

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ**
федеральное государственное бюджетное учреждение
**«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР АКУШЕРСТВА, ГИНЕКОЛОГИИ И ПЕРИНАТОЛОГИИ
ИМЕНИ АКАДЕМИКА В.И. КУЛАКОВА»**

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

**Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

НАУЧНЫЕ РУКОВОДИТЕЛИ:
доктор медицинских наук, доцент
Калинина Е.А.
кандидат медицинских наук
Донников А.Е.

МОСКВА - 2019

Оглавление

Оглавление	2
ВВЕДЕНИЕ	3
Глава 1. ВИТАМИН К-ЗАВИСИМЫЙ БЕЛОК ПЕРИОСТИН В РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНАХ И ТКАНЯХ И ЕГО РОЛЬ КАК ПРЕДИКТОРА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОГРАММЫ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЯХ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	11
1.1 Витамин К-зависимый белок периостин.....	12
1.2 Биохимические свойства периостина.....	14
1.3 Биологическая роль периостина в различных органах и тканях	16
1.4 Периостин и репродуктивная медицина	22
1.5 Роль витамин К-зависимого белка периостина как прогностического маркера программы врт	27
1.6 Витамин К и гены системы детоксикации	28
Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	30
2.1 Материал исследования	30
2.2 Материал исследования	31
2.3 Дизайн исследования	32
2.4 Методы исследования	37
2.5 Статистический анализ полученных данных.....	48
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	50
3.1 Клиническая характеристика женщин	50
3.2 Ассоциация между полиморфизмом гена витамин К-эпоксидредуктазного комплекса (VKORC1), уровнем витамина К и исходами программы ВРТ.	64
3.3 Взаимосвязь между уровнем периостина в фолликулярной жидкости, качеством ооцитов, эмбрионов и частотой наступления беременности	75
3.4 Оценка экспрессии мРНК периостина в соскобах эпителия из цервикального канала в «окно имплантации»	80
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	88
Заключение.....	96
ВЫВОДЫ	99
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	101
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	102
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	104

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Ежегодно примерно у 70 миллионов супружеских пар в мире диагностируется бесплодие [98]. Причиной бесплодия, согласно статистическим данным, в 30% случаев является так называемый «женский фактор», в 30% - «мужской фактор», в 25% - сочетание «мужского и женского факторов». В 15% случаев причину бесплодия установить не удаётся. Причины женского бесплодия, как правило, представляют собой отсутствие или нарушение проходимости маточных труб, отсутствие овуляции, а также генитальный эндометриоз [16]. Среди всех доступных в настоящее время методов лечения наиболее эффективными являются вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ). Частота бесплодных браков высока во всех странах мира и не имеет тенденции к снижению, что, безусловно, приводит к значительным медицинским, социальным и экономическим проблемам [106]. 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 составила 29,6% в расчете на забор ооцитов и 34,5% в расчете на перенос эмбрионов [48]. С учетом репродуктивных потерь лишь около четверти циклов экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) завершается рождением ребенка. По всей вероятности дальнейшее повышение результативности ВРТ невозможно без глубокого изучения новых маркеров качества ооцитов, эмбрионов и механизмов регуляции имплантации у человека.

Имплантация эмбриона представляет собой один из важных этапов для достижения успеха в программе вспомогательных репродуктивных технологий. Имплантация эмбриона представляет комплекс молекулярных и клеточных взаимодействий, регулируемых пара- и аутокринными факторами [5; 4]. Наступление беременности во многом зависит от двух составляющих — функционально полноценного эмбриона и рецептивности эндометрия [7;

9]. Неудачи имплантации являются наиболее распространенными причинами неэффективности программы экстракорпорального оплодотворения и переноса эмбрионов в полость матки [17].

Известно, что успех проведения ЭКО во многом определяется качеством ооцита и выбором эмбриона с высоким имплантационным потенциалом. В настоящее время оценка качества эмбрионов в первую очередь основывается на морфологических критериях, однако точность такого метода отбора эмбрионов остается недостаточно высокой, хотя его использование и привело к значительному повышению результативности программ ЭКО [6]. На сегодняшний день в современной репродуктивной медицине самым информативным методом определения здорового эмбриона до переноса в полость матки в цикле ЭКО является преимплантационный генетический скрининг (ПГС). Применение ПГС значительно снижает количество пригодных для переноса эмбрионов по сравнению с оценкой их состояния с использованием исключительно морфологических критериев, что значительно повышает эффективность исходов циклов ЭКО. Применение ПГС часто сопряжено с криоконсервацией всех эмбрионов и облегчает применение селективного переноса одного эмбриона в качестве подхода к преодолению бесплодия, однако данный метод является инвазивным и дорогостоящим.

Степень разработанности темы исследования

В последние годы отмечается рост интереса к разработке альтернативных неинвазивных методов анализа качества ооцитов, эмбрионов и процесса имплантации эмбриона. В последнем процессе принимают участие множество факторов, включая интегрины эндометрия, молекулы экстрацеллюлярного матрикса, молекулы адгезии, фактора роста и ионные каналы. С целью улучшения понимания механизмов неудачи имплантации идет разработка *in vitro* моделирования имплантации эмбриона. Понимание точных молекулярных путей, ассоциирующихся с неудачами имплантации,

позволит разработать новые прогностические и диагностические биомаркеры и в последующем идентифицировать молекулярные мишени для терапевтического воздействия [43].

Среди широкого спектра биохимических маркеров, определяемых в различных биологических материалах, в последнее время особое внимание исследователей привлекает матриксцеллюлярный белок периостин (POSTN). По данным ряда исследований уровень периостина в сыворотке крови, фолликулярной жидкости значимо коррелирует с качеством бластоцисты. Согласно данным авторов, по уровню периостина и морфологическими критериями можно спрогнозировать наступление беременности более точно, чем учитывая только морфологические критерии [21; 18].

Недавние экспериментальные данные продемонстрировали, что секретируемый белок периостин, принадлежащий семейству внеклеточных матриксных белков, может играть центральную роль в регулировании взаимосвязи эмбриона с эндометрием. Особенно важно то, что экспрессия периостина способна прогнозировать качество ооцитов, эмбрионов, частоту инплантации и исход беременности [22], то есть периостин может быть использован в качестве дополнительного инновационного неинвазивного маркера для улучшения прогнозирования результатов экстракорпорального оплодотворения (ЭКО)[18].

Таким образом, периостин может являться одним из биомаркеров, характеризующих процесс взаимодействия эндометрия и эмбриона при имплантации, характеризующий качество эмбриона и сыграть определенную роль в предикции результатов программ ЭКО.

Цель исследования

Оптимизация программы ВРТ 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

В настоящем исследовании впервые проведено изучение ассоциативной зависимости характера фолликулогенеза, оогенеза и эмбриогенеза, частоты 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 витамин К-эпоксидредуктазного комплекса (VKORC1) в программах вспомогательных репродуктивных технологий. Обоснована роль периостина в детерминации процессов фолликулогенеза, оогенеза и эмбриогенеза в циклах овуляторной стимуляции с переносом нативных эмбрионов.

В результате проведенной работы выявлена ассоциация уровня витамин К-зависимого белка периостина в фолликулярной жидкости с наступлением беременности у пациенток с наличием незрелых ооцитов в программе ВРТ.

Изучена ассоциация экспрессии мРНК периостина в эпителиальных клетках цервикального канала в «окно имплантации» с наступлением беременности в программе ВРТ.

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

Практическая значимость

В результате проведенного исследования 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.

По итогам работы представлена ассоциация уровня витамина К в сыворотке крови с качеством эмбрионов (у пациенток с эмбрионами класса С - эмбрионы низкого или плохого качества, уровень витамина К в сыворотке крови был ниже, чем у пациенток с преобладанием эмбрионов класса А - эмбрионы хорошего или отличного качества).

На основании полученных данных оптимизирован алгоритм индивидуального ведения пациенток в программе ВРТ с учетом 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.

Положения, выносимые на защиту

1. Клинико-anamнестическими 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 овуляторной 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 и интерпретации результатов лабораторных исследований, в обобщении и статистической обработке полученных данных. Автором лично осуществлялось обследование и ведение супружеских пар на всех этапах лечения бесплодия методом вспомогательных репродуктивных технологий.

Соответствие диссертации паспорту полученной 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 материалов диссертации

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

Внедрение результатов исследования в практику

Разработанный и оптимизированный на основании полученных результатов алгоритм персонализированного ведения программ ВРТ с учетом наличия неудачных попыток ВРТ в анамнезе, возраста, уровня периостина в фолликулярной жидкости, уровня экспрессии мРНК периостина эпителиальных клетках цервикального канала женщин в «окно имплантации» и уровня витамина К в сыворотке крови у пациенток репродуктивного возраста внедрен в практическую работу отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия (заведующий д.м.н., профессор Калинина Е.А.) ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (директор, профессор академик РАН Сухих Г.Т.).

Результаты по теме диссертации опубликованы в 3 печатных работах, из которых 3 в рецензируемых научных журналах.

Структура и объем диссертации

Работа изложена на 121 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов и практических рекомендаций. Работа иллюстрирована 32 таблицами и 20 рисунком. Библиографический указатель включает 145 литературных источников, из них 20 работ отечественных и 125 зарубежных авторов.

Глава 1. ВИТАМИН К-ЗАВИСИМЫЙ БЕЛОК ПЕРИОСТИН В РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНАХ И ТКАНЯХ И ЕГО РОЛЬ КАК ПРЕДИКТОРА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОГРАММЫ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЯХ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Бесплодие - серьезная проблема репродуктологии, при которой имеется крайне редкое сочетание социального, психического неблагополучия и практически всегда физического нездоровья в семье. Доля бесплодных браков в России превышает 15%, что, по данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), является критическим уровнем, а ежегодно примерно у 70 миллионов супружеских пар в мире диагностируется бесплодие [98]. Среди всех доступных в настоящее время методов лечения наиболее эффективными являются вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ). С учетом репродуктивных потерь лишь около четверти циклов экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) завершается рождением ребенка.

Имплантация эмбриона представляет комплекс молекулярных и клеточных взаимодействий, регулируемых пара- и аутокринными факторами [5; 4]. Наступление беременности во многом зависит от двух составляющих — функционально полноценного эмбриона и рецептивности эндометрия [7; 9; 18].

Известно, что успех проведения ЭКО во многом определяется качеством ооцита и выбором эмбриона с высоким имплантационным потенциалом. В настоящее время оценка качества эмбрионов в первую очередь основывается на морфологических критериях, однако точность такого метода отбора эмбрионов остается недостаточно высокой, хотя его использование и привело к значительному повышению результативности программ ЭКО [6; 18].

В последние годы отмечается рост интереса к разработке альтернативных неинвазивных подходов к разработке новых методов анализа качества ооцитов, эмбрионов и имплантации эмбриона [18]. В последнем

процессе принимает участие множество факторов, включая интегрины эндометрия, молекулы экстрацеллюлярного матрикса, молекулы адгезии, фактора роста и ионные каналы. С целью улучшения понимания механизмов неудачи имплантации идет разработка *in vitro* моделирования имплантации эмбриона. Понимание точных молекулярных путей, ассоциирующихся с неудачами имплантации, позволит разработать новые прогностические и диагностические биомаркеры и в последующем идентифицировать молекулярные мишени для терапевтического воздействия [43].

Среди широкого спектра биохимических маркеров, определяемых в различных биологических материалах, в последнее время особое внимание исследователей привлекает матриксцеллюлярный белок периостин, который может являться одним из будущих биомаркеров качества ооцитов, также следовательно характеризующий процесс взаимодействия эндометрия и эмбриона при имплантации, и сыграть определенную роль в улучшении будущих результатов программ ЭКО [18].

1.1 Витамин К-зависимый белок периостин

Периостин, впервые описанный как остеобласт-специфический фактор 2 в остеобластах мыши [116], является одним из белков внеклеточного матрикса (молекулярная масса 90 кДа, 836 аминокислотных остатков), экспрессия которого отмечена в многочисленных тканях человека. Наиболее высокие уровни периостина в организме человека наблюдаются в аорте, желудке, толстом кишечнике и, что наиболее важно с точки зрения репродуктивной медицины, в плаценте и в матке [70].

Основными триггерами экспрессии периостина являются трансформирующий фактор роста-бета (TGF- β), интерлейкины-4 и -13 [72; 73; 74]. Периостин активно вырабатывается в периоде эмбриогенеза; ему принадлежит важная роль в формировании структуры костей, зубов, хрящей и сердца [144;108]. Данный белок также определяется в подвергающихся механической нагрузке соединительных тканях взрослого организма,

включая клапаны сердца, кожу, связки периодонта, сухожилия и кости [37]; он участвует в адгезии и миграции клеток, и ему принадлежит важная роль в процессах заживления поврежденных тканей [80]. Периостин также может быть вовлечен в такие патологические процессы, как фиброз, атеросклероз и хроническое воспаление [97; 65; 86].

В последние годы опубликован ряд работ, посвященных роли периостина в процессах аллергического воспаления [71] и эпителиально-мезенхимального перехода при туморогенезе [76;94;87;68;92]. Особую важность в области онкологии имеет критически важная роль периостина при метастазировании [102]; представляется, что периостин необходим для поддержания метастатических клеток, и его блокирование ведет к предотвращению метастазирования [89]. Еще одним возможным механизмом участия периостина в метастазировании является формирование иммуносупрессивной преметастатической ниши [131].

Периостин активизирует сигнальную систему Wnt, участвующую также в процессах имплантации [24;93;118]; известно, что многие механизмы имплантации эмбриона были впервые описаны при онкологических заболеваниях и метастазировании.

Периостин является лигандом для интегринов $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$ и $\alpha6\beta4$, играющих важную роль в процессах имплантации [55], связываясь с ними через посредство четырех фасциклиновых доменов FAS-1 и способствуя повышению клеточной подвижности [56;76]. В частности, взаимодействие периостина с интегринными $\alpha\beta3$ и $\alpha\beta5$ приводит *in vitro* к миграции гладкомышечных клеток сосудов [84;18].

Биологические роли периостина в норме и патологии в различных органах и тканях будут более подробно рассмотрены ниже. Следует упомянуть, что аминокислотная последовательность периостина не претерпела выраженных эволюционных изменений, за исключением C-концевой последовательности [66], но данный белок подвергается посттрансляционной модификации с помощью витамин К-зависимого

фермента, который, как и в случае белка остеокальцина, изменяет глутаминовые остатки на гамма-карбоксихлутаматные. Белки, для активации которых требуется такое карбоксилирование, называются «витамин К-зависимыми» [42].

1.2 Биохимические свойства периостина

Посттрансляционная модификация под воздействием фермента гамма-глутамилкарбоксилазы может влиять на физиологические свойства периостина, одного из немногочисленных витамин К-зависимых белков организма человека, в результате карбоксилирования глутаматных остатков которых полученные гамма-карбоксихлутаматные остатки (Gla) приобретают высокую аффинность к ионам кальция [52;125]. К числу данных белков относятся такие белки крови, как протромбин, факторы свертывания крови VII, IX и X, протеины C, S и Z, а также костный белок остеокальцин, фактор роста TGFBI, матриксный Gla-белок MGP, GAS6, транстиретин, интер-альфа ингибитор трипсина тяжелой ITIH2 и белки PRRG1-4 [113;42;123].

Необходимое организму количество витамина К, выступающего при описанных выше процессах в роли кофактора гамма-глутамилкарбоксилазы, является достаточно небольшим (около 100 мкг/сут), что среди прочего обуславливается восстановлением его молекулы после карбоксилирования витамин К-зависимого белка специальным ферментом, витамин К-эпоксид редуктазы, которая превращает витамин К из неактивной формы (2,3-эпоксид витамин К) в активную (витамин К гидрохинолон), принимающую участие в карбоксилировании витамин К-зависимых белков крови [112;121; 49; Хечумян Л.Р. и соавт., 2017].

Изначально основное внимание ученых было сосредоточено на роли гамма-карбоксилирования витамин К-зависимых белков в процессах свертывания крови [Fenlund et al., 1975; Vermeer and De Boer-Van den Berg, 1985; Furie and Furie, 1988; Stenflo, 1999]; широко известно, что биологический механизм действия кумарин-подобных антикоагулянтов и в

частности варфарина основан на подавлении ими витамин К–эпоксид редуктазой, что ведет к снижению доступности витамина К и инактивации витамин К–зависимых факторов свертывания [Whitlon et al., 1978].

Лишь в 2008 г. в работе Coutu et al. [42] было показано, что в фасциклиновых доменах FAS1-1, FAS1-2, и FAS1-4 периостина имеются последовательности, сходные с опосредующими контакт с гамма-глутамилкарбоксилазой и витамин К–зависимое гамма-карбоксилирование глутаминовых остатков. При электрофоретическом разделении белков мезенхимальных стволовых клеток мыши или клеток линии аденокарциномы A549 человека и последующим иммуноблоттинге с моноклональным антителом к Gla в трех фасциклиновых доменах были выявлены многочисленные последовательности, в которых имело место гамма-карбоксилирование. Карбоксилирование периостина в мезенхимальных стволовых клетках подавлялось варфарином, что подтверждало его зависимость от присутствия витамина К [42]. Согласно базе данных последовательностей белков UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q15063>) периостин содержит до 24 остатков Gla.

Следует отметить, что одна исследовательская группа, попытавшаяся продемонстрировать гамма-карбоксилирование периостина и фактора роста TGFBI, потерпела неудачу в своих попытках [25;95]; по их мнению, возможные посттрансляционные модификации периостина и их клиническое значение должны стать предметом дальнейшего изучения, большую роль в котором могут сыграть разрабатываемые в настоящее время модификации клеточных линий человека для выработки гамма-карбоксилированных белков [44].

Известно, что степень активности витамин К–эпоксид редуктазы обусловлена генетически, и одной из причин дефицита активированного витамина К являются мутации гена VKORC1, кодирующего субъединицу 1 комплекса витамин К–эпоксид редуктазы и приводящие к снижению синтеза данного фермента. Проведенные к настоящему времени многочисленные

исследования полиморфизмов гена VKORC1, в том числе и отечественные [3;8;18], были в первую очередь сосредоточены на разработке схем назначения оральных антикоагулянтов кумаринового ряда и в первую очередь варфарина.

Наибольшее внимание исследователей привлекли полиморфизмы гена VKORC1 –1639 G/A и 1173 –С/Т, тесно связанные между собой и распространенные практически одинаково. При наличии гетерозиготного варианта VKORC1 –1639 G/A и тем более гомозиготного варианта A/A имеет место снижение экспрессии гена, что проявляется уменьшением содержания VKORC1 в гепатоцитах и снижением активности фермента. Считается, что полиморфизм 1173 С/Т сам по себе не должен влиять на строение или экспрессию гена VKORC1, но, поскольку он часто присутствует совместно с полиморфизмом 1639 G/A, его наличие также ассоциируется со снижением функциональной активности витамин К–эпоксид редуктазы [8]. Возможная зависимость содержания периостина в организме также может ассоциироваться с полиморфизмом гена VKORC1, что должно стать предметом дальнейших исследований.

1.3 Биологическая роль периостина в различных органах и тканях

Самая высокая экспрессия периостина в костной ткани наблюдается в остеоцитах и надкостнице, где он выступает как в качестве структурной молекулы костной матрицы, так и в качестве сигнальной молекулы, осуществляющей описанное выше взаимодействие с интегринами и сигнальными путями Wnt–бета-катенин [37;141]. Периостин остеоцитов активно участвует в регулировании функции остеобластов и формировании костной ткани, а также в ремоделировании последней на протяжении жизни организма [34]. Периостин, как предполагается, способен взаимодействовать с ингибитором рецепторов склеростином, повышение уровня которого отмечается при остеопорозе [101], и снижать его активность, тем самым

поддерживая ответ костной ткани на механическую нагрузку и повышение концентрации паратиреоидного гормона [35].

Периостин также участвует в осуществлении различных этапов восстановления костной ткани и заживления переломов, в особенности на протяжении ранней воспалительной фазы, когда в ткани имеет место рекрутирование клеток-предшественников костной ткани и дифференцировка остеобластов [37].

Сывороточные уровни периостина являются не зависящим от параметров минеральной плотности костной ткани прогностическим фактором риска переломов внепозвонковой локализации у пациенток с постменопаузальным остеопорозом [77]. Поскольку периостин преимущественно экспрессируется в компактном костном веществе и надкостнице, он является преимущественно маркером для кортикального слоя костей; дальнейшие исследования периостина как прогностического фактора остеологических нарушений продолжаются.

Периостин является одним из белков экстрацеллюлярного матрикса, секретлируемых опухолевыми клетками и прилегающими клетками стромы и обеспечивающих инициацию и рост первичной опухоли и метастазирование [81;86]. Многие солидные опухоли (карциномы молочной железы, кишечника, головы и шеи, поджелудочной железы, легких, щитовидной железы, яичников, желудка и печени, нейробластома, глиобластома) характеризуются высоким уровнем экспрессии периостина [40;102;91], при этом экспрессия периостина коррелирует с прогрессированием опухолевого процесса. Ее повышение является еще более выраженным в метастазах рака молочной железы в лимфатических узлах, при этом периостин выявляется в сыворотке крови пациентов с далеко зашедшим метастазированием, что позволяет расценить его в качестве опухолевого маркера, в первую очередь для метастазирующего рака молочной железы [124].

Полное описание роли периостина при онкозаболеваниях остается задачей на будущее [139]. Периостин может способствовать таким процессам

опухолевого роста и метастазирования, как протеолитическая активность, клеточная миграция и стимуляция ангиогенеза. Данный белок связывается с интегринами и может активировать такие внутриклеточные сигнальные пути, как АКТ/РКВ или FAK-опосредованный сигнальный путь; они участвуют в процессах адгезии, миграции и пролиферации раковых клеток [94]. Как упоминалось выше, периостин является важным регулирующим фактором эпителиально-мезенхимальной трансформации, процесса, в ходе которого клетки теряют экспрессию эпителиальных маркеров и приобретают экспрессию мезенхимальных маркеров наряду с повышением активности матриксных металлопротеиназ. Эпителиально-мезенхимальная трансформация обеспечивает возможность миграции и инвазии прилегающей стромы клетками; она является одним из процессов метастазирования [57], но ей также принадлежит важная роль в обеспечении раннего эмбрионального развития [85].

Периостин также способствует неоангиогенезу через посредство взаимодействия с сосудисто-эндотелиальным фактором роста VEGF, которому принадлежит ключевая роль в инициации физиологического и патологического ангиогенеза, а также лимфангиогенеза и васкулогенеза [67].

Периостин способствует восстановлению сердечной ткани, индуцируя пролиферацию различных кардиомиоцитов [82;78]. При анализе протеома атеросклеротических бляшек периостин был выявлен более чем в 90% случаев [29], являясь одним из немногочисленных белков, активно экспрессирующихся их интимой [86]. Периостин также может способствовать дегенерации аортальных клапанов, индуцируя тканевое ремоделирование и ангиогенез [60].

При исследовании сердечных тканей после трансплантации сердца в сравнении с сердечными тканями доноров было установлено, что уровни мРНК периостина были значимо выше в несостоятельном миокарде, при этом для экспрессии белка периостина и фиброза миокарда, а также для увеличения диастолического объема левого желудочка наблюдалась

положительная корреляция, что позволило предположить возможность использования периостина как биомаркера ремоделирования тканей сердца у пациентов с сердечной недостаточностью [142].

При исследовании почечной патологии на животных моделях наблюдается активная локальная экспрессия периостина; с другой стороны, у нокаутных по гену *Postn* мышей наблюдается менее выраженный интерстициальный фиброз и воспаление после травмы. Эти сведения позволяют предположить, что периостин может выступать в качестве важного медиатора почечной патологии, и его блокада может стать терапевтическим подходом в предотвращении хронического течения заболеваний почек [88]. Периостин также может быть вовлечен в процессы клеточной пролиферации и интерстициального фиброза при поликистозе почек [31;129]; он рассматривается также в качестве возможного маркера прогрессирования гипертензивной нефропатии [58] и маркера почечной функции при волчаночном нефрите [132]. У страдающих сахарным диабетом II типа пациентов повышение уровней периостина в моче отмечается до начала клинически значимой альбуминурии; таким образом уровень периостина в моче может выступать в качестве раннего маркера диабетического поражения почек [103].

Экспрессия периостина в коже, как и в иных органах и тканях, повышается в ответ на механическое повреждение. Его функцию в коже можно с полным правом расценить как протективную; он способствует заживлению ран через посредство влияния на кератиноциты и фибробласты. Периостин является одним из основных модуляторов процесса раневого заживления, способствуя дифференцировке фибробластов в миофибробласты, коллагеновому фибрилlogenезу и синтезу экстрацеллюлярного матрикса. Обычно после пролиферативной фазы заживления популяция миофибробластов подвергается апоптозу, оставляя шрам с высоким содержанием в ткани коллагена и низким – клеток. Периостин активно экспрессируется в келоидной и в гипертрофической

ткани, способствуя ангиогенезу и пролиферации фибробластов, а также синтезу коллагена [128].

Тем не менее, периостин также может обладать патологической ролью в процессах фиброза кожи и хронического аллергического воспаления. Уровни периостина в сыворотке крови коррелируют с тяжестью фиброза кожи у пациентов с системным склерозом; периостин также может рассматриваться как маркер системного склероза [138;137]. Периостин также активно вовлекается в патологические процессы, имеющие место при atopическом дерматите и псориазе [59;79]. Общим для данных заболеваний гистологическим признаком является эпидермальная гиперплазия (акантоз), хотя их клинические характеристики и подлежащие иммунологические механизмы являются различными. Представляется, что периостин играет важную роль в процессе эпидермальной гиперплазии, являясь общим для двух вышеуказанных заболеваний медиатором [27].

Аберрантная экспрессия периостина также наблюдается при системной или локальной склеродермии, меланоме и кожной Т-клеточной лимфоме. Можно заключить, что периостин индуцирует процессы, ведущие к развитию фиброза кожи, а также участвует в активации и пролонгации иммунных процессов [96].

Хотя, как и для многих других органов и тканей, функции периостина в легких изучены не полностью, данный белок принимает несомненное участие в формировании и восстановлении дыхательных путей [73]. Периостин участвует в разделении альвеол и в опосредованном TGF β фиброзировании верхних и нижних дыхательных путей. В эпителии бронхов здорового человека индуцированная IL-13 секреция периостина сосредоточена на базальной поверхности, при этом бокаловидные клетки гораздо более активны в отношении экспрессии периостина по сравнению с реснитчатыми клетками [114].

Под воздействием воспалительных стимулов, таких, как аллергены или патогены, лимфоциты, нейтрофилы и макрофаги высвобождают ряд

цитокинов, включая интерлейкины-4 и -13, являющиеся триггерами продукции периостина в эозинофилах [130]. Как было указано выше, клетки эпителия дыхательных путей также вырабатывают периостин, обладающий аутокринным эффектом, включая опосредованный TGF- β фиброз [120].

В данной ситуации периостин проявляет присущие ему свойства участия в эпителиально-мезенхимальной трансформации. Его экспрессия коррелирует с встречаемостью хронических легочных заболеваний, что неудивительно, учитывая вышеописанные физиологические эффекты данного белка.

Более того, периостин является прогностическим маркером течения ряда легочных заболеваний; так, у пациентов с идиопатическим легочным фиброзом сывороточные уровни периостина коррелировали с оценкой «пчелиных сот» при компьютерной томографии и являлись прогностическим фактором снижения выживаемости пациентов [115].

Определение периостина, белка фибробластов, специфического для эозинофильного, интерлейкин-13–зависимого воспаления, может быть специфическим маркером начавшегося ремоделирования бронхов при хроническом аллергическом воспалении, что позволяет установить Th2–зависимый патогенез бронхиальной астмы [10].

При бронхиальной астме сывороточные уровни периостина ассоциируются с повышением гиперреактивности бронхов, ростом уровней IgE в сыворотке крови, эозинофильным воспалением и субэпителиальным фиброзом. Периостин может рассматриваться в качестве неинвазивного маркера фенотипа бронхиальной астмы, характеризующегося выраженной активацией Th2-иммунного ответа [39].

Группа исследователей попыталась идентифицировать характерный для высокого содержания периостина в периферической крови фенотип бронхиальной астмы; по их мнению, для него характерна эозинофильная астма с поздним началом, высокая частота непереносимости

ацетилсалициловой кислоты, частое наличие сопутствующих патологий дыхательных путей и снижение легочной функции [90].

Таким образом, периостин может рассматриваться в качестве маркера специфического подтипа бронхиальной астмы с тяжелым течением. Хотя специфическая роль периостина в легких изучена не полностью, при бронхиальной астме наблюдается повышение экспрессии периостина в дыхательных путях [75]. Определенное клиническое значение придается периостину как в отношении прогнозирования ответа на традиционную терапию глюкокортикоидами [33], так и при применении новейших биопрепаратов, мишенью которых являются молекулы Th2-зависимого воспаления [41;61;99].

Можно заключить, что периостин является широко распространенным в организме человека многофункциональным белком, экспрессия которого повышается в ответ на механическую нагрузку или воспаление. Его физиологическая функция состоит в восстановлении ряда тканей после повреждения; тем не менее, его избыточная экспрессия наблюдается при ряде заболеваний, характеризующихся воспалением, фиброзом или опухолевым ростом.

В настоящее время периостин рассматривается в качестве возможного диагностического маркера или терапевтической мишени при ряде патологических состояний организма; его значение в клинической практике должно быть подтверждено дальнейшими исследованиями. Это верно и в отношении возможного значения периостина для будущего репродуктивной медицины. Возможные роли данного белка в процессах имплантации эмбрионов и раннего эмбрионального развития являются в настоящее время предметом внимательного изучения.

1.4 Периостин и репродуктивная медицина

Наличие определенного сходства между явлениями туморогенеза, метастазирования и имплантации эмбриона заставило специалистов обратить

внимание на функции периостина в эндометрии. При исследовании экспрессии периостина в эндометрии коров было установлено, что ее триггером является прогестерон, тогда как в присутствии тау-интерферона уровни периостина снижаются [23]. С другой стороны, при изучении экспрессии периостина в эндометрии крыс и человека наблюдалось ее повышение в пролиферативной фазе с последующим снижением в фазе секреции [63].

По всей вероятности, периостину также принадлежит важная роль в процессах эмбрионального развития, поскольку он присутствует в амниотических оболочках, а его экспрессия в пуповине новорожденных весьма высока [144;46;109]. Влияние данного белка на сигнальный путь Wnt, имеющий важное значение при беременности, упоминалось выше.

Важным шагом в изучении роли периостина в матке стало осуществленное Morelli et al. (2014) [93] экспериментальное исследование методом «случай–контроль», целями которого являлось определение экспрессии периостина в тканях и сыворотке крови при беременности, а также оценка потенциальной роли периостина в обеспечении рецептивности эндометрия и имплантации эмбриона [18].

В исследование было включено 15 пациенток после самопроизвольной потери беременности; контрольную группу составили 30 здоровых женщин, обратившихся для проведения медицинского аборта по собственному желанию. В обеих группах забор ткани трофобласта и децидуальной ткани производился на сроке 12 недель гестации. Оценка экспрессии периостина осуществлялась с использованием иммуногистохимических методов и полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией. Сывороточные уровни периостина определялись с помощью метода Вестерн-блот.

Было установлено, что уровни мРНК и белка периостина были значимо выше как в децидуальной ткани и в трофобласте, так и в сыворотке крови женщин, обратившихся за медицинским абортom, по сравнению с женщинами с самопроизвольной потерей беременности. Исследователи

предположили, что периостин может являться сывороточным маркером рецептивности эндометрия и качества эмбриона.

Тем не менее, поскольку в исследование вошли пациентки на сроке 12 недель гестации после потери/прерывания беременности, оценить возможность использования периостина как маркера прогрессирования беременности в I триместре на основании данных результатов не представляется возможным. Разработка раннего скринингового теста, позволяющего идентифицировать пациенток с высоким риском ранней потери беременности, позволит с одной стороны успокоить пациенток с благоприятными результатами тестирования в отношении прогноза беременности [100], с другой – при получении неблагоприятного результата пациентка будет предупреждена на самой ранней стадии беременности [62], что может позволить избежать ранние потери беременности в первом триместре и пролонгировать беременность.

Оценка возможности использования периостина в качестве биомаркера риска самопроизвольной потери беременности в I триместре стала целью работы Freis et al. (2017) [51], в которой впервые были определены уровни периостина в организме на протяжении ранней беременности в попытке дифференцировать пациенток с невынашиванием беременности от пациенток, беременность у которых будет протекать нормально.

В исследование была включена 41 беременная пациентка (возраст от 18 до 42 лет), беременность у которых наступила после стимуляции овуляции и переноса эмбрионов в программе ЭКО. Женщины были подразделены на группы с потерей беременности в I триместре (замершая беременность, неполный или полный самопроизвольный выкидыш; 18 пациенток) и с нормальным прогрессированием беременности (23 пациентки).

Наиболее подходящим с точки зрения исследователей моментом для оценки риска невынашивания являлся день анализа на наличие беременности; тем не менее, как и при последующем анализе на 6-й неделе гестации, различий уровней периостина между двумя группами выявить не

удалось, что, конечно, могло быть обусловлено малым объемом выборки в данной работе.

Исследователи продолжили оценку полученных в ходе исследования данных, обратив свое внимание на изменения концентраций периостина у отдельных женщин. Им удалось установить, что относительная экспрессия периостина между 4-й и 6-й неделями беременности была значимо выше у пациенток с последующей потерей беременности по сравнению с пациентками, беременности которых впоследствии развивались нормально. По мнению исследователей, это может объясняться повышением экспрессии периостина при воспалительных процессах [70].

Таким образом, колебания уровня периостина у отдельных пациенток могут стать новым независимым маркером риска потери беременности. Полученные результаты требуют валидации в работах с большим объемом выборки пациенток, которые позволят точнее определить клинически значимые пороговые значения уровней периостина.

Еще одним возможным подходом к использованию периостина в качестве прогностического маркера развития беременности является оценка его уровней в фолликулярной жидкости, а также параметры экспрессии данного белка blastocystami в программах ЭКО. Несомненный интерес в данном отношении представляет проспективное пилотное исследование, в котором был осуществлен качественный и количественный анализ содержания периостина в 200 индивидуальных образцах фолликулярной жидкости, полученных от 50 пациенток, проходящих лечение бесплодия методом ЭКО; также авторы исследовали 50 образцов культуральной среды, в которых культивировались 50 blastocyst, впоследствии перенесенных в полость матки. У всех пациенток был взят образец сыворотки крови [45].

Уровень периостина как в сыворотке крови, так и в фолликулярной жидкости характеризовался наличием отрицательной корреляции с возрастом пациентки, а также был ниже при низком овариальном резерве и привычном невынашивании беременности. Уровень периостина был значимо выше у

забеременевших пациенток (17 из 50) по сравнению с незабеременевшими в фолликулярной жидкости ($63,45 \pm 10,05$ по сравнению с $29,02 \pm 14,47$ нг/мл) и в сыворотке крови ($306,23 \pm 41,40$ по сравнению с $120,92 \pm 38,10$ нг/мл). Уровень периостина в фолликулярной жидкости был напрямую связан с морфологическим качеством бластоцисты и результатом переноса эмбрионов. Уровень периостина был значимо выше для бластоцист класса А, в особенности у тех, которые дали начало беременности, как в фолликулярной жидкости их ооцитов, так и в промывных средах ($95,93 \pm 18,20$ по сравнению с $41,83 \pm 8,98$ нг/мл и $10,74 \pm 3,68$ по сравнению с $1,09 \pm 2,95$ нг/мл соответственно).

По мнению исследователей [45], уровни периостина могут стать инновационным неинвазивным маркером качества эмбриона при проведении программы ЭКО. Поскольку данный белок может характеризовать протекание процессов взаимодействия эмбриона и эндометрия, концентрация периостина в фолликулярной жидкости, сыворотке и мазках из цервикального канала также способна предоставить информацию об успехе имплантации эмбриона и исходе ранней беременности. Для подтверждения полученных результатов потребуются дальнейшие исследования с большим количеством пациенток, а также с возможным включением в исследование образцов эндометрия.

Любопытно отметить также недавнее исследование Zheng et al. (2016) [143], в котором авторы определили уровни периостина в сыворотке крови и в перитонеальных смывах у 184 женщин с эндометриозом и без такового. Согласно полученным данным уровни периостина были значимо повышены у пациенток с эндометриозом как в пролиферативную, так и в секреторную фазу менструального цикла. С учетом таких ковариат, как дисменорея и бесплодие, периостин сыворотки крови характеризовался как диагностический показатель эндометриоза чувствительностью 75%, специфичностью 65% и площадью под кривой 0,774, тогда как аналогичные параметры для периостина перитонеальных смывов составили 94,23%, 90 и

0,967 соответственно. Авторы пришли к выводу, что периостин может рассматриваться в качестве потенциального биомаркера эндометриоза, в особенности при наличии дисменореи и бесплодия.

1.5 Роль витамин К-зависимого белка периостина как прогностического маркера программы врт

Среди компонентов экстрацеллюлярного матрикса, экспрессия которых увеличивается в периимплантационном периоде и которые поддерживают разрастание трофобласта *in vitro*, хорошо известны остеопонтин, фибронектин, ламинин и коллаген IV типа [26;133;134;32], при этом взаимодействие трофобласта с экстрацеллюлярным матриксом опосредуется в первую очередь различными интегринами [38]. Можно предположить, что активно взаимодействующий с интегринами витамин К–зависимый белок периостин является еще одним участвующим в регулировании взаимосвязи эмбриона с эндометрием белком экстрацеллюлярного матрикса, экспрессия которого способна стать прогностическим фактором частоты имплантации и исхода беременности в естественных циклах [18].

Изучение возможности использования периостина в качестве инновационного неинвазивного маркера качества ооцитов и эмбрионов является перспективным и актуальным направлением прогнозирования результатов программ ВРТ. Оценка экспрессии периостина в отдельных образцах фолликулярной жидкости, в сыворотке крови и в соскобах эпителиальных клеток цервикального канала поможет спрогнозировать возможный исход ЭКО.

Учитывая риск десинхронизации эмбриона и эндометрия после стимуляции суперовуляции при применении программ ВРТ, имеющий тенденцию к росту с возрастом пациентки [105], разработка новых методов оценки воздействия гонадотропинов на рецептивность эндометрия имеет несомненное клиническое значение. Изучение экспрессии периостина в сыворотке крови, в образцах фолликулярной жидкости, в соскобах

эпителиальных клетках цервикального канала, эндометрии и культуральных средах эмбрионов является одним из возможных подходов к исследованию данной проблемы. Для подтверждения его перспективности требуется проведение дальнейших исследований с тщательно разработанным дизайном.

1.6 Витамин К и гены системы детоксикации

Витамин К представляет собой жирорастворимый витамин, необходимый для свертывания крови. Природный витамин К включает витамин К1 (филлохинон) и витамин К2 (менахинон). Филлохинон содержится главным образом в овощах, тогда как менахинон синтезируется микроорганизмом и содержится в пище (ферментированные соевые бобы). Показано, что витамин К играет важную роль в гепатоцитах, поддерживая активность факторов коагуляции II, VII, IX и X и антикоагулянтов, белка С и белка S. Стоит отметить, что в литературе до сих пор нет точных референсных значений уровня витамина К в крови человека.

Авторы из Японии продемонстрировали, что витамин К также служит лигандом для рецептора стероидов и ксенобиотиков (SXR) [28]. SXR относятся к надсемейству ядерных рецепторов. Ядерные рецепторы (ЯР) представляют собой класс внутриклеточных белков, регулирующих транскрипцию специфических генов в определённых последовательностях ДНК генома, активирующих синтез ферментов и различных белков, управляющих эмбриональным развитием, клеточной дифференцировкой, апоптозом, иммунным ответом, гомеостазом и метаболическими процессами. Регулирование экспрессии генов ЯР происходит в основном только тогда, когда лиганд (ксенобиотик, лекарственное средство или эндогенные липофильные соединения – гормоны, холестерин, желчные кислоты, жирные кислоты, эйкозаноиды, витамины А и Д и др.) связываются со специальной зоной рецептора – лигандсвязывающим доменом (LBD). Связывание лиганда с ЯР приводит к его конформационным изменениям, способствующим его

активации, освобождению от блокирующего его корепрессора и транслокации из цитоплазмы в ядро вместе с белком теплового шока (шапероном). Уникальным свойством ЯР, отличающим их от других классов рецепторов, является их способность непосредственно взаимодействовать с геномной ДНК. Как следствие, ЯР играют ключевую роль в эмбриональном развитии, в росте и дифференцировании стволовых клеток, апоптозе, гомеостазе и метаболизме экзогенных и эндогенных липофильных соединений [69].

В связи с вышесказанным целесообразно изучение роли витамин К-зависимого белка периостина как инновационного неинвазивного маркера для предикции качества ооцитов, эмбрионов и частоты наступления беременности в программе ВРТ, и его внедрение в клиническую практику. Также необходимо учитывать особенности метаболизма самого витамина К, модулирующего биологические функции периостина.

Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материал исследования

Отбор пациентов для проведения данного исследования осуществлялся на базе отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени проф. Б.В. Леонова федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (заведующий – д.м.н., проф. Калинина Е.А.) в период с марта 2016 г. по март 2017 г.

Критерии включения пациенток в исследование:

- Возраст пациенток от 18 до 37 лет
- Женское бесплодие обусловленное трубно-перитонеальным фактором
- Регулярный менструальный цикл
- Мужское бесплодие без выраженной патозооспермии
- Информированное согласие на участие в исследовании

В исследование не включались пациентки с:

- Противопоказаниями для проведения ЭКО, в том числе с онкологическими заболеваниями и экстрагенитальной патологией
- Верифицированным лапароскопическим и/или ультрасонографически наружным генитальным эндометриозом (НГЭ) III – IV стадии распространения
- Патологией эндометрия
- Миомой матки более 4 см интерстициальной, субсерозной и/или субмукозной миомой, деформирующей полость матки.
- Выраженной патозооспермией
- Генетическими аномалиями
- Пороками развития половых органов

- Синдромом поликистозных яичников (СПКЯ)

В исследование были включены 100 пациенток, обратившихся для проведения программы ЭКО/ИКСИ и ПЭ, после предварительного обследования, строго в соответствии с критериями включения/исключения, подписавшие добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Исследование было одобрено комиссией по этике биомедицинских исследований при ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (протокол № 13 от 10.12.2015г.).

2.2 Материал исследования

Для определения уровня витамин К-зависимого белка периостина (POSTN) фолликулярная жидкость отбиралась во время трансвагинальной пункции яичников из первого фолликула в каждом яичнике, с промывкой иглы после каждого фолликула, в индивидуальные маркированные пробирки без гепарина. Каждая порция фолликулярной жидкости была центрифугирована в течение 20 минут. В исследование были включены те образцы фолликулярной жидкости, в которой был найден ооцит (n=87), поскольку уровень периостина в фолликулярной жидкости, полученной из разных яичников у одной пациентки, был сопоставим, анализировали средний уровень периостина в фолликулярной жидкости, полученной из разных фолликулов обоих яичников.

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 (Hoefel, США), составляла, в среднем, 50-100 мкг/мл.

Для определения уровня витамина К была получена сыворотка крови во время трансвагинальной пункции яичников перед введением внутривенной анестезии.

Соскоб эпителиальных клеток из цервикального канала был отобран на 5-е сутки после проведения трансвагинальной пункции яичников, в предполагаемое «окно имплантации», непосредственно перед проведением переноса эмбрионов в полость матки. Клетки помещали в пробирки со средой для стабилизации РНК («Стор-экс», ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) [19].

2.3 Дизайн исследования

Все пациентки, обратившиеся для проведения программы ЭКО/ИКСИ и ПЭ, были разделены на две группы сравнения в зависимости от результата программы ЭКО/ИКСИ: I группа - 28 пациентки, у которых в результате лечения наступила клиническая беременность, II группа - 72 пациенток с отрицательным результатом лечения бесплодия. Всем пациенткам осуществлялся перенос 1 эмбриона хорошего качества на 5-е сутки культивирования при нормальных размерах и структуре эндометрия по данным ультразвукового исследования.

2.3.1 Дизайн исследования для задачи №1

Проспективное исследование случай-контроль.

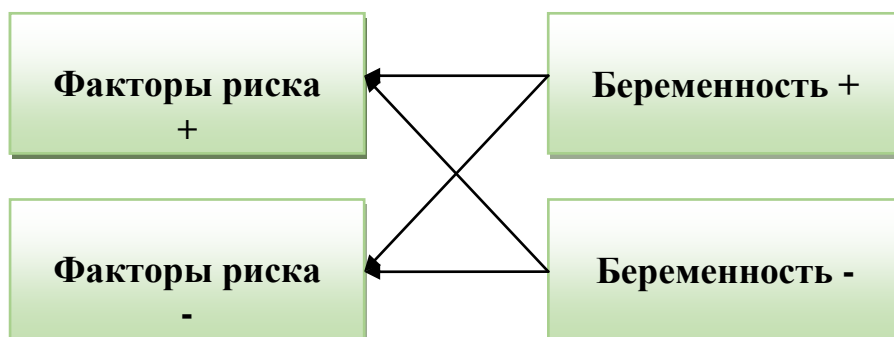


Рисунок 1. Дизайн исследования для задачи 1

Группы:

Группа 1 – пациентки с наступившей беременностью после ЭКО/ИКСИ и ПЭ.

Группа 2 – пациентки с отсутствием беременности после ЭКО/ИКСИ и ПЭ.

Исследуемый параметр:

- Средние значения и частоты параметров клинического и гормонального статуса в сравниваемых группах.

2.3.2 Дизайн исследования для задачи №2

Проспективное исследование случай-контроль.

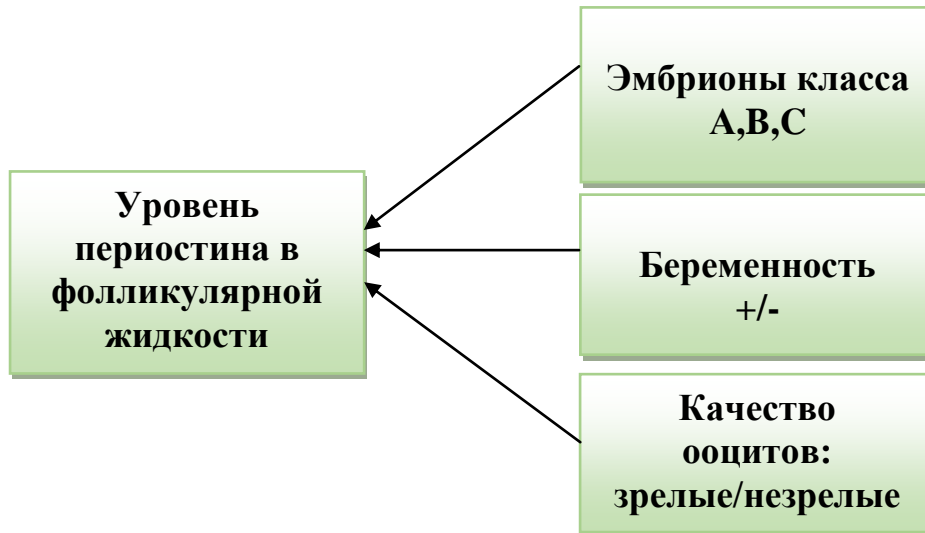


Рисунок 2. Дизайн исследования для задачи 2

Исследуемые параметры: уровень периостина в фолликулярной жидкости в зависимости от класса бластоцисты (класс А, В и С по системе Gardner ДК, 1999г.), исхода беременности после программы ЭКО/ИКСИ и качества ооцитов (зрелые и незрелые).

2.3.3 Дизайн исследования для задач №3

Проспективное когортное исследование

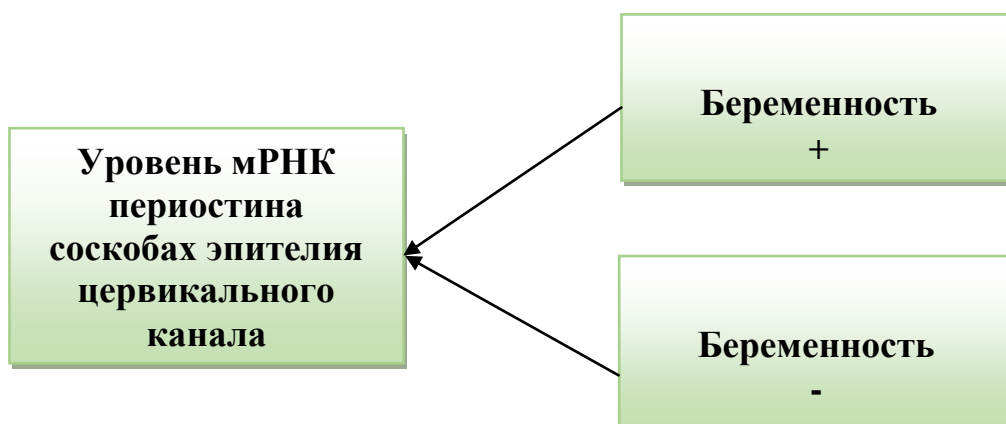


Рисунок 3. Дизайн исследования для задачи 3

Исследуемый параметр: уровень мРНК периостина в соскобах эпителия цервикального канала в группах сравнения

2.3.4 Дизайн исследования для задачи №4

Одномоментное исследование

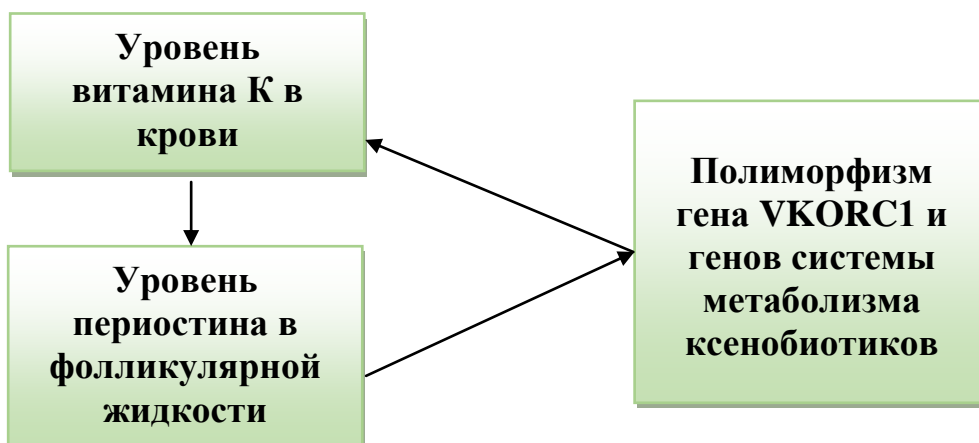


Рисунок 4. Дизайн исследования для задачи 4.

Исследуемые параметры:

уровень периостина у женщин с полиморфизмом гена VKORC1;

уровень витамина К у женщин с полиморфизмом гена VKORC1;

уровень периостина у женщин с полиморфизмом генов системы метаболизма ксенобиотиков.

Связь между уровнем периостина и уровнем витамина К.

2.3.5 Дизайн исследования для задач №5

Проспективное когортное исследование

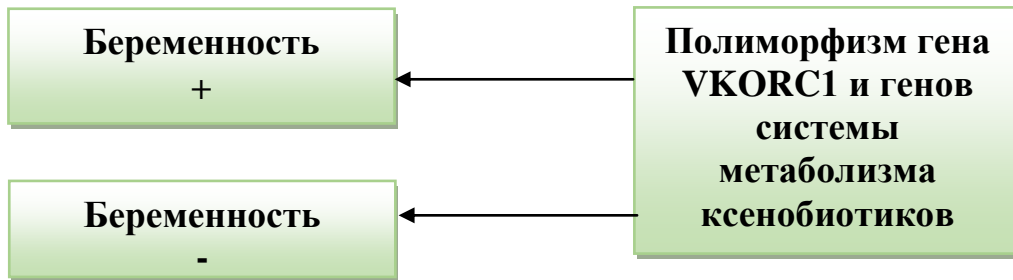


Рисунок 5. Дизайн исследования для задачи 5.

Эмбриологические показатели:

- качество полученных ооцитов
- количество полученных эмбрионов (на 5-е сутки)
- качество полученных эмбрионов (класс А, В и С по системе Gardner DK, 1999г.) в день переноса

Исходы беременности:

- биохимическая беременность (%)
- клиническая беременность (%)
- самопроизвольный выкидыш в I триместре беременности (%)
- неразвивающаяся беременность в I триместре (%)
- роды

Конечная точка исследования:

- частота наступления беременности, исходов беременности и частота ранних потерь беременности.
- Отношение шансов наступления беременности от выявленных предикторов беременности.

Во всех полученных группах полученные ооциты классифицировались по степени зрелости согласно критериям, представленным в работе К. Elder (Кембридж) [145]:

- GV (germinal vesicle, зародышевый пузырек) – окружающие клетки плотно расположены вокруг ооцита; присутствует большое ядро; такой ооцит находится на стадии профазы первого мейотического деления; полярное тельце не сформировано;
- M I (незрелый) – ооцит окружен плотно организованным слоем клеток лучистого венца, *cumulus* незначительно увеличен; такой ооцит находится на стадии метафазы первого деления мейоза; полярное тельце еще не сформировано;
- M II (преовуляторный, зрелый) – клетки лучистого венца все еще окружают ооцит, но не имеют радиальной структуры, *cumulus* разросшийся, имеет клеточную структуру; одно полярное тельце уже выделено; ооцит находится на стадии метафазы второго деления мейоза; этот уровень созревания подходит для успешного оплодотворения;
- Очень зрелый – ооцит часто визуализируется в виде бледного шара, присутствует небольшое количество клеток лучистого венца, отделенного от яйцеклетки; *cumulus* хорошо различим, имеет различимую клеточную структуру; полярное тельце хорошо видно;
- Лютеинизированный – ооцит бледный, часто трудноразличим; вокруг ооцита *cumulus* образуют скопления, становится желатинозной массой; такие яйцеклетки обладают низкой фертильностью, результаты инсеминации невысоки.

Эмбрионы классифицировались по морфологическим критериям на 5-е сутки в соответствии с классификацией, принятой Istanbul consensus workshop on embryo assessment (ESHRE, 2011) («модифицированная» классификация D. Gardner):

Внутренняя клеточная масса

I класс (A) – хорошо различима, содержит много компактно расположенных, плотно упакованных клеток;

II класс (B) – хорошо различима, но имеет незначительные дефекты (небольшой объем, неплотно упакована, мало клеток);

III класс (C) – трудно различима, содержит всего несколько клеток.

Трофэктодерма

I класс (A) – хорошо организована, многоклеточная, формирует плотный эпителий;

II класс (B) – содержит малое количество неравномерно распределенных клеток;

III класс (C) – незначительное количество клеток.

2.4 Методы исследования

Предварительно перед началом программы ВРТ всем пациенткам было проведено полное клинико-лабораторное обследование в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации № 107н "О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению" от 2013г [1;2]. Обследование проводилось в амбулаторных условиях по месту жительства пациентов или в ФГБУ «НМИЦАГиП им.В.И. Кулакова» МЗ РФ.

Обязательными исследованиями для супружеской пары были:

1. Определение антител к бледной трепонеме в крови (RW), антител класса M, G к вирусу иммунодефицита человека 1, 2 (ВИЧ 1,2), к антигену вирусного гепатита B и C (HBs-Ag, HCV);
2. Микроскопическое исследование отделяемого половых органов на факультативно-анаэробные и аэробные микроорганизмы, паразитологическое исследование на атрофозоиты трихомонад, на грибы рода кандиды;
3. Исследование соскоба из цервикального канала на микоплазму, хламидии и уреоплазму методом полимеразной цепной реакции (ПЦР);
4. Исследование соскоба из цервикального канала на цитомегаловирус, вирус простого герпеса 1, 2, методом ПЦР;

Обязательными исследованиями для женщин были:

1. Общий клинический анализ крови;

2. Биохимический анализ крови;
3. Гемостазиограмма;
4. Общий анализ мочи;
5. Определение групповой и резус-принадлежности крови;
6. Количественный анализ антител класса М, G к вирусу краснухи в сыворотке крови;
7. Расширенная кольпоскопия
8. Цитологическое исследование соскоба эндоцервикса и экзоцервикса;
9. Ультразвуковое исследование органов малого таза на 5-8 день менструального цикла;
10. Флюорография;
11. Электрокардиография (ЭКГ);
12. Заключение терапевта о наличии или отсутствии противопоказаний для проведения программы ЭКО и ПЭ;
13. УЗИ молочных желез (до 35 лет) или маммография (после 35 лет);
14. УЗИ щитовидной железы;
15. Гормоны крови (на 2-3 день менструального цикла): лютеинизирующий гормон (ЛГ), ФСГ, эстрадиол, тиреотропный гормон (ТТГ), свободный тироксин (Т4св), дегидроэпиандростерон-сульфат (ДГЭАС), пролактин, соматотропный гормон, кортизол, тестостерон, антимюллеров гормон (АМГ).

Обязательным исследованием для мужчины были:

1. Анализ эякулята;
2. Консультация андролога при отклонениях в результате анализа эякулята.

Исследованием по показаниям служили:

1. Оценка состояние матки, проходимости маточных труб (гистеросальпингография, гистероскопия и лапароскопия);
2. консультации смежных специалистов (эндокринолога, уролога).

2.4.1 Нормативные показатели параметров гемостазиограммы

Исследование системы гемостаза включало определение протромбинового индекса (ПТИ), активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), концентрации фибриногена, МНО. Нормативные показатели представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Нормативные параметры гемостазиограммы

Показатель	Нормативные показатели	Единицы измерения
Протромбиновый индекс	80-125	%
АЧТВ	20-40	сек
Концентрация фибриногена	1,8-6,0	г/л
МНО	0,8-1,2	%

Измерение выполняли на автоматических анализаторах «Sysmex CA-1500» (Испания) для определения плазменного звена гемостаза, CHRONOLOG (США) для измерения агрегации тромбоцитов, ROTEM (Германия) для определения тромбоэластограммы с использованием стандартных программ.

2.4.2 Общеклинические методы исследования

Производился сбор анамнеза пациенток, изучался аллергоанамнез, наследственный фактор, профессиональные вредности, перенесенные заболевания, уточнялись особенности менструальной функции (характер менструаций, возраст менархе, регулярность, продолжительность цикла), половой функции (возраст начала половой жизни, методы контрацепции). Тщательно производился сбор анамнестических данных о репродуктивной функции пациенток (количество беременностей, наступивших естественным путем, аборт, срочных и преждевременных родов, самопроизвольных выкидышей, неразвивающихся, внематочных беременностей, наличие осложненных беременностей и родов). Уточнялось, наступали беременности с настоящим или иным половым партнером. Отмечались перенесенные гинекологические заболевания и оперативные вмешательства на половых

органах (объем, характер, выполненной операции, течение послеоперационного периода, результаты гистологических исследований). Подробно выяснялась история бесплодия, продолжительность, причины, методы и эффективность проводимого лечения. Особое внимание уделялось ранее проведенным программам ЭКО/ИКСИ и ПЭ (дата и место проведения, метод, схема протокола стимуляции функции яичников, количество фолликулов перед ТВП, полученных ооцитов, качество ооцитов (зрелые и незрелые), эмбрионов, исход программы).

Объективно оценивали такие параметры, как общее состояние пациентки, тип телосложения, производили расчет индекса массы тела (ИМТ) по формуле: $ИМТ = \text{масса тела (кг)} / \text{рост}^2 \text{ (м}^2\text{)}$, давали оценку состояния систем органов кровообращения, дыхания, пищеварения, нервной системы, мочевого выделения.

При оценке гинекологического статуса пациенток проводился осмотр наружных половых органов, влагалища и шейки матки в зеркалах, бимануальное исследование, в ходе которого определяли общее состояние влагалища, шейки матки, тела матки, придатков, тазовой брюшины, околоматочной клетчатки, выявляли наличие объемных образований органов малого таза.

2.4.3 Гормональное исследование

Перед вступлением в программу ВРТ всем пациенткам производилась оценка гормонального статуса.

Оценка гормонального статуса осуществлялась в раннюю фолликулярную фазу (2-3 день) менструального цикла. В плазме крови исследовалась концентрация таких гормонов, как: ФСГ, ЛГ, АМГ, эстрадиол (Е2), пролактин (ПРЛ), кортизол (К), дегидроэпиандростерона сульфата (ДЭА-С), тестостерона, тиреотропного гормона (ТТГ), свободного тироксина (Т4св), соматотропного гормона (СТГ). Концентрацию прогестерона (П) оценивали в плазме крови в лютеиновую фазу менструального цикла (на 20-

22й д.м.ц.). Нормативные значения концентрации гормонов в плазме крови у женщин фертильного возраста приведены в таблице 2.

Таблица 2 - Нормативные значения концентрации гормонов в плазме крови у женщин репродуктивного возраста

Гормональное исследование крови (единицы измерения)	Нормативные показатели
ФСГ (МЕ/л)	3,0 – 10,0
АМГ (нг/мл)	1,0 до 4,5
Е2 (пмоль/л)	150-450
Прогестерон (нмоль/л) лютеиновая фаза цикла	16-95
Пролактин (мМЕ/л)	120-500
ЛГ (МЕ/л)	3,0-8,0
Кортизол (нмоль/л)	100-500
Тестостерон (нмоль/л)	1,0-2,5
ТТГ (мМЕ/л)	1,0-3,0
Т4 св. (пмоль/л)	10,0-25,0

2.4.4 Ультразвуковое исследование органов малого таза

Ультразвуковое исследование (УЗИ) органов малого таза проводилось всем пациенткам на этапе предварительного обследования на 5-7 день менструального цикла с целью исключения возможных противопоказаний для начала проведения лечебного цикла программы ЭКО/ИКСИ. Исследование проводилось с использованием ультразвуковых аппаратов компании «ВК Medical» (Дания) трансвагинальным датчиком с частотой 3,5-7,5 МГц при опорожненном мочевом пузыре.

В ходе исследования оценивались такие параметры как размеры тела матки, его положение и форма, структура миометрия, структура и толщина эндометрия, размеры яичников, выраженность фолликулярного аппарата, оценивалась степень выраженности спаечного процесса, исключалось наличие объемных образований органов малого таза.

УЗИ органов малого таза проводилось с частотой, предусматриваемой схемой протокола стимуляции суперовуляции. Так, при стимуляции функции яичников по протоколу с антГнРГ, первое УЗИ органов малого таза осуществлялось на 2-3 день менструального цикла, далее эхографическое исследование фолликулогенеза и роста эндометрия проводилось на 6 день стимуляции суперовуляции. Далее динамический контроль роста эндометрия и фолликулов осуществлялся с целью возможной коррекции дозы вводимых препаратов и в день назначения триггера овуляции.

2.4.5 Спермиологическое исследование эякулята

Оценка показателей эякулята производилась дважды: при предварительном обследовании в рамках подготовки к программе ЭКО/ИКСИ и в день трансвагинальной пункции яичников (ТВП). Пациенту был рекомендован соответствующая подготовка перед сдачей анализа. Сбор материала производился в стерильный контейнер.

Оценка показателей спермограммы производилась в соответствии с нормативами ВОЗ (2010) (таблица 3) [136].

Таблица 3 - Нормативы спермограммы (ВОЗ, 2010) [136]

Показатель	Нормативы ВОЗ
Объем эякулята	>2,0 мл
рН	7,2-8,0 ед
Вязкость	0,1-2,0 см
Время разжижения	10-60 мин
Лейкоциты	<1 000 000 кл/мл
Концентрация сперматозоидов	>20 млн/мл
Общее количество сперматозоидов	>40 млн
Активноподвижные (А)	>25%
Активные и малоподвижные (А + В)	>50%
Морфология	≥ 4 % нормальных форм
Жизнеспособных	75% или более

Агглютинация	отсутствует
Клетки сперматогенеза	2-4 кл/100
Эритроциты	отсутствуют

2.4.6 Специальные методы исследования

Молекулярно-генетические методы исследования

Анализ полиморфизма генов в генотипе пациенток производился в лаборатории молекулярно-генетических методов ФГБУ «НМИЦАГиП им. академика В.И. Кулакова» МЗ РФ. Дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) для генотипирования выделяли из образцов периферической крови (таблица 4).

Таблица 4 - Пациенткам проводилось генотипирование по 19 указанным локусам:

Полиморфный локус	Идентификатор в базе данных dbSNP национального центра биотехнологической информации США (National Center for Biotechnological Information, NCBI)
GSTP1: 313 A>G (Ile105Val)	rs8191450
GPX1: Pro 198Leu	rs1050450
GSTP1: 341 C>T (Ala114Val)	rs1138272
EPHX1: 337 T>C (Tyr113His)	rs1051740
EPHX1: 416 A>G (His139Arg)	rs2234922
SOD2: C47T (ALA16VAL)	rs4880
CYP1A1: 1506 (4889) A>G (Ile46Val)	rs1048943
NAT2: 341 T>C (Ile114Thr)	rs1801280
CYP1A1: 1382 (1295) C>A (Thr461Asn)	rs1799814
NAT2: 590G>A (Gly286Glu)	rs1799931
CTY1A1: 1189 T>C	rs464903
NAT2: 857 G>A (Gly286Glu)	rs1799931
SULT1A1: Arg213His	rs9282861
GSTM1: Ins>Del	делеция гена
GSTT1: Ins>Del	делеция гена

CYP2C9: 430 C>T (Arg144Cys)	rs1799853
CYP2C9: 1075 A>C (Ile359Leu)	rs1057910
VKORC1:-1639G>A	rs9923231

Генотипирование проводили методом ПЦР с анализом кривых плавления модифицированным методом «примыкающих проб» (adjacent probes, kissing probes) с помощью коммерческих тест-систем ООО «НПО ДНК-Технология», Россия. При исследовании генотипа CYP2C9 определяли наличие одного из трех наиболее распространенных в европейской популяции гаплотипов *1, *2, *3 на основании NCBI Reference Sequence M61857.1 с помощью исследования локусов 430 C>T (Arg144Cys) rs1799853 и 1075 A>C (Ile359Leu) rs1057910.

Оценка экспрессии мРНК гена периостина в соскобах эпителиальных клеток из цервикального канала была проведена методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Реакция амплификации проводилась с помощью детектирующего амплификата ДТ-96 («ДНК-Технология», Россия).

Нормировка уровня экспрессии генов выполнена с использованием метода сравнения индикаторных циклов (метод $\Delta\Delta C_p$) по четырем референсным генам TGFB1, VEGFA, TAGLN, IL1B.

Определение концентрации периостина (POSTN) в фолликулярной жидкости проводили иммуноферментным методом (ИФА) с использованием коммерческого набора «Human periostin/OSF-2 ELISA» (Кат.№ SK00072-08, США) в клинико-диагностической лаборатории ФГБУ «НМИЦ АГиП им. академика В.И. Кулакова» МЗ РФ (руководитель научно-диагностической лаборатории, к.м.н. Т.Ю. Иванец).

Уровень витамина К в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом (ИФА) с использованием коммерческого набора «Vitamin K1 (VK1)» (Кат.№CEA926Ge, США) в клинико-диагностической лаборатории ФГБУ «НМИЦ АГиП им. академика В.И. Кулакова» МЗ РФ (руководитель научно-диагностической лаборатории,

к.м.н. Т.Ю. Иванец). Для исследования использовали образцы сыворотки крови, полученные у пациенток в день проведения трансвагинальной пункции яичников.

2.4.7 Протокол стимуляции функции яичников

Овариальная стимуляция яичников у всех обследуемых женщин была проведена по стандартному протоколу с анГнРГ в комбинации с рекомбинантным ФСГ. Протокол стимуляции функции яичников начинался в раннюю фолликулиновую фазу со 2-3 дня менструального цикла. Доза препаратов рФСГ подбиралась индивидуально в зависимости от данных клинических и гормональных показателей от 150 МЕ до 300 МЕ.

Динамика роста фолликулов оценивалась при проведении ультразвукового мониторинга.

С целью предотвращения паразитарного пика эндогенного ЛГ, при достижении диаметра фолликулов 14-15мм назначалось подкожное введение препарата анГнРг в дозе 0,25мг/сут.

С целью финального дозревания ооцитов, в качестве триггера овуляции при достижении диаметра фолликулов 18 мм, вводился препарат хорионического гонадотропина человека в дозе 5-10 тыс ЕД/сут за 35-36 часов до планируемой трансвагинальной пункции яичников (рис. 6).

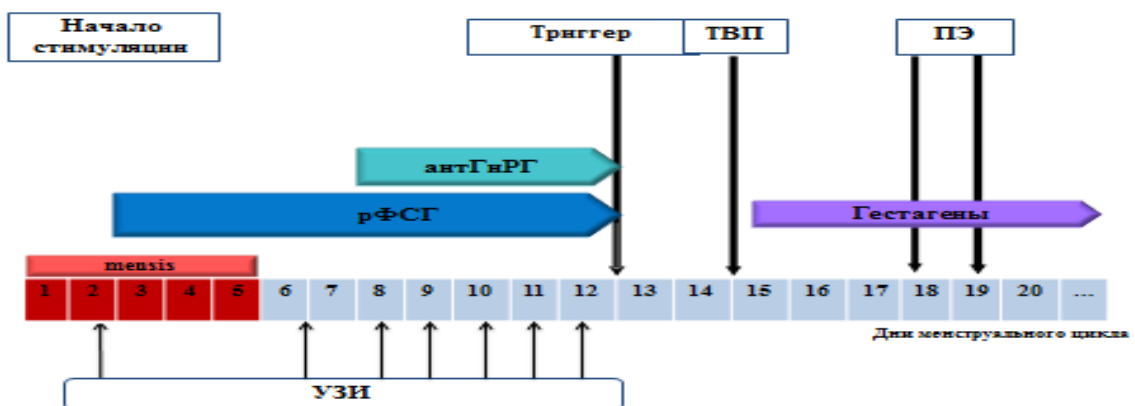


Рисунок 6. Стандартный протокол с анГнРг

2.4.8 Трансвагинальная пункция яичников

Трансвагинальная пункция яичников производилась спустя 35-36 часов после инъекции препарата хорионического гонадотропина человека под кратковременным внутривенным наркозом посредством вакуумной аспирации фолликулов под ультразвуковым мониторингом с использованием одноразовых игл (система Cook IVF). Аспирированная фолликулярная жидкость помещалась в подогретые стерильные пробирки, содержащие среду с гепарином - 0,5мл, предотвращающую образование кровяных сгустков. Пробирки незамедлительно передавались эмбриологу. Содержимое каждой из доставленных пробирок помещалось в чашку Петри, изучалось на предмет присутствия ооцит-кумулюсного комплекса, оценивались качество и степень зрелости полученных ооцитов.

2.4.9 Метод оплодотворения и культивирования дробящихся эмбрионов *in vitro*

Ооциты идентифицировались сразу же после аспирации фолликулов при помощи диссекционного микроскопа на нагретой поверхности. Постоянно поддерживались необходимые температурные условия и pH среды. Качество и степень зрелости ооцитов оценивались сразу после аспирации, клетки преинкубировались *in vitro* в течение 2-3 часов при температуре 37 C в атмосфере с 5% CO₂.

Выбор метода оплодотворения в основном зависел от показателей подвижности сперматозоидов, соотношения числа подвижных и неподвижных сперматозоидов, объема эякулята, наличия агглютинации. Каждый образец спермы подвергался центрифугированию, обработке в специальной среде.

В случае нормозооспермии (ВОЗ, 2010) [136] полученные ооциты инсеминировались, т.е. каждый ооцит переносился в каплю, содержащую подвижные сперматозоиды в концентрации примерно 100 000 на 1 мл. До переноса в инсеминационную каплю каждый ооцит изучался, при

необходимости производилось иссечение больших скоплений гранулезных клеток, сгустков крови и т.д.

При необходимости и определенных показаниях применялся метод ИКСИ, состоящий из нескольких этапов:

1. подготовка ооцита к инъекции, удаление кумулюса и лучистого венца; культивирование клеток в NEPES-забуферной среде в течение часа до микроманипуляции;
2. выбор сперматозоида и иммобилизация посредством раздавливания жгутика;
3. аспирация выбранного сперматозоида в инъекционную пипетку;
4. при помощи микроинструмента производился поворот ооцита с целью локализации полярного тельца;
5. инъекция сперматозоида с аспирированной ооплазмой в ооцит.

Оценка оплодотворения производилась на 17-20й час после инсеминации (16-18й час в случае ИКСИ). Цитоплазма клетки исследовалась на предмет наличия 2 пронуклеусов и 2 полярных телец, что свидетельствовало о нормальном оплодотворении.

2.4.10 Перенос эмбрионов в полость матки

Перенос эмбриона в полость матки осуществлялся на 5-е сутки после оплодотворения *in vitro* в стимулированных циклах. В асептических условиях под ультрозвуковым-контролем производился перенос селективного эмбриона в полость матки. Эмбрион находился в небольшом объеме культуральной среды в просвете гибкого одноразового стерильного катетера.

2.4.11 Поддержка посттрансферного периода и диагностика наступления беременности

На фоне отсутствующей либо блокированной эндогенной активности яичников методом выбора являлось назначение в посттрансферном периоде программы ЭКО/ИКСИ и ПЭ препаратов микронизированного прогестерона, с целью поддержания функции желтого тела, секреторной трансформации

эндометрия и подготовки его к имплантации, дальнейшей гормональной поддержки ранних сроков беременности [13].

Начало терапии осуществлялось после ТВП яичников спустя 24 часа, дозировка постепенно возрастала с 300 мг/сут до 600 мг/сут.

2.4.12 Диагностика наступления беременности

С целью определения наступления беременности после переноса эмбриона в полость матки через 14 дней оценивалась концентрация β -субъединицы ХГЧ в крови пациенток.

При положительном результате лечения бесплодия в программе ЭКО/ИКСИ УЗИ беременности производилось на 21й день после ПЭ в полость матки с целью визуализации плодного яйца в полости матки. Ультразвуковая диагностика сердцебиения плода проводилась в 5-6 недель беременности.

2.5 Статистический анализ полученных данных

Статистическая обработка данных выполнена на индивидуальном компьютере с помощью электронных таблиц «Microsoft Excel» и пакета прикладных программ «SPSS Statistics 21.0». Все полученные количественные данные обработаны методом вариационной статистики.

Для оценки характера распределения количественных данных перед проведением сравнительного анализа проводился тест Колмогорова-Смирнова или Шапиро-Уилка, определяемых в зависимости от размера выборки, а также при помощи построения графиков распределения анализируемых данных.

Для количественных параметров, подчиняющихся нормальному распределению, были определены: среднее значение (M) и ошибка среднего (m) с 95% доверительным интервалом ($M \pm m$). Для количественных параметров, неподчиняющихся нормальному распределению, были определены: медиана (Me), первый и третий квартили ($Q1$ и $Q3$

соответственно) и данные представляли в виде Me (Q1-Q3). Для качественных данных рассчитывали частоту встречаемости признака (%).

При нормальном типе распределения для сравнения групп применяли методы параметрической статистики: t-тест для анализа данных в 2-х независимых группах и однофакторный дисперсионный анализ ANOVA для анализа данных в трех и более независимых группах.

При распределении, отличающемся от нормального, использовались методы непараметрической статистики. В случае исследования нескольких независимых выборок использовали непараметрический тест Крускала-Уоллиса, при двух выборках – критерий Манна-Уитни для несвязанных совокупностей.

Для описания качественных данных использовали частоты и доли, с которыми данные признаки встречались в выборке. Для сравнения качественных показателей и установления значимых различий между ними в 2-х и более группах использовали тест χ^2 с поправкой на правдоподобие, для вычисления которого прибегали к построению таблиц сопряженности. При сравнении распределения анализируемого признака в группах вычисляли Отношение шансов (ОШ) с 95% доверительным интервалом (ДИ).

Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$ (95% уровень значимости).

С целью уменьшения ошибки выборки использовались строгие критерии отбора пациентов. Для минимизации системной ошибки при исследовании для всех пациентов использовались одни и те же методы диагностики на базе одной лаборатории. Оценка воздействующего фактора и исхода также была одинакова для всех пациентов.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Обследованы 100 женщин, обратившихся для проведения программы ЭКО/ИКСИ по поводу бесплодия, обусловленного трубно-перитонеальным фактором и/или мужским фактором (при отсутствии выраженной патозооспермии).

В связи с целью исследования о значении прогностической роли белка периостина в исходах программы ЭКО/ИКСИ для анализа полученных результатов и выделения возможных анамнестических и клиничко-лабораторных предикторов успеха лечения мы разделили пациенток на две группы: 1 группу составили - 28 женщин, у которых в результате лечения в программе ЭКО наступила клиническая беременность, 2 группу - 72 пациентки с отрицательным результатом лечения.

3.1 Клиническая характеристика женщин

Возрастные и антропометрические данные всех обследованных женщин представлены в таблицах 5 и 6.

Средний возраст пациенток был сопоставим в обеих группах и составил 30,5 лет (28,0 – 34,0 лет) в 1 группе и 31,2 лет (28,0 – 35,0 лет) во второй.

Таблица 5 – Возрастная характеристика

	Группа I беременность наступила (n=28)	Группа II беременность не наступила (n=72)
Минимум	21,0	23,0
Максимум	37,0	37,0
Среднее арифметическое	30,5	31,2
Тест Колмогорова- Смирнова (p)	0,129	0,122
P-уровень значимости	0,518	

ИМТ также не имел значимых межгрупповых различий и составил у пациенток 1 группы 21,3 (19,6-23,3) кг/м², у женщин 2 группы - 21,4 (19,8-23,0) кг/м².

Таблица 6 - Антропометрические характеристика

Показатель	Группа I (беременность наступила n=28)	Группа II (беременность не наступила n=72)	Р-уровень значимости
ИМТ (кг/м ²)	21,3 (19,6-23,3)	21,4 (19,8-23,0)	0,942

данные представлены как медиана, 25 - 75 процентиля, тест Манна-Уитни

Данные о длительности бесплодия представлены в таблице 7.

Таблица 7 - Продолжительность бесплодия

Показатель	Группа I беременность наступила (n=28)	Группа II беременность не наступила (n=72)	Р-уровень значимости
Продолжительность бесплодия	4,0 (2,8-5,0)	5,5 (4,0-7,0)	0,014

Продолжительность бесплодия у пациенток 2 группы составила - 5,5 (4,0-7,0) лет и значимо превышала аналогичный показатель у женщин 1 группы - 4,0 (2,8-5,0), p=0,014.

Данные о частоте и особенностях перенесенных гинекологических заболеваниях представлены в таблице 8.

Таблица 8 - Частота гинекологических заболеваний

Заболевание	Группа I (беременность наступила n=28)	Группа II (беременность не наступила n=72)	P-уровень значимости
Эктопия шейки матки	6 (21,4%)	15 (20,8%)	0,948
Полип эндометрия	5 (17,9%)	24(31,9%)	0,159
ИППП	3 (10,7%)	18 (23,0%)	0,555
Миома матки	3 (10,7%)	13 (18,1%)	0,369
Наружный генитальный эндометриоз	3 (10,7%)	10 (13,9%)	0,672
Внутренний эндометриоз	3 (10,7%)	4 (5,6%)	0,364
Хронический сальпингоофорит	1 (3,6%)	7 (9,7%)	0,309
Хронический эндометрит	1 (3,6%)	5 (6,9%)	0,524
Гиперплазия эндометрия	1 (3,6%)	3 (4,2%)	0,892

Данные представлены как абсолютные значения и %, χ^2 -тест

При сравнительной оценке частоты перенесенных гинекологических заболеваний мы не выявили статистически значимых межгрупповых различий. В структуре гинекологических заболеваний преобладали эктопии шейки матки - 21,4% у пациенток 1 группы и 20,8% у женщин второй группы, полипы эндометрия -17,9% и 31,9% и ИППП – 10,7% и 23% соответственно.

Частота и характер оперативных вмешательств на органах малого таза представлены в таблице 9.

Оперативное лечение органов малого таза было произведено у 23 пациенток (82,1%) 1 группы и у 68 пациенток (94,5%) 2 группы.

Таблица 9 -**Частота оперативных вмешательств на органах малого таза**

Показатели	Группа I (беременность наступила n=28)	Группа II (беременность не наступила n=72)	P-уровень значимости
Лапароскопия:	17 (60,7%)	39 (54,2%)	0,554
тубэктомия	9 (52,9%)	17 (43,5%)	0,383
коагуляция очагов НГЭ	1 (5,8%)	7 (17,9%)	0,309
миомэктомия	1 (5,8%)	3 (7,6%)	0,892
Гистероскопия диагностическая +РДВ	6 (21,4%)	29 (40,3%)	0,076
Гистероскопия+РДВ+ полипэктомия	5 (17,9%)	24 (33,3%)	0,126

Данные представлены как абсолютные значения и %, χ^2 -тест;

Наиболее частой гинекологической операцией явилась лапароскопия у 17 из 28 женщин (60,7%) 1 группы и у 39 из 72 пациенток (54,2%) 2 группы, выполненная в объеме тубэктомии по поводу трубной беременности в 32,1% и 23,6% случаев соответственно. Частота диагностической гистероскопии и РДВ для оценки состояния полости матки и эндометрия составила у женщин в 1 и 2 групп 21,4% и 40,3%, гистероскопии и полипэктомии – 17,9% и 33,3% соответственно. Несмотря на превалирование числа диагностических и хирургических гистероскопий у пациенток 2 группы мы не выявили статистически значимых межгрупповых различий.

Характеристика менструального цикла пациенток обследованных групп представлена в таблице 10.

Таблица 10 - Характеристика менструального цикла

Показатель	Группа I (беременность наступила n=28)	Группа II (беременность не наступила n=72)	P-уровень значимости
Возраст менархе (лет)*	13,0 (12,5-13,0)	13,0 (12,0-14,0)	0,398
Продолжительность менструального цикла (дней)*	28 (28-30)	28 (28-30)	0,610
Продолжительность менструального кровотечения (дней)*	5 (5-7)	5 (5-6)	0,534

данные представлены как медиана, 25 - 75 перцентили, тест Манна-Уитни

Средний возраст менархе не отличался от популяционного и составил 13,0 (12,5-13,0) лет у пациенток 1 группы и 13,0 (12,0-14,0) лет у женщин 2 группы. Все женщины на момент начала программы ЭКО имели регулярный менструальный цикл 28 (28-30) дней средней продолжительности менструального кровотечения 5 (5-7) дней.

Таким образом, пациентки обследованных групп не имели различий в возрасте менархе, длительности менструального цикла и менструального кровотечения.

На отсутствие беременностей в анамнезе указали 15 пациенток (53,6%), 1 группы и 39 женщин (54,2%) 2 группы. Частота вторичного бесплодия составила 46,4% (13 пациенток) в 1 группе и 45,8% (33 женщины) во 2 группе (рис. 7).

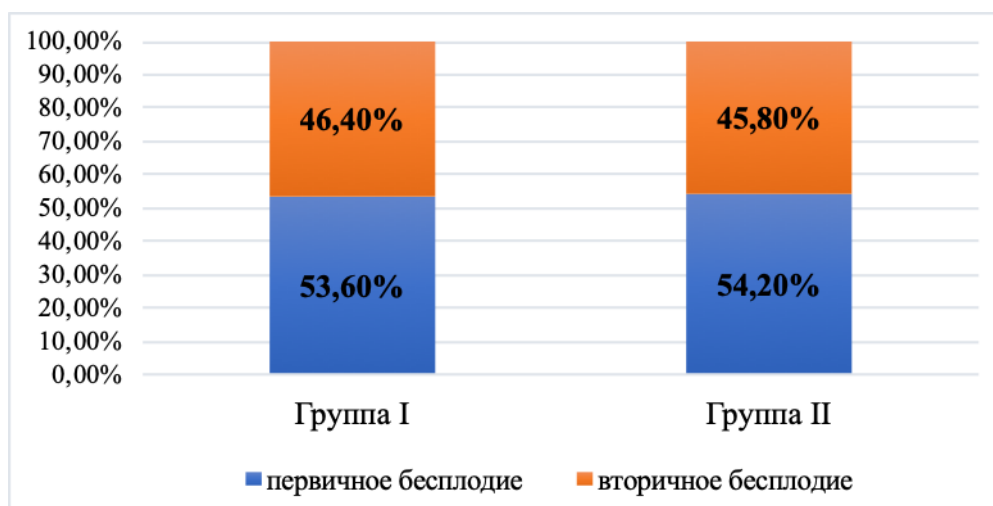


Рис. 7. Частота первичного и вторичного бесплодия

Данные об исходах беременностей у женщин с вторичным бесплодием представлены в таблице 11.

Таблица 11 - Исходы беременностей у женщин с вторичным бесплодием

Исходы беременности	Группа I беременность наступила (n=28)	Группа II беременность не наступила (n=72)	P-уровень значимости
Срочные роды	5 (17,8%)	10 (13,9%)	0,2
Трубная беременность	7 (25%)	10 (13,9%)	0,2
Неразвивающаяся беременность	4 (14,3%)	9 (12,5%)	0,8
Медицинский аборт	1 (3,6%)	7 (9,7%)	0,2
Самопроизвольный выкидыш	0 (0,0%)	3(4,2%)	0,6

Согласно представленным данным, срочными родами завершились только 17,8% беременностей у женщин 1 группы и 13,9% у женщин второй.

Во всех остальных случаях беременность завершилась в 1 триместре. В структуре ранних репродуктивных потерь преобладали: трубная и неразвивающаяся беременности (25% и 14,3% в 1 группе и 13,9% и 12,5 %

во второй). На медицинский аборт в анамнезе указали 3,6% и 9,7% пациенток соответственно.

Таким образом, подавляющее большинство беременностей у женщин обследованных групп (82,2% и 86,1%) завершились на раннем сроке гестации.

Частота факторов бесплодия у женщин обследованных групп представлена рисунке 8.

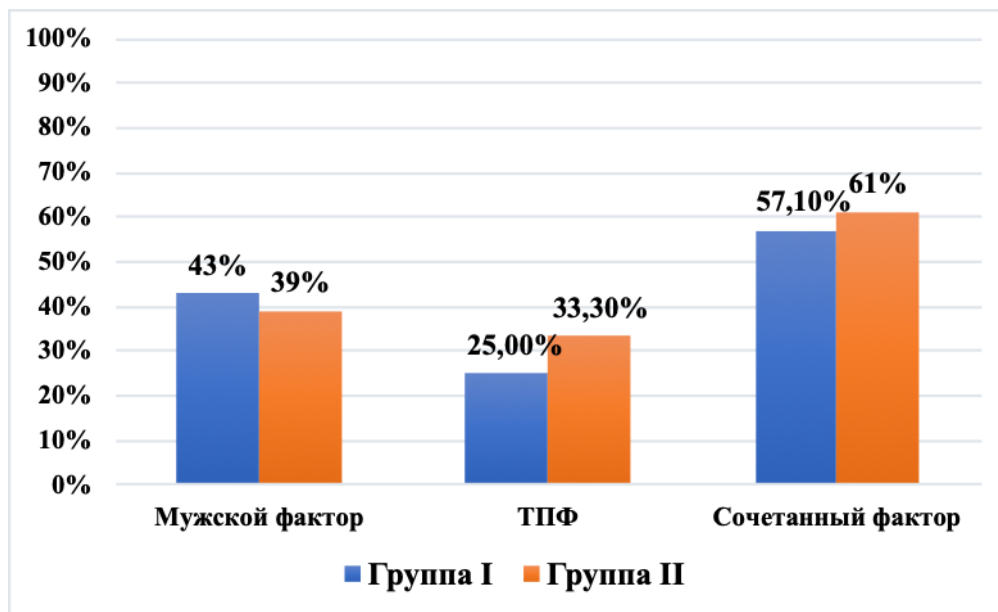


Рис.8. Частота факторов бесплодия

Женщины обследованных групп были сопоставимы по частоте факторов бесплодия. Так мужской фактор составил 42,9% в 1 группе и 38,9% во 2 второй группе, трубно-перитонеальный - 25% и 33,3%, сочетанный - 57,1%, и 61% соответственно.

Данные о частоте и количестве ранее проведенных циклов ЭКО отражены в таблице 12.

Таблица 12 - Частота и количество ране проведенных циклов ЭКО

Исходы беременности	Группа I беременность наступила (n=28)	Группа II беременность не наступила (n=72)	P-уровень значимости
Циклы ЭКО в анамнезе:	19 (67,9%)	33 (45,8%)	0,07
1 цикл ЭКО	6 (31,5%)	15 (45,4%)	0,8
2 цикла ЭКО	8 (24,1%)	14 (42,4%)	0,4
3 и более цикла ЭКО	5 (26,3%)	4 (12,1%)	1,0

Попытки ЭКО в анамнезе ране проведены у 19 пациенток (25,8%) 1 группы; в том числе 6 (31,5%) из них имели 1 попытку, 8 (24,1%) – 2 попытки ЭКО, 5 (21%) женщин – 3 и более попыток. У 5 из 19 женщин 1 группы циклы ЭКО завершились беременностями с исходом срочными в 3-х случаях и неразвивающимися беременностями в 2-х случаях.

33 пациентки (45,8%) 2 группы ранее имели попытки ЭКО. У 15 (45,4%) из них была 1 попытка, у 14 (42,4%) – 2 попытки и у 4 (12,1%) – 3 и более попыток ЭКО. Беременности наступили в 4 случаях, 2 из которых завершились родами, а 2 - неразвивающейся беременностью.

Таким образом, женщины обследуемых групп были сопоставимы по частоте и исходам ране проведенных циклов ЭКО, а также по количеству наступивших беременностей и их исходам.

Лабораторные показатели женщин

Принимая во внимание важную роль витамин К в поддержании активности факторов коагуляции II, VII, IX, X, а также естественных антикоагулянтов протеинов С и S мы изучили показатели гемостазиограммы у все обследованных женщин. Данные представлены в таблице 13.

Таблица 13 - Параметры гемостазиограммы

Показатель	Группа I (беременность наступила n=28)	Группа II (беременность не наступила n=72)	P-уровень значимости
Протромбиновый индекс	99,5±2,2	100,5±1,5	0,7
АЧТВ	31±0,8	30,3±0,4	0,5
Концентрация фибриногена	3,2 ±0,1	3,3±0,09	0,5
МНО	1,02±0,01	1±0,008	0,3

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

Согласно полученным данным все оцениваемые показатели не имели межгрупповых различий и находились в пределах референсных значений.

Характеристика гормонального статуса представлена в таблице 14.

Таблица 14 - Гормональный статус

Показатели	Группа I (беременность наступила n=28)	Группа II (беременность не наступила n=72)	P-уровень значимости
ФСГ, мЕд/мл**	6,3±2,2	6,8±2,2	0,322
ЛГ, мЕд/мл*	5,2 (2,8-12,5)	5,4 (4,2-6,9)	0,875
АМГ, нг/мл*	3,1 (1,7-5,4)	2,7 (1,5-6,2)	0,701
Эстрадиол, пмоль/л*	70,5 (35,0-113,0)	79,0 (45,0-149,0)	0,282
Пролактин, мЕд/л*	226,5 (25,0-360,5)	227,5 (22,0-357,5)	0,578
Тестостерон, нмоль/л*	1,0 (0,5-1,3)	0,8 (0,4-1,4)	0,305
ТТГ, мЕд/л*	2,0 (1,3-2,6)	1,7 (1,1-2,1)	0,082
Т _{4св} пмоль/л*	13,5 (9,8-14,6)	12,6 (1,4-14,4)	0,693
Прогестерон, нмоль/л	27,8 (16,1-42,4)	19,7 (13,0-43,2)	0,546

*Данные представлены как медианы с интерквартильным размахом, тест Манна Уитни

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

Согласно данным таблицы 12 базальные уровни гонадотропных и стероидных гормонов в сыворотке крови женщин обследованных групп не имели значимых межгрупповых различий и находились в пределах референсных значений.

Медиана АМГ в группах составила 3,1 и 2,7 нг/мл, $p=0,701$. Статистически значимые различия между группами отсутствовали.

Характеристика стимулированного цикла

Параметры стимулированного цикла и раннего эмбриогенеза представлены в таблице 15.

Таблица 15 - Параметры стимулированного цикла и раннего эмбриогенеза

Показатели	Группа I (беременность наступила n=28)	Группа II (беременность не наступила n=72)	P-уровень значимости
Суммарная доза гонадотропина, МЕ, (M±m)	1484±78,2	1584,3±61,7	0,4
Продолжительность стимуляции, дни, (M±m)	8,6±0,2	9,09±0,18	0,1
Число фолликулов в день триггера, (M±m)	10±0,6	9,3±0,4	0,2
Количество полученных ооцитов (M±m)	9,4±0,6	8,1±0,4	0,1
Количество зрелых ооцитов (M±m)	6,8±0,6	6,3±0,4	0,5
Количество незрелых ооцитов (M±m)	2,5±0,4	1,7±0,2	0,1
Количество зигот (M±m)	6,2±0,6	5,3±0,3	0,2

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

Пациентки обследованных групп были сопоставимы по суммарной дозе гонадотропинов, продолжительности стимуляции, числу

преовуляторных фолликулов в день введения триггера, количеству полученных ооцитов, числу зрелых и незрелых ооцитов и количеству зигот.

Клинические исходы циклов ЭКО

Клиническая беременность в исходе данного лечебного цикла ЭКО наступила у 28 (28%) из 100 обследованных женщин, у 72 пациенток (72%) результат лечения был отрицательным.

Срочными родами завершилась беременность у 22 (78,5%) из 28 пациенток. Неразвивающаяся беременность диагностирована у 6 (21,4%) из 28 женщин.

Таким образом, при анализе клинико-анамнестических и лабораторных данных мы не выявили значимых межгрупповых различий по возрасту женщин, их антропометрических данных, частоте и характере перенесенных гинекологических заболеваний и оперативных вмешательств, частоте первичного и вторичного бесплодия, количеству и исходам беременностей у женщин со вторичным бесплодием, факторам бесплодия, показателям гормонального статуса, коагуляционного потенциала крови, параметрам стимулированного цикла и раннего эмбриогенеза. Поэтому принимая во внимание статистически значимые межгрупповые различия в длительности бесплодия, мы изучили частоту наступления беременности в данном лечебном цикле ЭКО при различной длительности бесплодия. Полученные данные отражены на рисунке 9.

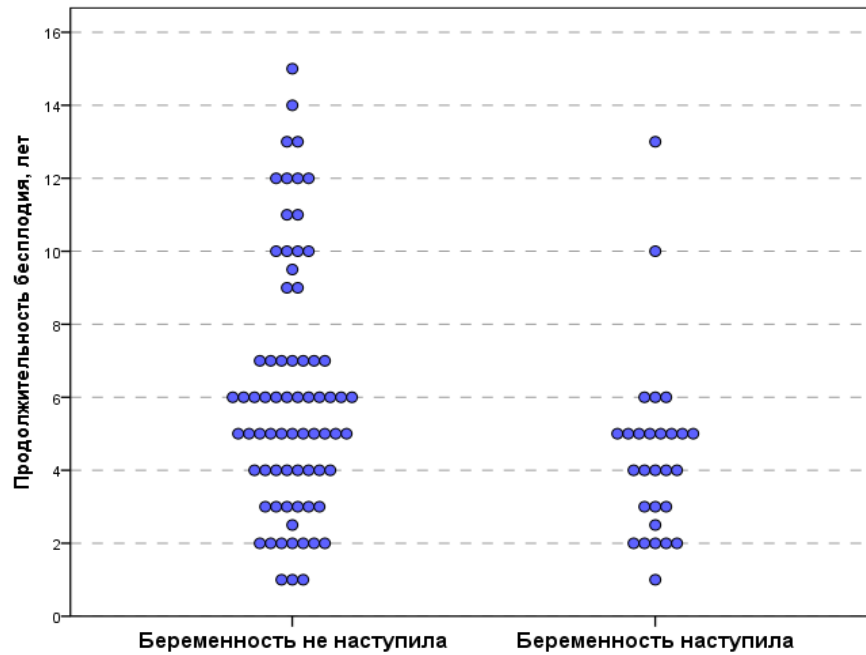


Рис. 9. Частота наступления беременности цикле ЭКО в зависимости от продолжительности бесплодия.

Согласно полученным данным женщины 1 группы с наступившей беременностью имели на 1,5 года меньшую длительность бесплодия по сравнению с пациентками 2 группы, у которых беременность не наступила.

Далее мы проанализировали зависимость исхода данной программы ЭКО от количества попыток ЭКО в анамнезе у пациенток с различной длительностью бесплодия (табл.16)

Таблица 16 - Исход данной программы ЭКО в зависимости от длительности бесплодия и циклов ЭКО в анамнезе

Продолжительность бесплодия	Попытки ЭКО в анамнезе	Группа I (беременность наступила n=28)	Группа II (беременность не наступила n=72)
<6 лет	нет	8 (20,5%)	31 (79,5%)
	да	18 (52,9%)	17 (48,6%)
>7 лет	нет	1 (11,1%)	8 (88,9%)
	да	1 (5,9%)	16 (94,1%)

Согласно данным таблицы 14 у пациенток с длительностью бесплодия менее 6 лет и с наличием циклов ЭКО в анамнезе беременность наступила в 18 случаях (52,9%), тогда как у того же контингента женщин, но с отсутствием циклов ЭКО в анамнезе беременность наступила всего лишь в 8 случаях (20,5%). В тоже время частота наступления беременности в данном цикле ЭКО у женщин с длительностью бесплодия более 7 лет и наличием попыток ЭКО в анамнезе сопоставимы (11,1% - 1 беременность и 5,9% - 1 беременность).

Для поиска возможных клинико-анамнестических и лабораторных предикторов успеха программы ЭКО мы изучили зависимость этих показателей от продолжительности бесплодия (табл. 17)

Таблица 17 - **Клинико - лабораторные показатели, параметры стимулированного цикла и продолжительность бесплодия**

Показатель	Продолжительность бесплодия <6 лет (n=74)	Продолжительность бесплодия >7 (n=26)	P-уровень значимости
Возраст (лет)	30 (28-33)	33 (31-36)	0,02
ИМТ	20,9 (19,1-22,6)	22,1 (21,0-24,9)	0,018
ФСГ (МЕ/л)	6,6 (5,6-8,0)	6,3 (4,6-7,4)	0,235
E2 (пмоль/л)	88 (46-154)	59 (43-111)	0,197
АМГ нг/мл	3,0 (1,7-6,2)	2,4 (1,5-6,1)	0,029
Курсовая доза гонадотропина МЕ	1388 (1125-1800)	1725 (1275-2025)	0,014
Количество фолликулов в день ТВП	10 (7-12)	7 (5-10)	0,023
Количество полученных ооцитов	9 (6-12)	7 (5-9)	0,087

Анализ полученных данных продемонстрировал значимые статистические различия по показателям возраста, ИМТ, уровню АМГ,

курсовой дозе гонадотропина и количеству пунктированных фолликулов при различной длительности бесплодия. Женщины с длительностью бесплодия более 7 лет имели более старший возраст - 33 (31-36) лет ($p=0,02$), более высокий ИМТ- 22,1, (21,0-24,9) $p=0,018$, большую курсовую дозу гонадотропина - 1725 (1275-2025)МЕ($p=0,014$), меньший уровень АМГ 2,4 (1,5-6,1) нг/мл ($p=0,029$) и меньшее количество фолликулов в день ТВП -7(5-10) ($p=0,023$).

Полученные данные позволяют обсуждать влияние длительности бесплодия на результативность программы ЭКО в обследованной когорте женщин.

Таким образом, при изучении и анализе клинико-anamнестических и лабораторных данных, а также параметров данного цикла ЭКО было показано отсутствие межгрупповых различий по возрасту женщин, их антропометрическим данным, частоте и характере перенесенных гинекологических заболеваний и оперативных вмешательств, частоте первичного и вторичного бесплодия, количеству и исходам беременностей у женщин с вторичным бесплодием, факторам бесплодия, показателям гормонального статуса, коагуляционного потенциала крови, параметрам стимулированного цикла и раннего эмбриогенеза. Полученные данные послужили основанием для более детального анализа на пути поиска возможных клинико-anamнестических предикторов успеха программы ЭКО, в связи с чем, мы изучили зависимость частоты наступления беременности от длительности бесплодия и наличия попыток ЭКО в анамнезе. Средняя длительность бесплодия у женщин с наступившей беременностью оказалась 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 ($p= 0,014$). Кроме того, беременность наступала в 2 раза чаще (52,9% против 20,5%) у женщин с продолжительностью бесплодия менее 6 лет и наличием попыток ЭКО в анамнезе.

Нами получены значимые статистические различия по показателям возраста, ИМТ, уровню АМГ, курсовой дозе гонадотропина и количеству пунктированных фолликулов при различной длительности бесплодия. Большая длительность бесплодия и более старший возраст женщин сопровождались снижением уровня АМГ, а также ухудшением параметров цикла ЭКО, что нашло свое отражение, в увеличении курсовой дозы гонадотропинов, продолжительности дней стимуляции и меньшего числа фолликулов в день ТВП.

В заключении необходимо отметить, что совокупность полученных клинико-anamnestических данных может послужить дополнительным прогностическим критерием исхода программы ВРТ у обследованных групп пациенток.

3.2 Ассоциация между полиморфизмом гена витамин К-эпоксидредуктазного комплекса (VKORC1), уровнем витамина К и исходами программы ВРТ.

Для выявления дополнительных неинвазивных маркеров качества ооцитов, эмбрионов и частоты наступления беременности на следующем этапе исследования была произведена оценка уровня витамина К в сыворотке крови у пациенток проходящих лечение бесплодия в программе ВРТ и их генотипирование.

Уровень витамина К в сыворотке крови у женщин 1 группы составил 4456 пг/мл (2455-5755), у пациенток 2 группы 4739 пг/мл (2800-5561) и не имел значимых статистических различий (табл.18).

Таблица 18 -Уровень витамина К в сыворотке крови

Исходы беременности	Группа I беременность наступила (n=28)	Группа II беременность не наступила (n=72)	P-уровень значимости
Уровень витамина К, пг\мл	4456 (2455-5755)	4739 (2800-5561)	0,34

Данные представлены как медиана, 25 - 75 процентиля, тест Манна-Уитни

При сравнительном анализе уровня витамина К в сыворотке крови пациенток, проходящих лечение бесплодия в программе ВРТ мы не выявили статистически значимых различий с качеством ооцитов и наступлением беременности в данном цикле ЭКО/ИКСИ. Но, следует отметить, 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 порога доля пациенток, у которых были получены эмбрионы класса С, составила 57% (4 из 7), тогда как среди женщин с высоким уровнем витамина К таких пациенток было всего 16% (13 из 81). Отношение шансов составило 0,14 (95% ДИ 0.03 - 0.65), $p = 0,024$ (рис 10).

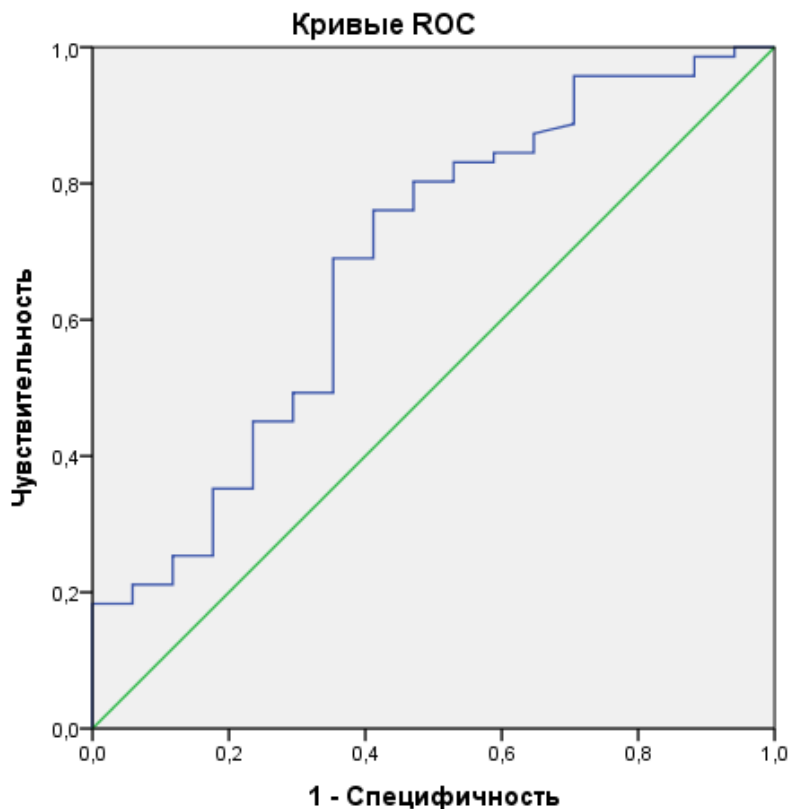


Рисунок 10. ROC-кривая зависимости эмбрионов класса С от уровня витамина К в сыворотке крови.

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 клинико-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.

Далее при проведении исследования мы не выявили статистически значимых различий между уровнем витамина К и полиморфизмом гена витамин К-эпоксидредуктазного комплекса VKORC1 (рис. 11).

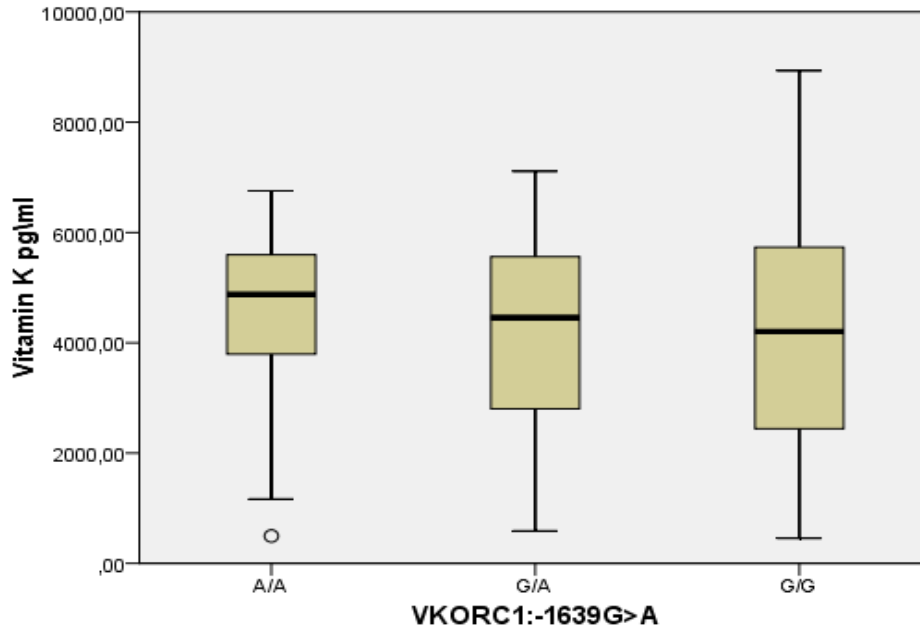


Рисунок 11. Уровень витамина К в крови и полиморфизм гена витамин К-эпоксидредуктазного комплекса VKORC1.

Одной из важных задач, имеющее особое практическое и научное значение, является возможность определения дополнительных прогностических факторов наступления беременности и исходов программы ВРТ, чему посвящен следующий этап работы.

Ассоциация полиморфизма исследуемых генов у пациенток двух групп представлена в таблице 19.

Таблица 19 -Ассоциация полиморфизма исследуемых генов с частотой наступления беременности

Полиморфизм	Генотип	Группа I беременность наступила (n=28)	Группа II беременность не наступила (n=72)	P-уровень значимости
CYP2C9 430C>T	C/C	20 (71,4%)	54 (75,0%)	0,84
	C/T	8 (28,5%)	18 (25,0%)	
	T/T	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
CYP2C9 A>C	A/A	21 (75%)	64 (88,9%)	0,40
	A/C	7 (25%)	8 (11,1%)	
	C/C	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
CYP4F2 C>T	C/C	15 (53,4%)	41 (56,9%)	0,92
	C/T	11 (39,2%)	25 (34,7%)	
	T/T	2 (7,1%)	6 (8,3%)	
VKORC1 -1639G>A	A/A	7 (25%)	17 (23,6%)	0,61
	G/A	15 (53,4%)	35 (48,6%)	
	G/G	6 (21,4%)	20 (27,8%)	

При проведении анализа ассоциации генотипа пациенток исследуемых групп статистически значимых межгрупповых различий выявлено не было.

Для оценки ассоциации генотипа пациенток с учетом исхода программы ВРТ и наличием незрелых ооцитов были проанализированы распределения аллелей и генотипов генов (табл. 20).

Таблица 20 -Ассоциация полиморфизма исследуемых генов с частотой наступления беременности и наличием незрелых ооцитов

Полиморфизм	Генотип	Пациентки с наличием незрелых ооцитов (n=66)		Пациентки без наличия незрелых ооцитов (n=34)		Р-уровень значимости
		Беременность				
		Не наступила (n=44)	Наступила (n=22)	Не наступила (n=28)	Наступила (n=6)	
CYP2C9 430C>T	C/C	35 (79,5%)	17 (77,3%)	19 (67,9%)	6 (100,0%)	0,84
	C/T	9 (20,5%)	5 (22,7%)	9(32,1%)	0 (0,0%)	
	T/T	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
CYP2C9 A>C	A/A	41 (93,2%)	19 (86,4%)	23 (82,1%)	4 (66,7%)	0,37
	A/C	3 (6,8%)	3 (13,6%)	5 (17,9%)	2 (33,3%)	
	C/C	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
CYP4F2 C>T	C/C	25 (56,8%)	12 (54,5%)	16 (57,1%)	4 (66,7%)	0,78
	C/T	14 (31,8%)	9 (40,9%)	11(39,3%)	2 (33,3%)	
	T/T	5 (11,4%)	1 (4,5%)	1 (3,6%)	0 (0,0%)	
VKORC1 -1639G>A	A/A	11 (25,0%)	5 (22,7%)	6 (21,4%)	1 (16,7%)	0,62
	G/A	22 (50,0%)	14 (63,6%)	13 (46,4%)	4 (66,7%)	
	G/G	11 (25,0%)	3 (13,6%)	9 (32,1%)	1 (16,7%)	

При проведении анализа ассоциации генотипа данных пациенток с учетом наличия незрелых ооцитов и частоты наступления беременности статистически значимых различий выявлено не было. Но при исследовании была выявлена ассоциация генотипа CYP2C9 430C>T с наличием незрелых ооцитов у пациенток в данном цикле ЭКО/ИКСИ (табл.21).

Таблица 21 - Ассоциация полиморфизма гена **CYP2C9 430C>T** с наличием незрелых ооцитов

Полиморфизм	Генотип	Пациентки с наличием незрелых ооцитов (n=66)	Пациентки без наличия незрелых ооцитов (n=34)	P-уровень значимости
CYP2C9 430C>T	C/C	46 (71,9%)	18 (28,1%)	0,055
	C/T	14 (60,9%)	9 (39,1%)	
	T/T	6 (46,2%)	7 (53,8%)	

При анализе вероятности получения незрелых ооцитов у пациенток, проходящих лечение в программе ВРТ, была выявлена связь с генотипом **CYP2C9 430C>T** (рис. 12). У носительниц «медленных» гаплоипов (*2 и *3) вероятность получения незрелых ооцитов составила 61% и 46% соответственно, тогда как у женщин 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.

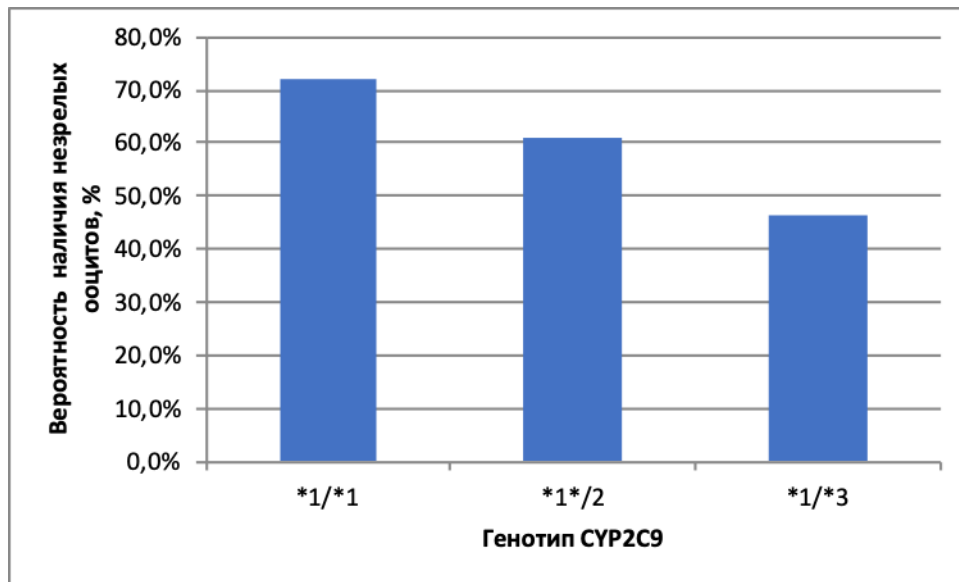


Рисунок 12. Вероятность наличия незрелых ооцитов от генотипа CYP2C9 430C>T

Учитывая, что CYP2C9 430C>T является одним из ферментов системы детоксикации организма от ксенобиотиков, был проведен анализ ассоциации между полиморфизмом ряда генов детоксикации в обследованных группах (табл. 22).

Таблица 22 - Ассоциация полиморфизма генов детоксикации

Полиморфизм	Генотип	Группа I беременность наступила (n=28)	Группа II беременность не наступила (n=72)	P-уровень значимости
GSTP1: 313 A>G (Ile105Val)	A/A	11 (39,3%)	35 (48,6%)	0,29
	A/G	13 (46,4%)	31 (43,1%)	
	G/G	4 (14,3%)	6 (8,3%)	
GPX1: Pro 198Leu	C/C	15 (53,6%)	30 (41,7%)	0,31
	C/T	10 (35,7%)	32 (44,4%)	
	T/T	3 (10,7%)	10 (13,9%)	
GSTP1: 341 C>T (Ala114Val)	C/C	21 (75,0%)	57 (79,2%)	0,44
	C/T	6 (21,4%)	15 (20,8%)	
	T/T	1 (3,6%)	0 (0,0%)	
EPHX1: 337 T>C (Tyr113His)	C/C	6 (21,4%)	6 (8,3%)	0,09
	T/C	13 (46,4%)	34 (47,2%)	
	T/T	9 (32,1%)	32 (44,4%)	
EPHX1: 416 A>G (His139Arg)	A/A	17 (60,7%)	46 (63,9%)	0,83
	A/G	1 (35,7%)	23 (31,9%)	
	G/G	10 (3,6%)	3 (4,2%)	

Продолжение таблицы 22

SOD2: C47T (ALA16Val)	C/C	6 (21,4%)	18 (25,0%)	0,39
	T/C	13 (46,4%)	38 (52,8%)	
	T/T	9 (32,1%)	16 (22,2%)	
CYP1A1: 1506 (4889) A>G (Ile46Val)	A/A	26 (92,9%)	66 (91,7%)	0,84
	A/G	2 (7,1%)	6 (8,3%)	
	G/G	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
NAT2: 341 T>C (Ile114Thr)	C/C	3 (10,7%)	14 (19,4%)	0,73
	T/C	17 (60,7%)	35 (48,6%)	
	T/T	8 (28,6%)	23 (31,9%)	
CYP1A1: 1382 (1295) C>A (Thr461Asn)	A/A	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0,96
	C/A	4 (14,3%)	10 (13,9%)	
	C/C	24 (85,7%)	62 (86,1%)	
NAT2: 590G>A (Gly286Glu)	A/A	3 (10,7%)	6 (8,5%)	0,35
	G/A	11 (39,3%)	22 (31,0%)	
	G/G	14 (50,0%)	43 (60,6%)	
CTY1A1: 1189 T>C	C/C	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0,38
	T/C	4 (14,3%)	16 (22,5%)	
	T/T	24 (85,7%)	55 (77,5%)	
NAT2: 857 G>A (Gly286Glu)	A/A	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0,54
	G/A	2 (7,1%)	3 (4,2%)	
	G/G	26 (92,9%)	69 (95,8%)	
SULT1A1: Arg213His	A/A	4 (14,3%)	11 (15,5%)	0,39
	G/A	17 (60,7%)	32 (45,1%)	
	G/G	7 (25,0%)	28 (39,4%)	
GSTM1: Ins>Del	+	14 (50,0%)	36 (50,0%)	1,0
	del	14 (50,0%)	36 (50,0%)	
GSTT1: Ins>Del	+	26 (92,9%)	58 (80,6%)	0,22
	del	2 (7,1%)	14 (19,4%)	

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) (рис. 13). Возможно различия не достигали уровня статистической значимости из-за ограниченной численности групп [20].

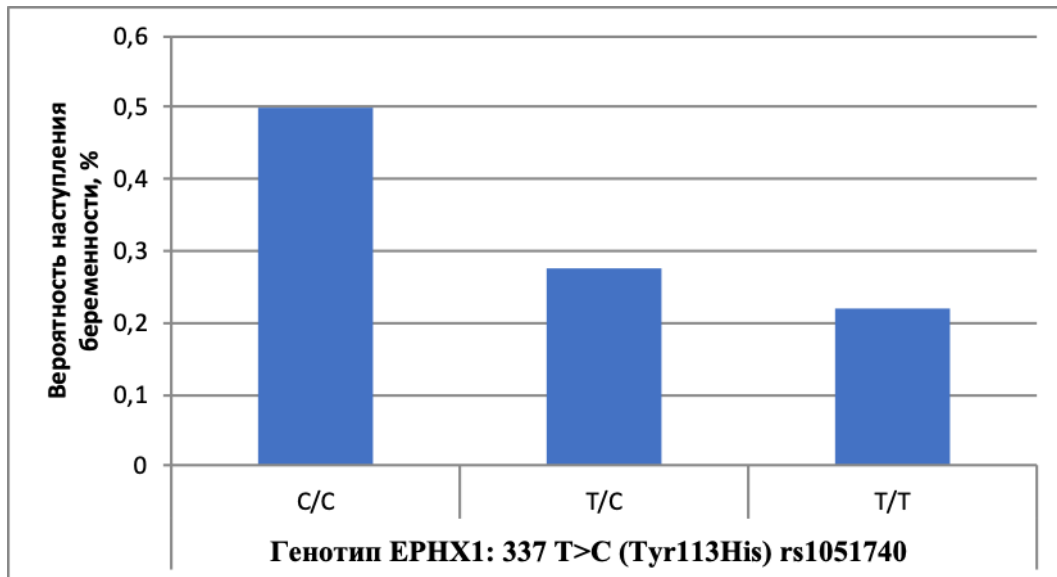


Рисунок 13. Вероятность наступления беременности от генотипа микросомальной эпоксидгидролазы EPHX1: 337 T>C (Tyr113His) rs1051740

Ассоциация полиморфизма генов детоксикации с наличием незрелых ооцитов продемонстрирована в таблице 23.

Таблица 23 - Ассоциация полиморфизма генов детоксикации с наличием незрелых ооцитов

Полиморфизм	Генотип	Пациентки с наличием незрелых ооцитов (n=66)	Пациентки без наличия незрелых ооцитов (n=34)	P-уровень значимости
GSTP1: 313 A>G (Ile105Val)	A/A	29 (43,9%)	17 (50,0%)	0,80
	A/G	31 (47,0%)	13 (38,2%)	
	G/G	6 (9,1%)	4 (11,8%)	
GPX1: Pro 198Leu	C/C	34 (51,5%)	11 (32,4%)	0,36
	C/T	22 (33,3%)	20 (58,8%)	
	T/T	10 (15,2%)	3 (8,8%)	
GSTP1: 341 C>T (Ala114Val)	C/C	51 (77,3%)	27 (79,4%)	0,70
	C/T	14 (21,2%)	7 (20,6%)	
	T/T	1 (1,5%)	0 (0,0%)	
EPHX1: 337 T>C (Tyr113His)	C/C	9 (13,6%)	3 (8,8%)	0,72
	T/C	30 (45,5%)	17 (50,0%)	
	T/T	27 (40,9%)	4 (41,2%)	
EPHX1: 416 A>G (His139Arg)	A/A	41 (62,1%)	22 (64,7%)	0,69
	A/G	24 (36,4%)	9 (26,5%)	
	G/G	1 (1,5%)	3 (8,8%)	

Продолжение таблицы 23

SOD2: C47T (ALA16VAL)	C/C	12 (18,2%)	12 (35,3%)	0,31
	T/C	38 (57,6%)	13 (38,2%)	
	T/T	16 (24,2%)	9 (26,5%)	
CYP1A1: 1506 (4889) A>G (Ile46Val)	A/A	61 (92,4%)	31 (91,2%)	0,83
	A/G	5 (7,6%)	3 (8,8%)	
	g/g	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
NAT2: 341 T>C (Ile114Thr)	C/C	8 (12,1%)	9 (26,5%)	0,40
	T/C	38 (57,6%)	14 (41,2%)	
	T/T	20 (30,3%)	11 (32,4%)	
CYP1A1: 1382 (1295) C>A (Thr461Asn)	a/a	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0,46
	C/A	8 (12,1%)	6 (17,6%)	
	C/C	58 (87,9%)	28 (82,4%)	
NAT2: 590G>A (Gly286Glu)	A/A	6 (9,2%)	3 (8,8%)	0,38
	G/A	24 (36,9%)	9 (26,5%)	
	G/G	35 (53,8%)	22 (64,7%)	
CTY1A1: 1189 T>C	c/c	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0,24
	T/C	11 (16,7%)	9 (27,3%)	
	T/T	55 (83,3%)	24 (72,7%)	
NAT2: 857 G>A (Gly286Glu)	a/a	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0,21
	G/A	2 (3,0%)	3 (8,8%)	
	G/G	64 (97,0%)	31 (91,2%)	
SULT1A1: Arg213His	A/A	10 (15,4%)	5 (14,7%)	0,72
	G/A	33 (50,8%)	16 (47,1%)	
	G/G	22 (33,8%)	13 (38,2%)	
GSTM1: Ins>Del	+	31 (47,0%)	19 (55,9%)	
	0	35 (53,0%)	15 (44,1%)	
GSTT1: Ins>Del	+	55 (83,3%)	29 (85,3%)	
	0	11 (16,7%)	5 (14,7%)	

При проведении анализа ассоциации генотипа системы детоксикации пациенток с наличием незрелых ооцитов у пациенток статистически значимых различий выявлено не было.

Таким образом, результаты этого этапа исследования продемонстрировали отсутствие межгрупповых статистически значимых различий с уровнем витамина К в сыворотке крови и полиморфизмом гена VKORC1. Также не было выявлено статистически значимых различий между

уровнем витамина К, полиморфизмом гена VKORC1 и генов системы детоксикации.

Выявлено пороговое значение уровня витамина К в сыворотке крови равное 1190 пг/мл - отношение шансов составило 0,14 (95% ДИ 0.03 - 0.65), $p = 0,024$. Полученные данные показывают, что у обследованной когорты женщин уровень витамина К в сыворотке крови ниже порогового значения 1190 пг/мл может свидетельствовать о наличии эмбрионов класса С (т.е. эмбрионы низкого или плохого качества) по классификации D. Gardner.

Обнаружена связь генов системы детоксикации с качеством ооцитов, у носительниц «медленных» гаплотипов гена CYP2C9 (*2 и *3) вероятность получения незрелых ооцитов составила 61% и 46% соответственно, тогда как для пациенток с нормальным генотипом (*1/*1) в 72% случаях получали незрелые ооциты. Также выявлена связь вероятности наступления беременности в программе ЭКО/ИКСИ и генотипом микросомальной эпоксидгидролазы ERHX1, хоть и статистические значения не достигли до значимых различий ($p=0,09$), возможно это связано с малой выборкой групп.

3.3 Взаимосвязь между уровнем периостина в фолликулярной жидкости, качеством ооцитов, эмбрионов и частотой наступления беременности

Принимая во внимание данные о возможной роли витамин К-зависимого белка периостина, отражающей качество ооцитов, эмбрионов и вероятность наступления беременности, следующий этап настоящего исследования мы начали с изучения показателей оогенеза и раннего эмбриогенеза обследованной когорте женщин (таблица 24).

Таблица 24 - Показатели оогенеза и эмбриогенеза

Исходы беременности	Группа I беременность наступила (n=28)	Группа II беременность не наступила (n=72)	P- уровень значимо- сти
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 бластоцист	3,2 ± 1,92	2,2 ± 2,48	0,07

* - критерий Стьюдента

Данные таблицы 24 демонстрируют отсутствие значимых статистических различий по всем оцениваемым показателям (общее количество аспирированных ооцитов, количество зрелых и незрелых ооцитов, количество и качество бластоцист) у женщин с наступившей и ненаступившей беременностью.

Примечательно, что доля незрелых ооцитов среди всего пула клеток, оказалась несколько выше в группе женщин с наступившей беременностью ($2,5 \pm 2,15$ против $1,8 \pm 1,96$). При этом отмечена тенденция к повышению частоты наступления беременности у женщин с получением хотя бы одного незрелого ооцита при трансвагинальной пункции.

Средний уровень периостина в фолликулярной жидкости у женщин 1 группы составил 2864,3 нг/мл (11-1630), у пациенток 2 группы 245 нг/мл (48-13496) и не имел значимых статистических различий (табл. 25).

Таблица 25 - Уровень периостина в фолликулярной жидкости

Исходы беременности	Группа I беременность наступила (n=28)	Группа II беременность не наступила (n=72)	P-уровень значимости
Уровень периостина, нг\мл	2864,3 (11-16308)	245 (48-13496)	0,669

Данные представлены как медиана, 25 - 75 процентиля, тест Манна-Уитни

Несмотря на отсутствие, статистически значимых межгрупповых различий средний уровень периостина в фолликулярной жидкости у женщин

2 группы, с ненаступившей беременностью, оказался в 2 раза ниже по сравнению с аналогичным показателем женщин 1 группы и значительно ниже (однако без значимых статистических различий) у женщин, с потерями беременностей, наступившими в данном лечебном цикле ЭКО/ИКСИ (табл. 26, рис.14) .

Таблица 26 - Уровень периостина в фолликулярной жидкости

Показатель	Беременность наступила (n=22)	Потеря беременности (n=6)	Беременность не наступила (n=72)
Уровень периостина, нг\мл	4043 (38-16363)	116,5 (2,25-8321)	245 (48-13496)
P-уровень значимости	0,331	0,394	0,523

Данные представлены как медиана, 25 - 75 процентиля, тест Манна-Уитни

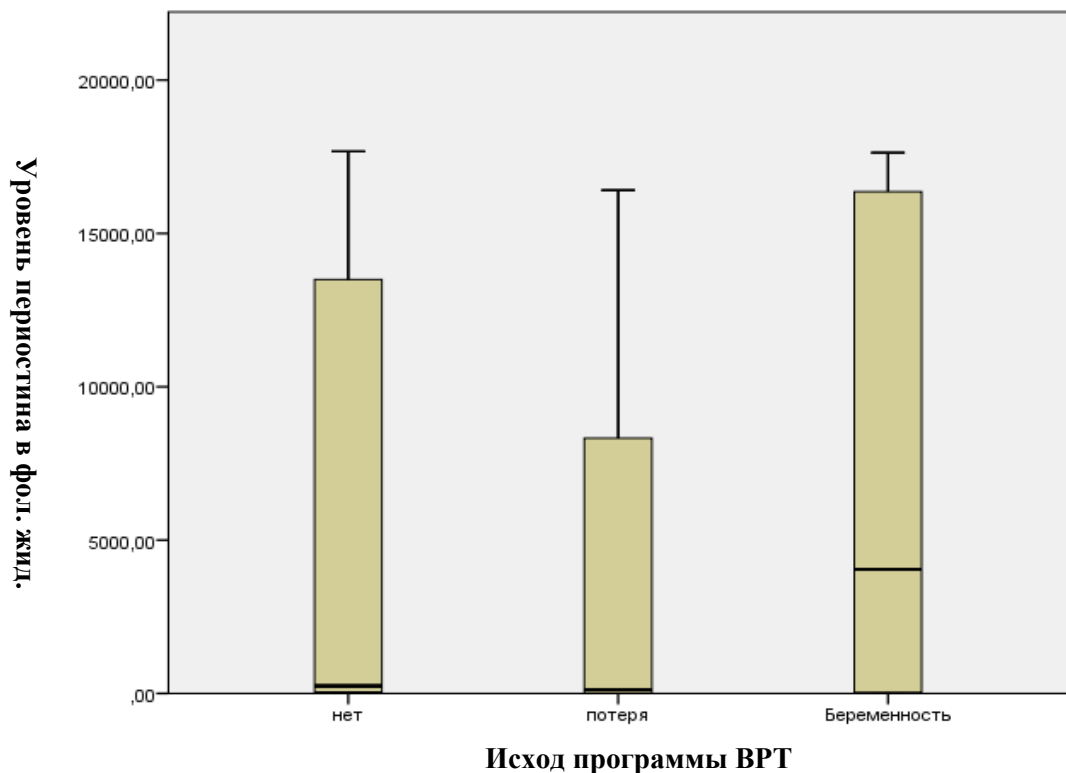


Рисунок 14. Уровень периостина в фолликулярной жидкости и исходы лечения бесплодия у женщин в программе ВРТ.

Далее мы анализировали уровень периостина в фолликулярной жидкости женщин обследованных групп с учетом наличия незрелых ооцитов (табл.27).

Таблица 27 - Уровень периостина в фолликулярной жидкости у женщин с наличием незрелых ооцитов

Показатель	Пациентки с наличием незрелых ооцитов (n=66)	Пациентки без наличия незрелых ооцитов (n=34)	Коэффициент корреляции	P-уровень значимости
Уровень периостина, нг\мл	212,45 (38,1-8543,69)	4227,5 (48 - 16343)	0,35	0,01

Данные представлены как медиана, 25 - 75 процентиля, тест Манна-Уитни

Согласно данным таблицы 27 уровень периостина был статистически значимо ниже у пациенток с наличием незрелых ооцитов - 212,45 (38,1-8543,69) нг/мл против 4227,5 (48 – 16343нг/мл). Выявлена статистически значимая обратная взаимосвязь между средним уровнем периостина в фолликулярной жидкости и долей незрелых ооцитов ($r_s=0,35;p=0.01$), то есть с увеличением уровня периостина в фолликулярной жидкости, число незрелых ооцитов уменьшалось и наоборот [19]. Полученные данные позволяют рассматривать белок периостин как возможный маркер качества ооцитов.

Далее мы проанализировали взаимосвязь уровня периостина в фолликулярной жидкости с исходом данного цикла ЭКО/ИКСИ у пациенток с наличием незрелых ооцитов (хотя бы одного) (табл. 28)

Таблица 28 - Уровень периостина в фолликулярной жидкости и исходы данного цикла ЭКО/ИКСИ у пациенток с наличием незрелых ооцитов (хотя бы одного)

Показатель	Женщины с наличием незрелых ооцитов (n=66)		Женщины без наличия незрелых ооцитов (n=34)		Р-уровень значимости
	Беременность				
	Не наступила (n=44)	Наступила (n=22)	Не наступила (n=28)	Наступила (n=6)	
Уровень периостина, нг\мл	88,7 (46,7-7451,2)	1740,4 (17,6-16202,5)	4356,7(48-16343)	4098 (0-16767,5)	0,42

Данные представлены как медиана, 25 - 75 процентиля, тест Манна-Уитни

У 66 из 100 пациенток обследованных групп в общем количестве полученных ооцитов преобладали незрелые ооциты, из них: у 22 женщин (33,3%) наступила беременность. В то же время у остальных 34 пациенток, имеющих только зрелые ооциты, частота наступления беременности оказалась ниже и составила 21,4% (6 пациенток). У пациенток с наступившей беременностью и наличием незрелых ооцитов средний уровень периостина составил 1740,4 (17,6-16202,5) нг/мл и оказался выше аналогичного показателя у женщин с ненаступившей беременностью при наличии незрелых ооцитов - 88,7 (46,7-7451,2) нг/мл. Однако, анализируемые показатели не достигли статистически значимых цифр. В тоже время уровень периостина у женщин с наличием только зрелых ооцитов был практически одинаков независимо от наступления беременности (рис. 15)

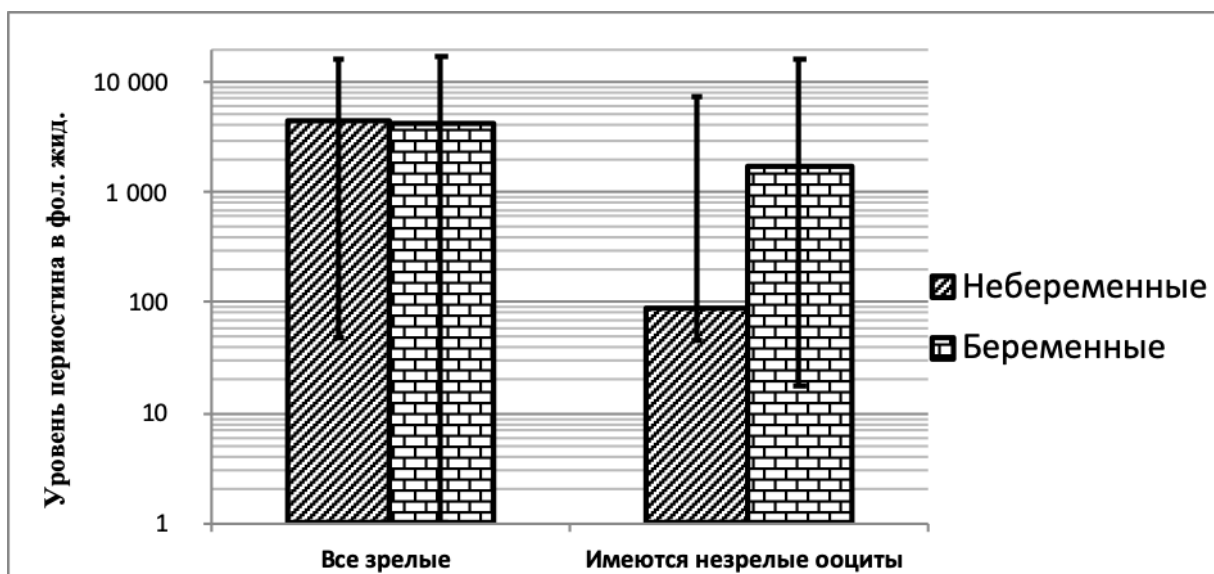


Рис 15. Уровень периостина в фолликулярной жидкости у женщин с наличием незрелых ооцитов, полученных в данной программе ЭКО/ИКСИ.

3.4 Оценка экспрессии мРНК периостина в соскобах эпителия из цервикального канала в «окно имплантации»

На следующем этапе исследования был проанализирован уровень экспрессии мРНК периостина в соскобах эпителия из цервикального канала в предполагаемое «окно имплантации» (табл.29).

Таблица 29 - Уровень экспрессии мРНК периостина в соскобах эпителия из цервикального канала

Исходы беременности	Группа I беременность наступила (n=28)	Группа II беременность не наступила (n=72)	P-уровень значимости
Уровень экспрессии мРНК периостина	0,0022 (0-0,0085)	0 (0-0,0034)	0,05

Данные представлены как медиана, 25 - 75 процентиля, тест Манна-Уитни

Следую из данных таблицы 29 уровень экспрессии мРНК периостина в соскобах эпителия из цервикального канала был выше у женщин 1 группы но не достиг достоверных значений ($p=0,05$).

Принимая во внимание выраженное снижение уровня периостина у женщин с неблагоприятными исходами беременности в данном цикле

ЭКО/ИКСИ мы изучили уровень экспрессии мРНКА периостина у данной категории женщин (данные таблицы 30).

Таблица 30 - Уровень экспрессии мРНК периостина в соскобах эпителия из цервикального канала и исходы беременности в данной программе ВРТ

Показатель	Беременность наступила (n=22)	Потеря беременности (n=6)	Беременность не наступила (n=72)
Уровень мРНК периостина	0,005 (0-0,011)	0(0-0)	0(0-0,0034)
Р-уровень значимости	0,004	0,08	0,09

Данные представлены как медиана, 25 - 75 процентиля, тест Манна-Уитни

Полученные данные показывают статистически значимое увеличение уровня экспрессии мРНК периостина у женщин с наступившей беременностью и ее дальнейшим благополучным течением по сравнению с аналогичным показателем при отсутствии беременности - 0,005 (0-0,011) у.е. против 0(0-0,0034) у.е. (P=0,004). В то же время уровень экспрессии мРНК периостина у женщин с потерей беременности так же как и уровень периостина в фолликулярной жидкости оказался значительно ниже у женщин с ранней потерей беременности полученной в исходе данного цикла ЭКО/ИКСИ, хотя и не достиг достоверных значений (рис.16).

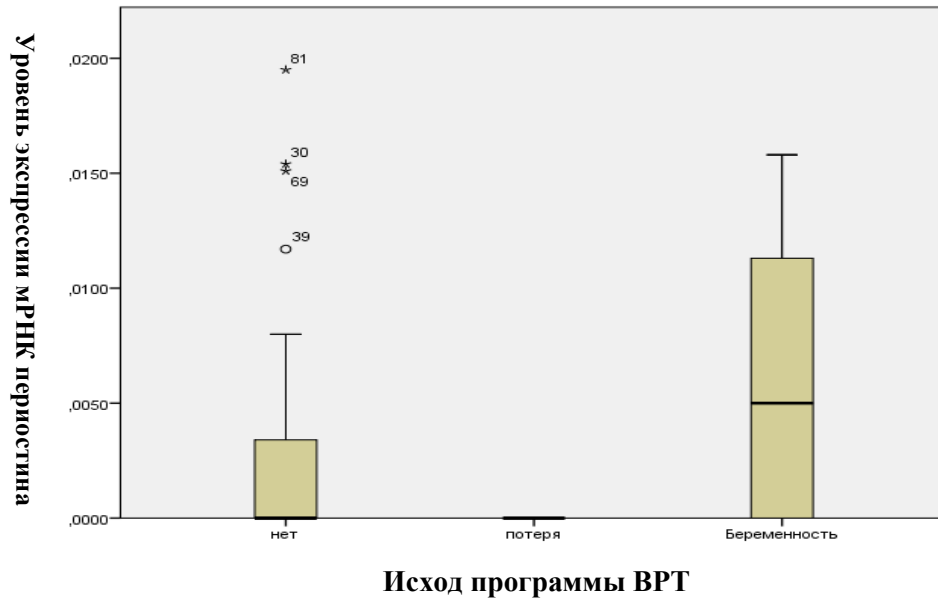


Рис. 16. Уровень экспрессии мРНК периостина в соскобах эпителия из цервикального канала женщин в предпологаемое «окно имплантации» и исходы программы ВРТ.

При сравнении уровня периостина в фолликулярной жидкости и уровня мРНК периостина из соскоба эпителиальных клеток цервикального канала статистически значимых различий выявлено не было (рис. 17).

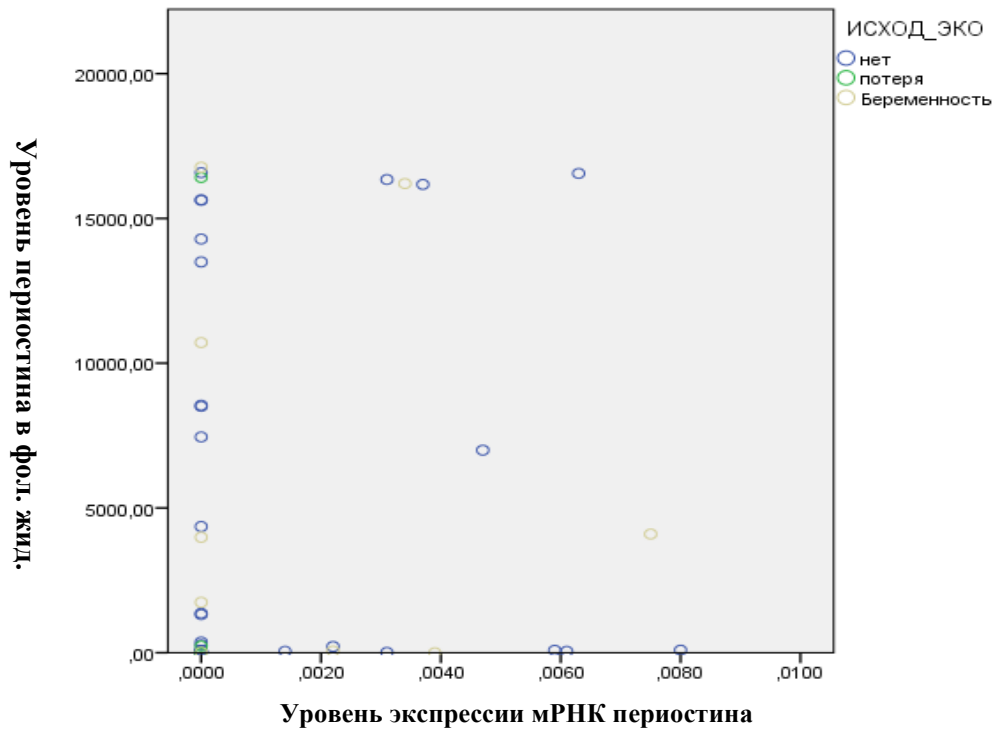


Рис. 17. Уровень периостина в фолликулярной жидкости и уровень мРНК периостина эпителиальных клеток цервикального канала ($P > 0,05$).

Принимая во внимание, полученные в настоящем исследовании данные о взаимосвязи между уровнем периостина в фолликулярной жидкости у женщин с незрелыми ооцитами и частотой наступления беременности мы проанализировали зависимость уровня экспрессии мРНК периостина эпителиальных клеток цервикального канала от исхода программы ВРТ у пациенток с наличием незрелых ооцитов.

В таблице 31 представлены данные об уровне экспрессии мРНК периостина у пациенток с наличием незрелых ооцитов.

Таблица 31 -Уровень экспрессии мРНК периостина в соскобах эпителия из цервикального канала у пациенток с наличием незрелых ооцитов

Показатель	Пациентки с наличием незрелых ооцитов (n=66)	Пациентки без наличия незрелых ооцитов (n=34)	P-уровень значимости
Уровень мРНК периостина	0(0-0,0037)	0 (0-0,0063)	0,31

Данные представлены как медиана, 25 - 75 процентиля, тест Манна-Уитни

Согласно данным таблицы 31 статистически значимых различий уровня мРНК периостина у женщин с наличием без наличия незрелых ооцитов не было выявлено.

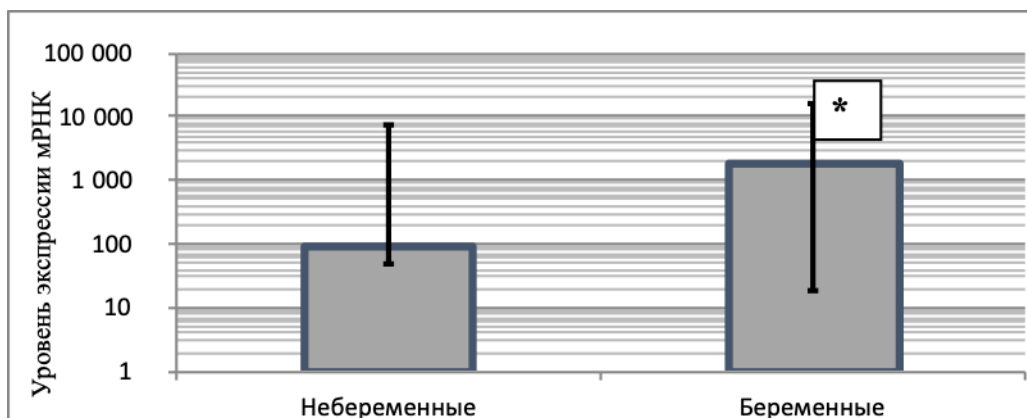
Уровень экспрессии мРНК периостина в соскобах эпителия из цервикального канала женщин с учетом исхода проведенной программы ВРТ и наличием незрелых ооцитов представлены в таблице 32.

Таблица 32 - Уровень экспрессии мРНК периостина с учетом исхода проведенной программы ВРТ и наличием незрелых ооцитов

Показатель	Пациентки с наличием незрелых ооцитов (n=66)		Пациентки без наличия незрелых ооцитов (n=34)		Р-уровень значимости
	Беременность				
	Не наступила (n=44)	Наступила (n=22)	Не наступила (n=28)	Наступила (n=6)	
Уровень мРНК периостина	0(0-0,0014)	0,0022 (0-0,011)	0(0-0,006)	0,001(0-0,007)	0,019

Данные представлены как медиана, 25 - 75 процентиля, тест Манна-Уитни

Согласно данным таблицы 32 уровень мРНК периостина был значимо выше у женщин с наступившей беременностью и наличием незрелых ооцитов (0,0022 (0-0,011) у.е. против 0(0-0,0014) ; $p=0,019$) (рис. 18).



Примечание.* - $p<0,05$ между пациентками с наступившей и не наступившей беременностью

Рис. 18. Уровень экспрессии мРНК периостина эпителиальных клеток цервикального канала у пациенток с наличием незрелых ооцитов в стимулированном цикле.

На основании полученных данных, был проведен ROC-анализ, согласно которому уровень экспрессии мРНК гена периостина может быть использован в качестве предиктора эффективности программы ВРТ у женщин с преобладанием незрелых ооцитов среди общего количества полученных ооцитов в стимулированном цикле. Критический уровень экспрессии мРНК гена периостина составил 0,01 у.е. Из общего числа женщин с уровнем мРНК гена периостина ниже порога 0,01 у.е. доля пациенток с наступившей беременностью, имеющих незрелые ооциты составила 28,1% (16 из 57 пациенток), тогда как из числа пациенток с высоким уровнем мРНК гена периостина этот показатель составил 66,7% (6 из 9 женщин). Площадь под кривой составила 0,65, отношение шансов составило 5,12 (95% ДИ: 1,23-23,34, $p=0,05$) (рис. 19).

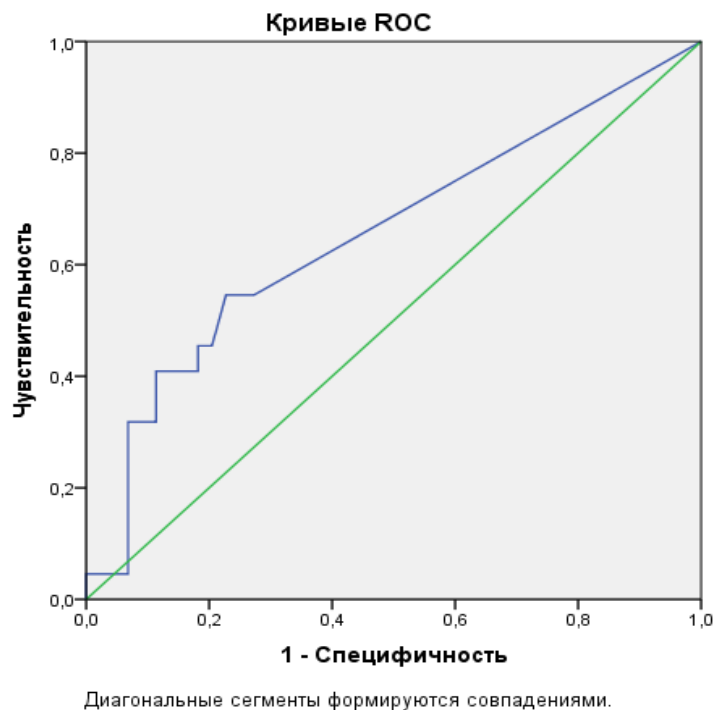


Рис. 19. ROC-кривая зависимости наступления беременности в цикле ЭКО у пациенток с наличием незрелых ооцитов от уровня экспрессии мРНК.

Таким образом, результаты этого этапа настоящего исследования продемонстрировали отсутствие значимых статистических различий по всем показателям оогенеза и эмбриогенеза (общему количеству аспирированных

ооцитов, количеству зрелых и незрелых ооцитов, количеству и качеству бластоцист) в группах женщин с наступившей и ненаступившей беременностью.

Уровень периостина в фолликулярной жидкости и уровень экспрессии мРНК гена периостина в соскобах эпителия из цервикального канала не были статистически различимы, но имели тенденцию к повышению у женщин 1 группы (с наступившей беременностью), хотя и не достигли статистически значимых показателей.

Показано статистически значимое повышение уровня экспрессии мРНК гена периостина в соскобах эпителия из цервикального канала у пациенток с наступившей беременностью в данном цикле ЭКО/ИКСИ и ее благополучным течением по сравнению с аналогичным показателем при потере беременности ($p=0,004$).

Принимая во внимание, что доля незрелых ооцитов среди всего пула клеток, полученных при трансвагинальной пункции, была несколько выше в группе пациенток с наступившей беременностью, мы изучили взаимосвязь между уровнем периостина в фолликулярной жидкости, уровнем экспрессии мРНК периостина в соскобах эпителия из цервикального канала и наличием незрелых ооцитов. Полученные данные показали, что уровень белка периостина в фолликулярной жидкости и уровень экспрессии мРНК гена периостина в соскобах эпителия из цервикального канала был выше при наличии только зрелых ооцитов, хотя не имел статистической значимости.

Повышение уровня периостина в фолликулярной жидкости сопровождалось тенденцией к увеличению частоты наступления беременности у женщин с наличием незрелых ооцитов (33,3%) по сравнению с данным показателем у женщин со зрелыми ооцитами (21,4%). В то же время уровень экспрессии мРНК периостина в соскобах эпителия из цервикального канала оказался статистически значимо выше у женщин с незрелыми ооцитами и наступившей беременностью ($p=0,019$).

Выявлено пороговое значение уровня экспрессии мРНК 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, $p=0,05$). Полученные данные демонстрируют, что у обследованной когорты женщин с наличием незрелых ооцитов уровень экспрессии мРНК периостина в соскобах эпителия из цервикального канала выше порогового значения 0,01 у.е. отражает положительный исход программы ВРТ и может рассматриваться в качестве 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».

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В рамках данной диссертационной работы было проведено комплексное изучение белка периостина как предиктора эффективности программы ЭКО. Исследование количественных параметров его концентраций в сыворотке крови, в фолликулярной жидкости, уровней экспрессии в цервикальном секрете позволило подтвердить его важную прогностическую значимость у пациенток с трубно-перитонеальным и/или мужскими факторами бесплодия, получающих лечение в рамках программы ЭКО.

При изучении и анализе клинико-анамнестических и лабораторных данных пациенток, разделенных на 2 группы по результату лечения в рамках программы ЭКО (наступление беременности или отсутствие наступления беременности), а также параметров данного цикла ЭКО было показано отсутствие межгрупповых различий по возрасту женщин, их антропометрическим данным, частоте и характере перенесенных гинекологических заболеваний и оперативных вмешательств, частоте первичного и вторичного бесплодия, количеству и исходам беременностей у женщин с вторичным бесплодием, факторам бесплодия, показателям гормонального статуса, коагуляционного потенциала крови, параметрам стимулированного цикла и раннего эмбриогенеза. Была определена статистически значимая разница в продолжительности бесплодия. Так у пациенток с отрицательным результатом лечения длительность бесплодия на 1,5 года превысила данный параметр у женщин с положительным исходом программы ЭКО (5,5 лет и 4 года, $p=0,014$). Известно, что длительность бесплодия наряду с другими общепризнанными предикторами (возраст биологических родителей, показатели овариального резерва) является одним из основных факторов прогнозирования исходов ВРТ [140]. При анализе клинико-лабораторных показателей и параметров стимулированного цикла в зависимости от продолжительности бесплодия было определено, что

женщины с длительностью бесплодия более 7 лет и старше имеют более высокий индекс массы тела.

Использование предикторов исхода лечения бесплодия методом ЭКО является важным как на этапе консультирования пациентов, и при планировании цикла стимуляции суперовуляции [122]. Важно разделять пациентов в зависимости от прогноза лечения на основании данных гормональных исследований (уровня АМГ), индекса массы тела (ИМТ) и осуществлять индивидуальный подход к лечению. В нашей работе в группе пациентов с большей продолжительностью бесплодия определены более высокий ИМТ, более низкие показатели АМГ по сравнению с пациентами с длительностью бесплодия менее 6 лет. При проведении дальнейшей стимуляции в данной группе женщин наблюдалось увеличение курсовой дозы гонадотропинов и меньшее число пунктируемых фолликулов, что в будущем может говорить и возможности предикции финансовых затрат на лечение. Статистически значимая разница в числе полученных ооцитов в двух группах пациентов не было установлена ($p=0,087$), но выявлена тенденция к получению большего количества ооцитов у женщин с длительностью бесплодия меньше 6 лет. В свою очередь число ооцитов – признанный предиктор наступления беременности в циклах ЭКО [111].

Преыдушие попытки ЭКО в анамнезе входят в предиктивные модели исходов ВРТ. В нашей работе у пациенток с длительностью бесплодия менее 6 лет и с наличием циклов ЭКО в анамнезе беременность наступила в 52,9%, тогда как у пациенток с такой же продолжительностью бесплодия, но с отсутствием циклов ЭКО в анамнезе беременность наступила всего лишь в 20,5%. Наши данные не согласуются с известной предиктивной моделью [117], в которой установлено что неудачные попытки ЭКО в анамнезе наряду с длительностью бесплодия и с возрастом негативно сказываются на частоте живорождения [83]. По данным диссертационной работы частота наступления беременности в данном цикле ЭКО у женщин с длительностью бесплодия более 7 лет и наличием/отсутствием попыток ЭКО

в анамнезе сопоставимы (11,1% - 1 беременность и 5,9% -1 беременность). Возможно, требуется подтверждение данной тенденции на большей выборке пациентов.

В ходе анализа результатов настоящего исследования было выявлено отсутствие статистически значимых различий по всем показателям оогенеза и эмбриогенеза (общему количеству аспирированных ооцитов, количеству зрелых и незрелых ооцитов, количеству и качеству бластоцист) в группах женщин с наступившей и ненаступившей беременностью.

В рамках данной диссертационной работы особое внимание уделено изучению вероятности наступления беременности у женщин с бесплодием с учетом неинвазивного маркера качества ооцитов/эмбрионов и частоты наступления беременности в программе ВРТ – белка периостина.

Авторы Morelli et al. (2014) [93] в своем исследовании получили результаты, которые демонстрируют наиболее высокий уровень периостина в секреторную фазу менструального цикла. Учитывая полученные авторами данные на фоне секреторных изменений во вторую фазу менструального цикла в рамках диссертационной работы был проанализирован уровень экспрессии мРНК гена периостина в соскобах эпителия из цервикального канала в предполагаемое «окно имплантации».

Роль периостина в репродукции продолжает изучаться, так как определено его участие в процессах децидуализации эндометрия, в миграции клеток трофобласта [43;44], то есть в важнейших этапах эмбриогенеза [45;46;48;49]. Стоит отметить, что возможным подходом к использованию периостина в качестве прогностического маркера развития беременности является оценка его уровней в фолликулярной жидкости в программах ЭКО. В одном из пилотных исследований [45] было показано, что уровень периостина в фолликулярной жидкости напрямую связан с морфологическим качеством бластоцисты и результатом переноса эмбрионов. Уровень периостина был значимо выше для бластоцист класса А,

в особенности у тех, которые дали начало беременности, как в фолликулярной жидкости их ооцитов, так и в промывных средах [45].

Также учитывая, что периостин присутствует в амниотических оболочках, имеет высокую экспрессию в пуповине новорожденных, можно предполагать значительную роль данного белка в процессах эмбрионального развития [144;46;109], а низкие уровни периостина определены в децидуальной ткани, трофобласте и сыворотке крови у женщин с невынашиванием беременности по сравнению с женщинами с прерыванием беременности по собственному желанию [93], что в свою очередь заставляет предполагать возможность периостина быть сывороточным маркером рецептивности эндометрия и качества эмбриона. Данные литературы послужили поводом для изучения роли витамин К-зависимого белка периостина в предикции эффективности программы ЭКО/ИКСИ и его влияния на качество ооцитов и эмбрионов.

По результатам настоящего исследования в группах женщин с наступившей клинической беременностью и с отсутствием беременности статистически значимой разницы между средним уровнем периостина в фолликулярной жидкости и уровнем экспрессии мРНК гена периостина эпителиальных клеток цервикального канала не установлено (2864,3 нг/мл и 245нг/мл ($p=0,669$); 0,0022-0,0 у.е. ($p=0,05$) соответственно), но стоит отметить, что уровень периостина ниже в группе женщин, у которых беременность не наступила. Возможно, результаты данного исследования не достигли статистически значимых показателей, что может быть связано с малой выборкой.

Также стоит отметить выявленную тенденцию к низким показателям периостина в фолликулярной жидкости и экспрессии мРНК гена периостина эпителиальных клеток цервикального канала у женщин с потерями беременности ($p=0,394$). Показано статистически значимое повышение уровня экспрессии мРНК гена периостина в соскобах эпителия из цервикального канала у женщин с наступившей беременностью в данном

цикле ЭКО/ИКСИ и ее благополучным течением по сравнению с аналогичным показателем при потере беременности ($p=0,004$). Известно, что молекулы адгезии играют важную роль в процессах эмбрио/органогенеза, а также в правильном формировании/инвазии клеток трофобласта. Опубликована работа о роли периостина в более поздних последствиях нарушения формирования плодово-плацентарного диалога и в патогенезе преэклампсии [104].

Примечательно, 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. В работе Владимировой И.В. [14] было показано, что именно сам факт наличия незрелых ооцитов обладает большей прогностической значимостью, чем доля незрелых клеток, поэтому в дальнейшем при анализе использовали именно этот показатель. Мы изучили взаимосвязь между уровнем периостина в фолликулярной жидкости, уровнем экспрессии мРНК периостина в соскобах эпителия из цервикального канала и наличием незрелых ооцитов. Полученные данные показали, что уровень белка периостина в фолликулярной жидкости и уровень экспрессии мРНК гена периостина в соскобах эпителия из цервикального канала был выше при наличии только зрелых ооцитов, хотя не имел статистической значимости.

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 женщин с наличием незрелых ооцитов (33,3%) по сравнению с данным показателем у

женщин со зрелыми ооцитами (17,6%). В то же время уровень экспрессии мРНК периостина в соскобах эпителия из цервикального канала оказался статистически значимо выше у женщин с незрелыми ооцитами и наступившей беременностью ($p=0,019$).

Выявлено пороговое значение уровня экспрессии мРНК 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, $p=0,05$). Полученные данные демонстрируют, что у обследованной когорты женщин с наличием незрелых ооцитов уровень экспрессии мРНК периостина в соскобах эпителия из цервикального канала выше порогового значения 0,01 у.е. отражает положительный исход программы ЭКО/ИКСИ и может рассматриваться в качестве предиктора наступления беременности.

Учитывая, что белок периостин витамин К-зависимый [42], в данной работе мы также изучали уровень витамина К в сыворотке крови у женщин проходящих лечение бесплодия в программе ЭКО/ИКСИ. Уровень витамина К в сыворотке крови был сопоставим в обследованных группах (4456 пг/мл и 4739 нг/мл в 1 и 2 группах соответственно) и статистически значимо не различался.

Нами была поставлена задача выявить ассоциацию между уровнем витамина К в сыворотке крови, уровнем периостина в фолликулярной жидкости и уровнем экспрессии мРНК гена периостина. В результате исследования не были выявлены корреляции между уровнем витамина К в сыворотке крови с уровнем периостина в фолликулярной жидкости и с уровнем экспрессии мРНК гена периостина.

В ходе исследования было выявлено пороговое значение уровня витамина К в сыворотке крови равное 1190 пг/мл - отношение шансов составило 0,14 (95% ДИ 0.03 - 0.65; $p = 0,024$). Среди женщин с уровнем витамина К в крови ниже порога доля пациенток, у которых были получены эмбрионы класса С (т.е. эмбрионы низкого или плохого качества) по классификации D. Gardner, составила 57%, а среди женщин с высоким

уровнем витамина К таких пациенток было всего 16%. Но также стоит отметить, что определение уровня витамина К в клинической практике пока не используется, и точных данных о референсных значениях данного витамина в сыворотке крови в литературе нет. В настоящее время определение уровня витамина К используется только в научных целях.

Данные результаты могут свидетельствовать о зависимости качества эмбрионов от уровня витамина К, соответственно данная взаимосвязь не может быть не ассоциирована с наступлением беременности, так как одним из важных аспектов наступления беременности в программе ЭКО является хорошее качество эмбриона.

Поскольку витамин К служит лигандом для рецептора стероидов и ксенобиотиков, возможно его биологические эффекты при проведении программ ВРТ опосредуются через изменение системы детоксикации. Этим может объясняться его влияние именно на качество ооцитов и эмбрионов[28]. Полиморфизм других генов системы детоксикации ксенобиотиков в нашем исследовании продемонстрировал сходные эффекты.

В нашем исследовании была выявлена связь генотипа CYP2C9 430C>T с наличием незрелых ооцитов. У носительниц «медленных» гаплоипов (*2 и *3) вероятность получения незрелых ооцитов составила 61% и 46% соответственно, тогда как у женщин 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.

Таким образом остается открытым вопрос о влиянии генотипа CYP2C9 на процесс созревания ооцитов. Ген CYP2C9 кодирует аминокислотную последовательность фермента цитохрома P450 (семейство 2, подсемейство C,

полипептид 9). CYP2C9 является одним из ферментов системы детоксикации организма от ксенобиотиков. Если у носителей «дикого типа» - CYP2C9*1, скорость метаболизма ксенобиотиков является стандартной, то при наличии вариантов CYP2C9*2 и CYP2C9*3 активность фермента может быть снижена до 90%, что приводит к снижению скорости метаболизма ксенобиотиков (т.н. являются "медленные метаболизаторы"), что, в свою очередь, может приводить к накоплению различных ксенобиотиков [64]. Данный механизм лежит в основе изменения эффективности ряда препаратов и приводит к необходимости снижать дозировку соответствующих лекарственных средств. Возможно, что полиморфизм гена CYP2C9 модифицирует эффективность фармакологической поддержки созревания ооцитов.

По данным литературы роль полиморфизма генов системы детоксикации показана при развитии гестационных осложнений [11]. Также имеются данные о значимости этой системы для проведения программ ВРТ. Малышкина А.И. и др. в своей работе посвященной полиморфизму генов детоксикации в супружеских парах, участвующих в программе ЭКО, показали роль системы детоксикации у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием и низким качеством эмбрионов, полученных при прохождении процедуры ЭКО [12].

В ходе данного исследования была выявлена связь между наступлением беременности и генотипом микросомальной эпоксидгидролазы (ERHX1: 337 T>C (Tyr113His) rs1051740). Ген микросомальной эпоксидгидролазы - фермент системы биотрансформации ксенобиотиков. Полиморфизм T-337C ответственен за снижение активности фермента на 50% ("медленный" аллель) в результате чего снижается эффективность инактивации токсических метаболитов, что ведет к развитию «оксидативного стресса», сущность которого заключается в выделении большого количества свободных радикалов, значительно превышающего физиологические потребности. Показано, что существует ассоциация полиморфизма гена

микросомальной эпоксидгидролазы (EPHX) с развитием хроническим обструктивным заболеванием легких, бронхиальной астмой, патологией женской репродуктивной сферы: эндометриозом, осложнением течения беременности (гестозы, невынашивания беременности), реализуемая через мощное повреждающее действие свободных радикалов [47].

Гены системы детоксикации участвуют в механизмах защиты клеток от повреждающего действия ксенобиотиков и эндогенных субстанций, в том числе продуктов перекисного окисления. Вероятно, отсутствие генетической «защищенности» организма от средового прессинга с одной стороны, и неспособность ферментативных систем клетки адекватно обезвреживать эндогенные токсические вещества в ходе их метаболических превращений, негативно сказывается на качестве ооцитов, и как следствие, на качестве эмбрионов в программе ВРТ.

Заключение

Таким образом, полученные в ходе проведения нашего исследования 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 [15].

Стоит отметить, что при сборе анамнестических данных женщин перед вступлением в программу ЭКО/ИКСИ важно учитывать длительность продолжительности бесплодия и наличие ранее проведенных циклов ЭКО/ИКСИ в анамнезе, что может являться прогностическим критерием будущего лечебного цикла ВРТ.

Остается открытым вопрос влияния генов системы детоксикации на качество ооцитов, эмбрионов и частоту наступления беременности в программе ЭКО/ИКСИ. Изучение данного направления на большей выборке пациентов поможет индивидуализировать и оптимизировать лечение бесплодия, придавая значение используемым курсовым дозам гонадотропинов.

На основании полученных результатов был 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. 20).

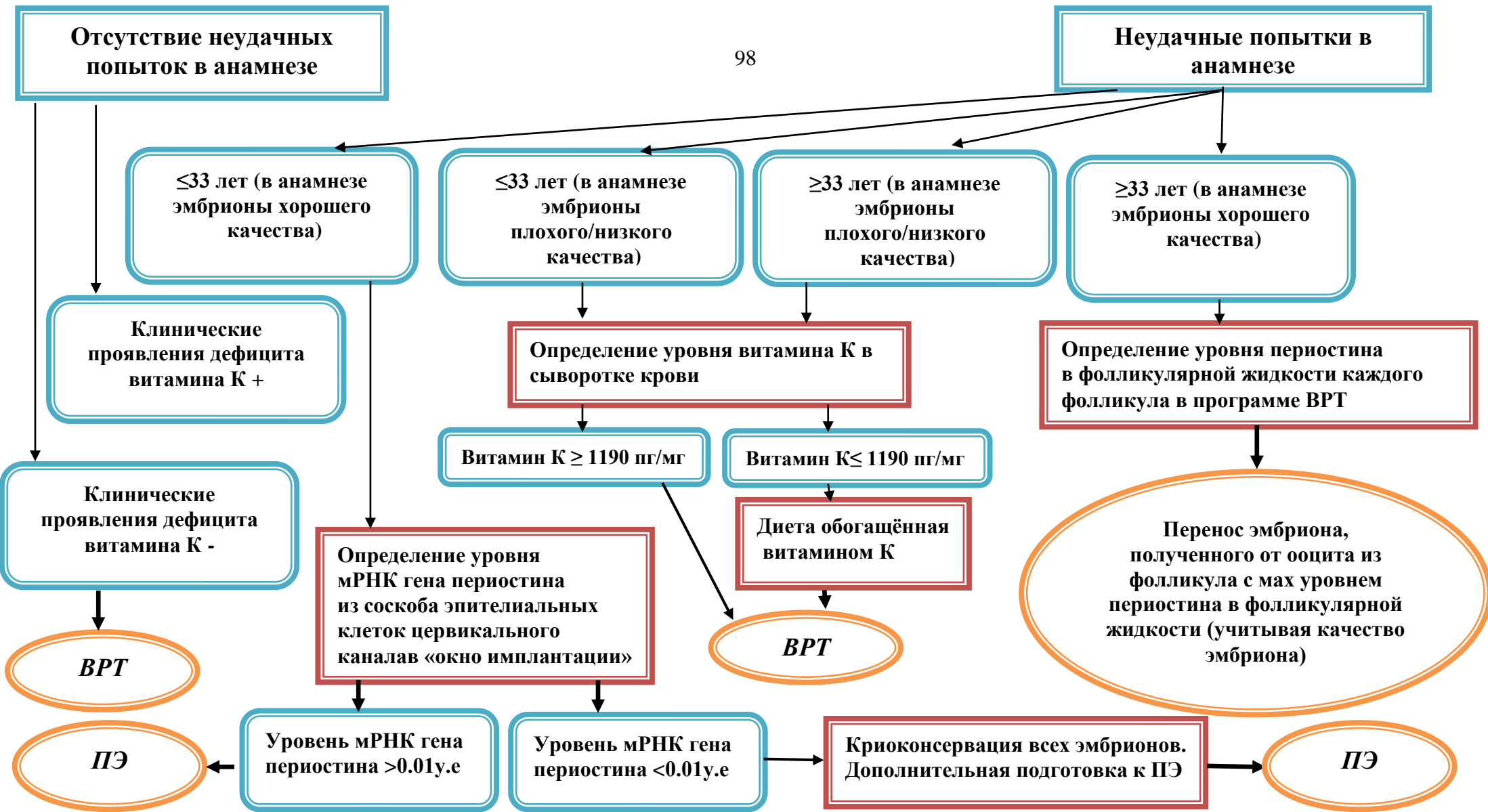


Рисунок 20. Алгоритм персонализированного ведения программы ВРТ с учетом возраста, наличия неудачных попыток в анамнезе и уровня витамин К-зависимого белка периостина в фолликулярной жидкости.

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 CYP2C9 (*1/*1) в 72% случаев получены незрелые ооциты, тогда как у носительниц «медленных» гаплотипов гена CYP2C9 (*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 ($r_s=0,35$; $p=0.01$) - 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 овуляторной 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 (≤ 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 СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

а-ГнРГ – агонисты гонадотропин релизинг-гормона;

АМГ – антимюллеров гормон;

ант-ГнРГ – антагонисты гонадотропин-релизинг гормона

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ВРТ – вспомогательные репродуктивные технологии;

д.м.ц. – день менструального цикла

ДГЭАС – дегидроэпиандростерон-сульфат;

ДИ – доверительный интервал;

ИКСИ – от англ. ICSI – intracytoplasmic sperm injection –

интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида;

ИППП – инфекции, передающиеся половым путем

ИМТ – индекс массы тела;

КИО – контролируемая индукция овуляции

ЛГ – лютеинизирующий гормон;

М1 – первое мейотическое деление;

МII – второе мейотическое деление;

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота;

НЦАГиП – Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии

ОР – относительный риск;

ОШ – отношение шансов;

ПГД – преимплантационная генетическая диагностика

ПГС – преимплантационный генетический скрининг

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

ПРЛ – пролактин

ПЭ – перенос эмбриона

РТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция в реальном времени;

СПКЯ – синдром поликистозных яичников;

Т – тестостерон;

T3 – трийодтиронин;

T₄_{св} – свободный тироксин;

T3C – тератозооспермия;

ТТГ – тиреотропный гормон;

ФСГ – фолликулостимулирующий гормон;

ХГ – хорионический гонадотропин;

β-ХГЧ – бета-субъединица хорионического гонадотропина человека;

ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение;

TGF-β – transforming growth factor beta – трансформирующий фактор роста бета;

VEGFA – vascular endothelial growth factor A (фактор роста эндотелия сосудов A);

VKORC1 - витамин К-эпоксид редуктазный комплекс

EPHX1 - микросомальной эпоксидгидролазы

CYP2C9 - изофермент цитохрома P450

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 2013 г. № 107н "О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению".
2. Министерство здравоохранения Российской Федерации, письмо от 15 февраля 2019 г. N15-4/И/2-1218 "О направлении клинических рекомендаций "Женское бесплодие (современные подходы к диагностике и лечению)"" (вместе с "Клиническими рекомендациями (протокол лечения)", утв. Российским обществом акушеров-гинекологов 28.12.2018, Российской ассоциацией репродукции человека 21.12.2018).
3. Загорская В.Л. Изучение полиморфизма гена, кодирующего витамин К эпоксид-редуктазу (VKORC1) и его значение в клинической практике. // Рефлексология, 2007.-N 1-2.-С.20-22.
4. Калинина Е.А., Эбзеева М.В., Кузьмичев Л.Н. Опыт применения «мягких» схем стимуляции суперовуляции у пациенток группы риска развития синдрома гиперстимуляции яичников. // Акушерство и гинекология, 2010.-N 6.-С.60-64.
5. Коган Е.А., Калинина Е.А., Кузьмичев Л.Н., Дюжева Е.В. Иммуногистохимическое исследование эндометрия в программах ВРТ. // Вестник РУДН, 2009.-N 6.-С.98-104.
6. Краснощока О.Е., Смольникова В.Ю., Калинина Е.А., Елагин В.В. Роль морфологической оценки ооцита и эмбриона при использовании вспомогательных репродуктивных технологий (обзор литературы). // Проблемы репродукции, 2015.-N 1.-С.54-58.
7. Кузьмичев Л.Н., Смольникова В.Ю., Калинина Е.А., Дюжева Е.В. Принципы комплексной оценки и подготовки эндометрия у пациенток программ вспомогательных репродуктивных технологий. // Акушерство и гинекология, 2010.-N 5.-С.32-36.

8. Лавринов П.А., Белова Н.И., Воробьева Н.А. Полиморфизмы гена VKORC1 -1639 G/A и 1173 C/T в популяции коренных жителей Ненецкого автономного округа. // Ученые записки Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И. П. Павлова. 2014;21(2):33-36.

9. Левиашвили М.М., Демура Т.А., Мишиева Н.Г., Файзуллина Н.М., Назаренко Т.А., Коган Е.А. Оценка рецептивности эндометрия у пациенток с безуспешными программами экстракорпорального оплодотворения в анамнезе. // Акушерство и гинекология, 2012.-N 4(1).-С.65-69.

10. Масальский С.С, Калмыкова А.С., Уханова О.П., Климов Л.Я., Разгуляева А.В. Обзор роли периостина - нового биологического маркера при бронхиальной астме. // Российский аллергологический журнал, 2014.-N 6.-С.5-8.

11. Казанцева Е.В., Долгушина Н.В., Донников А.Е., Беднягин Л.А., Баранова Е.Е., Терешков П.П. Влияние пренатальной экспозиции бенз(а)пирена, стриола и формальдегида на массу тела при рождении в зависимости от полиморфизмов генов системы детоксикации // Акушерство и гинекология. 2016. № 7. С. 68-78.

12. Малышкина А. И., Фетисова И. Н., Липин М.А. Полиморфизм генов детоксикации в супружеских парах, участвующих в программе ЭКО. – Иваново: ФГУ «Ивановский научно-исследовательский институт материнства и детства имени В. Н. Городкова» Минздравсоцразвития России, 2012.

13. Бесплодный брак. Современные подходы к диагностике и лечению / Под ред. Г. Т. Сухих, Т. А. Назаренко. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 774.

14. Владимирова И.В., Калинина Е.А., Донников А.Е., Беляева Н.А., Макарова Н.П. Современные методы прогнозирования и профилактики получения незрелых ооцитов в программе ЭКО // В сб. материалов XXX

юбилейного международного конгресса: Новые технологии в диагностике и лечении гинекологических заболеваний. – М., 2017. – С. 197

15. Владимирова И.В., Калинина Е.А., Донников А.Е. Молекулярно-генетические предикторы овариального ответа, качества ооцитов и эмбрионов в программах вспомогательных репродуктивных технологий // Акушерство и гинекология. 2015. Т. 3.

16. Серебренникова К.Г. и др. Современные технологии лечения бесплодия у женщин с оперированными яичниками. // Международный журнал экспериментального образования. 2010;(9):115–7.

17. Рудакова, Е.Б. Диагностика внутриматочной патологии при подготовке к экстракорпоральному оплодотворению / Е. Б. Рудакова, П.В. Давыдов, В. В. Давыдов // Лечащий врач. – 2015. – № 1. – С. 83-86.

18. Хечумян Л.Р., Калинина Е.А., Донников А.Е., Кулакова Е.В., Ибрагимова Э.О. Роль витамин К-зависимого белка периостина в предикции эффективности программы ВРТ (обзор литературы) // Акушерство и гинекология, 2017- N 7. – С. 28-32.

19. Хечумян Л.Р., Калинина Е.А., Бурменская О.В., Донников А.Е., Кулакова Е.В. Оценка витамин К-зависимого белка периостина как нового маркера качества ооцитов, эмбрионов и эффективности программы ЭКО/ИКСИ // Акушерство и гинекология, 2018- N 7. – С. 72-76.

20. Хечумян Л.Р., Калинина Е.А., Донников А.Е., Иванец Т.Ю., Кулакова Е.В. Ассоциация уровня витамина К в крови с исходами программы вспомогательных репродуктивных технологий // Акушерство и гинекология, 2018- N 11. – С. 80-85.

21. Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. //Hum Reprod Update 2006;12:731–46.

22. Acosta AA, Elberger L, Borghi M, et al. Endometrial dating and determination of the window of implantation in healthy fertile women. // Fertil Steril 2000;73:788–98.

23. Ahn HW, Farmer JL, Bazer FW, Spencer TE. Progesterone and interferon tau-regulated genes in the ovine uterine endometrium: identification of periostin as a potential mediator of conceptus elongation. // *Reproduction*. 2009 Nov;138(5):813-25. doi: 10.1530/REP-09-0208.
24. Alfieri CM, Cheek J, Chakraborty S, Yutzey KE. Wnt signaling in heart valve development and osteogenic gene induction. // *Dev Biol*. 2010 Feb 15;338(2):127-35. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.11.030.
25. Annis DS, Ma H, Balas DM, Kumfer KT, Sandbo N, Potts GK, Coon JJ, Mosher DF. Absence of Vitamin K-Dependent γ -Carboxylation in Human Periostin Extracted from Fibrotic Lung or Secreted from a Cell Line Engineered to Optimize γ -Carboxylation. // *PLoS One*. 2015 Aug 14;10(8):e0135374. doi: 10.1371/journal.pone.0135374. ECollection 2015.
26. Apparao KB, Illera MJ, Beyler SA, Olson GE, Osteen KG, Corjay MH, Boggess K, Lessey BA. Regulated expression of osteopontin in the peri-implantation rabbit uterus. // *Biol Reprod*. 2003 May;68(5):1484-90.
27. Arima K, Ohta S, Takagi A, Shiraishi H, Masuoka M, Otsuka K, Suto H, Suzuki S, Yamamoto K, Ogawa M, Simmons O, Yamaguchi Y, Toda S, Aihara M, Conway SJ, Ikeda S, Izuhara K. Periostin contributes to epidermal hyperplasia in psoriasis common to atopic dermatitis. // *Allergol Int*. 2015 Jan;64(1):41-8. doi: 10.1016/j.alit.2014.06.001.
28. Azuma K, Urano T, Watabe T, Ouchi Y, Inoue S. PROX1 suppresses vitamin K-induced transcriptional activity of Steroid and Xenobiotic Receptor. // *Genes Cells*. 2011 Nov;16(11)
29. Bagnato C, Thumar J, Mayya V, Hwang SI, Zebroski H, Claffey KP, Haudenschild C, Eng JK, Lundgren DH, Han DK. Proteomics analysis of human coronary atherosclerotic plaque: a feasibility study of direct tissue proteomics by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. // *Mol Cell Proteomics*. 2007 Jun;6(6):1088-102.
30. Bao S, Ouyang G, Bai X, Huang Z, Ma C, Liu M, Shao R, Anderson RM, Rich JN, Wang XF. Periostin potently promotes metastatic growth of colon

cancer by augmenting cell survival via the Akt/PKB pathway. // *Cancer Cell*. 2004 Apr;5(4):329-39.

31. Bible E. Polycystic kidney disease: Periostin is involved in cell proliferation and interstitial fibrosis in polycystic kidney disease. // *Nat Rev Nephrol*. 2014 Feb;10(2):66. doi: 10.1038/nrneph.2013.270.

32. Blankenship TN, Enders AC, King BF. Distribution of laminin, type IV collagen, and fibronectin in the cell columns and trophoblastic shell of early macaque placentas. // *Cell Tissue Res*. 1992 Nov;270(2):241-8.

33. Bobolea I, Barranco P, Del Pozo V, Romero D, Sanz V, López-Carrasco V, Canabal J, Villasante C, Quirce S. Sputum periostin in patients with different severe asthma phenotypes. // *Allergy*. 2015 May;70(5):540-6. doi: 10.1111/all.12580.

34. Bonewald LF. The amazing osteocyte. // *J Bone Miner Res*. 2011 Feb;26(2):229-38. doi: 10.1002/jbmr.320.

35. Bonnet N, Standley KN, Bianchi EN, Stadelmann V, Foti M, Conway SJ, Ferrari SL. The matricellular protein periostin is required for sost inhibition and the anabolic response to mechanical loading and physical activity. // *J Biol Chem*. 2009 Dec 18;284(51):35939-50. doi: 10.1074/jbc.M109.060335.

36. Bonnet N, Conway SJ, Ferrari SL. Regulation of beta catenin signaling and parathyroid hormone anabolic effects in bone by the matricellular protein periostin. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Sep 11;109(37):15048-53. doi: 10.1073/pnas.1203085109.

37. Bonnet N, Garnero P, Ferrari S. Periostin action in bone. // *Mol Cell Endocrinol*. 2016 Sep 5;432:75-82. doi: 10.1016/j.mce.2015.12.014.

38. Chen G, Xin A, Liu Y, Shi C, Chen J, Tang X, Chen Y, Yu M, Peng X, Li L, Sun X. Integrins $\beta 1$ and $\beta 3$ are biomarkers of uterine condition for embryo transfer. // *J Transl Med*. 2016 Oct 26;14(1):303.

39. Chiappori A, De Ferrari L, Folli C, Mauri P, Riccio AM, Canonica GW. Biomarkers and severe asthma: a critical appraisal. // *Clin Mol Allergy*. 2015 Oct 1;13:20. doi: 10.1186/s12948-015-0027-7. eCollection 2015.

40. Conway SJ, Izuhara K, Kudo Y, Litvin J, Markwald R, Ouyang G, Arron JR, Holweg CT, Kudo A. The role of periostin in tissue remodeling across health and disease. // *Cell Mol Life Sci.* 2014 Apr;71(7):1279-88. doi: 10.1007/s00018-013-1494-y.
41. Corren J, Lemanske RF, Hanania NA, Korenblat PE, Parsey MV, Arron JR, Harris JM, Scheerens H, Wu LC, Su Z, Mosesova S, Eisner MD, Bohen SP, Matthews JG. Lebrikizumab treatment in adults with asthma. // *N Engl J Med.* 2011 Sep 22;365(12):1088-98. doi: 10.1056/NEJMoa1106469.
42. Coutu DL, Wu JH, Monette A, Rivard GE, Blostein MD, Galipeau J. Periostin, a member of a novel family of vitamin K-dependent proteins, is expressed by mesenchymal stromal cells. // *J Biol Chem.* 2008 Jun 27;283(26):17991-8001. doi: 10.1074/jbc.M708029200.
43. Davidson LM, Coward K. Molecular mechanisms of membrane interaction at implantation. // *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2016 Mar;108(1):19-32. doi: 10.1002/bdrc.21122.
44. de Sousa Bomfim A, de Freitas MCC, Covas DT, de Sousa Russo EM. Human Cells as Platform to Produce Gamma-Carboxylated Proteins. // *Methods Mol Biol.* 2018;1674:49-61. doi: 10.1007/978-1-4939-7312-5_4.
45. Di Cello A, Rania E, Di Sanzo M, Alviggi E, Rienzi L, Morelli M, Zullo F, Costanzo F. O-026. Periostin a new non-invasive parameter in addition to the morphologic criteria for evaluating oocyte/blastocyst quality and its impact on endometrial receptivity. // Abstract book of the 31st ESHRE Annual Meeting, Lisbon, Portugal, 14-17 June 2015. *Hum Reprod.* 2015 Jun;30 Suppl 1:i12.
46. Dobрева MP, Lhoest L, Pereira PN, Umans L, Camus A, Chuva de Sousa Lopes SM, Zwijsen A. Periostin as a biomarker of the amniotic membrane. // *Stem Cells Int.* 2012;2012:987185. doi: 10.1155/2012/987185.
47. Duan C.Y., Liu M.Y., Li S.B., Ma K.S., Bie P. Lack of association of EPHX1 gene polymorphisms with risk of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. // *Tumour Biol.* 2014 Jan;35(1):659-66. doi: 10.1007/s13277-013-1090-7.

48. European IVF-monitoring Consortium (EIM); European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), Calhaz-Jorge C, De Geyter C, Kupka MS, de Mouzon J, Erb K, Mocanu E, Motrenko T, Scaravelli G, Wyns C, Goossens V. Assisted reproductive technology in Europe, 2013: results generated from European registers by ESHRE. // *Hum Reprod.* 2017 Oct 1;32(10):1957-1973. doi: 10.1093/humrep/dex264.
49. Ferron M, Lacombe J, Germain A, Oury F, Karsenty G. GGCX and VKORC1 inhibit osteocalcin endocrine functions. // *J Cell Biol.* 2015 Mar 16;208(6):761-76. doi: 10.1083/jcb.201409111.
50. Fernlund P, Stenflo J, Roepstorff P, Thomsen J. Vitamin K and the biosynthesis of prothrombin. V. Gamma-carboxyglutamic acids, the vitamin K-dependent structures in prothrombin. // *J Biol Chem.* 1975 Aug 10;250(15):6125-33.
51. Freis A, Schlegel J, Kuon RJ, Doster A, Jauckus J, Strowitzki T, Germeyer A. Serum periostin levels in early in pregnancy are significantly altered in women with miscarriage. // *Reprod Biol Endocrinol.* 2017 Nov 2;15(1):87. doi: 10.1186/s12958-017-0307-9.
52. Friedman PA, Przysiecki CT. Vitamin K-dependent carboxylation. *Int J Biochem.* 1987;19(1):1-7.
53. Furie B, Bouchard BA, Furie BC. Vitamin K-dependent biosynthesis of gamma-carboxyglutamic acid. *Blood.* 1999 Mar 15;93(6):1798-808.
54. Furie B, Furie BC. The molecular basis of blood coagulation. *Cell.* 1988 May 20;53(4):505-18.
55. Germeyer A, Savaris RF, Jauckus J, Lessey B. Endometrial beta3 integrin profile reflects endometrial receptivity defects in women with unexplained recurrent pregnancy loss. *Reprod Biol Endocrinol.* 2014 Jun 20;12:53. doi: 10.1186/1477-7827-12-53.
56. Gillan L, Matei D, Fishman DA, Gerbin CS, Karlan BY, Chang DD. Periostin secreted by epithelial ovarian carcinoma is a ligand for alpha(V)beta(3)

and alpha(V)beta(5) integrins and promotes cell motility. *Cancer Res.* 2002 Sep 15;62(18):5358-64.

57. Guarino M. Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion. // *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(12):2153-60.

58. Guerrot D, Dussaule JC, Mael-Ainin M, Xu-Dubois YC, Rondeau E, Chatziantoniou C, Placier S. Identification of periostin as a critical marker of progression/reversal of hypertensive nephropathy. *PLoS One.* 2012;7(3):e31974. doi: 10.1371/journal.pone.0031974.

59. Guttman-Yassky E, Nogales KE, Krueger JG. Contrasting pathogenesis of atopic dermatitis and psoriasis--part I: clinical and pathologic concepts. *J Allergy Clin Immunol.* 2011 May;127(5):1110-8. doi: 10.1016/j.jaci.2011.01.053.

60. Hakuno D, Kimura N, Yoshioka M, Mukai M, Kimura T, Okada Y, Yozu R, Shukunami C, Hiraki Y, Kudo A, Ogawa S, Fukuda K. Periostin advances atherosclerotic and rheumatic cardiac valve degeneration by inducing angiogenesis and MMP production in humans and rodents. // *J Clin Invest.* 2010 Jul;120(7):2292-306. doi: 10.1172/JCI40973.

61. Hanania NA, Wenzel S, Rosén K, Hsieh HJ, Mosesova S, Choy DF, Lal P, Arron JR, Harris JM, Busse W. Exploring the effects of omalizumab in allergic asthma: an analysis of biomarkers in the EXTRA study. // *Am J Respir Crit Care Med.* 2013 Apr 15;187(8):804-11. doi: 10.1164/rccm.201208-1414OC.

62. Hannan NJ, Bambang K, Kaitu'u-Lino TJ, Konje JC, Tong S. A bioplex analysis of cytokines and chemokines in first trimester maternal plasma to screen for predictors of miscarriage. // *PLoS One.* 2014 Apr 3;9(4):e93320. doi: 10.1371/journal.pone.0093320. eCollection 2014.

63. Hiroi H, Momoeda M, Nakazawa F, Koizumi M, Tsutsumi R, Hosokawa Y, Osuga Y, Yano T, Tsutsumi O, Taketani Y. Expression and regulation of periostin/OSF-2 gene in rat uterus and human endometrium. // *Endocr J.* 2008 Mar;55(1):183-9.

64. Herded M., Minowa Y., Nakano Y., Suzuki K., Shiga T., Nishio M., Miyoshi J., Takahashi H., Hama T. Drug interactions between tyrosine kinase inhibitors (gefitinib and erlotinib) and warfarin: Assessment of international normalized ratio elevation characteristics and in vitro CYP2C9 activity. // *J Oncol Pharm Pract.* 2018 Sep 26;1078155218801061. doi: 10.1177/1078155218801061.
65. Hixson JE, Shimmin LC, Montasser ME, Kim DK, Zhong Y, Ibarguen H, Follis J, Malcom G, Strong J, Howard T, Langefeld C, Liu Y, Rotter JJ, Johnson C, Herrington D. Common variants in the periostin gene influence development of atherosclerosis in young persons. // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011 Jul;31(7):1661-7. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.224352.
66. Hoersch S, Andrade-Navarro MA. Periostin shows increased evolutionary plasticity in its alternatively spliced region. // *BMC Evol Biol.* 2010 Jan 28;10:30. doi: 10.1186/1471-2148-10-30.
67. Hu F, Shang XF, Wang W, Jiang W, Fang C, Tan D, Zhou HC. High-level expression of periostin is significantly correlated with tumour angiogenesis and poor prognosis in osteosarcoma. // *Int J Exp Pathol.* 2016 Feb;97(1):86-92. doi: 10.1111/iep.12171.
68. Hu WW, Chen PC, Chen JM, Wu YM, Liu PY, Lu CH, Lin YF, Tang CH, Chao CC. Periostin promotes epithelial-mesenchymal transition via the MAPK/miR-381 axis in lung cancer. // *Oncotarget.* 2017 Jul 15;8(37):62248-62260. doi: 10.18632/oncotarget.19273. eCollection 2017 Sep 22.
69. Huang P. Structural overview of the Nuclear Receptor Superfamily : Insights into Physiology and Therapeutics / P.Huang, V.Chandra [et al.] // *Ann. Rev. Physiol.* – 2010. – Vol.72. – P.247–272.
70. Idolazzi L, Ridolo E, Fassio A, Gatti D, Montagni M, Caminati M, Martignago I, Incorvaia C, Senna G. Periostin: The bone and beyond. // *Eur J Intern Med.* 2017 Mar;38:12-16. doi: 10.1016/j.ejim.2016.11.015.
71. Izuhara K, Arima K, Ohta S, Suzuki S, Inamitsu M, Yamamoto KI. Periostin in Allergic Inflammation. // *Allergol Int.* 2014;63(2):143-151. doi: 10.2332/allergolint.13-RAI-0663.

72. Izuhara K, Matsumoto H, Ohta S, Ono J, Arima K, Ogawa M. Recent developments regarding periostin in bronchial asthma. // *Allergol Int*. 2015 Sep;64 Suppl:S3-10. doi: 10.1016/j.alit.2015.04.012.

73. Izuhara K, Conway SJ, Moore BB, Matsumoto H, Holweg CT, Matthews JG, Arron JR. Roles of Periostin in Respiratory Disorders. // *Am J Respir Crit Care Med*. 2016 May 1;193(9):949-56. doi: 10.1164/rccm.201510-2032PP.

74. Izuhara K, Nunomura S, Nanri Y, Ogawa M, Ono J, Mitamura Y, Yoshihara T. Periostin in inflammation and allergy. // *Cell Mol Life Sci*. 2017 Dec;74(23):4293-4303. doi: 10.1007/s00018-017-2648-0.

75. Kanemitsu Y, Matsumoto H, Izuhara K, Tohda Y, Kita H, Horiguchi T, Kuwabara K, Tomii K, Otsuka K, Fujimura M, Ohkura N, Tomita K, Yokoyama A, Ohnishi H, Nakano Y, Oguma T, Hozawa S, Nagasaki T, Ito I, Oguma T, Inoue H, Tajiri T, Iwata T, Izuhara Y, Ono J, Ohta S, Tamari M, Hirota T, Yokoyama T, Niimi A, Mishima M. Increased periostin associates with greater airflow limitation in patients receiving inhaled corticosteroids. // *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Aug;132(2):305-12.e3. doi: 10.1016/j.jaci.2013.04.050.

76. Kanno A, Satoh K, Masamune A, Hirota M, Kimura K, Umino J, Hamada S, Satoh A, Egawa S, Motoi F, Unno M, Shimosegawa T. Periostin, secreted from stromal cells, has biphasic effect on cell migration and correlates with the epithelial to mesenchymal transition of human pancreatic cancer cells. // *Int J Cancer*. 2008 Jun 15;122(12):2707-18. doi: 10.1002/ijc.23332.

77. Kim BJ, Rhee Y, Kim CH, Baek KH, Min YK, Kim DY, Ahn SH, Kim H, Lee SH, Lee SY, Kang MI, Koh JM. Plasma periostin associates significantly with non-vertebral but not vertebral fractures in postmenopausal women: Clinical evidence for the different effects of periostin depending on the skeletal site. // *Bone*. 2015 Dec;81:435-41. doi: 10.1016/j.bone.2015.08.014.

78. Kong P, Christia P, Saxena A, Su Y, Frangogiannis NG. Lack of specificity of fibroblast-specific protein 1 in cardiac remodeling and fibrosis. // *Am*

J Physiol Heart Circ Physiol. 2013 Nov 1;305(9):H1363-72. doi: 10.1152/ajpheart.00395.2013.

79. Kou K, Okawa T, Yamaguchi Y, Ono J, Inoue Y, Kohno M, Matsukura S, Kambara T, Ohta S, Izuhara K, Aihara M. Periostin levels correlate with disease severity and chronicity in patients with atopic dermatitis. // Br J Dermatol. 2014 Aug;171(2):283-91. doi: 10.1111/bjd.12943.

80. Kudo A. Periostin in fibrillogenesis for tissue regeneration: periostin actions inside and outside the cell. // Cell Mol Life Sci. 2011 Oct;68(19):3201-7. doi: 10.1007/s00018-011-0784-5.

81. Kudo Y, Siriwardena BS, Hatano H, Ogawa I, Takata T. Periostin: novel diagnostic and therapeutic target for cancer. // Histol Histopathol. 2007 Oct;22(10):1167-74. doi: 10.14670/HH-22.1167.

82. Kühn B, del Monte F, Hajjar RJ, Chang YS, Lebeche D, Arab S, Keating MT. Periostin induces proliferation of differentiated cardiomyocytes and promotes cardiac repair. // Nat Med. 2007 Aug;13(8):962-9.

83. Leushuis E, van der Steeg JW, Steures P, Bossuyt PM, Eijkemans MJ, van der Veen F, Mol BW, Hompes PG. Prediction models in reproductive medicine: a critical appraisal. // Hum Reprod Update. 2009 Sep-Oct;15(5):537-52. doi: 10.1093/humupd/dmp013.

84. Li G, Jin R, Norris RA, Zhang L, Yu S, Wu F, Markwald RR, Nanda A, Conway SJ, Smyth SS, Granger DN. Periostin mediates vascular smooth muscle cell migration through the integrins α v β 3 and α v β 5 and focal adhesion kinase (FAK) pathway. // Atherosclerosis. 2010 Feb;208(2):358-65. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2009.07.046.

85. Lindsley A, Snider P, Zhou H, Rogers R, Wang J, Olaopa M, Kruzynska-Frejtag A, Koushik SV, Lilly B, Burch JB, Firulli AB, Conway SJ. Identification and characterization of a novel Schwann and outflow tract endocardial cushion lineage-restricted periostin enhancer. // Dev Biol. 2007 Jul 15;307(2):340-55.

86. Liu AY, Zheng H, Ouyang G. Periostin, a multifunctional matricellular protein in inflammatory and tumor microenvironments. // *Matrix Biol.* 2014 Jul;37:150-6. doi: 10.1016/j.matbio.2014.04.007.
87. Lv YJ, Wang W, Ji CS, Jia, Xie MR, Hu B. Association between periostin and epithelial-mesenchymal transition in esophageal squamous cell carcinoma and its clinical significance. // *Oncol Lett.* 2017 Jul;14(1):376-382. doi: 10.3892/ol.2017.6124.
88. Mael-Ainin M, Abed A, Conway SJ, Dussaule JC, Chatziantoniou C. Inhibition of periostin expression protects against the development of renal inflammation and fibrosis. // *J Am Soc Nephrol.* 2014 Aug;25(8):1724-36. doi: 10.1681/ASN.2013060664.
89. Malanchi I, Santamaria-Martínez A, Susanto E, Peng H, Lehr HA, Delaloye JF, Huelsken J. Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. // *Nature.* 2011 Dec 7;481(7379):85-9. doi: 10.1038/nature10694.
90. Matsusaka M, Kabata H, Fukunaga K, Suzuki Y, Masaki K, Mochimaru T, Sakamaki F, Oyamada Y, Inoue T, Oguma T, Sayama K, Koh H, Nakamura M, Umeda A, Ono J, Ohta S, Izuhara K, Asano K, Betsuyaku T. Phenotype of asthma related with high serum periostin levels. // *Allergol Int.* 2015 Apr;64(2):175-80. doi: 10.1016/j.alit.2014.07.003.
91. Mikheev AM, Mikheeva SA, Trister AD, Tokita MJ, Emerson SN, Parada CA, Born DE, Carnemolla B, Frankel S, Kim DH, Oxford RG, Kosai Y, Tozer-Fink KR, Manning TC, Silber JR, Rostomily RC. Periostin is a novel therapeutic target that predicts and regulates glioma malignancy. // *Neuro Oncol.* 2015 Mar;17(3):372-82. doi: 10.1093/neuonc/nou161.
92. Mino M, Kanno K, Okimoto K, Sugiyama A, Kishikawa N, Kobayashi T, Ono J, Izuhara K, Kobayashi T, Ohigashi T, Ohdan H, Tazuma S. Periostin promotes malignant potential by induction of epithelial-mesenchymal transition in intrahepatic cholangiocarcinoma. // *Hepatology Communications* 2017. doi:10.1002/hep4.1114

93. Morelli M, Misaggi R, Di Cello A, Zuccalà V, Costanzo F, Zullo F, Quaresima B. Tissue expression and serum levels of periostin during pregnancy: a new biomarker of embryo-endometrial cross talk at implantation. // *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2014 Apr;175:140-4. doi: 10.1016/j.ejogrb.2013.12.027.
94. Morra L, Moch H. Periostin expression and epithelial-mesenchymal transition in cancer: a review and an update. // *Virchows Arch.* 2011 Nov;459(5):465-75. doi: 10.1007/s00428-011-1151-5.
95. Mosher DF, Johansson MW, Gillis ME, Annis DS. Periostin and TGF- β -induced protein: Two peas in a pod? // *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2015;50(5):427-39. doi: 10.3109/10409238.2015.1069791.
96. Murota H, Lingli Y, Katayama I. Periostin in the pathogenesis of skin diseases. *Cell Mol Life Sci.* 2017 Dec;74(23):4321-4328. doi: 10.1007/s00018-017-2647-1.
97. Norris RA, Damon B, Mironov V, Kasyanov V, Ramamurthi A, Moreno-Rodriguez R, Trusk T, Potts JD, Goodwin RL, Davis J, Hoffman S, Wen X, Sugi Y, Kern CB, Mjaatvedt CH, Turner DK, Oka T, Conway SJ, Molkentin JD, Forgacs G, Markwald RR. Periostin regulates collagen fibrillogenesis and the biomechanical properties of connective tissues. // *J Cell Biochem.* 2007 Jun 1;101(3):695-711.
98. Pandey S, Shetty A, Hamilton M, Bhattacharya S, Maheshwari A. Obstetric and perinatal outcomes in singleton pregnancies resulting from IVF/ICSI: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2012 Sep-Oct;18(5):485-503. doi: 10.1093/humupd/dms018. Epub 2012 May 19.
99. Parulekar AD, Atik MA, Hanania NA. Periostin, a novel biomarker of TH2-driven asthma. *Curr Opin Pulm Med.* 2014 Jan;20(1):60-5. doi: 10.1097/MCP.0000000000000005.
100. Pillai RN, Konje JC, Tincello DG, Potdar N. Role of serum biomarkers in the prediction of outcome in women with threatened miscarriage: a systematic review and diagnostic accuracy meta-analysis. // *Hum Reprod Update.* 2016 Mar-Apr;22(2):228-39. doi: 10.1093/humupd/dmv054.

101. Rossini M, Gatti D, Adami S. Involvement of WNT/ β -catenin signaling in the treatment of osteoporosis. // *Calcif Tissue Int.* 2013 Aug;93(2):121-32. doi: 10.1007/s00223-013-9749-z.
102. Ruan K, Bao S, Ouyang G. The multifaceted role of periostin in tumorigenesis. // *Cell Mol Life Sci.* 2009 Jul;66(14):2219-30. doi: 10.1007/s00018-009-0013-7.
103. Satirapoj B, Tassanasorn S, Charoenpitakchai M, Supasyndh O. Periostin as a tissue and urinary biomarker of renal injury in type 2 diabetes mellitus. // *PLoS One.* 2015 Apr 17;10(4):e0124055. doi: 10.1371/journal.pone.0124055. ECollection 2015.
104. Sasaki H, Roberts J, Lykins D, Fujii Y, Auclair D, Chen LB. Novel chemiluminescence assay for serum periostin levels in women with preeclampsia and in normotensive pregnant women. // *Am J Obstet Gynecol.* 2002 Jan;186(1):103-8
105. Shapiro BS, Daneshmand ST, Desai J, Garner FC, Aguirre M, Hudson C. The risk of embryo-endometrium asynchrony increases with maternal age after ovarian stimulation and IVF. // *Reprod Biomed Online.* 2016 Jul;33(1):50-5. doi: 10.1016/j.rbmo.2016.04.008.
106. Shen C., Shu D., Zhao X., Gao Y. Comparison of clinical outcomes between fresh embryo transfers and frozen-thawed embryo transfers. // *Iran J Reprod Med.* 2014 Jun;12(6):409-14.
107. Sidhu SS, Yuan S, Innes AL, Kerr S, Woodruff PG, Hou L, Muller SJ, Fahy JV. Roles of epithelial cell-derived periostin in TGF-beta activation, collagen production, and collagen gel elasticity in asthma. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Aug 10;107(32):14170-5. doi: 10.1073/pnas.1009426107.
108. Snider P, Hinton RB, Moreno-Rodriguez RA, Wang J, Rogers R, Lindsley A, Li F, Ingram DA, Menick D, Field L, Firulli AB, Molkentin JD, Markwald R, Conway SJ. Periostin is required for maturation and extracellular matrix stabilization of noncardiomyocyte lineages of the heart. // *Circ Res.* 2008 Apr 11;102(7):752-60. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.159517.

109. Song HJ, Zhang P, Guo XJ, Liao LM, Zhou ZM, Sha JH, Cui YG, Ji H, Liu JY. The proteomic analysis of human neonatal umbilical cord serum by mass spectrometry. // *Acta Pharmacol Sin.* 2009 Nov;30(11):1550-8. doi: 10.1038/aps.2009.140.
110. Stenflo J. Contributions of Gla and EGF-like domains to the function of vitamin K-dependent coagulation factors. // *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 1999;9(1):59-88.
111. Sunkara SK, Pundir J, Khalaf Y. Effect of androgen supplementation or modulation on ovarian stimulation outcome in poor responders: a meta-analysis. // *Reprod Biomed Online.* 2011 Jun;22(6):545-55. doi: 10.1016/j.rbmo.2011.01.015.
112. Suttie JW. The metabolic role of vitamin K. // *Fed Proc.* 1980 Aug;39(10):2730-5.
113. Suttie JW. Synthesis of vitamin K-dependent proteins. // *FASEB J.* 1993 Mar;7(5):445-52.
114. Suzaki I, Kawano S, Komiya K, Tanabe T, Akaba T, Asano K, Suzaki H, Izuhara K, Rubin BK. Inhibition of IL-13-induced periostin in airway epithelium attenuates cellular protein expression of MUC5AC. // *Respirology.* 2017 Jan;22(1):93-100. doi: 10.1111/resp.12873.
115. Tajiri M, Okamoto M, Fujimoto K, Johkoh T, Ono J, Tominaga M, Azuma K, Kawayama T, Ohta S, Izuhara K, Hoshino T. Serum level of periostin can predict long-term outcome of idiopathic pulmonary fibrosis. // *Respir Investig.* 2015 Mar;53(2):73-81. doi: 10.1016/j.resinv.2014.12.003.
116. Takeshita S, Kikuno R, Tezuka K, Amann E. Osteoblast-specific factor 2: cloning of a putative bone adhesion protein with homology with the insect protein fasciclin I. // *Biochem J.* 1993 Aug 15;294 (Pt 1):271-8.
117. Templeton A, Morris JK, Parslow W. Factors that affect outcome of in-vitro fertilisation treatment. // *Lancet.* 1996 Nov 23;348(9039):1402-6.

118. Tepekoy F, Akkoyunlu G, Demir R. The role of Wnt signaling members in the uterus and embryo during pre-implantation and implantation. // *J Assist Reprod Genet.* 2015 Mar;32(3):337-46. doi: 10.1007/s10815-014-0409-7.

119. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting // *Hum. Reprod.* – 2011. – Vol. 26, No 6. – P. 1270-1283.

120. Uchida M, Shiraishi H, Ohta S, Arima K, Taniguchi K, Suzuki S, Okamoto M, Ahlfeld SK, Ohshima K, Kato S, Toda S, Sagara H, Aizawa H, Hoshino T, Conway SJ, Hayashi S, Izuhara K. Periostin, a matricellular protein, plays a role in the induction of chemokines in pulmonary fibrosis. // *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012 May;46(5):677-86. doi: 10.1165/rcmb.2011-0115OC.

121. Uotila L. The metabolic functions and mechanism of action of vitamin K. // *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1990;201:109-17.

122. van Loendersloot L., Repping S., Bossuyt PM., van der Veen F., van Wely M. Prediction models in in vitro fertilization; where are we? A mini review. // *J Adv Res.* 2014 May;5(3):295-301. doi: 10.1016/j.jare.2013.05.002.

123. Vatandoost J, Pakdaman SF. The Effects of Influencing Factors on γ -carboxylation and Expression of Recombinant Vitamin K Dependent Coagulation Factors. // *J Biomed.* 2016;1(2):e6077. doi: 10.17795/jmb-6077.

124. Venning FA, Wullkopf L, Erler JT. Targeting ECM Disrupts Cancer Progression. // *Front Oncol.* 2015 Oct 20;5:224. doi: 10.3389/fonc.2015.00224. eCollection 2015.

125. Vermeer C. Gamma-carboxyglutamate-containing proteins and the vitamin K-dependent carboxylase. // *Biochem J.* 1990 Mar 15;266(3):625-36.

126. Vermeer C. Vitamin K: the effect on health beyond coagulation - an overview. // *Food Nutr Res.* 2012;56. doi: 10.3402/fnr.v56i0.5329.

127. Vermeer C, De Boer-Van den Berg MA. Vitamin K-dependent carboxylase. // *Haematologia (Budap).* 1985;18(2):71-97.

128. Walker JT, McLeod K, Kim S, Conway SJ, Hamilton DW. Periostin as a multifunctional modulator of the wound healing response. // *Cell Tissue Res.* 2016 Sep;365(3):453-65. doi: 10.1007/s00441-016-2426-6.

129. Wallace DP, White C, Savinkova L, Nivens E, Reif GA, Pinto CS, Raman A, Parnell SC, Conway SJ, Fields TA. Periostin promotes renal cyst growth and interstitial fibrosis in polycystic kidney disease. // *Kidney Int.* 2014 Apr;85(4):845-54. doi: 10.1038/ki.2013.488.
130. Wang M, Wang X, Zhang N, Wang H, Li Y, Fan E, Zhang L, Zhang L, Bachert C. Association of periostin expression with eosinophilic inflammation in nasal polyps. // *J Allergy Clin Immunol.* 2015 Dec;136(6):1700-1703.e9. doi: 10.1016/j.jaci.2015.09.005.
131. Wang Z, Xiong S, Mao Y, Chen M, Ma X, Zhou X, Ma Z, Liu F, Huang Z, Luo Q, Ouyang G. Periostin promotes immunosuppressive premetastatic niche formation to facilitate breast tumour metastasis. // *J Pathol.* 2016 Aug;239(4):484-95. doi: 10.1002/path.4747.
132. Wantanasiri P, Satirapoj B, Charoenpitakchai M, Aramwit P. Periostin: a novel tissue biomarker correlates with chronicity index and renal function in lupus nephritis patients. // *Lupus.* 2015 Jul;24(8):835-45. doi: 10.1177/0961203314566634.
133. Wartiovaara J, Leivo I, Vaheri A. Expression of the cell surface-associated glycoprotein, fibronectin, in the early mouse embryo. // *Dev Biol.* 1979 Mar;69(1):247-57.
134. Wewer UM, Liotta LA, Jaye M, Ricca GA, Drohan WN, Claysmith AP, Rao CN, Wirth P, Coligan JE, Albrechtsen R, et al. Altered levels of laminin receptor mRNA in various human carcinoma cells that have different abilities to bind laminin. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Oct;83(19):7137-41.
135. Whitlon DS, Sadowski JA, Suttie JW. Mechanism of coumarin action: significance of vitamin K epoxide reductase inhibition. // *Biochemistry.* 1978 Apr 18;17(8):1371-7.
136. World Health Organization reference values for human semen characteristics / T. G. Cooper [et al.] // *Hum. Reprod. Update.* – 2010. – Vol. 16, No 3. – P. 231-245.

137. Yamaguchi Y. Periostin in skin tissue and skin-related diseases. // *Allergol Int.* 2014 Jun;63(2):161-70. doi: 10.2332/allergolint.13-RAI-0685.

138. Yamaguchi Y, Ono J, Masuoka M, Ohta S, Izuhara K, Ikezawa Z, Aihara M, Takahashi K. Serum periostin levels are correlated with progressive skin sclerosis in patients with systemic sclerosis. // *Br J Dermatol.* 2013 Apr;168(4):717-25. doi: 10.1111/bjd.12117.

139. Ye D, Shen ZS, Qiu SJ, Li Q, Wang GL. Role and underlying mechanisms of the interstitial protein periostin in the diagnosis and treatment of malignant tumors. // *Oncol Lett.* 2017 Nov;14(5):5099-5106. doi: 10.3892/ol.2017.6866.

140. Zarinara A., Zeraati H., Kamali K., Mohammad K., Shahnazari P., Akhondi MM. Models Predicting Success of Infertility Treatment: A Systematic Review. // *J Reprod Infertil.* 2016 Apr-Jun;17(2):68-81.

141. Zhang F, Luo K, Rong Z, Wang Z, Luo F, Zhang Z, Sun D, Dong S, Xu J, Dai F. Periostin Upregulates Wnt/ β -Catenin Signaling to Promote the Osteogenesis of CTLA4-Modified Human Bone Marrow-Mesenchymal Stem Cells. // *Sci Rep.* 2017 Jan 27;7:41634. doi: 10.1038/srep41634.

142. Zhao S, Wu H, Xia W, Chen X, Zhu S, Zhang S, Shao Y, Ma W, Yang D, Zhang J. Periostin expression is upregulated and associated with myocardial fibrosis in human failing hearts. // *J Cardiol.* 2014 May;63(5):373-8.

143. Zheng Q, Lu J, Li R, Hu C, Liu P. Elevated periostin in serum and peritoneal washing fluids as potential biomarkers for endometriosis. // *Gynecol Endocrinol.* 2016 Nov;32(11):900-903.

144. Zhu S, Barbe MF, Amin N, Rani S, Popoff SN, Safadi FF, Litvin J. Immunolocalization of Periostin-like factor and Periostin during embryogenesis. // *J Histochem Cytochem.* 2008 Apr;56(4):329-45.

145. Элдер К. Экстракорпоральное оплодотворение / К. Элдер, Б. Дэйл. – М.: МЕДпресс-информ, 2008. – 276 с.