

*На правах рукописи*

ХЕЧУМЯН  
Лусине Робертовна

ПРЕДИКЦИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОГРАММЫ  
ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВИТАМИН К-ЗАВИСИМОГО БЕЛКА  
ПЕРИОСТИНА

14.01.01- акушерство и гинекология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Москва 2019

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор Калинина Елена Анатольевна  
кандидат медицинских наук Донников Андрей Евгеньевич

Официальные оппоненты:

Калугина Алла Станиславовна – доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова» Минздрава России, кафедра акушерства, гинекологии и неонатологии, профессор

Рудакова Елена Борисовна – доктор медицинских наук, профессор, ГБУЗ МО «Московский областной перинатальный центр», отделение вспомогательных репродуктивных технологий, научный консультант

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 года в 13:00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.125.01 на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» по адресу 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации [http://science.ncagp.ru/upfiles/pdf/KhechumyanLR\\_diss.pdf](http://science.ncagp.ru/upfiles/pdf/KhechumyanLR_diss.pdf)

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор медицинских наук, профессор

Калинина Елена Анатольевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Ежегодно примерно у 70 миллионов супружеских пар в мире диагностируется бесплодие (Pandey et al., 2011). Среди всех доступных в настоящее время методов лечения наиболее эффективными являются вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ). Тем не менее, по данным Европейского общества репродукции человека и эмбриологии (ESHRE) частота наступления клинической беременности в Европе в 2013 г. при проведении программы ЭКО/ИКСИ составляет 29,6% в расчете на забор ооцитов и 34,5% в расчете на перенос эмбрионов (European IVF-monitoring Consortium et al., 2017).

Имплантация эмбриона представляет собой один из важных этапов для достижения успеха в программе ВРТ. Это комплекс молекулярных и клеточных взаимодействий, регулируемых пара- и аутокринными факторами (Калинина А.С и соавт., 2017). Неудачи имплантации являются наиболее распространенными причинами неэффективности программы ЭКО/ИКСИ и ПЭ (Рудакова Е.Б., 2015). Нарушение рецепторного аппарата эндометрия может послужить причиной многократных неудач при проведении программ ВРТ. В настоящее время исследователями разных стран уделяется большое внимание изучению состояния эндометрия и ведется поиск новых информативных биологических маркеров, позволяющих прогнозировать наступление беременности в программах ВРТ (Калугина А.С. и соавт., 2012).

### Степень разработанности темы исследования

В последние годы среди широкого спектра биохимических маркеров, определяемых в различных биологических материалах, особое внимание исследователей привлекает матриксцеллюлярный белок периостин (POSTN), который может являться одним из биомаркеров качества ооцитов, эмбрионов, характеризующий процесс взаимодействия эндометрия и эмбриона при имплантации, и сыграть определенную роль в

прогнозировании результатов программ ВРТ (A. Di Cello et al., 2015; M. Morelli et al., 2014).

Периостин является зависимым от Витамина К доменом (элемент третичной структуры белка) (Ferron et al., 2015). Витамин К-зависимый белок периостин, впервые описанный как остеобласт-специфический фактор 2 в остеобластах мышцы, является одним из белков внеклеточного матрикса (Takeshita et al., 1993). Наиболее высокая экспрессия белка периостина отмечена в аорте, желудке, толстом кишечнике и, что наиболее важно с точки зрения репродуктивной медицины, в плаценте и в матке. Периостин активно вырабатывается в периоде эмбриогенеза (Idolazzi et al., 2017).

Для нормального функционирования организму требуется очень небольшое количество витамина К. Это связано с тем, что молекула данного вещества после использования (то есть после карбоксилирования К-зависимого белка) может быть восстановлена специальным ферментом – витамин К-эпоксид редуктазой, за который отвечает ген VKORC1.

Таким образом, представляется актуальным, современным и перспективным изучение роли инновационного неинвазивного маркера витамин К-зависимого белка периостина для предикции качества ооцитов, эмбрионов и частоты наступления беременности в программах ВРТ для прогнозирования исходов лечения бесплодия.

#### Цель исследования:

Оптимизация программы вспомогательных репродуктивных технологий с учетом витамин К-зависимого белка периостина как предиктора качества ооцитов, эмбрионов и исходов лечения.

#### Задачи исследования:

1. Оценить данные анамнеза, параметры клинического, соматического и гормонального статуса, а также параметры фолликулогенеза, оогенеза и раннего эмбриогенеза у обследуемых пациенток в зависимости от исхода программы ВРТ.

2. Изучить ассоциацию между уровнем витамина К, полиморфизмом гена витамин К-эпоксид редуктазного комплекса (VKORC1).

3. Проанализировать ассоциацию частоты наступления беременности при селективном переносе эмбриона с полиморфизмом гена VKORC1

4. Изучить взаимосвязь между качеством ооцитов, эмбрионов, частотой наступления беременности и уровнем периостина в фолликулярной жидкости.

5. Оценить экспрессию мРНК периостина в эпителиальных клетках цервикального канала в «окно имплантации».

6. На основании выявленных клиничко-лабораторных предикторов эффективности программы ВРТ оптимизировать алгоритм индивидуализированного ведения пациенток.

#### Научная новизна

Впервые проведено изучение ассоциация зависимости характера фолликулогенеза, оогенеза и эмбриогенеза, частота наступления клинической беременности в зависимости от уровня витамин К-зависимого белка периостина в фолликулярной жидкости, уровня витамина К в сыворотке крови, экспрессии мРНК периостина в эпителиальных клетках цервикального канала в «окно имплантации» и гена VKORC1 в программах ВРТ. Обоснована роль периостина в детерминации процессов фолликулогенеза, оогенеза и эмбриогенеза в циклах овариальной стимуляции с переносом нативных эмбрионов.

Изучено влияние уровня периостина в фолликулярной жидкости и уровня экспрессии мРНК гена периостина на эффективность программы ВРТ у пациенток с наличием незрелых ооцитов.

### Практическая значимость

Выявлена и показана прогностическая роль витамин К-зависимого белка периостина и экспрессии мРНК периостина в эпителиальных клетках цервикального канала в «окно имплантации» в исходах программ ВРТ. Также представлена ассоциация уровня белка периостина в фолликулярной жидкости и экспрессии мРНК периостина в эпителиальных клетках цервикального канала с наступлением беременности у пациенток с наличием незрелых ооцитов в программе ВРТ.

Выявлена ассоциация уровня витамина К в сыворотке крови с качеством эмбрионов у исследуемых группах.

Разработан алгоритм индивидуального ведения пациенток в программе ВРТ с учетом возраста пациенток, наличия неудачных попыток ВРТ в анамнезе, уровня периостина в фолликулярной жидкости, уровня экспрессии мРНК периостина эпителиальных клетках цервикального канала женщин в «окно имплантации» и уровня витамина К в сыворотке крови, что дополнительно позволило осуществить селекцию оптимального эмбриона для переноса в полость матки.

### Методология и методы исследования

Проведено проспективное обследование супружеских пар в программах ВРТ. Пациенты обследованы в соответствии с приказом Минздрава России №107н от 30.08.2012 г. «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению». Определение уровня экспрессии мРНК гена периостина в эпителиальных клетках цервикального канала в «окно имплантации» проведено методом ОТ-ПЦР в реальном времени, определение уровня периостина в фолликулярной жидкости и уровня витамина К в сыворотке крови - методом ИФА, изучение полиморфизма гена VKORC1 - методом ПЦР с анализом кривых плавления.

### Положения, выносимые на защиту

1. Клинико-anamnestическими критериями успешного лечения у исследуемых пациенток в программе ВРТ явились: совокупность параметров возраста, ИМТ, АМГ, длительности бесплодия, наличия неудачных попыток ВРТ в анамнезе, подготовка к беременности. У пациенток до 33 лет с ИМТ <22 и наличием неудачных попыток ЭКО/ИКСИ в анамнезе при длительности бесплодия 6 и менее лет частота наступления клинической беременности составила 35,1%. У пациенток старше 33-х лет с ИМТ>22 при длительности бесплодия 7 и более лет частота наступления беременности в программах ВРТ в 5 раз ниже - 7,7%.

2. Уровень витамина К в сыворотке крови после овариальной стимуляции ниже порогового (1190 пг/мл) ассоциирован с получением эмбрионов класса С (низкого или плохого качества) (OR=7,0 (1.6-31.5), p=0.024). Ассоциация между полиморфизмом гена витамин К-эпоксид редуктазного комплекса (VKORC1) и уровнем витамина К не выявлена.

3. Уровень витамин К-зависимого белка периостина в фолликулярной жидкости коррелирует с качеством ооцитов (зрелых и незрелых). Для пациенток, у которых при овариальной стимуляции получены только зрелые ооциты, характерен высокий уровень периостина в фолликулярной жидкости (4227,5 нг/мл против 212,4 нг/мл). У пациенток с наличием незрелых ооцитов (хотя бы одного) высокий уровень периостина в фолликулярной жидкости (>4227,5 нг/мл) ассоциирован с наступлением беременности в программе ВРТ.

4. Уровень экспрессии мРНК гена периостина в эпителиальных клетках цервикального канала в «окно имплантации» является дополнительным предиктором наступления беременности в программе ВРТ у пациенток с наличием незрелых ооцитов. При уровне экспрессии мРНК гена периостина выше 0,01 усл. ед. шансы наступления беременности увеличиваются в 5,1 раз.

### Личный вклад автора

Автор участвовал в выборе темы научной работы, разработке цели и задач исследования, сборе биологического материала исследуемых пациенток, в проведении лабораторных исследований и интерпретации, в обобщении и статистической обработке полученных данных. Автор лично осуществлял обследование и ведение пациенток на всех этапах лечения бесплодия методом ВРТ.

### 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 результатов

Работа обсуждена на конференции отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова (25.06.2018 г.) и заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (19.11.2018 г, протокол №12).

### Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены в практическую работу отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова (заведующий - д.м.н., профессор Калинина Е.А.) ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (директор - академик РАН Сухих Г.Т.).

По теме диссертации опубликовано 3 печатные работы в рецензируемых научных журналах.

### Структура и объем диссертации

Работа изложена на 121 странице и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов и



практических рекомендаций. Иллюстрирована 32 таблицами и 20 рисунками. Библиографический указатель включает 145 литературных источника, из них 20 работ отечественных и 125 зарубежных авторов.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материал и методы исследования

Обследованы 100 пациенток, обратившихся для проведения программы ВРТ в отделение вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова ФГБУ «НЦАГиП им. В.И. Кулакова» Минздрава России в период с марта 2016 г. по март 2017 г. Критерии включения: возраст от 18 до 37 лет включительно, женское бесплодие трубного происхождения и/или мужской фактор бесплодия (при отсутствии выраженной патозооспермии), регулярный менструальный цикл, нормальное строение матки, наличие информированного согласия на участие в исследовании.

В процессе лечения методом ВРТ пациентки были разделены на две группы: 1 группа - 28 пациенток, у которых наступила клиническая беременность; 2 группа - 72 пациентки с отрицательным результатом лечения.

Стимуляцию функции яичников проводили по стандартному протоколу с препаратами рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона (рФСГ) и антагонистами гонадотропного рилизинг гормона (антГнРГ) со 2-3 дня менструального цикла. Морфологическую оценку эмбрионов осуществляли согласно принятым критериям (классификация ESHRE, 2011). Перенос одного эмбриона проводили на 5 сутки, ведение посттрансферного периода и диагностику беременности - по стандартизированной методике.

Определение уровня витамина К в сыворотке крови и периостина в фолликулярной жидкости выполнено в клинико-диагностической лаборатории (заведующий - д.м.н. Т.Ю. Иванец), определение уровня экспрессии мРНК гена периостина в эпителиальных клетках из

цервикального канала и генотипирование пациенток - в лаборатории молекулярно-генетических методов (заведующий - к.м.н. Донников А.Е.).

Для определения уровня витамин К-зависимого белка периостина (POSTN) фолликулярную жидкость отбирали во время трансвагинальной пункции яичников из первого фолликула в каждом яичнике, с промывкой иглы после каждого фолликула, в индивидуальные маркированные пробирки без гепарина. Определение концентрации периостина в фолликулярной жидкости проводили иммуноферментным методом с использованием коммерческого набора «Human periostin/OSF-2 ELISA» (Кат.№ SK00072-08, США).

ДНК для генотипирования выделяли из образцов периферической крови, взятой с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) в день трансвагинальной пункции яичников в качестве антикоагулянта с помощью комплекта реагентов «Проба-ГС-генетика» ООО «НПО ДНК-Технология», Россия. Концентрация ДНК, определенная на ДНК-минифлуориметре (Hoefler, США), составляла, в среднем, 50-100 мкг/мл. Анализ полиморфизма генов в генотипе пациенток производился в лаборатории молекулярно-генетических методов.

Для определения уровня витамина К была получена сыворотка крови во время трансвагинальной пункции яичников перед введением внутривенной анестезии. Уровень витамина К в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом с использованием коммерческого набора «Vitamin K1 (VK1) (Кат.№ CEA926Ge, США).

Соскоб эпителиальных клеток из цервикального канала отобран на 5-е сутки после проведения трансвагинальной пункции яичников, в предполагаемое «окно имплантации», непосредственно перед предполагаемым проведением переноса эмбрионов в полость матки. Клетки помещали в пробирки со средой для стабилизации РНК («Стор-экс», ООО «НПО ДНК-Технология», Россия).

Статистическая обработка данных выполнена с помощью пакета прикладных программ «SPSS Statistics 21.0», «Statistica for Windows» v. 7.0. Статистически значимыми считали отличия при  $p \leq 0,05$ .

#### Результаты собственных исследований и их обсуждение

При изучении и анализе клинико-anamнестических и лабораторных данных, а также параметров данной программы ВРТ отмечено отсутствие межгрупповых различий по возрасту пациенток, их антропометрическим данным, частоте и характере перенесенных гинекологических заболеваний и оперативных вмешательств, первичного и вторичного бесплодия, количеству и исходам беременностей у пациенток со вторичным бесплодием, факторам бесплодия, показателям гормонального статуса, коагуляционного потенциала крови, параметрам стимулированного цикла и раннего эмбриогенеза. Полученные данные послужили основанием для более детального их анализа на пути поиска возможных клинико-anamнестических предикторов успеха программы ВРТ. Для этого изучили зависимость частоты наступления беременности от длительности бесплодия и наличия неудачных попыток ВРТ в анамнезе у исследуемых пациенток. Выявили, что средняя длительность бесплодия у пациенток с наступившей беременностью была на 1,5 года меньше по сравнению с аналогичным показателем при отрицательном результате лечения- 4,0 (2,8-5,0) лет и 5,5 (4,0-7,0) лет ( $p = 0,014$ ). У пациенток с длительностью бесплодия 6 и менее лет частота наступления беременности составила 35,1%, тогда как у пациенток с длительностью бесплодия 7 и более лет частота наступления беременности составила 7,7%. Отношение шансов наступления беременности составило 6,50 (1,46-28,89)  $p=0,010$  (рис. 1).

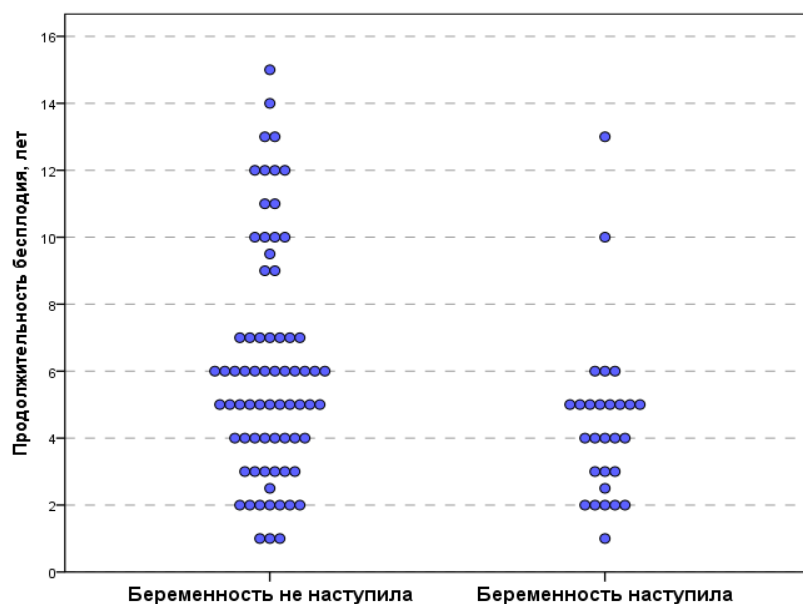


Рисунок 1. Частота наступления беременности в программе ВРТ в зависимости от продолжительности бесплодия.

Беременность наступила в 2 раза чаще - 52,9% у исследуемых пациенток с продолжительностью бесплодия 6 и менее лет и наличием неудачных попыток ВРТ в анамнезе, чем у пациенток той же группы, но без наличия попыток ВРТ в анамнезе - 20,5%, что может являться дополнительным клинико-анамнестическим и прогностическим критерием частоты наступления беременности у пациенток в программе ВРТ. Это может быть обусловлено более углубленным обследованием пациенток перед повторными попытками ВРТ на предмет генотипирования, оценки рецептивности эндометрия, качества эмбриона и др., и соответствующей подготовкой к лечению.

Пациентки с длительностью бесплодия 7 и более лет имели более старший возраст - 33 (31-36) лет ( $p=0,02$ ), ИМТ- 22,1, (21,0-24,9)  $p=0,018$ , меньший уровень АМГ 2,4 (1,5-6,1) нг/мл ( $p=0,029$ ), получали большую курсовую дозу гонадотропина - 1725 (1275-2025) МЕ ( $p=0,014$ ), и меньшее количество фолликулов в день ТВП -7(5-10) ( $p=0,023$ ). Большая длительность бесплодия и более старший возраст этих пациенток сопровождалась снижением уровня АМГ, а также ухудшением параметров цикла ВРТ, что привело к увеличению курсовой дозы гонадотропинов,

продолжительности дней стимуляции, меньшему числу фолликулов в день ТВП и полученных ооцитов.

Следует отметить, что совокупность полученных клинико-анамнестических данных может послужить дополнительным прогностическим критерием исхода программы ВРТ у обследованных групп пациенток.

На следующем этапе исследования для выявления дополнительных неинвазивных маркеров качества ооцитов, эмбрионов и частоты наступления беременности была произведена оценка уровня витамина К в сыворотке крови у пациенток проходящих лечение бесплодия в программе ВРТ. Уровень витамина К в сыворотке крови у пациенток 1 группы составил 4456 пг/мл (2455-5755), у пациенток 2 группы 4739 пг/мл (2800-5561).

В ходе исследования было выявлено, что уровень витамина К в сыворотке крови значительно ниже у пациенток, имеющих эмбрионы класса С (т.е. эмбрионы низкого или плохого качества) по классификации D. Gardner. С помощью ROC-анализа был определен критический уровень витамина К в сыворотке крови, равный 1190 пг/мл. Среди пациенток с уровнем витамина К в крови ниже порогового (1190 пг/мл) доля пациенток, у которых были получены эмбрионы класса С, составила 57%, тогда как среди пациенток с уровнем витамина К выше порогового доля таких пациенток составила всего 16% (отношение шансов составило 0,14 (95% ДИ 0.03 - 0.65),  $p = 0,024$ ) (рис. 2). Таким образом, уровень витамина К в сыворотке крови может являться дополнительным прогностическим критерием качества эмбрионов в программах ВРТ.

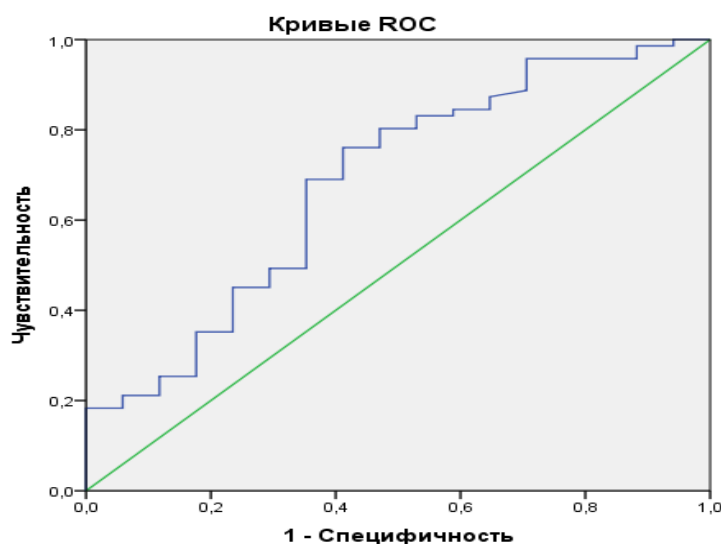


Рисунок 2. ROC-кривая зависимости эмбрионов класса С от уровня витамина К в сыворотке крови.

Полученные данные послужили основанием для более детального анализа уровня витамина К в сыворотке крови у исследуемых пациенток. Было выявлено, что у 29% пациенток был отмечен уровень витамина К в сыворотке крови ниже порогового числа ( $<1190$  пг/мл), а у 71% пациенток уровень витамина К был выше порогового числа ( $>1190$  пг/мл),  $p < 0,05$ . Стоит отметить, что в группе пациенток со сниженным уровнем витамина К при сборе анамнестических данных у 20% пациенток был отмечен геморрагический синдром (носовые кровотечения, кровотечения из дёсен, внутрикожные и подкожные кровоизлияния), средняя продолжительность менструального кровотечения составила 6-7 дней, тогда, как у пациенток с уровнем витамина К выше порогового геморрагический синдром в анамнезе встречался только в 5% случаев, средняя продолжительность менструального кровотечения составила 4-5 дней ( $p < 0,05$ ). Также при анализе клинко-лабораторных данных в группе пациенток с уровнем витамина К в сыворотке крови ниже порогового в 80% случаев было выявлено повышение времени свертывания крови при проведенных ранее пробах Ли-Уайта и Дуке (от 8 до 9 минут при норме от 4 до 7 минуты; от 5 до 7 минут при норме от 2 до 4 минут соответственно). У пациенток при уровне витамина К в сыворотке

крови выше порогового данные показатели были в пределах нормы ( $p < 0,05$ ). При этом параметры гемостаза у всех исследуемых пациенток был а пределах нормы.

Стоит отметить, что в результате не было выявлено статистически значимых различий между уровнем витамина К, качеством ооцитов и наступлением беременности в данном лечебном цикле ЭКО/ИКСИ у исследуемых пациенток.

Учитывая, что одной из причин дефицита активированного витамина К является изменение в гене *VKORC1*, приводящее к снижению синтеза фермента, а низкая концентрация витамина К в сыворотке крови может быть связана с полиморфизмом гена *VKORC1*, далее был проведен анализ генотипа исследуемых пациенток и поиск ассоциации с частотой наступления беременности после ВРТ. В результате не наблюдалась ассоциация уровня витамина К в сыворотке крови у пациенток в стимулированных циклах с полиморфизмом гена *VKORC1*. Также не было выявлено статистически достоверных различий между наступлением беременности и полиморфизмом гена *VKORC1*.

Так как витамин К служит лигандом для рецептора стероидов и ксенобиотиков (Azuma et al., 2011), возможно его биологические эффекты при проведении программ ВРТ опосредуются через изменение системы детоксикации. Этим может объясняться его влияние на качество ооцитов и эмбрионов. Полиморфизм других генов системы детоксикации ксенобиотиков в данном исследовании продемонстрировал сходные эффекты, так при анализе вероятности получения незрелых ооцитов у пациенток, проходящих лечение в программе ЭКО/ИКСИ, была выявлена связь с генотипом *CYP2C9 430C > T* (рис. 3).

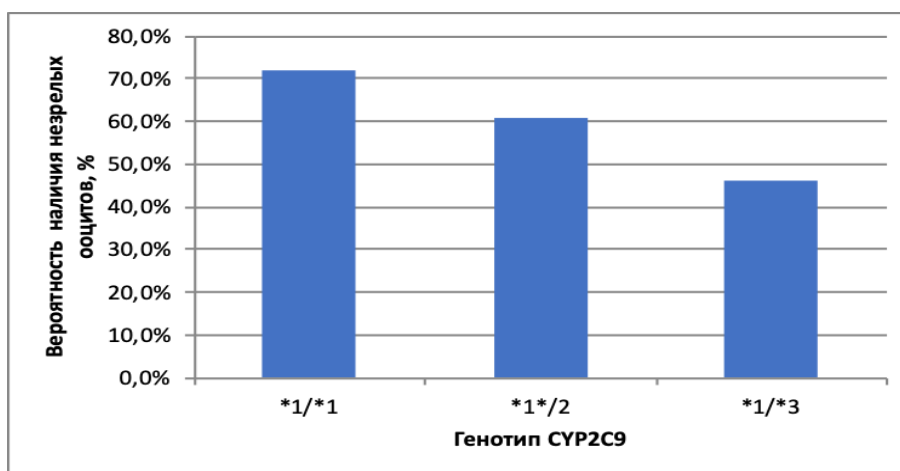


Рисунок 3. Вероятность наличия незрелых ооцитов от генотипа CYP2C9 430C> T

У носительниц «медленных» гаплотипов (\*2 и \*3) вероятность получения незрелых ооцитов составила 61% и 46% соответственно, тогда как у пациенток с нормальным генотипом (\*1/\*1) в 72% случаях получали незрелые ооциты. Выявленная зависимость имела пограничную статистическую значимость ( $p=0,055$ ). При этом, статистически значимой связи между генотипом CYP2C9 430C> T с уровнем витамина К и уровнем периостина в данном исследовании не наблюдалось, хотя для носителей гаплотипа \*3 уровень витамина К был все-таки несколько ниже: 3540 (2495-5022) пг/мл по сравнению с другими генотипами: 4540 (2730-5747) пг/мл.

При проведении анализа ассоциации генотипа системы детоксикации пациенток с частотой наступления беременности была выявлена пограничная статистическая значимость ( $p=0,09$ ) вероятности наступления беременности и генотипом микросомальной эпоксидгидролазы (EPHX1: 337 T>C (Tyr113His) rs1051740) (рисунок 4). Возможно различия не достигали уровня статистической значимости из-за ограниченной численности групп.



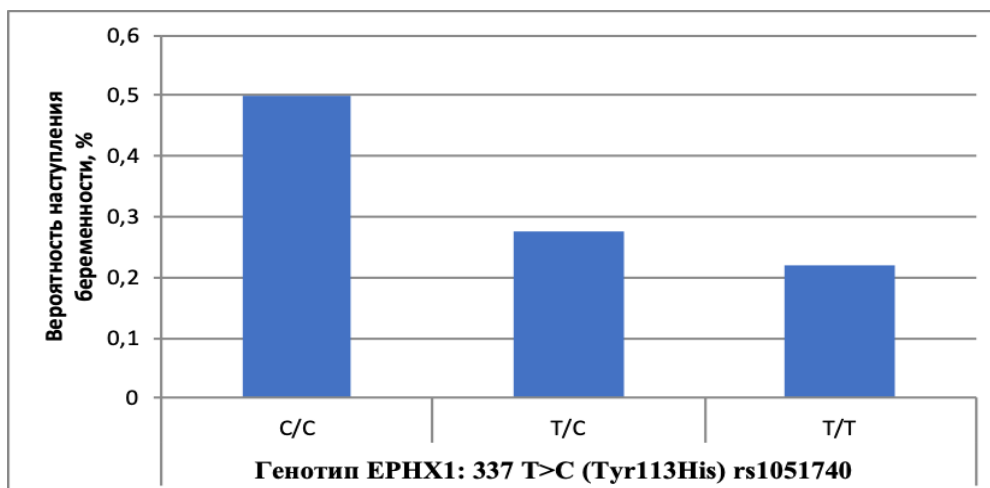


Рисунок 4. Вероятность наступления беременности от генотипа микросомальной эпоксидгидролазы EPHX1: 337 T>C (Tyr113His) rs1051740

Учитывая выявленную ассоциацию между вероятностью наступления беременности, качеством ооцитов и генами системы детоксикации, вероятно в последующих циклах ВРТ целесообразно индивидуализировать и оптимизировать лечение бесплодия, придавая значение используемым курсовым дозам гонадотропинов, так как механизм работы генов системы детоксикации лежит в основе изменения эффективности ряда препаратов, возможно, что полиморфизм данных генов модифицирует эффективность фармакологической поддержки созревания ооцитов.

На следующем этапе было проведено исследование уровня витамин К-зависимого белка периостина в фолликулярной жидкости. В ходе исследования было выявлено, что уровень периостина в фолликулярной жидкости не имел статистически достоверных различий с наступлением беременности у пациенток в программе ВРТ. Но стоит отметить, что уровень периостина в фолликулярной жидкости был в 16,5 раза ниже в группе пациенток, у которых не наступила беременность по сравнению с уровнем периостина в фолликулярной жидкости у пациенток с наступившей беременностью и в 35 раз ниже у пациенток, у которых в последующем была потеря данной беременности  $n=6$  (средний уровень периостина в фолликулярной жидкости у пациенток с наступившей беременностью

составил 4043 нг/мл (38 нг/мл -16363 нг/мл); у пациенток с не наступившей беременностью уровень периостина составил 245 нг/мл (48 нг/мл -13496 нг/мл)) (рис. 5).

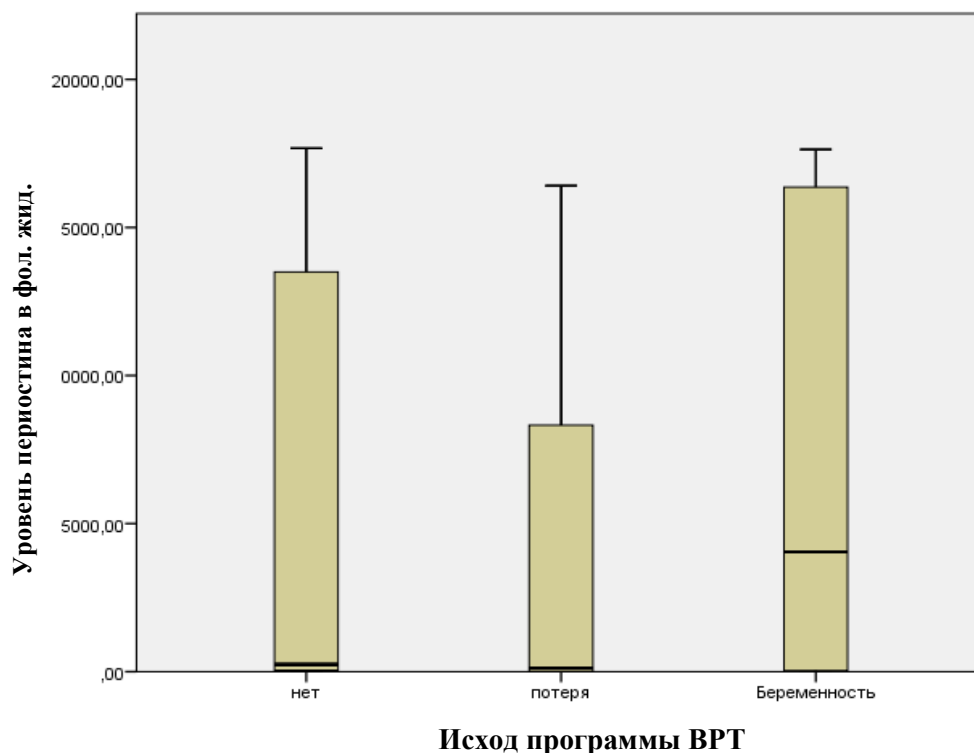


Рисунок 5. Уровень периостина в фолликулярной жидкости и исходы лечения бесплодия у пациенток в программе ВРТ.

Выявлено, что медиана доли незрелых ооцитов среди всего пула клеток, полученных от одной пациентки, была несколько выше в группе, где наступила беременность. Тем не менее, пациентки, у которых в результате пункции был получен хотя бы один незрелый ооцит, чаще наблюдались в группе, где беременность не наступила (таблица 1). Стоит отметить, что именно факт наличия незрелых ооцитов обладает большей прогностической значимостью, чем доля незрелых клеток, поэтому в дальнейшем при анализе использовали именно этот критерий (Владимирова И.В. и соав., 2017).

Таблица 1 - Показатели оогенеза и эмбриогенеза

Исходы беременности	Группа 1 беременность наступила (n=28)	Группа 2 беременность не наступила (n=72)	P-уровень значимости
Количество ооцитов	9,4 ± 3,38	8,2 ± 4,13	0,15
Количество зрелых ооцитов	6,9 ± 3,35	6,3 ± 3,57	0,48
Количество незрелых ооцитов	2,5 ± 2,15	1,8 ± 1,96	0,10
Доля незрелых ооцитов среди всех полученных клеток	25 (14-39) %	20 (0-33) %	0,17
Количество пациенток, у которых был получен хотя бы один незрелый ооцит	22 (79%)	44 (61%)	0,10
Количество blastocyst	3,2 ± 1,92	2,2 ± 2,48	0,07

Данные представлены как средние ± стандартное отклонение, t-критерий Стьюдента

Далее была проанализирована взаимосвязь между уровнем периостина в фолликулярной жидкости и наличием незрелых ооцитов у исследуемых пациенток. Полученные данные показали, что уровень белка периостина в фолликулярной жидкости был в 20 раз выше при наличии у пациентки только зрелых ооцитов (4227,5 нг/мл против 212,45 нг/мл).

При оценке периостина как неинвазивного маркера качества ооцитов стоит указать на наличие обратной корреляции между средним уровнем периостина в фолликулярной жидкости и незрелыми ооцитами. Было выявлено, что с увеличением уровня периостина в фолликулярной жидкости, число незрелых ооцитов уменьшается и наоборот ( $r_s=0,35$ ;  $p=0.01$ ). Повышение уровня периостина в фолликулярной жидкости сопровождалось тенденцией к увеличению частоты наступления беременности у пациенток с наличием незрелых ооцитов (33,3%) по сравнению с данным показателем у пациенток только со зрелыми ооцитами (17,6%) (рис. 6).

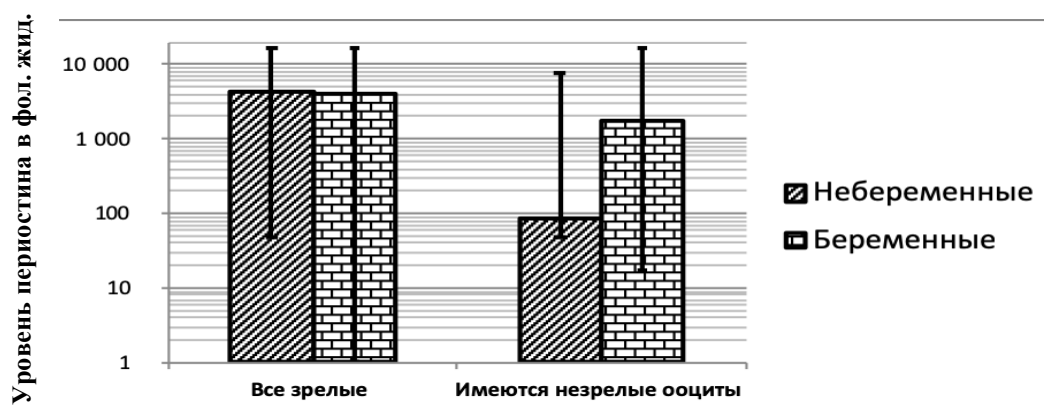
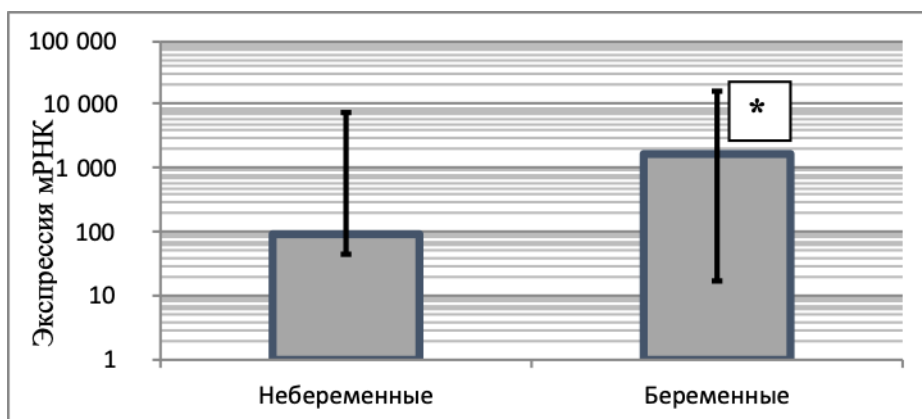


Рисунок 6. Уровень периостина в фолликулярной жидкости у пациенток с наличием незрелых ооцитов, полученных при ВРТ ( $p > 0,05$ ).

По данным литературы (Morelli M. et al., 2014), высокие уровни периостина в эндометрии коррелируют с частотой наступления и вынашивания беременности. Установлен наиболее высокий уровень периостина в секреторную фазу менструального цикла (Morelli M. et al., 2014). Учитывая данные литературы о схожих секреторных изменениях в цервикальном канале во вторую фазу менструального цикла (Zhang S.Y. et al., 2008), для минимизации инвазивных методов исследования на следующем этапе работы был проанализирован уровень экспрессии мРНК периостина в соскобах эпителия из цервикального канала в предполагаемое «окно имплантации». Было выявлено, что уровень экспрессии мРНК периостина, как и в случае с уровнем периостина в фолликулярной жидкости, был значительно выше в группе пациенток с наступившей клинической беременностью (0,0022-0,0 у.е. ( $p=0,05$ )). Показано статистически значимое повышение уровня экспрессии мРНК гена периостина в соскобах эпителия из цервикального канала в "окно имплантации" у пациенток с наступившей и развивающейся беременностью по сравнению с аналогичным показателем в группе пациенток с потерей беременности - 0,005 (0-0,011)у.е. против 0(0-0,0034) у.е. ( $p=0,004$ ).

При проведении анализа взаимосвязи между уровнем экспрессии мРНК гена периостина в соскобах эпителия из цервикального канала и наличием незрелых ооцитов, было выявлено, что уровень экспрессии мРНК гена

периостина статистически значимо выше у пациенток с незрелыми ооцитами и наступившей беременностью ( $p=0,019$ ) (рис. 7).



*Примечание.\** -  $p<0.05$  между пациентками с наступившей и не наступившей беременностью

Рисунок 7. Уровень экспрессии мРНК периостина эпителиальных клеток цервикального канала у пациенток, имевших незрелые ооциты в стимулированном цикле.

Был проведен ROC-анализ, согласно которому было выявлено пороговое значение уровня экспрессии мРНК периостина в соскобах эпителия из цервикального канала у пациенток, имеющих хотя бы один незрелый ооцит в ходе проведения данного цикла программы ВРТ - равное 0,01 у.е. - площадь под кривой составила 0,65, ОШ 5,12 (95% ДИ: 1,23-23,34,  $p=0,05$ ) (рис. 8).

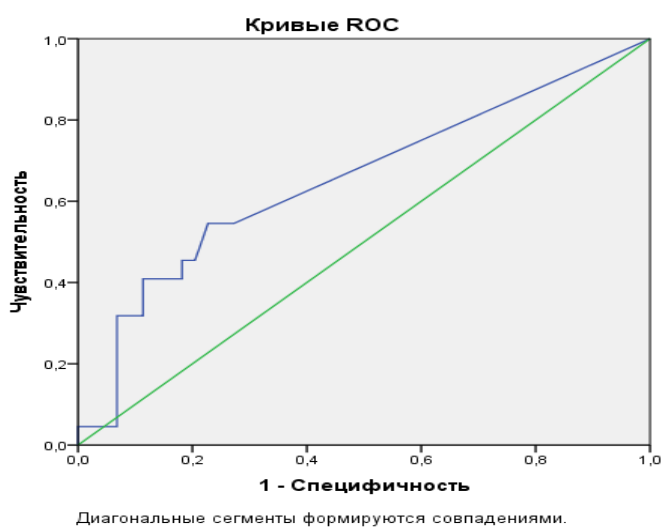


Рисунок 8. ROC-кривая зависимости наступления беременности в цикле ВРТ у пациенток с незрелыми ооцитами (хотя бы один) от уровня экспрессии мРНК периостина.

Полученные данные демонстрируют, что у исследованной группы пациенток с наличием незрелых ооцитов (хотя бы одного) уровень экспрессии мРНК периостина в соскобах эпителия из цервикального канала в предполагаемое «окно имплантации» выше порогового значения 0,01 у.е. коррелирует с положительным исходом программы ВРТ, что может рассматриваться в качестве дополнительного неинвазивного предиктора наступления беременности.

Следует отметить, что при проведении анализа не было выявлено значимой корреляции между уровнем витамина К в сыворотке крови, полиморфизмом гена VKORC1, уровнем периостина в фолликулярной жидкости и уровнем экспрессии мРНК периостина из соскоба эпителиальных клеток цервикального канала в предполагаемое «окно имплантации».

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что определение уровня витамин К-зависимого белка периостина в фолликулярной жидкости, уровень экспрессии мРНК гена периостина в эпителиальных клетках цервикального канала и изучение уровня витамина К в сыворотке крови пациенток с целью предикции результатов программ ВРТ, являются перспективными и актуальными направлениями для науки и клинической практики, которые позволят в будущем индивидуализировать и оптимизировать лечение бесплодия у различных групп пациенток проходящих лечение бесплодия в программе ВРТ.

Разработан и оптимизирован алгоритм персонализированного ведения программ ВРТ с учетом возраста, наличия неудачных попыток в анамнезе и уровня витамин К-зависимого белка периостина в фолликулярной жидкости (рис. 9).

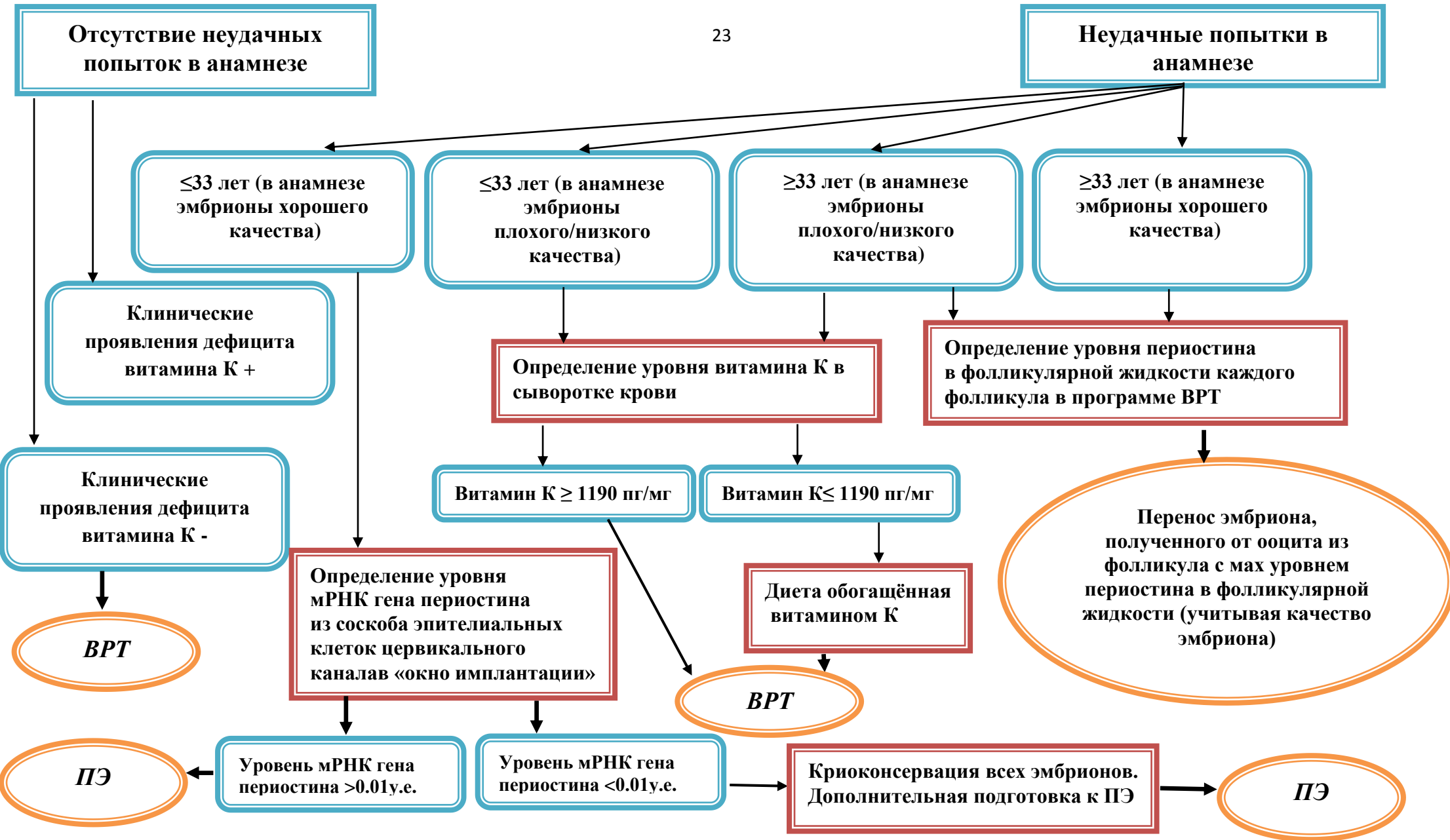


Рисунок 9. Алгоритм персонализированного ведения программы ВРТ с учетом возраста, наличия неудачных попыток в анамнезе и уровня витамин К-зависимого белка периостина в фолликулярной жидкости

## ВЫВОДЫ

1. У исследуемых пациенток с возрастом до 33-х лет, ИМТ до 22 и длительностью бесплодия 6 и менее лет частота наступления беременности при ВРТ составила 35,1%. При наличии неудачных попыток в анамнезе отмечено увеличение частоты наступления беременности в последующих циклах ВРТ. У пациенток с возрастом старше 33-х лет, ИМТ более 22 при длительности бесплодия 7 и более лет частота наступления беременности составила 7,7%. Обозначенные параметры в совокупности являлись дополнительным клинико-анамнестическим прогностическим критерием частоты наступления беременности в программе ВРТ.

2. Определено пороговое значение уровня витамина К в сыворотке крови равное 1190 пг/мл при овариальной стимуляции - отношение шансов составило 0,14 (95% ДИ 0.03 - 0.65),  $p = 0,024$ . У пациенток с уровнем витамина К ниже порогового в 57% случаев были получены эмбрионы класса С; у пациенток с уровнем витамина К выше порогового - в 16% случаев. Уровень витамина К в сыворотке крови выше 1190 пг/мл отмечен у пациенток с преобладанием эмбрионов класса А (эмбрионы хорошего или отличного качества).

3. У пациенток с уровнем витамина К в сыворотке крови  $<1190$  пг/мл чаще отмечались клинические проявления геморрагического синдрома в анамнезе: кровотечения носовые и из дёсен, внутрикожные и подкожные кровоизлияния, также более длительные менструальные выделения.

4. У пациенток с нормальным генотипом СYP2C9 (\*1/\*1) в 72% случаев получены незрелые ооциты, тогда как у носительниц «медленных» гаплотипов гена СYP2C9 (\*2 и \*3) вероятность получения незрелых ооцитов составила 61% и 46%. Выявлена ассоциация вероятности наступления беременности в программе ВРТ и генотипом микросомальной эпоксидгидролазы EPHX1, что может свидетельствовать о взаимосвязи генов



системы метаболизма ксенобиотиков и процессов оо- и эмбриогенеза.

5. Более высокий уровень белка периостина (4227нг/мл) в фолликулярной жидкости отмечен у пациенток, у которых в результате овариальной стимуляции получены только зрелые ооциты по сравнению с пациентками, у которых имелись незрелые ооциты (хотя бы один) (212 нг/мл).

6. Выявлена обратная корреляция между средним уровнем периостина в фолликулярной жидкости и качеством ооцитов ( $rs=0,35$ ;  $p=0,01$ ) - с увеличением уровня периостина в фолликулярной жидкости число незрелых ооцитов было меньше и наоборот.

7. Высокий уровень белка периостина (1740,4нг/мл) в фолликулярной жидкости является дополнительным предиктором наступления беременности у пациенток с наличием хотя бы одного незрелого ооцита после овариальной стимуляции (частота наступления беременности составила 33,3%)

8. Установлена ассоциация уровня экспрессии мРНК гена периостина в соскобах эпителия из цервикального канала в «окно имплантации» с частотой наступления беременности у пациенток при ВРТ с развивающейся беременностью по сравнению с группой пациенток с последующей потерей беременности ( $p=0,004$ ).

9. Определено пороговое значение уровня экспрессии мРНК гена периостина в соскобах эпителия из цервикального канала равное 0,01 у.е. - площадь под кривой составила 0,65, ОШ 5,12 (95% ДИ: 1,23-23,34,  $p=0,05$ ). У пациенток с наличием незрелых ооцитов после овариальной стимуляции уровень экспрессии мРНК гена периостина в соскобах эпителия цервикального канала выше порогового значения 0,01 у.е. может рассматриваться в качестве дополнительного предиктора наступления беременности.

#### ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для повышения эффективности программы ВРТ пациенткам с неудачными попытками и наличием эмбрионов плохого качества в анамнезе

(эмбрионы класса С по классификации D. Gardner), а также при клинических проявлениях дефицита витамина К целесообразно проводить определение уровня витамина К в сыворотке крови.

2. Пациенткам с недостаточностью уровня витамина К в сыворотке крови ( $\leq 1190$  пг/мл) следует рекомендовать диету, обогащенную витамином К.

3. У пациенток старше 33-х лет с наличием неудачных попыток ВРТ в анамнезе при нормальном или субоптимальном ответе яичников на стимуляцию целесообразно определять уровень периостина в фолликулярной жидкости каждого фолликула. При наличии нескольких эмбрионов одинакового качества рекомендован перенос в полость матки эмбриона, полученного от ооцита, в фолликулярной жидкости которого определена максимальная концентрация периостина.

4. Пациенткам до 33-х лет и с наличием неудачных попыток ЭКО/ИКСИ в анамнезе, показано определение уровня экспрессии мРНК гена периостина эпителиальных клеток цервикального канала в предполагаемое "окно имплантации" как раннего дополнительного прогностического теста наступления беременности. При уровне периостина  $< 0,01$  у.е., рекомендована отмена переноса и криоконсервация всех эмбрионов.

#### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Роль витамин К-зависимого белка периостина в предикции эффективности программы ВРТ (обзор литературы) / **Л.Р. Хечумян**, Е.А. Калинина, А.Е. Донников, Е.В. Кулакова, Э.О. Ибрагимова // **Акушерство и гинекология**. - 2017. - № 7. – С. 28-32.

2. Оценка витамин К-зависимого белка периостина как нового маркера качества ооцитов, эмбрионов и эффективности программы ЭКО/ИКСИ / **Л.Р. Хечумян**, Е.А. Калинина, О.В. Бурменская, А.Е. Донников, Е.В. Кулакова // **Акушерство и гинекология**. - 2018. - № 7. – С. 72-76.

3. Ассоциация уровня витамина К в крови с исходами программы вспомогательных репродуктивных технологий / Л.Р. Хечумян, Е.А. Калинина, А.Е. Донников, Т.Ю. Иванец, Е.В. Кулакова // **Акушерство и гинекология**. - 2018. - №11. – С. 80-85.