

Научно-практический медицинский
рецензируемый журнал «Доктор.Ру»
№ 1 (79) — 2013 год

Включен в Перечень российских
рецензируемых научных журналов,
в которых должны быть опубликованы
основные научные результаты
диссертаций на соискание ученых
степеней доктора и кандидата наук

Главный редактор журнала «Доктор.Ру»
Гинекология Эндокринология

Хамошина М. Б.,
профессор кафедры акушерства и
гинекологии с курсом перинатологии
ФГБОУ ВПО «Российский университет
дружбы народов», д. м. н., профессор

Редакционный совет
журнала «Доктор.Ру»
Гинекология Эндокринология

Андреева Е. Н.,
д. м. н., профессор кафедры
репродуктивной медицины и
хирургии факультета дополнительного
профессионального образования ГБОУ ВПО
«Московский государственный медико-
стоматологический университет им. Н.
А. Семашко», заведующая отделением
эндокринной гинекологии ФГБУ
«Эндокринологический научный центр»
Минздрава России

Анциферов М. Б.,
д. м. н., профессор, главный врач ГУЗ
«Эндокринологический диспансер ДЗМ»,
главный эндокринолог Департамента
здравоохранения г. Москвы

Дедов И. И.,
д. м. н., профессор, академик РАН и
РАМН, президент РАМН, директор ФГБУ
«Эндокринологический научный центр»
Минздрава России, заведующий кафедрой
эндокринологии ГБОУ ВПО «Первый
Московский государственный медицинский
университет им. И. М. Сеченова»
Минздрава России, главный специалист-
эксперт эндокринолог Минздрава России

Мельниченко Г. А.,
д. м. н., профессор, академик
РАМН, директор Института
клинической эндокринологии ФГБУ
«Эндокринологический научный центр»
Минздрава России, профессор кафедры
эндокринологии лечебного факультета
ГБОУ ВПО «Первый Московский
государственный медицинский
университет им. И. М. Сеченова»
Минздрава России

Петунина Н. А.,
д. м. н., профессор, заведующая
кафедрой эндокринологии факультета
послевузовского профессионального
образования врачей ГБОУ ВПО «Первый
Московский государственный медицинский
университет им. И. М. Сеченова»
Минздрава России

Прилепская В. Н.,
д. м. н., профессор, заместитель директора
по научной работе ФГБУ «Научный центр
акушерства, гинекологии и перинатологии
им. академика В. И. Кулакова» Минздрава
России

Радзинский В. Е.,
д. м. н., профессор, заведующий кафедрой
акушерства и гинекологии с курсом
перинатологии ФГБОУ ВПО «Российский
университет дружбы народов»

СЛОВО ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА ЖУРНАЛА «ДОКТОР.РУ» ГИНЕКОЛОГИЯ ЭНДОКРИНОЛОГИЯ

Савельева Г. М.,
д. м. н., профессор, академик РАМН,
заведующая кафедрой акушерства и
гинекологии педиатрического факультета
ГБОУ ВПО «Российский национальный
исследовательский медицинский
университет им. Н. И. Пирогова»
Минздрава России

Серов В. Н.,
д. м. н., профессор, академик РАМН, ФГБУ
«Научный центр акушерства, гинекологии
и перинатологии им. академика В. И.
Кулакова» Минздрава России

Сутурина Л. В.,
д. м. н., профессор, руководитель отдела
охраны репродуктивного здоровья ФГБУ
«Научный центр проблем здоровья семьи и
репродукции человека СО РАМН»

Фаткуллин И. Ф.
д. м. н., профессор, заведующий кафедрой
акушерства и гинекологии № 2 ГБОУ ВПО
«Казанский государственный медицинский
университет» Минздрава России

Шестакова М. В.,
д. м. н., профессор, член-корреспондент
РАМН, директор Института диабета
ФГБУ «Эндокринологический научный
центр» Минздрава России, заведующая
кафедрой эндокринологии и диабетологии
педиатрического факультета ГБОУ ВПО
«Первый Московский государственный
медицинский университет им. И. М.
Сеченова» Минздрава России

Научно-практический медицинский
рецензируемый журнал «Доктор.Ру»

Интернет-версия
www.medicina-journal.ru

В научной электронной библиотеке
eLIBRARY.ru доступны полные
тексты статей «Доктор.Ру»

Подписной индекс журнала в каталоге
Агентства «Роспечать»:
на полугодие — 18413;
на год — 80366

Особенности локального и системного иммунитета у больных с гиперпластическими процессами эндометрия

Н. А. Щербина, И. Ю. Кузьмина, М. А. Карташова, О. А. Кузьмина, И. Ю. Плaxотная

Specific Features of Local and Systemic Immunity in Patients with Endometrial Hyperplasia

N. A. Shcherbina, I. Yu. Kuzmina, M. A. Kartashova, O. A. Kuzmina, I. Yu. Plakhotnaya

Гиперплазия эндометрия (ГЭ) — гормонально-зависимое заболевание, возникающее на фоне нарушений центральной регуляции функции репродуктивной системы и вызывающее гиперэстрогению, недостаточность лютеиновой фазы или ановуляцию [6]. Механизм развития патологических пролиферативных процессов регулируется стероидными гормонами, цитокинами и эпидермальными факторами роста [3].

По данным различных исследований, важное значение в нарушении тканевого гомеостаза эндометрия имеет дисбаланс процессов апоптоза и пролиферации с относительным преобладанием последнего [4]. В течение менструального цикла происходят циклические изменения эндометрия путем реконструкции межклеточного матрикса в соответствии с гормональным статусом организма [5]. Вероятно, этим можно объяснить сложность и многообразие сочетаний

патофизиологических процессов, лежащих в основе формирования патологии слизистой оболочки полости матки (рис.).

Активация иммунных механизмов в эндометрии при его патологической трансформации сопровождается преимущественным изменением уровня локальных цитокинов [1]. Половые гормоны способны модулировать экспрессию провоспалительных цитокинов в эндометриальной ткани [8, 10].

Учитывая схожесть действия цитокинов и факторов гормональной регуляции, некоторые авторы рассматривают их в качестве своеобразной «микроэндокринной системы» [2, 7]. В связи с этим изучение иммунологических аспектов функционирования эндометрия включает в себя определение локального действия цитокинов.

Иммунная система принимает важное участие в обеспечении нормального функционирования репродуктивной систе-

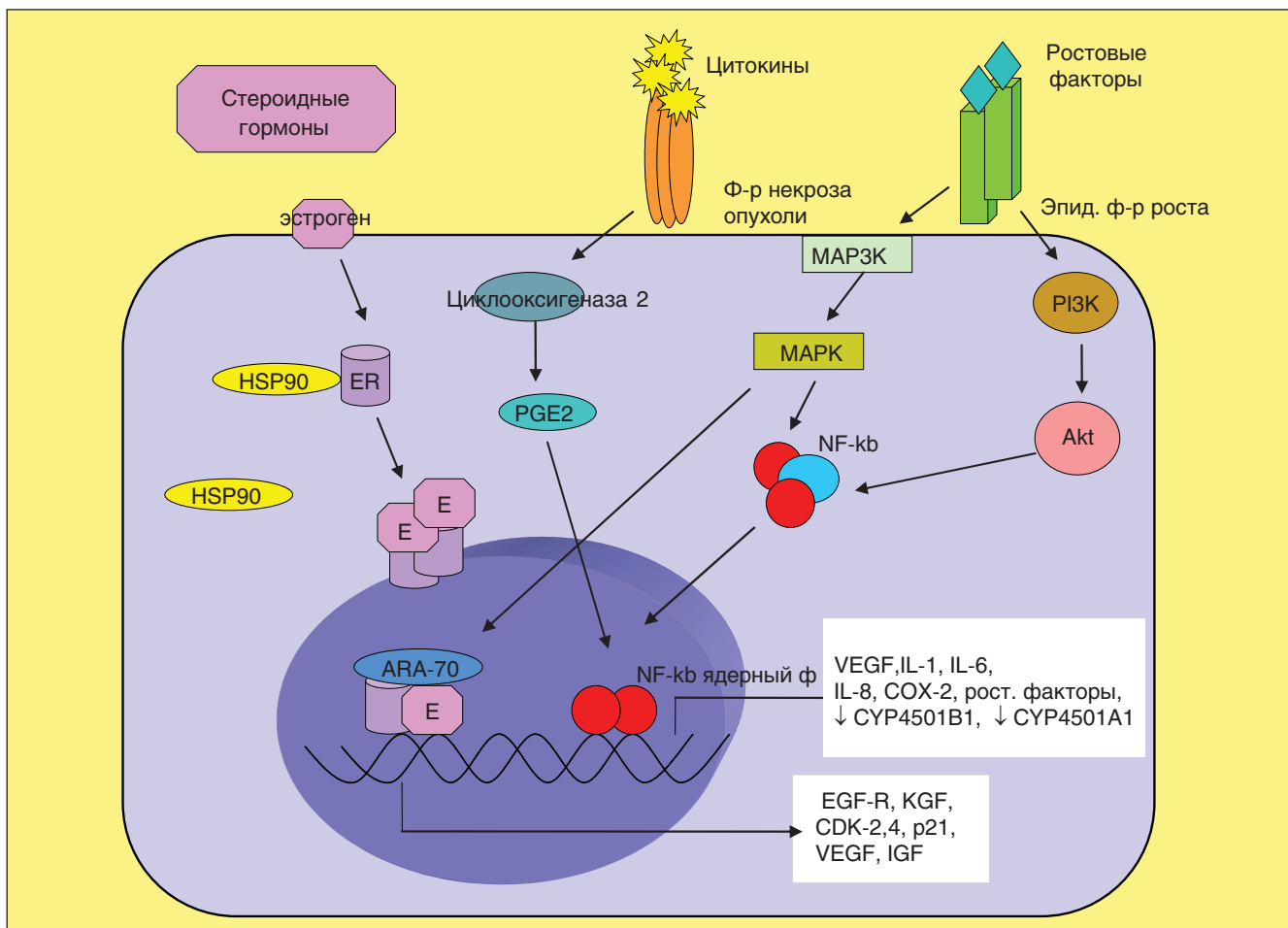


Рис. Механизм развития патологических пролиферативных процессов

мы женщины [9]. В литературе имеются данные, касающиеся изменений системного иммунитета при гиперпластических процессах эндометрия (ГПЭ) [11], однако сведения о состоянии локального иммунитета гиперплазированного эндометрия практически отсутствуют. Значение повышения локальной активации цитокинов при ГЭ и возможность использовать определение их уровня в диагностических и прогностических целях остаются дискуссионными [8].

Целью настоящего исследования явилось изучение основных показателей иммунной системы у больных с ГПЭ на системном и локальном уровнях.

Материал и методы

Исследование проведено на базе Харьковского областного клинического перинатального центра сотрудниками кафедры акушерства и гинекологии № 1 Харьковского национального медицинского университета. Под наблюдением находились 42 женщины перименопаузального периода с гистологически подтвержденной ГЭ, возраст которых находился в пределах от 47 до 52 лет. Критерием отбора в исследование служило наличие ГПЭ, распределение больных на группы выполняли в соответствии с морфологической формой ГПЭ (согласно МКБ-10). Контрольную группу составили 10 здоровых женщин без патологических изменений эндометрия.

Всем женщинам проводили раздельное диагностическое выскабливание слизистой матки с последующим морфологическим исследованием полученного материала. Гистологические исследования выполняли по стандартной методике серийных срезов. В результате гистологического исследования выяснено, что из 42 пациенток с ГПЭ 24 женщины были с аденоматозной гиперплазией эндометрия (АГЭ) и 18 — с железистой гиперплазией эндометрия (ЖГЭ). Соответственно были выделены группы АГЭ и ЖГЭ. Подавляющее большинство больных в обеих группах имели нарушения менструального цикла по типу олигоменореи в сочетании с менометроррагиями.

Иммунологические показатели. Абсолютное и процентное содержание лимфоцитов CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺ определяли методом прямой иммунофлюоресценции с мечеными ФИТЦ мышинными моноклональными антигенами фирмы Becton Dickinson (США) с регистрацией результатов на проточном цитофлуориметре Becton Dickinson. Для определения концентраций цитокинов ИЛ-1β, ИЛ-6 и ФНО-α твер-

дофазным ИФА-методом использовали наборы реагентов «Вектор-Бест» (Россия).

Статистическую обработку результатов исследования выполняли с помощью пакета компьютерных программ Microsoft Excel. Различия средних величин, оцененное по параметрическому критерию Стьюдента, считали статистически значимым при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При исследовании иммунологического статуса обследованных женщин выяснено, что по относительному содержанию различных популяций лимфоцитов в периферической крови больные с ЖГЭ существенно не отличались от пациенток контрольной группы. Данные исследования свидетельствовали об уменьшении средних значений количества Т-лимфоцитов (CD3⁺), Т-супрессоров (CD8⁺) и Т-хелперов (CD4⁺) в периферической крови у пациенток с ГПЭ по сравнению с контролем. Отмечена также тенденция к увеличению средних показателей относительного содержания ЕК-клеток (CD16⁺) (табл. 1). Существенных различий между больными с АГЭ и ЖГЭ по средним значениям указанных выше показателей не установлено.

Статистически значимые различия по средним показателям абсолютных значений Т- и В-лимфоцитов (CD3⁺ и CD19⁺), а также Т-хелперов (CD4⁺) между больными с ГПЭ и здоровыми женщинами также не выявлены (табл. 2). Установлены имевшие статистическую значимость снижение содержания субпопуляции Т-супрессоров (CD8⁺) и повышение содержания ЕК-клеток (CD16⁺) при ГПЭ по сравнению с группой контроля.

Изучение гуморального звена иммунитета, результаты которого представлены в таблице 3, позволило выявить статистически значимое увеличение содержания иммуноглобулинов класса G в группах больных с ГПЭ и при АГЭ по сравнению как со здоровыми женщинами, так и с больными группы ЖГЭ.

Существенных различий в средних уровнях IgM и IgA между обследованными группами не установлено.

Таким образом, исследование иммунных показателей на системном уровне позволило выявить тенденцию к уменьшению относительного содержания Т-лимфоцитов (CD3⁺), снижению количества Т-хелперов (CD4⁺) и Т-супрессоров (CD8⁺), а также повышение содержания ЕК-клеток (CD16⁺) и

Таблица 1

Относительное содержание различных популяций лимфоцитов в периферической крови у больных с гиперпластическими процессами эндометрия и в группе контроля ($M \pm m$), %

Показатели	Группа контроля (n = 10)	Больные с ГПЭ (n = 42)	Группа ЖГЭ (n = 18)	Группа АГЭ (n = 24)
CD3 ⁺	64,6 ± 1,8	59,9 ± 2,1	62,1 ± 3,8	59,1 ± 2,4
CD4 ⁺	41,1 ± 0,9	36,2 ± 1,6*	33,9 ± 3,2	35,9 ± 1,8*
CD8 ⁺	22,9 ± 1,0	20,9 ± 1,4	20,3 ± 2,8	22,1 ± 1,6
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,8 ± 0,2	2,1 ± 0,3	2,4 ± 0,8	1,9 ± 0,5
CD16 ⁺	13,7 ± 1,5	16,2 ± 1,8	16,7 ± 2,5	17,9 ± 2,9
CD19 ⁺	11,2 ± 1,1	8,8 ± 0,9	9,9 ± 1,9	8,4 ± 1,2

* Статистически значимые различия с группой контроля ($p < 0,05$).

Примечание. Здесь и в последующих таблицах: АГЭ — аденоматозная гиперплазия эндометрия; ГПЭ — гиперпластические процессы эндометрия; ЖГЭ — железистая гиперплазия эндометрия.

иммуноглобулинов класса G у больных с ГПЭ и, особенно, при наличии у них АГЭ.

Локальный иммунитет оценивали по содержанию основных популяций иммунокомпетентных клеток и цитокинов в ткани слизистой оболочки матки методом проточной цитофлюориметрии.

Согласно полученным данным, у больных с ГПЭ средний показатель количества лейкоцитов в пересчете на грамм ткани эндометрия был почти в 2 раза выше, чем у здоровых женщин ($p < 0,05$) (табл. 4).

При АГЭ среднее значение этого параметра оказалось выше, чем при ЖГЭ, хотя статистически значимой разницы между группами выявить не удалось. Процентное содержание лимфоцитов в общей популяции лейкоцитов эндометрия у больных с ГПЭ составило 64,90%, что существенно не отличалось от группы контроля (см. табл. 4).

При сравнении общего количества лимфоцитов в пересчете на грамм ткани эндометрия у больных с ГПЭ было выявлено почти двукратное повышение их содержания по срав-

нению с контрольными значениями, подобно тому как это отмечалось при анализе содержания количества лейкоцитов. Статистически значимых различий показателя в зависимости от формы ГЭ выявлено не было.

При ГПЭ отмечено изменение соотношения регуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов, что связано с уменьшением абсолютного содержания Т-хелперов (CD4⁺). В группе больных с ЖГЭ, несмотря на умеренное повышение абсолютного содержания CD4⁺-клеток, по сравнению с показателями у больных с ГПЭ и АГЭ, статистически значимых различий с группой контроля не выявлено.

Изменение уровня провоспалительных цитокинов зависит как от формы ГПЭ, так и от наличия сопутствующего воспалительного процесса в репродуктивной системе женщины. Формирование ГПЭ приводило к росту уровня локальных цитокинов (табл. 5). Так, уровень ИЛ-1β при ГПЭ статистически значимо увеличивался в 3,5 раза, при ЖГЭ более чем в 20 раз, а при АГЭ почти в 50 раз. Прогрессивно увеличивались уровни ИЛ-6 и ФНО-α. Значения ИЛ-6 при ГПЭ превосходили

Таблица 2

Абсолютное содержание различных популяций лимфоцитов в периферической крови у больных с гиперпластическими процессами эндометрия и в группе контроля ($M \pm m$), абс. $\times 10^9/л$ %

Показатели	Группа контроля (n = 10)	Больные с ГПЭ (n = 42)	Группа ЖГЭ (n = 18)	Группа АГЭ (n = 24)
Общее количество лимфоцитов в плазме крови	1,90 ± 0,20	1,95 ± 0,18	1,97 ± 0,60	1,95 ± 0,15
CD3 ⁺	1,10 ± 0,09	1,14 ± 0,10	1,10 ± 0,30	1,20 ± 0,09
CD4 ⁺	0,90 ± 0,02	0,70 ± 0,10	0,80 ± 0,30	0,70 ± 0,05
CD8 ⁺	0,50 ± 0,02	0,39 ± 0,03*	0,40 ± 0,1	0,40 ± 0,02*
CD16 ⁺	0,20 ± 0,05	0,38 ± 0,04*	0,35 ± 0,09	0,42 ± 0,05*
CD19 ⁺	0,20 ± 0,06	0,18 ± 0,02	0,15 ± 0,08	0,18 ± 0,03

* Статистически значимые различия с группой контроля ($p < 0,05$).

Таблица 3

Содержание иммуноглобулинов в периферической крови у больных с гиперпластическими процессами эндометрия и в группе контроля ($M \pm m$), мг%

Показатели	Группа контроля (n = 10)	Больные с ГПЭ (n = 42)	Группа ЖГЭ (n = 18)	Группа АГЭ (n = 24)
IgG	1223,0 ± 65,6	1490,2 ± 111,0*	1139,9 ± 99,2	1656,2 ± 143,1*,**
IgM	182,0 ± 12,1	179,8 ± 16,1	147,1 ± 18,1	199,1 ± 21,8
IgA	224,4 ± 24,9	217,9 ± 15,1	234,4 ± 23,8	212,3 ± 18,9

* Статистически значимое различие с группой контроля ($p < 0,05$).

** Статистически значимое различие с группой ЖГЭ ($p < 0,05$).

Таблица 4

Количество лейкоцитов и лимфоцитов на грамм ткани эндометрия у больных с гиперпластическими процессами эндометрия и в группе контроля ($M \pm m$)

Показатели	Группа контроля (n = 10)	Больные с ГПЭ (n = 42)	Группа ЖГЭ (n = 18)	Группа АГЭ (n = 24)
Количество лейкоцитов, $10^6/гтк$	1,22 ± 0,15	2,42 ± 0,29*	1,90 ± 0,36*	2,60 ± 0,40*
% лимфоцитов	62,90 ± 4,70	64,90 ± 1,50	65,50 ± 2,60	64,30 ± 1,60
Количество лимфоцитов, $10^6/гтк$	0,70 ± 0,10	1,40 ± 0,10*	1,30 ± 0,20*	1,50 ± 0,13*

* Статистически значимые различия с группой контроля ($p < 0,05$).

Содержание локальных цитокинов у больных с гиперпластическими процессами эндометрия и в группе контроля ($M \pm m$), пг/мг

Показатели	Группа контроля (n = 10)	Больные с ГПЭ (n = 42)	Группа ЖГЭ (n = 18)	Группа АГЭ (n = 24)
ИЛ-1β	3,56 ± 0,90	12,80 ± 1,32*	80,30 ± 8,90*	174,70 ± 15,10*
ИЛ-6	4,36 ± 1,19	22,55 ± 3,96*	44,32 ± 9,70*	67,81 ± 16,39*
ФНО-α	5,04 ± 1,68	9,96 ± 1,52*	12,41 ± 1,85*	15,59 ± 2,66*

* Статистически значимые различия с группой контроля ($p < 0,05$).

контроль в 5 раз, при ЖГЭ — в 10 раз, а при АГЭ — более чем в 15 раз. При этом уровень ФНО-α был статистически значимо повышен в 2–3 раза при всех типах гиперплазий.

Таким образом, в результате проведенного исследования выяснено, что формирование ГЭ сопровождается локальной активацией провоспалительных цитокинов ИЛ-1β, ИЛ-6 и ФНО-α. Уровни цитокинов прогрессивно повышаются при ЖГЭ и АГЭ.

Выводы

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что абсолютное и относительное содержание иммунокомпетентных клеток периферической крови не отражает изменений, имеющих в локальном звене иммунитета у больных с ГПЭ. Согласно полученным данным, однотипные изменения локального иммунитета слизистой оболочки

матки (выраженная лейкоцитарная инфильтрация эндометрия, представленная преимущественно Т-лимфоцитами и клетками моноцитарно-макрофагального ряда, с повышенной экспрессией молекул адгезии и некоторым увеличением содержания ЕК-клеток) характерны для больных как с железистой, так и с аденоматозной гиперплазией эндометрия.

Формирование ГЭ сопровождается локальной активацией провоспалительных цитокинов ИЛ-1β, ИЛ-6 и ФНО-α, уровни которых прогрессивно повышаются при ЖГЭ и АГЭ.

Заключение

Выявленные нарушения могут свидетельствовать о локальном воспалительном процессе в слизистой оболочке матки при наличии в ней гиперпластических или аденоматозных изменений.

Резюме

Цель исследования: изучение основных показателей иммунной системы, а также изменения локального иммунитета и содержания цитокинов слизистой оболочки матки у больных с гиперплазией эндометрия (ГЭ).

Материал и методы. Обследованы 42 женщины, находящиеся в перименопаузальном периоде, с гистологически подтвержденной ГЭ. Контрольную группу составили 10 здоровых женщин.

Всем женщинам проводили гистологическое исследование слизистой оболочки матки по стандартной методике серийных срезов. Содержание лимфоцитов CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺/CD8⁺ определяли методом прямой иммунофлюоресценции с мечеными ФИТЦ мышинными моноклональными антигенами, концентрацию цитокинов ИЛ-1β, ИЛ-6 и ФНО-α — твердофазным ИФА-методом.

Результаты. Исследование иммунных показателей на системном уровне позволило выявить тенденцию к уменьшению относительно содержания Т-лимфоцитов (CD3⁺), снижение количества Т-хелперов (CD4⁺) и Т-супрессоров (CD8⁺), а также повышение содержания ЕК-клеток (CD16⁺) и иммуноглобулинов класса G у больных с ГЭ.

При изучении локального иммунитета у больных с ГЭ было обнаружено почти двукратное увеличение количества лимфоцитов по сравнению с контрольными значениями. Формирование ГЭ сопровождалось локальной активацией провоспалительных цитокинов ИЛ-1β, ИЛ-6 и ФНО-α.

Заключение. Выявленные нарушения могут свидетельствовать о локальном воспалительном процессе в слизистой оболочке матки при наличии в ней гиперпластических или аденоматозных изменений.

Ключевые слова: гиперплазия эндометрия (ГЭ), локальный иммунитет, системный иммунитет, аденоматоз.

Summary

Study Objective: To study the key immune parameters and investigate the changes in local immunity and cytokine levels in the endometrium in patients with endometrial hyperplasia (EH).

Materials and Methods: We examined 42 women in the perimenopausal state who had histologically confirmed EH. The control group included 10 healthy women.

Histological examination of uterine-lining samples was performed in all cases, using a conventional technique of serial sectioning. Levels of CD4⁺ and CD8⁺ cells and the CD4⁺/CD8⁺ ratio were determined by direct immunofluorescence, using fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated mice monoclonal antibodies. The levels of cytokines (IL1β, IL-6, and TNF-α) were measured by ELISA assay.

Results: The evaluation of systemic immunity revealed that in patients with EH, the relative percentage of T-cells (CD3⁺) and T-helper (CD4⁺) and T-suppressor (CD8⁺) cells tended to be lower and the levels of NK cells (CD16⁺) and immunoglobulin G tended to be higher than in the control group. The assessment of local immunity showed a nearly two-fold increase in lymphocyte counts in this patient population compared to the control group. The development of EH was associated with an increased activity of pro-inflammatory cytokines (IL1β, IL-6, and TNF-α) at the local level.

Conclusion: These abnormalities may suggest that hyperplastic or adenomatous lesions in the uterine lining are associated with local inflammatory changes.

Keywords: endometrial hyperplasia (EH), local immunity, systemic immunity, adenomatosis.

Литература

1. Выбор метода терапии гиперплазии эндометрия в перименопаузе / Л. М. Капушева [и др.] // *Акушерство и гинекология*. 2005. № 6. С. 37–42.
2. Давыдов А. И. Основные аспекты диагностики и гормональной терапии железистой гиперплазии эндометрия / А. И. Давыдов, Л. Чекувадзе, О. В. Крижановская // *Пробл. репродукции. Спец. выпуск*. 2009. С. 177–178.
3. Ищенко И. А. Молекулярно-биологические аспекты гиперпластических процессов и рака эндометрия / И. А. Ищенко, И. В. Станоевич // *Вопр. гинекологии, акушерства и перинатологии*. 2006. Т. 5. № 3. С. 47–50.
4. Клинышкова Т. В. Особенности пролиферативной активности и апоптоза при гиперпластических процессах эндометрия / Т. В. Клинышкова, Н. Б. Фролова // *Пробл. репродукции. Спец. выпуск*. 2009. С. 190–191.
5. Макаров О. В. Гиперпластические процессы эндометрия: диагностика и лечение с учетом рецепторного профиля эндометрия / О. В. Макаров, В. П. Сергеев, Е. Н. Карева // *Акушерство и гинекология*. 2003. № 3. С. 32–36.
6. Пугач Н. А. Клинико-иммунологическая характеристика больных с гиперпластическими процессами эндометрия: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Челябинск, 2006. 21 с.
7. Apoptosis, proliferation, and sex steroid receptors in postmenopausal endometrium before and during HRT / M. Dahmoun [et al.] // *Maturitas*. 2004. Vol. 49. N 2. P. 114–123.
8. Histopathologic features and risk factors for benignity, hyperplasia, and cancer in endometrial polyps / L. Savelli [et al.] // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2003. Vol. 188. N 4. P. 927–931.
9. Regulation of monocyte chemotactic protein-1 expression in human endometrial endothelial cells by sex steroids: a potential mechanism for leukocyte recruitment in endometriosis / J. Luk [et al.] // *Reprod. Sci.* 2010. Vol. 17. N 3. P. 278–287.
10. Sex hormone modulation of proinflammatory cytokine and C-reactive protein expression in macrophages from older men and postmenopausal women / M. P. Corcoran [et al.] // *J. Endocrinol.* 2010. Vol. 206. N 2. P. 217–224.
11. Ultrasound assessment of endometrial thickness and endometrial polyps in women on hormonal replacement therapy / T. Van den Bosch [et al.] // *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2003. Vol. 188. N 5. P. 1249–1253. ■