершыню ўстаноўлена ўзаемасувязь паміж паспяховай імплантацыяй эмбрыёна і інтэнсіўнасцю экспрэсіі бялкоў FSHR, ER β у гранулёзных клетках фалікулярнай вадкасці, атрыманай пры правядзенні экстракарпаральнага апладнення. Распрацавана і праверана на прыдатнасць да выкарыстання матэматычная мадэль ацэнкі паспяховасці імплантацыі эмбрыёна.

Рэкамендацыі па выкарыстанні. Распрацаваны і ўкаранёны ў практычную ахову здароўя метады імунацытамарфалагічнага даследавання фалікулярнай вадкасці.

Галіна прымянення: паталагічная анатомія, рэпрадуктыўная медыцына.

РЕЗЮМЕ

Мотолянец Павел Михайлович

Морфологическая характеристика гранулезных клеток яичников пациенток с бесплодием при проведении экстракорпорального оплодотворения

Ключевые слова: гранулезные клетки, фолликулярная жидкость, рецепторы гормонов, клеточный блок, жидкостная цитология, экстракорпоральное оплодотворение, бесплодие

Цель исследования: выявить морфологические характеристики гранулезных клеток яичников для прогнозирования успешности имплантации эмбрионов при экстракорпоральном оплодотворении.

Объект и методы исследования. Гранулезные клетки фолликулярной жидкости, полученной при экстракорпоральном оплодотворении, изучали с применением методов жидкостной цитологии, клеточных блоков, иммуноцитохимического исследования, морфометрии и статистического анализа.

Полученные результаты и их новизна. Впервые определены основные морфологические характеристики гранулезных клеток стимулированных яичников при проведении экстракорпорального оплодотворения, включая вариабельность размеров их ядер и особенности экспрессии белков рецепторов половых гормонов в них. Впервые в париетальных гранулезных клетках человека выявлена комбинированная экспрессия белка PR в виде сочетания ядерного и цитоплазматического окрашивания при ИГХ-реакции. Впервые установлена взаимосвязь между успешной имплантацией эмбриона и интенсивностью экспрессии белков FSHR, ER β в гранулезных клетках фолликулярной жидкости, полученной при проведении экстракорпорального оплодотворения. Разработана и проверена на пригодность использования математическая модель оценки успешности имплантации эмбриона.

Рекомендации по использованию. Разработан и внедрен в практическое здравоохранение метод иммуноцитоморфологического исследования фолликулярной жидкости.

Область применения: патологическая анатомия, репродуктивная медицина.

SUMMARY

Matalianets Pavel Mikhailovich **Morphological characteristics of ovarian granulosa cells** **in patients with infertility during in vitro fertilization**

Keywords: granulosa cells, follicular fluid, hormone receptors, cell block, liquid-based cytology, in vitro fertilization, infertility

Aim of the study: to identify morphological characteristics of ovarian granulosa cells for predicting the success of embryo implantation after in vitro fertilization.

Object and methods of the study. Granulosa cells from the follicular fluid, obtained during in vitro fertilization, were studied using methods of liquid-based cytology, cell blocks, immunocytochemical examination, morphometry and statistical analysis.

Results obtained and their novelty. For the first time, the main morphological characteristics of granulosa cells of stimulated ovaries during in vitro fertilization were determined, including variability in the size of their nuclei and heterogeneity of expression of sex hormone receptor proteins in these cells. For the first time, combined expression of PR protein in human parietal granulosa cells was detected as a combination of nuclear and cytoplasmic staining in the IHC reaction. For the first time, a relationship was established between successful embryo implantation and the intensity of FSHR and ER β protein expression in granulosa cells of follicular fluid obtained during in vitro fertilization. A mathematical model for assessing the success of embryo implantation was developed and tested for suitability for use.

Recommendations for use. A method of immunocyto-morphological examination of follicular fluid has been developed and introduced into practical healthcare.

Field of application: pathological anatomy, reproductive medicine.

Подписано в печать 22.09.26. Формат 60×84/16. Бумага писчая «Марафон Бизнес».
Ризография. Гарнитура «Times».
Усл. печ. л. 1,39. Уч.-изд. л. 1,16. Тираж 60 экз. Заказ 562.

Издатель и полиграфическое исполнение: учреждение образования
«Белорусский государственный медицинский университет».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/187 от 24.11.2023.
Ул. Ленинградская, 6, 220006, Минск.