

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
АКУШЕРСТВА, ГИНЕКОЛОГИИ И ПЕРИНАТОЛОГИИ
ИМЕНИ АКАДЕМИКА В. И. КУЛАКОВА»

На правах рукописи

Князева
Екатерина Андреевна

Реализация вспомогательных репродуктивных технологий
у пациенток с бесплодием с учетом
молекулярно-генетических особенностей эндометрия

14.01.01 — Акушерство и гинекология
Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Е. А. Калинина

кандидат медицинских наук

А. Е. Донников

Москва — 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
Актуальность темы исследования	5
Степень разработанности темы исследования	7
Цель исследования	10
Задачи исследования	10
Научная новизна	11
Теоретическая и практическая значимость	11
Методология и методы исследования	12
Положения, выносимые на защиту	13
Личный вклад автора	13
Соответствие диссертации паспорту научной специальности	14
Апробация результатов	14
Внедрение результатов исследования в практику	14
Структура и объем диссертации	15
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	16
1.1. Бесплодие и рецептивность эндометрия	16
1.2. Транскриптомные маркеры рецептивности и исходов программ ВРТ	18
1.3. НОХ-гены как регуляторы молекулярно-генетических особенностей эндометрия	22
1.3.1. История изучения НОХ-генов	22
1.3.2. Регуляция экспрессии НОХ-генов	24
1.3.3. Влияние НОХА10 и НОХА11 на гены-мишени	26
1.4. Роль НОХ-генов в женской репродуктивной системе	32
1.4.1. НОХ-гены в регуляции рецептивности эндометрия	32
1.4.2. НОХ-гены и эндометриоз	33
1.4.3. НОХ-гены и миома матки	36
1.4.4. НОХ-гены и трубно-перитонеальный фактор бесплодия	37
1.4.5. НОХ-гены и другие патологии, связанные с бесплодием	38

1.5. Эпигаллокатехин-3-галлат как потенциальный регулятор генетических и эпигенетических особенностей эндометрия.....	40
1.6. Заключение	42
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	45
2.1. Материал исследования.....	45
2.2. Дизайн исследования	45
2.3. Методы исследования.....	52
2.3.1. Общеклинические методы обследования.....	53
2.3.2. Ультразвуковое исследование малого таза	55
2.3.3. Гормональное исследование	57
2.3.4. Исследования эякулята.....	57
2.3.5. Пайпель-биопсия эндометрия.....	59
2.3.6. Гистологическое исследование эндометрия	59
2.3.7. Овариальная стимуляция и трансвагинальная пункция фолликулов....	59
2.3.8. Морфологическая оценка ооцитов и этап оплодотворения	60
2.3.9. Морфологическая оценка эмбрионов	62
2.3.10. Перенос эмбрионов в полость матки и ведение посттрансферного периода.....	63
2.4. Специальные методы исследования.....	64
2.4.1. Выделение ДНК, бисульфитная конверсия и секвенирование по Сэнгеру	64
2.4.2. Выделение ДНК, бисульфитная конверсия и секвенирование нового поколения	66
2.4.3. Выделение РНК для транскриптомного исследования и ПЦР-РВ	67
2.4.4. Полногеномный транскриптомный анализ	68
2.4.5. Полимеразная цепная реакция с детекцией продуктов амплификации в реальном времени.....	68
2.5. Статистическая обработка полученных данных.....	69
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	71

3.1. Клинико-лабораторная характеристика пациенток, включенных в исследование.....	71
3.2. Характеристика циклов ЭКО и переноса эмбрионов.....	82
3.2.1. Характеристика протоколов стимуляции в программе ЭКО в исследуемых группах пациенток.....	82
3.2.2. Характеристика фолликулогенеза, оогенеза и раннего эмбриогенеза ..	83
3.3. Особенности транскриптома эндометрия при повторных неудачных попытках ЭКО с различными исходами.....	84
3.4. Модель на основе экспрессии нескольких генов для предсказания исхода программы ВРТ	93
3.4.1. Предварительный отбор генов с помощью полногеномного транскриптомного анализа.....	93
3.4.2. Валидация модели на основе сочетаний генов с помощью ПЦР-РВ	95
3.5. Анализ метилирования генов <i>HOXA10</i> и <i>HOXA11</i> при повторных неудачных попытках ЭКО	101
3.5.1. Анализ метилирования генов с использованием секвенирования по Сэнгеру.....	102
3.5.2. Анализ метилирования генов с использованием секвенирования следующего поколения.....	106
3.6. Влияние эпигаллокатехин-3-галлата на транскриптом и эпигенетические характеристики эндометрия	110
3.6.1. Влияние эпигаллокатехин-3-галлата на метилирование промоторов генов <i>HOXA10</i> и <i>HOXA11</i>	110
3.6.2. Влияние эпигаллокатехин-3-галлата на транскриптом эндометрия....	113
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	122
ВЫВОДЫ	128
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	129
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	131
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	134

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Проблема бесплодия является одной из центральных проблем в акушерстве и гинекологии. Причиной бесплодия могут являться нарушения репродуктивной системы у одного или обоих супругов. Выявление конкретных причин бесплодия и последующая их коррекция часто способствуют естественному наступлению беременности, однако в ряде случаев требуется применение вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) [3,12]. Несмотря на развитие и совершенствование технологий оказания помощи при бесплодии, частота наступления беременности в программах ВРТ составляет около 30–45% [5]. Частота женского бесплодия составляет около 50%, мужского — 20–30%, а еще в 20–30% случаев отмечают сочетание женского и мужского фактора бесплодия [8]. У женщин с чисто женским или сочетанным бесплодием на течение беременности негативное влияние оказывают в том числе и те факторы, которые обусловили женское бесплодие до использования ВРТ. В связи с этим для улучшения результатов программ ВРТ предварительно необходимо провести коррекцию заболеваний, способных оказывать негативное влияние на зачатие и течение беременности [2].

В основе многих случаев бесплодия лежит нарушение рецепторных взаимодействий между бластоцистой и эндометрием [15]. В научной литературе часто используется понятие «рецептивность эндометрия» (РЭ), обозначающее сложный комплекс структурно-функциональных характеристик эндометрия с определёнными временными и пространственными параметрами [106]. Эмбрион имеет возможность имплантироваться в подготовленный эндометрий, причём это возможно только в определённый период менструального цикла, называемый «окном имплантации». Этому периоду соответствует конец ранней секреторной фазы и начало средней секреторной фазы (6-8-й день после пика ЛГ) [112]. В

эндометрии экспрессия молекулярных и иммуногистохимических маркёров «окна имплантации» сочетается с ключевыми морфологическими изменениями ткани. Одними из основных ультраструктурных образований, участвующих в формировании РЭ, являются пиноподии — микроскопические выпячивания на апикальной поверхности эпителиальных клеток эндометрия, обнаруживаемые именно во время «окна имплантации». Роль данных образований до конца не ясна, однако установлено, что основные рецепторы для прикрепления бластоцисты располагаются преимущественно на поверхности пиноподий [112].

Циклические изменения эндометрия у женщин репродуктивного возраста происходят по аналогии с развитием тканей и органов у эмбриона. Известно, что многие гены, традиционно считавшиеся регуляторами эмбрионального развития, участвуют в контроле циклической трансформации эндометрия в течение менструального цикла [41]. Большое внимание в настоящее время уделяется роли семейства *НОХ*-генов. В последние годы была показана важная роль продуктов экспрессии генов *НОХА10* и *НОХА11* в реализации репродуктивного потенциала у женщин. Данные гены экспрессируются в ядрах эпителия желез и строме эндометрия; в период «окна имплантации» их экспрессия значительно возрастает и остается повышенной до конца менструального цикла. При этом пик экспрессии *НОХА10* и *НОХА11* приходится именно на период «окна имплантации», что позволяет предположить важную роль продукта экспрессии данного гена в процессе имплантации эмбриона [41]. Гены *НОХА10* и *НОХА11* кодируют транскрипционные факторы, существенные для РЭ и имплантации эмбриона. В ряде исследований показано, что у женщин с различными заболеваниями репродуктивного тракта снижение экспрессии *НОХА10* и *НОХА11* в период «окна имплантации» приводит к снижению частоты имплантации [41]. Таким образом, к числу ключевых регуляторов процессов РЭ, предопределяющих фертильность, принадлежат гены *НОХА10* и *НОХА11* и кодируемые ими белки. При этом одним из основных способ регуляции экспрессии генов *НОХА10* и *НОХА11* является метилирование промоторов их генов. Статус метилирования этих генов изучен при

многих заболеваниях женских половых органов и различных типах бесплодия, однако при трубно-перитонеальном факторе бесплодия с несколькими неудачными попытками ЭКО в анамнезе роль метилирования промоторов генов *HOXA10* и *HOXA11* остается малоизученной [129].

Постоянно ведется поиск других молекулярно-генетических маркеров РЭ и прогноза успешности программ ВРТ. Так, один из наиболее известных тестов, оценивающих статус рецептивности эндометрия, носит название ERA (от англ. Endometrial receptivity analysis) и включает 238 генов, совместная оценка экспрессии которых позволяет классифицировать эндометрий как пререцептивный, рецептивный или пострецептивный и дать индивидуальные рекомендации по смещению дня переноса эмбриона (ПЭ) в программах ВРТ [17,137]. Однако данный тест валидировался только в естественном цикле или в цикле заместительной гормональной терапии (ЗГТ) и не исследовался у женщин с многократными неудачными попытками ВРТ в анамнезе. Более того, выбор индивидуального дня ПЭ в соответствии с результатами теста ERA не приводил к значимым изменениям частоты развития беременности [38]. Всё это делает актуальным дальнейший поиск маркеров рецептивности и успешности программ ВРТ, особенно в группе женщин с неоднократными неудачными попытками ЭКО в анамнезе, чему и посвящено данное научное исследование

Степень разработанности темы исследования

Вопросы бесплодия и поиска морфологических и молекулярно-генетических предикторов успешности ВРТ активно исследуются российскими и зарубежными научными группами ввиду высокой актуальности данной проблемы. Такие понятия, как «рецептивность эндометрия» (РЭ) и «окно имплантации», были впервые обозначены и затем более подробно раскрыты в работах Adams E. C., Baird D. D., Bartlett M. K., Gillam J. S., Grunfeld L., Hertig A. T., Jones G. E. S., Navot T.,

Noyes R. W., Psychoyos A., Rock J., Weinberg C. R., Wentz A. C., Wilcox A. J. и других зарубежных ученых.

Хотя многими авторами были изучены морфологические изменения в ткани эндометрия, создающие условия для успешной имплантации и развития эмбриона, и регуляция этих изменений гормонами и другими факторами, однако продолжается изучение молекулярно-генетических основ данных процессов, поиск генов, ответственных за РЭ и успешное развитие беременности. Роль генов *HOXA10* и *HOXA11* в развитии женского репродуктивного тракта, их связь с заболеваниями акушерско-гинекологического профиля и бесплодием активно изучалась в работах Arici A., Bagot C., Benson G. V., Daftary G. S., Dey S. K., Fei X., Igarashi P., Kardana A., Lim H., Maas R.L., Olive D., Paria B. C., Satokata I., Taylor H. S., Troy P. J., Van den Heuvel G. B. и др. Однако остается малоизученной роль данных генов и метилированиях их промоторов как механизма изменения экспрессии генов при неоднократных неудачных попытках экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) в анамнезе в сочетании с трубно-перитонеальным фактором бесплодия и исключением других факторов бесплодия и заболеваний репродуктивной системы.

В ряде работ, посвященных поиску маркеров РЭ и предикторов исходов ВРТ, выдвигается предположение о невозможности найти универсальные гены-маркеры, поскольку сложные процессы имплантации и развития беременности контролируются большим числом генов, в связи с чем оценка РЭ и прогнозирование беременности должно опираться на целые панели генов. В поиске и разработке таких панелей принимали участие такие ученые, как Alamá P., Arslan M., Blesa D., Bocca S., Cadesky K., Cardone V. R. S., Carranza F., Carrera J., Churikov D., Corica A., Diaz J. I., Díaz-Gimeno P., Esteban F. J., Fernández-Sánchez M., Gómez E., Grunert G. M., Horcajadas J. A., Keefe D. L., Kliman H. J., Martínez-Conejero J. A., McSweet J. C., Mirkin S., Oehninger S., Pellicer A., Ruiz-Alonso M., Simón C., Vilella F., Williams S. и др.

В последние годы вопросы оценки РЭ и прогноза программ ВРТ активно изучаются и в России. Существенный вклад в изучение данной проблемы внесли Г. Т. Сухих, Л. В. Адамян, В. Н. Прилепская, Е. А. Калинина, А. В. Асатунова, О. В. Бурменская, Т. А. Демура, Н. В. Долгушина, М. М. Зиганшина, Е. А. Коган, Н. Г. Мишиева, Е. Б. Рудакова, Н. И. Тапильская, Н. М. Файзуллина и другие российские специалисты.

Следует отметить, что диагностические панели при оценке РЭ и прогнозировании исходов программ ВРТ чаще всего составляются на основе тех генов, которые обладают наибольшей дифференциальной экспрессией в исследуемых группах биологических образцов. Вместе с тем существует подход, когда поиск диагностических и прогностических генетических панелей проводится по всем известным генам вне зависимости от индивидуальных различий их экспрессии в изучаемых группах. Биологический смысл поиска таких панелей заключается в том, что разные гены могут воздействовать на одни и те же сигнальные пути и биологические процессы, поэтому слабовыраженный сдвиг экспрессии каждого из таких генов в сумме может приводить к выраженному эффекту. Поиск таких панелей для предсказания РЭ и прогноза программ ВРТ остается актуальным вопросом акушерства и гинекологии.

Также следует отметить, что результаты тестов, оценивающих РЭ, сопровождаются рекомендациями об изменении дня ПЭ в программах ВРТ на основе расчета индивидуального окна имплантации, в то время как вопрос терапевтических воздействий, способных изменить эпигенетические и генетические особенности эндометрия в благоприятную для успешной имплантации сторону, требует дальнейшего изучения.

Цель исследования

Индивидуализация программ вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток с трубно-перитонеальным фактором бесплодия и неудачными попытками ЭКО в анамнезе на основании изучения роли транскриптома эндометрия и метилирования промоторов ключевых генов эндометрия.

Задачи исследования

1. Сопоставить данные анамнеза, параметров клинического, соматического и гормонального статуса пациенток в зависимости от наступления беременности в программах вспомогательных репродуктивных технологий.
2. Проанализировать транскриптом эндометрия в секреторную фазу менструального цикла у пациенток в зависимости от исходов программ вспомогательных репродуктивных технологий.
3. Оценить уровень метилирования промоторов ключевых генов у пациенток при различных исходах программ вспомогательных репродуктивных технологий.
4. Изучить влияние эпигаллокатехин-3-галлата на транскриптом эндометрия и профиль метилирования промоторов ключевых генов у пациенток с трубно-перитонеальным фактором бесплодия с неудачными попытками ЭКО и гиперплазией эндометрия в анамнезе.
5. Разработать алгоритм персонифицированной подготовки и проведения программы ВРТ у пациенток с трубно-перитонеальным фактором бесплодия и неудачными попытками ЭКО в анамнезе на основании выявленных молекулярно-генетических особенностей эндометрия.

Научная новизна

В результате проведенного исследования впервые проведена оценка роли метилирования промоторов генов *HOXA10* и *HOXA11* в исследуемой группе пациенток. Выявлены специфические изменения транскриптома эндометрия в «окно имплантации», связанные с наступлением и ненаступлением беременности в программе ВРТ у пациенток с трубно-перитонеальным фактором бесплодия и неоднократными неудачными попытками ЭКО в анамнезе.

Разработана модель прогноза исходов программ ВРТ у пациенток с ТПФ бесплодия и неоднократным неудачными попытками ЭКО, основанная на экспрессии функционально и гомологично связанных генов без предварительного отбора генов с наибольшей индивидуальной прогностической ценностью и дифференциальной экспрессией.

Оценено влияние эпигаллокатехин-3-галлата на метилирование промоторов генов *HOXA10* и *HOXA11* и особенности транскриптома эндометрия у пациенток с ТПФ бесплодия с неоднократными неудачными попытками ЭКО и гиперплазией эндометрия в анамнезе.

Теоретическая и практическая значимость

Определены наиболее значимые клиничко-анамнестические предикторы исхода программ ВРТ в исследуемой группе пациенток.

Обоснована целесообразность индивидуализированного подхода к проведению программ ВРТ у пациенток с ТПФ бесплодия и неудачными попытками ЭКО в анамнезе в зависимости от уровня экспрессии выявленных ключевых генов эндометрия.

Разработан алгоритм персонифицированной подготовки и проведения программы ВРТ у пациенток с ТПФ бесплодия и неоднократными неудачными

попытками ЭКО в анамнезе с учетом молекулярно-генетических особенностей эндометрия.

Методология и методы исследования

Проведено обследование 78 пациенток с трубно-перитонеальным фактором бесплодия и неоднократными неудачными попытками ЭКО в анамнезе, подписавших добровольное информированное согласие на участие в исследовании, на базе ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России

Перед началом программы ВРТ всем пациенткам проведено полное клинико-лабораторное обследование в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации № 107н. Затем всем женщинам (N=78) в цикле, предшествующем стимуляции суперовуляции, была выполнена аспирационная пайпель-биопсия эндометрия в период «окна имплантации» (на 5–7 день после произошедшей овуляции). Далее, части пациенток (n=12), у которых в период 6 месяцев до вступления в исследование в анамнезе была выявлена и пролечена гиперплазия эндометрия, был рекомендован приём эпигаллокатехин-3-галлата в дозе 50 мг 3 р/сут. в течение 1 месяца. После чего этим пациенткам повторно была проведена пайпель-биопсия эндометрия в период «окна имплантации». После проведения пайпель-биопсии (однократно или двукратно) пациенткам проводилось лечение бесплодия методом ВРТ. Проводился анализ исхода программ ВРТ в зависимости от различных факторов, включая молекулярно-генетические особенности эндометрия.

Из специальных методов обследования проводилось гистологическое исследование биоптатов эндометрия; выделение ДНК и РНК из образцов эндометрия, бисульфитная конверсия и секвенирование следующего поколения (NGS, next generation sequencing) для определения уровня метилирования промоторов генов *HOXA10* и *HOXA11*; полногеномный транскриптомный анализ с микрочипами; полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в реальном

времени (ОТ-ПЦР-РВ) для оценки уровня экспрессии генов. Также проводилась оценка степени зрелости, качества ооцитов, оценка качества эмбрионов согласно классификации Гарднера («модифицированная» классификация D. Gardner).

Положения, выносимые на защиту

1. У пациенток с трубно-перитонеальным фактором бесплодия и неудачными попытками ЭКО в анамнезе среди клиничко-анамнестических показателей наиболее значимыми предикторами исхода программ ВРТ являются возраст пациентки, наличие воспалительных заболеваний органов малого таза в анамнезе, уровень АМГ и длительность бесплодия, что позволило создать модель прогноза исходов лечения с информативностью 42,6%.

2. Модель, разработанная на основе экспрессии генов *MSX1 (HOX7)*, *HOXA11* и *TP53I3* в эндометрии, позволяет прогнозировать исходы программ ВРТ у пациенток с трубно-перитонеальным фактором бесплодия и неудачными попытками ЭКО в анамнезе с чувствительностью 73% и специфичностью 71%.

3. Применение эпигаллокатехин-3-галлата у пациенток с трубно-перитонеальным фактором бесплодия с неудачными попытками ЭКО и гиперплазией эндометрия в анамнезе позволяет снизить метилирование промотора гена *HOXA10* и изменить экспрессию ключевых генов, определяющих исход программ ВРТ.

Личный вклад автора

Автор участвовал в формулировании темы диссертации, постановке цели и определении задач работы; осуществлял сбор клиничко-анамнестических данных, обследование и сопровождение пар на всех этапах лечения бесплодия методом ВРТ; принимал непосредственное участие в клиничко-лабораторных исследованиях, анализе и интерпретации полученных данных. Автором

сформулированы основные положения и выводы диссертационной работы, разработаны практические рекомендации.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют коду специальности 14.01.01 – «акушерство и гинекология» (медицинские науки). Результаты проведенного исследования относятся к области исследования специальности, конкретно пунктам 4 и 5 паспорта акушерства и гинекологии.

Апробация результатов

Основные положения работы были представлены на межклинической конференции. Диссертация апробирована и рекомендована к защите на заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России 07.12.2020 г. (протокол №32).

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены и используются в практической работе отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия (заведующий – д. м. н., профессор Калинина Е. А.), лаборатории молекулярно-генетических методов (заведующий – к. м. н. Донников А. Е.) ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России (директор – академик РАН, профессор Сухих Г. Т.). Материалы и результаты исследования включены в лекции и практические занятия для клинических ординаторов и аспирантов ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России.

По теме диссертации опубликовано 5 научных работ, из них 5 изданы в научных журналах из перечня рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ для публикации.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 149 страницах компьютерной верстки, иллюстрирована 33 таблицами и 21 рисунком, состоит из введения, обзора литературы, двух глав, посвященных материалам и методам и собственным результатам, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений и списка литературы, содержащего 153 литературных источника зарубежных и отечественных авторов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Бесплодие и рецептивность эндометрия

Проблема бесплодия является одной из центральных проблем в акушерстве и гинекологии. Причиной бесплодия могут являться нарушения репродуктивной системы у одного или обоих супругов. Выявление конкретных причин бесплодия и последующая их коррекция часто способствуют естественному наступлению беременности, однако в ряде случаев требуется применение вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Несмотря на развитие и совершенствование технологий оказания помощи при бесплодии, потери беременности на различных ее сроках сохраняются достаточно высокими и составляют по разным данным от 20 до 30% [6].

Эндометрий человека является уникальной тканью, в которой происходит регулярная циклическая смена процессов пролиферации, дифференцировки и десквамации. Эта сложная трансформация является прямым отражением различных функций эндометрия: с одной стороны, он должен обеспечить имплантацию развивающегося эмбриона в циклах с успешным оплодотворением и создавать условия для инвазии трофобласта; с другой стороны, эндометрий должен ограничить чрезмерно агрессивную инвазию трофобласта для предотвращения повреждения матки; наконец, в циклах с отсутствием имплантации или нарушениями развития эмбриона эндометрий должен подвергнуться отторжению, а затем регенерировать для подготовки к следующей потенциальной беременности. Ни одна другая ткань человеческого организма не подвергается настолько радикальному изменению своей биологии, эндокринологии, структуры и функций с многократным повторением циклов изменений. В связи с этим оценка функции эндометрия является очень сложной, комплексной задачей, а понимание причин нарушения функционирования эндометрия, их диагностика и разработка методов лечения представляют собой нетривиальную задачу современной медицины [95].

Функциональная и структурная сложность эндометрия придает ему точный и избирательный потенциал, что, в свою очередь, позволяет развиваться только эмбрионам определенного качества в момент времени, когда организм женщины наиболее подготовлен к поддержанию успешной беременности [109].

В основе многих случаев бесплодия лежит нарушение рецепторных взаимодействий между бластоцистой и эндометрием. В научной литературе часто используется понятие «рецептивность эндометрия» (РЭ), обозначающее сложный комплекс структурно-функциональных характеристик эндометрия с определёнными временными и пространственными параметрами [106]. Эмбрион имеет возможность имплантироваться в подготовленный к этому эндометрий, причём это возможно только в определённый период менструального цикла, называемый «окном имплантации» (6-8-й день после пика ЛГ). Этому периоду соответствует конец ранней секреторной фазы и начало средней секреторной фазы. Морфологические изменения эндометрия являются определяющими для формирования «окна имплантации», однако также важную роль играет экспрессия молекулярных и иммуногистохимических маркеров в эндометрии в этот же период [15].

Неоднократные неудачные попытки программы ЭКО при проведенном полном объеме обследований у пациенток с бесплодием и при переносе им эмбрионов высокого качества указывают на то, что одной из причин бесплодия могут быть нарушения процессов имплантации эмбриона, связанные с нарушением РЭ [65].

В связи с этим представляет интерес изучение молекулярно-генетических особенностей эндометрия в имплантационный период, так как от состояния эндометрия в определенной степени зависят необходимые процессы в реализации репродуктивного потенциала у женщин. Одним из подходов к поиску маркеров рецептивности эндометрия и предсказания исходов программ ВРТ является полногеномный транскриптомный анализ с выявлением генов и их сочетаний, влияющих на процесс имплантации эмбриона.

1.2. Транскриптомные маркеры рецептивности и исходов программ ВРТ

Такие процессы в эндометрии, как образование пиноподий и изменение их морфологических свойств, появление специфических белков в мембране клеток, выделение специфических сигнальных и регуляторных молекул, регулируются на уровне экспрессии генов. В процессе транскрипции генов образуются молекулы матричной РНК (мРНК), с которых затем могут быть транскрибированы пептидные последовательности. Совокупность мРНК клетки называется транскриптомом, а его оценка позволяет измерить степень активности различных генов и выявить маркеры, связанные с нормальной и патологической беременностью, благоприятными и неудачными исходами беременности и программ ВРТ [92].

Один из подходов к прогнозированию РЭ и исходов программ ВРТ — это выявление отдельных генов, экспрессия которых значительно отличается у разных групп пациентов. В результате развития такого подхода было выявлено множество потенциальных маркеров, таких как гены фактора LIF, субъединиц интегрина $\alpha v \beta 3$, белка p27, циклина E, рецептора прогестерона, гены *HOXA10* и *HOXA11* и др., экспрессия которых может значительно повышаться или понижаться при нарушениях РЭ, имплантации эмбриона и поддержании беременности [95]. Однако такие методы, как полногеномное транскриптомное профилирование с помощью гибридационных чипов или секвенирования последовательностей нуклеиновых кислот, позволяют строить более сложные математические модели с учетом экспрессии целых наборов генов, что может значительно улучшать диагностические и предсказательные модели.

В результате реализации такого подхода был разработан так называемый тест ERA (от англ. Endometrium Receptivity Analysis, тест РЭ), который позволяет оценивать наступление «окна имплантации» и РЭ на основе экспрессии 238 генов [17]. Каждый из этих генов статистически значимо отличался между группами образцов эндометрия, классифицированных как пререцептивный, рецептивный или пострецептивный эндометрий. При этом для оценки РЭ на основе всех 238

генов используется специальная математическая модель, учитывающая экспрессию каждого из этих генов. Данная модель была построена в результате анализа образцов эндометрия в естественном цикле или в цикле ЗГТ [137,139] и не была валидирована на образцах в программах ВРТ с контролируемой гормональной стимуляцией овуляцией. Тест ERA проводится на образце эндометрия, взятом спустя 7 дней с момента пика ЛГ, или спустя 6 дней после овуляции при контроле с помощью УЗИ, или спустя 5 дней с момента начала стимуляции цикла с помощью ЗГТ. В результате проведения теста эндометрий в данный день цикла оценивается как рецептивный, пререцептивный или пострецептивный. Первый вариант оценки позволяет рекомендовать ПЭ в этот же день следующего цикла, а оценка «пререцептивный» или «пострецептивный» означает сдвиг «окна имплантации» и связана с рекомендацией перенести день ПЭ [137,139]. Было показано, что оценка сдвига «окна имплантации» у одних и тех же пациентов сохранялась одинаковой спустя 29–40 месяцев после первого анализа [137], что указывает на хорошую воспроизводимость результата. В то же время остается неясным, насколько состояние РЭ по тесту ERA может предсказывать исход программы ВРТ. Так, было показано, что только у 50% пациентов, имеющих рецептивный эндометрий по результатам тест ERA, наблюдалось зачатие в следующем цикле ВРТ, в то время как среди пациентов с пре- и пострецептивным эндометрием, которым был произведен сдвиг дня ПЭ, зачатие произошло только у 33,3%, что практически совпадает с результатом у женщин, которым не производился тест ERA (35,2%) [38]. Другие исследователи показали, что применение теста ERA было связано с улучшением частоты имплантации и беременности, хотя различия не достигали статистической значимости [141]. Были опубликованы предварительные результаты рандомизированного контролируемого исследования (РКИ) применения теста ERA у женщин, впервые проходящих процедуру ЭКО [88]. Основным изучаемым исходом являлось рождение живого ребенка, а вторичными точками оценки являлись частоты наступления беременности и имплантации, а также биохимической беременности,

выкидышей, акушерских и неонатальных исходов. В первой попытке ЭКО не было выявлено значимого увеличения частоты рождения живых детей при использовании теста ERA по сравнению с переносом свежего эмбриона и криоэмбриона, но при анализе кумулятивной частоты рождения живых детей по сумме всех попыток ЭКО в течение года было отмечено статистически значимое преимущество теста ERA перед двумя другими протоколами ведения пациентов. Также частота имплантации и беременности была значимо выше в группе теста ERA как в первой попытке ЭКО, так и при кумулятивном анализе за год. Авторами сделан вывод о перспективности метода при первой попытке ЭКО и необходимости более крупных РКИ [88].

В ряде работ были обнаружены другие панели генов, связанные с РЭ. Так, в работе Norcajadas J. A. et al. был проведен анализ полногеномных исследований образцов эндометрия и был выявлен список из 25 генов, которые могут ассоциироваться с РЭ [69]. Предварительно было выявлено более тысячи генов, экспрессия которых была изменена в течение «окна имплантации» у женщин в естественном цикле [43,87,128]. Среди этих генов для 342 экспрессия изменяется при контролируемой стимуляции яичников [43,66], а для 52 генов — у пациенток с рефрактерным эндометрием [42]. При сравнении всех списков была получена панель из 25 пересекающихся генов, которые и являются, по предположению авторов, связанными с определением РЭ.

Также недавно был предложен тест оценки РЭ на основе анализа экспрессии панели из 40 генов с помощью метода ПЦР-РВ. Данные гены были выявлены в результате анализа образцов эндометрия в средней лютеиновой фазе. Интересно, что результаты анализа с помощью этого набора генов совпадали с результатами теста ERA более чем в 90% случаев, хотя общими в двух тестах являлись лишь 7 генов [31]. И вместе с тем все упомянутые панели генов не анализировались в плане предсказания исходов программ ВРТ. Всё это делает перспективным дальнейший поиск наборов генов, которые могут быть ассоциированы с РЭ и помогут

предсказывать вероятность наступления беременности у каждой пациентки и давать персональные рекомендации по ведению программ ВРТ.

В результате проведения полногеномных транскриптомных исследований не было выявлено отдельных генов, безусловно являющихся ключевыми в определении РЭ и исходов программ ВРТ. Это может быть связано с тем, что образцы мРНК выделяются из большого количества клеток, входящих в состав биопсийного образца эндометрия, при этом функционально активные клетки, экспрессирующие основные факторы РЭ, составляют лишь малую долю от всех клеток в образце, поэтому крупные скачки экспрессии ключевых факторов в данных клетках могут остаться незамеченными на фоне стабильной экспрессии этих факторов в остальных клетках. И наоборот, гены, экспрессия которых меняется во всей массе клеток, необязательно являются теми ключевыми маркерами, которые играют основную роль в функционально активных клетках. В связи с этим фактором результаты полногеномного транскриптомного анализа зачастую не совпадают с анализом экспрессии единичных генов [87].

Также существует теория, что РЭ определяется экспрессией совокупности определенных генов, без преобладающей роли каких-либо из них [92]. При этом отдельные гены в составе данной совокупности могут не различаться значимо по экспрессии в исследуемых группах, однако общий кумулятивный эффект этих генов приводит к различиям в состоянии эндометрия и исходах программ ВРТ. Ранее такой подход к поиску значимых диагностических сочетаний генов, состоящих из генов без индивидуальной прогностической ценности, был применен для поиска маркеров прогноза онкологических заболеваний [67,110]. В этих исследованиях гены с низкой экспрессией в тканях и незначимыми различиями экспрессии у разных групп пациентов позволяли получить совокупную модель из нескольких генов с высокой диагностической точностью. Это может объясняться тем, что каждый из этих генов участвует в регуляции определенного блока биологических процессов в клетке, поэтому небольшое изменение экспрессии каждого из этих генов в совокупности приводит к выраженному эффекту на весь

блок процессов в клетке. Поиск аналогичных транскриптомных панелей для предсказания РЭ и исходов программ ВРТ является актуальной задачей современной медицины. При этом следует помнить уже упомянутый ранее факт, что результаты полногеномного анализа и направленного анализа экспрессии отдельных генов могут не совпадать между собой, поэтому важно проводить валидацию полногеномных исследований такими прицельными методами, как ПЦР.

Ранее было обнаружено, что особую роль в развитии женских репродуктивных органов, а также в созревании эндометрия, формировании «окна имплантации» и определении РЭ играют так называемые НОХ-гены.

1.3. НОХ-гены как регуляторы молекулярно-генетических особенностей эндометрия

1.3.1. История изучения НОХ-генов

Впервые НОХ-гены были открыты как гены, связанные с сегментацией тела животных. Для онтогенеза большинства животных, включая человека, характерен процесс сегментации — разделения эмбриона на отдельные сегменты. Данный процесс контролируют 2 группы генов:

- 1) гены сегментации (эти гены делят зародыш на ряд участков, определяя число сегментов, их размер и полярность каждого сегмента);
- 2) селекторные гены (гены, определяющие уникальные свойства каждого сегмента. Наиболее хорошо изученными генами данной группы являются гомеозисные гены у *Drosophila melanogaster* [103,104]).

Всего в геноме дрозофилы было обнаружено 8 гомеозисных генов, входящих в состав 2-х комплексов. Lewis E. в 1948 г. обнаружил соответствие между порядком расположения генов одного из этих комплексов в хромосоме и порядком расположения сегментов, за развитие которых они отвечают, вдоль переднее-

задней оси тела. Группой исследователей DeRobertis E. et al. в 1984 году был выявлен первый гомеозисный ген позвоночного [30,153]. В дальнейшем такие гены были обнаружены у многих видов животных, в том числе и у человека.

Было выявлено, что все эти гены имеют общие нуклеотидные последовательности длиной около 180 пар оснований, которые получили название гомеобокс (homeobox). В связи с этим данные гены стали называть гомеобокс-содержащими генами, или НОХ-генами. Все гомеозисные гены кодируют ядерные белки, которые функционируют как факторы транскрипции. Коллинеарный гомеобоксу участок молекулы белка называется гомеодоменом — именно эта область белковой молекулы ответственна за связывание регуляторного белка с промотором гена-мишени. Таким образом, гомеозисные гены регулируют работу многих других генов и определяют индивидуальные свойства различных сегментов эмбриона [68].

Всего у человека имеется 39 НОХ-генов, которые подразделяются на 4 кластера: А, В, С и D. Большинство мутаций приводят к формированию нежизнеспособного эмбриона. С другой стороны, высокая степень гомологии между НОХ-генами разных кластеров приводит к функциональной избыточности, за счет чего один НОХ-ген может компенсировать утрату функции вследствие мутации другого НОХ-гена [117].

Часть членов семейства НОХ-генов экспрессируется в эмбриональном периоде человека в определенных зонах вдоль вольфовых и мюллеровых протоков. Ген *НОХА9* экспрессируется на участке мюллерова протока, дающем начало маточной трубе, *НОХА10* — в развивающейся матке, *НОХА11* — в области будущих тела и шейки матки, а *НОХА13* — на месте будущей шейки матки и верхней трети влагалища [90]. Точечные мутации этих генов вызывают развитие дефектов на том месте репродуктивного тракта, за которое ответственен тот или иной ген. Несмотря на то, что раньше считалось, что экспрессия НОХ-генов происходит во время эмбрионального этапа развития, сейчас показано, что у взрослого организма также происходит экспрессия этих генов, однако не столь

активно. Например, у женщины экспрессия генов *HOXA9–13* происходит в тех же участках репродуктивного тракта, что и у эмбриона женского пола [90].

Таким образом, после эмбрионального периода экспрессия НОХ-генов значительно снижается в организме человека, но эндометрий является одной из немногих тканей, где экспрессия данных генов продолжается и во взрослом организме [64].

1.3.2. Регуляция экспрессии НОХ-генов

На настоящий момент нет четкой концепции того, как происходит регуляция экспрессии НОХ-генов. Продолжается исследование межклеточных сигналов и транс-активирующих факторов, которые управляют экспрессией НОХ-генов [121,127]. Однако нет сомнений в том, что процесс регуляции этих генов очень сложен и многостадийен.

Известно, что на экспрессию генов *HOXA10* и *HOXA11* влияют стероидные гормоны, включая прогестерон и эстрогены. При этом максимальная экспрессия *HOXA10* и *HOXA11* достигается при совместном воздействии обоих гормонов [28,33,136]. В одном из исследований было показано, что при введении синтетического аналога эстрогена диэтилstilбестрола (DES) беременным самкам мышей происходит значительное снижение экспрессии *HOXA10* гена. В связи с этим возникает нарушение формирования репродуктивного тракта как у эмбрионов мужского пола, так и у эмбрионов женского пола. Именно этим объясняются некоторые тератогенные эффекты DES. Также продемонстрировано, что при блокировании рецепторов прогестерона его антагонистом RU486 экспрессия *HOXA10* гена подавляется [18,108]. Было выявлено, что ген *HOXA11* регулируется схожим образом. В опытах *in vitro* и *in vivo* было показано, что физиологические концентрации прогестерона вызывают дозозависимое увеличение экспрессии *HOXA11* [133,150]. Именно эта регуляция стероидными гормонами экспрессии *HOXA10* и *HOXA11* лежит в основе различной экспрессии этих генов в течение

одного менструального цикла. Однако механизм регуляции остается на настоящий момент мало изученным.

Было обнаружено, что транскрипция *НОХА*-генов также может регулироваться путем конденсации и выпетливания ДНК в области кластеров *НОХ*-генов, кроме того, была изучена трехмерная структура и белковые взаимодействия при данных изменениях организации хроматина [142].

Немаловажную роль в контроле экспрессии *НОХ*-генов играет эпигенетическая регуляция. Метилирование ДНК относится к одному из двух основных видов эпигенетической регуляции наряду с модификацией гистонов [126]. Метилирование ДНК обычно происходит по 5-му углероду цитозина с образованием метилцитозина и играет значительную роль в регуляции экспрессии генов [49]. У млекопитающих метилирование наблюдается преимущественно в CpG динуклеотидах, или CpG-островках, то есть по цитозину, за которым следует гуанин. Когда CpG-островки промотора гена метилируются, экспрессия соответствующего гена подавляется на уровне транскрипции. Состояние повышенного метилирования может стабильно поддерживаться в течение многих поколений клеток. Для этого существует специальный механизм, обеспечивающий присоединение метильных групп в местах, аналогичных тем, где уже произошло метилирование в другой цепи ДНК. Механизм действия метильных групп заключается в том, что они нарушают взаимодействие ДНК с транскрипционным фактором. Выступая в большую бороздку ДНК, метильные группы препятствуют связыванию транскрипционных факторов. Кроме того, метилированные участки ДНК могут взаимодействовать с транскрипционными репрессорами типа MeCP2, являющегося составной частью белкового регуляторного комплекса [36,120].

Инактивация *НОХ*-генов путем метилирования их промоторов достаточно хорошо была изучена при эндометриозе. Исследования сначала на животных, а потом на людях показали, что при эндометриозе снижен уровень экспрессии *НОХА11* и *НОХА10*, однако повышен уровень метилирования генов этого кластера [20,25,101]. Более того, ферменты, катализирующие метилирование ДНК, в

частности ДНК-метилтрансферазы (DNMT) 1, 3А и 3В, были гиперэкспрессированы в эпителиальном компоненте эктопической эндометриоидной ткани в сравнении с нормальным контролем, а в эутопической ткани также была повышена экспрессия DNMT 3А [19], что может объяснять наблюдаемое при эндометриозе повышенное метилирование и пониженную экспрессию генов *HOXA10* и *HOXA11*.

1.3.3. Влияние *HOXA10* и *HOXA11* на гены-мишени

Белки *HOXA10* и *HOXA11* являются транскрипционными факторами, способными регулировать экспрессию целого ряда генов-мишеней, за счет чего и достигается их биологическая функция. Был обнаружен целый ряд генов-мишеней данных белков, который может объяснять роль генов *HOXA10* и *HOXA11* в эндометрии.

Цитоскелет млекопитающих частично состоит из кератиновых филаментов, образующих сложную динамичную внутриклеточную систему. Было проведено исследование экспрессии цитокератина 15 (СК15) в человеческом эндометрии и ее регуляции с помощью *HOXA10* в клеточной линии человеческого эндометрия. С помощью ИГХ было показано, что экспрессия белка СК15 в период окна имплантации (с 16 по 23 день цикла) в железистом эпителии снижается на 50% от уровня в пролиферативную фазу. С помощью ПЦР выявлено, что введение в клеточную линию человеческого эндометрия Ishikawa вектора с геном *HOXA10* приводит к снижению уровня мРНК СК15 на 99%. Таким образом, пик экспрессии *HOXA10* совпадает со снижением экспрессии СК15 в период окна имплантации. Значимые изменения клеточной архитектуры в период секреторной фазы необходимы для подготовки окна имплантации, а *HOXA10* участвует в регуляции данного процесса, обеспечивая РЭ [91].

FKBP4 и FKBP5 являются кошаперонами рецептора прогестерона, соответственно повышая и понижая прогестерон-ассоциированную транскрипцию

генов. Была изучена экспрессия данных белков в эутопическом эндометрии женщин с эндометриозом и влияние данных белков на децидуализацию стромальных клеток эндометрия человека. Экспрессия мРНК *FKBP4* была повышена в течение поздней пролиферативной фазы и оставалась повышенной в течение секреторной фазы, а экспрессия *FKBP5* оставалась низкой и значимо не изменялась в течение всего цикла. При эндометриозе отмечалось снижение экспрессии *FKBP4*. При децидуализации *in vitro* экспрессия *НОХА10* и *FKBP4* повышалась параллельно. Гиперэкспрессия *НОХА10* в стромальных клетках эндометрия приводила к повышению мРНК и белка *FKBP4*, а подавление гена *НОХА10* снижало экспрессию *FKBP4*, что может указывать на прямую регуляцию экспрессии *FKBP4* с помощью *НОХА10* [60].

Детальный механизм адгезии и имплантации эмбриона изучен недостаточно полно. Было обнаружено, что матриксная металлопротеиназа-26 (*MMP-26*) является геном-мишенью, регулируемым с помощью *НОХА10* в эндометрии человека. *НОХА10* напрямую связывается с геном *MMP26* и регулирует экспрессию и секрецию белка в дозозависимой манере. При этом стимуляция гиперэкспрессии *MMP-26* в клеточной линии Ishikawa приводит к усилению адгезии сфероидов, образованных клетками человеческой хориокарциномы BeWo, а блокирование *MMP-26* специфичными антителами напротив снижает адгезию, что указывает на *НОХА10*-зависимую роль *MMP-26* в имплантации [22]. Кроме того, было обнаружено, что *НОХА10* активирует экспрессию *MMP-3* и приводит к активации p38 MAPK пути, что стимулирует адгезионные и инвазивные свойства клеток [75].

НОХА10 является регулятором, подавляющим активность другого транскрипционного фактора, *EMX2*, который также участвует в регуляции дифференцировки и развития производных мюллера протока у человека. Повышение экспрессии *НОХА10* в период окна имплантации приводит к подавлению экспрессии *EMX2*, причем как в экспериментах на мышах, так и в исследовании с участием людей [80].

Одним и наиболее изученных генов-мишеней *NOXA10* является ген интегрина $\beta 3$ (*ITGB3*), участвующего в межклеточных взаимодействиях и адгезии клеток. *NOXA10* приводит к повышению экспрессии мРНК *ITGB3* и белка интегрина $\beta 3$. Последний является компонентом димера $\alpha v\beta 3$, являющегося маркером РЭ у человека, уровень которого повышается в окно имплантации и значимо снижен у женщин с бесплодием и эндометриозом. Гиперметилирование гена *NOXA10* или ацетилирование белка *NOXA10* приводит к снижению экспрессии *ITGB3* [113].

С использованием иммунопреципитации хроматина был проведен скрининг мишеней *NOXA10* и обнаружен p300/CBP-ассоциированный фактор (p/CAF), являющийся прямой мишенью *NOXA10 in vivo*. Аденовирус-ассоциированное усиление экспрессии *NOXA10* и подавление экспрессии *NOXA10* с помощью РНК-интерференции изменяло активность промотора p/CAF, поскольку *NOXA10* способен взаимодействовать с тремя последовательными ТТАТ-элементами данного промотора в клетках эндометрия человека [79]. В то же время сам p/CAF способен ацетилировать белок *NOXA10* и снижать таким образом РЭ [113].

Было показано, что ген фактора роста фибробластов 2 (*FGF2*) является мишенью *NOXA10*, обеспечивая некоторые биологические эффекты последнего. Экспрессия и секреция *FGF2* оказалась зависима от экспрессии *NOXA10*, а повышенное содержание *FGF2* приводит к активации фосфоинозитол-3-киназы и увеличению белка β -катенина. Это в свою очередь приводит к аутокринной стимуляции пролиферации и повышенную чувствительность к другим цитокинам данного пути в *NOXA10*-гиперэкспрессирующих клетках [76].

Также в качестве гена-мишени *NOXA10* был определен ген трансформирующего фактора роста $\beta 2$ (*TGF\beta 2*). *NOXA10* активирует транскрипцию *TGF\beta 2* путем взаимодействия с тандемными *cis*-элементами промотора его гена, что также приводит к аутокринной стимуляции пролиферации клеток [77].

Ген гомеодомен-содержащего транскрипционного фактора *CDX4* является прямой мишенью *NOXA10*, а *CDX4* в свою очередь имеет сайты связывания в промоторе гена *NOXA10*. Оба названных регулирующих воздействия являются активирующими, поэтому *NOXA10* повышает экспрессию *CDX4*, который в свою очередь еще более усиливает экспрессию *NOXA10*. Нокадаун гена *CDX4* в клетках с гиперэкспрессией *NOXA10* приводит к снижению гиперчувствительности к цитокинам [70].

NOXA10 имеет два сайта связывания в промоторе гена *ARIH2*, кодирующего белок *Triad1*. *Triad1* имеет E3-убиквитинлигазную активность, и активация *NOXA10* приводит к усилению убиквитинилирования белков и снижению пролиферации клеток. Это может указывать, что повышение экспрессии *Triad1* при гиперэкспрессии *NOXA10* является механизмом отрицательной обратной связи, контролирующей процессы деления клеток [74].

Анализ с помощью микрочипов выявил 40 генов-мишеней *NOXA10*, уровень экспрессии которых изменяется в ответ на изменение активности гена *NOXA10* в период периимплантации у мышей. Среди данных мишеней авторы особо отмечают гены фосфоглицерат-3-дегидрогеназы (ключевой фермент биосинтеза L-серина) и белка кластерина. В целом указанные 40 генов, экспрессия 31-го из которых подавляется *NOXA10* и девяти — стимулируется, относятся к онтогенетическим группам молекул клеточной адгезии, факторов передачи сигнала и метаболических регуляторов [148].

Прямой мишенью *NOXA10* является ген *IGFBP1*, кодирующий инсулиноподобный фактор роста (ИФР)-связывающий белок 1, участвующий в децидуализации клеток эндометрия. Снижение экспрессии *IGFBP1* при гиперэкспрессии *NOXA10* и возрастание мРНК *IGFBP1* при сайленсинге *NOXA10* было показано на эндометрии бабуинов и в клетках эндометрия человека [25]. Также *NOXA10* способен повышать транскрипцию гена *DUSP4*, кодирующего митоген-активируемую фосфатазу протеинкиназ 2 (МКР2). Через воздействие на

экспрессию данного белка *HOXA10* способен снижать апоптоз и повышать жизнеспособность клеток [71].

Введение в клетки вектора, содержащего гиперэкспрессируемый ген *HOXA10*, привело к повышению уровня экспрессии генов Wnt-пути, в частности гена лиганда *WNT10B* и рецепторов *FZD1* и *FZD5*. Также повысилась экспрессия генов *ERG*, *IRX3*, *VLCS-H1* и *ALDH1* (кодирует альдегиддегидрогеназу 1). *HOXA10* также подавлял экспрессию генов, вовлеченных в биосинтез гема, и трех генов глобинов, что может являться показателем подавления эритроидной дифференцировки [23].

В человеческом эндометрии экспрессируются гомеодомен-содержащие белки *PBX2* и *MEIS1*. В железистом компоненте эндометрия экспрессия *HOXA10* и *MEIS1* изменяется в течение различных стадий цикла, а экспрессия *PBX2* сохраняется постоянной. При этом в клеточной линии эндометрия человека *Ishikawa* наблюдается экспрессия лишь *PBX2*, но не *MEIS1*. Оказалось, что *HOXA10* может связываться в гетеродимер с *PBX2* и повышает таким образом экспрессию гена *EMX2*, являющегося мишенью *HOXA10*. При этом присоединение *MEIS1* с образованием тримера также приводит к стимуляции экспрессии *EMX2* [132]. Также было показано, что комплекс *HOXA10* с другим гомеодомен-содержащим белком, *PBX1A*, может приводить к подавлению экспрессии генов *СУВВ* и *NCF2* [78].

С помощью микрочипов был проведен скрининг генов-мишеней, регулируемых с помощью *HOXA11*. Подавление экспрессии *HOXA11* приводило к более чем двукратному повышению экспрессии 11 генов и снижению экспрессии 51 гена. Функциональная аннотация данных генов продемонстрировала их принадлежность к группам регуляторов роста, митохондриальных белков и регуляторов дигидропиримидиназной активности. Анализ функциональных сетей взаимодействия данных белков выявил наиболее значимые гены, экспрессия которых наиболее вероятно регулируется *HOXA11*: гены рецептора трансформирующего фактора роста бета 2 (*TGFBR2*), богатого цистеином

трансмембранного BMP-регулятора 1 (*CRIMI*), тиоредоксин-взаимодействующего белка (*TXNIP*), дигидропиримидиназоподобного белка (*DPYSL2*) и белка-медиатора ответа на коллапсин (*CRMP1*) [145].

Подавление экспрессии *HOXA11* в эндометрии приводило к изменению экспрессии генов-мишеней, общих с *HOXA10*, а именно к повышению экспрессии мРНК *EMX2* и *IGFBP1* и к снижению экспрессии мРНК *ITGB3* и гена ингибирующего лейкемию фактора (*LIF*). Данные изменения также были подтверждены на уровне белковых продуктов с помощью вестерн-блоттинга [124]. У самок мышей, мутантных по гену *HOXA11*, наблюдалось значительное снижение уровня экспрессии белка *LIF*, который является плеiotропным цитокином, необходимым для имплантации эмбриона и нормального протекания беременности [24,102].

Сам по себе *HOXA11* является ингибитором промотора гена *PRL* децидуального пролактина, однако в комплексе с *FOXO1A* он начинает активировать активность данного гена. Поскольку экспрессия *FOXO1A* повышается во время децидуализации, авторами был сделан вывод о децидуально-специфичной функции транскрипционного комплекса этого белка с *HOXA11* [81].

Таким образом, *HOXA10* и *HOXA11* регулируют широкий спектр генов, активность которых связана с клеточной адгезией, инвазией, выживаемостью, пролиферацией и поддержанием беременности. Именно благодаря этим регуляторным взаимодействиям *HOXA10* и *HOXA11* обеспечивают вклад в РЭ, поэтому снижение экспрессии генов *HOXA10* и *HOXA11*, ассоциированное с бесплодием, приводит к нарушению механизмов нормальной имплантации и развития беременности.

1.4. Роль НОХ-генов в женской репродуктивной системе

1.4.1. НОХ-гены в регуляции рецептивности эндометрия

Циклические изменения эндометрия у женщин репродуктивного возраста происходят по аналогии с развитием тканей и органов у эмбриона. Известно, что многие гены, традиционно считавшиеся регуляторами эмбрионального развития, участвуют в контроле циклической трансформации эндометрия в течение менструального цикла. Большое внимание в настоящее время уделяется роли семейства НОХ-генов. В последние годы была показана важная роль продуктов экспрессии генов *НОХА10* и *НОХА11* в реализации репродуктивного потенциала у женщин [40]. Данные гены экспрессируются в ядрах эпителия желез и строме эндометрия в различных участках матки; в период «окна имплантации» их экспрессия значительно возрастает и остается повышенной до конца менструального цикла [115]. Данный процесс является гормонозависимым и активируется под действием эстрогенов и прогестерона в секреторной фазе менструального цикла [114]. При этом пик экспрессии *НОХА10* приходится именно на период «окна имплантации», что позволяет предположить важную роль продукта экспрессии данного гена в процессе имплантации эмбриона [124]. Известно также, что большое значение в развитии пиноподий — апикальных выпячиваний плазматической мембраны поверхностного слоя эндометрия — имеет ген *НОХА10*, блокирование которого приводит к резкому уменьшению количества пиноподий [7]. Описано около 40 генов, регулируемых *НОХА10*, среди которых гены, участвующие в регуляции РЭ [15]. Было показано, что в процессе децидуализации клеток эндометрия в них значимо повышается экспрессия генов-регуляторов РЭ *НОХА10* и *НОХА11* и гена фактора роста эндотелия сосудов *VEGF* [125]. Таким образом, к числу ключевых регуляторов процессов РЭ, предопределяющих фертильность, принадлежат гены *НОХА10* и *НОХА11* и кодируемые ими белки.

Известно, что к снижению уровня белка в ткани могут приводить как генетические причины (мутации кодирующего его гена или полиморфизм данного гена), так и различные эпигенетические отклонения, в том числе и метилирование промоторной области гена. Именно метилирование промоторного участка генов *HOXA10* и *HOXA11* приводит к снижению экспрессии гена, вплоть до полной его инактивации («эпигенетическое молчание»), что может быть связано с нарушением РЭ и бесплодием [1,16]. По данным литературы в эндометрии здоровых женщин репродуктивного возраста не наблюдается промоторное метилирование *HOXA10* и *HOXA11* генов [57,122].

В последние годы гинекологические заболевания, в том числе и ассоциированные с бесплодием, всё чаще начинают рассматриваться как результат нарушения работы генов. Изменение экспрессии *HOXA10* и *HOXA11* генов было выявлено при эндометриозе, хроническом эндометрите, наличии миомы матки и других патологиях женских половых органов, а оперативное лечение при данных заболеваниях позволяло улучшить РЭ [135].

1.4.2. НОХ-гены и эндометриоз

Эндометриоз — хроническое гормонально зависимое заболевание с рецидивирующим течением, при котором за пределами полости матки происходит доброкачественное разрастание ткани, которая по морфологическим и функциональным свойствам подобна эндометрию [14]. Было показано, что эндометриозом страдает около 10% женщин репродуктивного возраста, причем у 20-50% женщин с эндометриозом диагностируется бесплодие [152].

К вероятным причинам бесплодия при данном заболевании относят нарушение фолликулогенеза, плохое качество ооцитов и нарушения процесса имплантации эмбриона. В последние годы было выявлено, что вклад в развитие бесплодия у пациенток с эндометриозом вносит изменение профиля

метилирования ДНК в клетках эндометрия [140], в том числе генов *HOXA10* и *HOXA11*, участвующих в эмбриогенезе и формировании РЭ [98].

HOXA10 влияет на экспрессию гена *EMX2*, экспрессия которого в норме снижается в периимплантационный период, однако при нарушении данной регуляторной связи наблюдается нарушение процессов имплантации [40]. Также ген *HOXA10* контролирует работу гена интегрин β_3 . Интегрин β_3 экспрессируется в эндометрии в период «окна имплантации», и снижение его экспрессии связано с нарушением РЭ и бесплодием. У женщин с эндометриозом описано нарушение экспрессии как гена *HOXA10*, так и гена интегрин β_3 [27]. В моделях эндометриоза у мышей и бабуинов было показано гиперметилование промотора *HOXA10* гена и его сниженная экспрессия в эутопическом эндометрии [25,101].

В эндометрии 14 женщин с бесплодием и минимальным эндометриозом уровень мРНК и белка *HOXA11* был значительно ниже, чем у здоровых женщин ($p = 0,003$ и $p = 0,004$ соответственно) и женщин с трубно-перитонеальным фактором бесплодия ($p = 0,041$ и $p = 0,001$ соответственно). Кроме того, при эндометриозе по сравнению с другими группами было значимо повышено метилирование CpG-островка в 1-м экзоне гена *HOXA11* ($p < 0,001$) [57].

Ранее той же группой было показано, что при эндометриозе значимо понижены уровни транскрипта и белка *HOXA10*. При этом было подтверждено значимо повышенное метилирование CpG-островков геномной ДНК при эндометриозе [122]. Другой группой также было показано понижение экспрессии мРНК гена *HOXA10* в эутопическом эндометрии в середину лютеиновой фазы при бесплодии, связанном с эндометриозом, что ассоциировалось с повышенным метилированием промотора *HOXA10* [86].

В исследовании с участием 31 женщины с бесплодием и эндометриозом и 26 женщин с бесплодием без эндометриоза в эндометрии в окно имплантации при эндометриозе обнаружилось не только понижение экспрессии *HOXA10* и *HOXA11*, но и более высокая экспрессия генов матриксных металлопротеиназ *MMP2* и *MMP9* [83].

С помощью иммуногистохимии и ПЦР-РВ была изучена экспрессия *HOXA10* в эндометрии в середине секреторной фазы у женщин с эндометриозом, а также миомами, бесплодием неясного генеза и у здоровых женщин. В стромальных клетках эндометрия всех групп больных были понижены как мРНК, так и белок *HOXA10*. Уровень мРНК *HOXA10* был значительно ниже в железистом эпителии, чем в стромальных клетках. Процент пациентов со снижением уровня белка *HOXA10* был статистически значимо выше (100%, 20/20, $p < 0,05$) при поверхностном эндометриозе брюшины, чем в других группах бесплодия: 72,7% (16/22) при глубоком инфильтрирующем эндометриозе, 70,0% (14/20) при эндометриоидных кистах яичников, 68,8% (11/16) при миомах и 55,6% (5/9) при бесплодности неясного генеза [73].

В пилотном исследовании с участием 18 пациенток с эндометриозом и 12 женщин без эндометриоза было обнаружено значительное повышение метилирования промотора *HOXA10* в эутопическом эндометрии при эндометриозе, чем в случае без эндометриоза. Также уровень метилирования был значительно выше в эутопической ткани при эндометриозе, чем в эктопической [37].

Отмечалась тенденция к сниженной экспрессии *HOXA10* и *HOXA11* при удалении эндометриоидных и неэндометриоидных кист в сравнении со здоровыми женщинами, однако различия не были значимыми. После удаления эндометриоидных кист отмечено значимое повышение экспрессии *HOXA10* и *HOXA11* в 12,1 и 17,2 раза соответственно, что может указывать на улучшение РЭ после операции [100].

Изучение метилирования промотора гена *HOXA10* в крови плода при эндометриозе у матери позволило показать, что у плодов 22 женщин, принимавших фолиевую кислоту, уровень метилирования *HOXA10* был значительно ниже, чем у плодов 15 матерей, не принимавших фолиевую кислоту [44].

Обработка стромальных клеток эндометрия, полученных из эутопического эндометрия женщин с эндометриозом, с помощью деметилирующего агента 5-

азациитидина приводила к значительному повышению уровня мРНК и белка *НОХА10* [54].

1.4.3. НОХ-гены и миома матки

Миома матки — это доброкачественная гормонально-зависимая опухоль миометрия, возникающая у женщин репродуктивного возраста. По данным многих авторов наличие миомы может снижать вероятность наступления беременности, в том числе в программах ВРТ, однако конкретные механизмы остаются не до конца понятными [96]. Предполагается возможная роль генов *НОХА10* и *НОХА11* в данной патологии [116].

С помощью иммуногистохимии (ИГХ) и ПЦР-РВ была изучена экспрессия генов *НОХА10* и *НОХА11* во время окна имплантации у пациенток с бесплодием и недеформирующими интрамуральными миомами ($n = 18$) в сравнении со здоровыми женщинами ($n = 12$). Уровень мРНК и белков *НОХА10* и *НОХА11* был ниже у женщин с бесплодием, однако статистически значимое снижение было отмечено только для уровня мРНК *НОХА10* ($p = 0,03$) и для стромального уровня белка *НОХА10* ($p = 0,001$), что позволило авторам предположить роль *НОХА10* в нарушении РЭ у женщин с бесплодием при интрамуральных миомах [50].

В другом исследовании изучалась паракринная роль трансформирующего фактора роста (TGF)- $\beta 3$, секретируемого миомами матки, в ингибировании РЭ и децидуализации эндометрия. Миоматозные и эндометриальные стромальные клетки изолировались из хирургических образцов. Среда после культивирования клеток миомы наносилась на клетки эндометрия, что приводило к TGF- β зависимому угнетению экспрессии мРНК *НОХА10*. Предварительная обработка антителами к рецепторам TGF- β или трансфекция клеток мутантными рецепторами приводила к предотвращению угнетения экспрессии *НОХА10*, что указывает на возможный механизм нарушения РЭ при миомах [39].

В исследовании для изучения роли миом в нарушении РЭ *in vivo* принимали участие женщины с интрамуральными миомами, не деформирующими полость матки, подслизистыми миомами, перегородкой матки и здоровые женщины. У каждой участницы образец эндометрия был получен в окно имплантации, а у пациенток, прошедших миомэктомию, также и после операции. До операции уровень экспрессии *HOXA10* и *HOXA11* при миомах был ниже, чем у двух остальных групп, но статистически незначимо. Однако после миомэктомии интрамуральных миом произошло значимое повышение экспрессии *HOXA10* в 12,8 раз и *HOXA11* в 9,0 раз. В то же время удаление подслизистых миом не оказало значимого влияния на экспрессию данных генов [56]. В другом исследовании при сравнении экспрессии генов *HOXA10* и *HOXA11* в середину лютеиновой фазы 12 женщин с бесплодием и интрамуральными миомами до и через три месяца после миомэктомии не удалось показать значимого изменения уровня мРНК данных генов, что может указывать на более комплексную регуляцию экспрессии в живом организме [45].

1.4.4. НОХ-гены и трубно-перитонеальный фактор бесплодия

В проспективном обсервационном исследовании была проведена биопсия эндометрия на 7–8-й день после овуляции у 25 здоровых женщин и 65 пациенток с бесплодием, из которых у 22 был отмечен плохой овариальный резерв, у 13 — трубное бесплодие, у 5 — эндометриоз и у 15 — бесплодие неясного генеза. Была проведена ИГХ-оценка экспрессии генов *HOXA10* и *HOXA11* в эпителиальных и стромальных клетках с расчетом гистохимического индекса (h-score). При сравнении двух групп (здоровые и бесплодные женщины) различия в экспрессии белков *HOXA10* и *HOXA11* в стромальных и эпителиальных клетках не являлись значимыми, однако при анализе подгрупп бесплодия было выявлено, что экспрессия *HOXA11* была минимальной в эпителии при бесплодии неясного

генеза, статистически значимо отличаясь от экспрессии в контрольной группе ($p=0,005$) [51].

Гидросальпинкс — заболевание маточной трубы, характеризующееся нарушением её проходимости со скоплением в просвете трубы жидкости. Было показано, что у женщин с гидросальпинксом частота наступления беременности в программах ВРТ ниже, чем у женщин без данной патологии, причем предварительная тубэктомия или перевязка маточных труб положительно влияла на исходы программы [130]. Доказано, что жидкость, накапливающаяся в полости измененной маточной трубы, эмбриотоксична, поскольку в ней содержатся лимфоциты, микроорганизмы, погибшие клетки слизистой маточной трубы. Погружение эмбрионов морских свинок и мышей в жидкость из гидросальпинкса приводило к нарушению или полному прекращению дробления клеток эмбрионов, а в другом исследовании *in vitro* было показано, что жидкость из гидросальпинкса подавляла экспрессию мРНК гена *HOXA10* дозозависимым образом [40]. Также было показано, что у женщин с ГС уровень экспрессии *HOXA10* был значительно ниже, чем у женщин в группе контроля, а удаление патологической измененной маточной трубы привело к повышению экспрессии *HOXA10* на уровне белка и мРНК [131].

1.4.5. НОХ-гены и другие патологии, связанные с бесплодием

Помимо перечисленных выше заболеваний среди наиболее частых патологий эндометрия, наблюдающихся при бесплодии, неудачах имплантации и привычных выкидышах, отмечают также полипы эндометрия, нарушения кровотока в сосудах эндометрия и хронический эндометрит [61]. В исследовании случай-контроль с участием 21 женщины с эндометриальными полипами и 9 здоровых женщин без полипов было показано, что экспрессия мРНК гена *HOXA10* значимо снижена в 2,9 раза ($p = 0,016$), а *HOXA11* — в 5,5 раза ($p = 0,03$) при наличии полипов

относительно контрольной группы. При этом разница в размере полипов и их количестве значимо не влияла на изменение экспрессии данных генов [118].

В наблюдательном когортном исследовании приняли участие 18 здоровых женщин, 12 женщин с привычными неудачами имплантации и 20 женщин с привычным невынашиванием. Изучение экспрессии белка *HOXA10* с помощью ИГХ в «окно имплантации» данных групп показало, что белок преимущественно локализуется в ядрах стромальных клеток и цитоплазме железистого эпителия. Гистохимический индекс для *HOXA10* в строме и эпителии при неудачной имплантации и невынашивании был значимо ниже, чем в контрольной группе, что может указывать роль данного гена в неудачных исходах программ ВРТ [72].

Было проведено исследование целого ряда гинекологических заболеваний, играющих роль в бесплодии, включая 13 случаев подслизистых миом, 13 случаев интрамуральных миом, 27 случаев эндометриоза, 6 случаев внутриматочной перегородки, 8 случаев синдрома Ашермана, 4 случая гидросальпинкса и 11 случаев полипов эндометрия, а также 7 контрольных случаев здоровых женщин-доноров яйцеклеток. В целом в образцах эндометрия во всех группах был показан низкий уровень метилирования ДНК. Отмечалось очень небольшое количество CpG-островков, метилированных более чем на 50%, однако ряд регионов был метилирован специфично. Например, отмечалось высокое метилирование в ряде CpG-островков промотора гена *HOXA10* при полипах эндометрия, подслизистых и интрамуральных миомах. Интересно, что в противоположность многим другим исследованиям было отмечено, что метилирование промотора *HOXA10* при эндометриозе оказалось снижено относительно здорового контроля [97].

Хронический эндометрит — это клинко-морфологический синдром, характеризующийся комплексом морфофункциональных изменений эндометрия воспалительного генеза, приводящих к нарушению нормальной циклической трансформации и рецептивности ткани [13]. У женщин с подтвержденным хроническим эндометритом бесплодие диагностируется в 60% случаев, а неудачные попытки ЭКО — в 40–50% случаев [10]. У 25 женщин репродуктивного

возраста, страдающих бесплодием на фоне хронического эндометрита, были получены биоптаты эутопического эндометрия. Показано, что у 21 пациентки (84%) наблюдалось метилирование в промоторном участке гена *HOXA10*, а у 16 пациенток — гена *HOXA11* (64%). Уровень метилирования коррелировал с длительностью бесплодия: при бесплодии длительностью до 1 года уровень метилирования составил 5,7%, тогда как при бесплодии более 10 лет — приближался к 50% [1].

1.5. Эпигаллокатехин-3-галлат как потенциальный регулятор генетических и эпигенетических особенностей эндометрия

Поскольку в ряде исследований было показано, что эпигенетические и генетические особенности эндометрия могут влиять на развитие патологий репродуктивной системы женщины и исходы программ ВРТ, то актуальной задачей медицины является поиск потенциальных способов воздействия на данные особенности для улучшения программ ведения пациенток с различными факторами бесплодия. Перспективным в свете данной задачи является вещество эпигаллокатехин-3-галлат (ЭГ), полифенольное соединение в составе зеленого чая.

Было показано, что с использованием препаратов, содержащих ЭГ, можно добиться снижения уровня метилирования генов при различных заболеваниях женской репродуктивной системы. Так, в российском исследовании с участием 32 женщин с хроническим эндометритом, 31 женщины с эндометриальными полипами, 43 женщин с простой формой гиперплазии эндометрия без атипии, 46 женщин с комплексной гиперплазией без атипии и 42 женщин с комплексной гиперплазией и атипией было показано, что прием данных препаратов в комплексе со стандартным лечением приводил к снижению метилирования генов-опухолевых супрессоров и излечению указанных патологий без рецидива в течение года, в то время как рецидив при использовании только стандартной терапии отмечался в разных группах в 2,2–16,0% случаев [4].

В исследовании у 25 женщин с бесплодием на фоне хронического эндометрита было показано наличие гиперметилирования промоторов генов *HOXA10* и *HOXA11* в ткани эндометрия. Применение индол-3-карбинола и ЭГ привело к снижению метилирования у всех участниц исследования, при этом 4 из 25 женщин смогли забеременеть естественным путем [94]. Предполагается, что ЭГ ингибирует фермент ДНК-метилтрансферазу, который поддерживает метилирование ДНК.

Известно, что активные формы кислорода в числе прочих процессов могут влиять на стероидогенез в яичниках, имплантацию и развитие эмбриона [55,119]. Оксидативный стресс может ассоциироваться с бесплодием, приводя к снижению эффективности оплодотворения, ухудшению развития эмбриона и потере беременности [89,138,146]. ЭГ является наиболее активным полифенольным соединением зеленого чая с сильными антиоксидантными свойствами, противодействующими оксидативному стрессу [93]. В эксперименте *in vivo* на крупном рогатом скоте было показано, что ЭГ обладает антиоксидантным и противовоспалительным эффектом, улучшая развитие эмбрионов и частоту беременности [149]. В экспериментах *in vitro* данное вещество повышало частоту успешного ЭКО и улучшало развитие эмбрионов [47,48]. Также ЭГ обладает потенциально положительным эффектом при лечении эндометриоза [107] и лейомиомы матки [147].

Таким образом, в связи с тем, что одной из причин снижения экспрессии генов *HOXA10* и *HOXA11* при различных патологических состояниях является метилирование промоторных участков данных генов, то применение препаратов, содержащих ЭГ, вероятно, может считаться одним из способов модификации данных заболеваний за счет влияния на метилирование ДНК. Антиоксидантные и противовоспалительные свойства ЭГ также могут играть роль в изменении экспрессии ряда генов, ассоциированных с РЭ и нормальным развитием беременности. Однако для оценки влияния данного вещества на эндометрий необходимо проведение дополнительных исследований.

1.6. Заключение

Преодоление бесплодия является одной из основных задач современного акушерства и гинекологии. Многие заболевания, проявления которых можно обнаружить на макроскопическом и микроскопическом уровнях, могут служить причиной бесплодия. Однако в некоторых случаях в основе бесплодия лежит нарушение процесса взаимодействия бластоцисты и эндометрия, обнаружить причину которого можно только на молекулярно-генетическом уровне. В поддержании РЭ в так называемое «окно имплантации» принимает участие множество генов, и нарушение работы многих из них может стать причиной бесплодия. В частности, была обнаружена взаимосвязь исходов беременности с активностью так называемых НОХ-генов.

Впервые НОХ-гены были открыты как гены, контролирующие сегментацию эмбриона в процессе онтогенетического развития как беспозвоночных, так и позвоночных животных. НОХ-гены получили свое название благодаря наличию общей нуклеотидной последовательности, названной гомеобоксом. Все они кодируют транскрипционные факторы, способные регулировать экспрессию множества других генов, реализуя таким образом свою функцию.

Часть членов семейства НОХ-генов, участвующих в эмбриональном развитии производных мюллеровых и вольфовых протоков, сохраняет свою активность и во взрослом организме. В частности, экспрессия генов *НОХА10* и *НОХА11*, активность которых в онтогенезе наблюдается в области формирующейся матки, циклически изменяется в эндометрии в течение менструального цикла женщины. Наивысшая экспрессия этих генов наблюдается в окно имплантации, что позволило предположить роль данных генов в определении РЭ. При этом бесплодие, ассоциированное с такими причинами, как эндометриоз, хронический эндометрит, миома матки, трубно-перитонеальный фактор бесплодия и др., может ассоциироваться с пониженной экспрессией генов *НОХА10* и *НОХА11*.

Было обнаружено несколько механизмов регуляции экспрессии НОХ-генов, в том числе регуляция на транскрипционном уровне стероидными гормонами, ретиноевой кислотой, метилированием промоторов этих генов, изменением структуры хроматина, а также на уровне трансляции путем регуляции синтеза белка НОХ-генов в рибосомах. Многие исследования позволили продемонстрировать, что в случае бесплодия основной причиной снижения экспрессии НОХ-генов является повышенное метилирование промоторов этих генов.

Снижение экспрессии НОХ-генов приводит к нарушению регуляции их генов-мишеней. Среди мишеней НОХА10 и НОХА11 выявлены гены, кодирующие белки внеклеточного матрикса и адгезии клеток, матриксные металлопротеиназы, кошапероны рецепторов половых гормонов, факторы роста, ферменты метаболических путей, другие транскрипционные факторы и т. п. Именно с нарушением регуляции этих генов связывают развитие бесплодия при снижении экспрессии генов *НОХА10* и *НОХА11*. Изучение экспрессии данных генов в эндометрии женщин с трубно-перитонеальным фактором бесплодия и множественными неудачными попытками ЭКО является актуальной задачей, решение которой может помочь в борьбе со сложными случаями бесплодия.

Кроме того, еще одним подходом к поиску маркеров РЭ и предсказания исходов программ ВРТ является полногеномный транскриптомный анализ с выявлением сочетаний генов, обладающих совокупной предсказательной ценностью. Самым известным из выявленных наборов генов для анализа РЭ является тест ERA, включающий в себя 238 генов, каждый из которых значимо отличается по экспрессии в пререцептивном, рецептивном и пострецептивном эндометрии. Чаще всего панели генов составляются из тех генов, индивидуальная экспрессия которых значимо отличается в изучаемых группах, однако было высказано предположение, что РЭ может определяться совокупностью генов без возможности выделения отдельно значимых генов. В связи с этим становится актуальным поиск диагностических и прогностических панелей генов, состоящих

из генов с низкой индивидуальной, но высокой совокупной предсказательной ценностью. Отсутствие выраженных значимых отличий в экспрессии каждого отдельного гена может компенсироваться тем, что все эти гены имеют общую биологическую функцию и оказывают выраженный суммарный эффект на клетки эндометрия. Выявление таких панелей генов может позволить повысить эффективность программ ВРТ за счет индивидуальной оптимизации протокола ведения.

Одним из потенциальных способов модификации уровня метилирования промоторов генов в эндометрии и изменения транскриптома эндометрия может являться применение полифенолов зеленого чая, включая ЭГ, для которого было показано выраженное антиоксидантное и противовоспалительное действие и положительное влияние на качество эмбрионов и частоту развития беременности. Дальнейшее изучение данного вещества у женщин с трубно-перитонеальным фактором бесплодия может помочь выявить его влияние на эпигенетические и генетические особенности эндометрия.

Всё вышесказанное обуславливает актуальность, современность и своевременность исследования, проведенного в данной диссертационной работе.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материал исследования

Научное исследование проводилось в ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России (директор — академик РАН, профессор Г. Т. Сухих). Отбор пациентов для данного исследования осуществлялся среди женщин, обратившихся для лечения бесплодия в отделение вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова института репродуктивной медицины (заведующий — д. м. н., профессор Е. А. Калинина). Лабораторные исследования проводились в лаборатории молекулярно-генетических методов исследования (руководитель — к. м. н. А. Е. Донников).

Исследование было одобрено этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова». В исследование было включено 78 пар, обратившихся для лечения бесплодия методами ВРТ. Супружеские пары были обследованы в соответствии с приказом Минздрава России №107н от 30.08.2012 г. «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению».

2.2. Дизайн исследования

В соответствии с поставленными задачами было проведено проспективное и ретроспективное исследование. Данное исследование включало три этапа (Рисунок 1). На первом этапе в исследование было включено 78 пациенток согласно критериям включения и невключения, представленным ниже. Всем пациенткам проведено полное клинико-anamnestическое обследование: сбор анамнеза, общий и гинекологический осмотр, клинико-лабораторное обследование. Для прогнозирования наступления беременности в программе ВРТ с учетом клинико-

анамнестических показателей использовался метод множественного логистического регрессионного анализа.

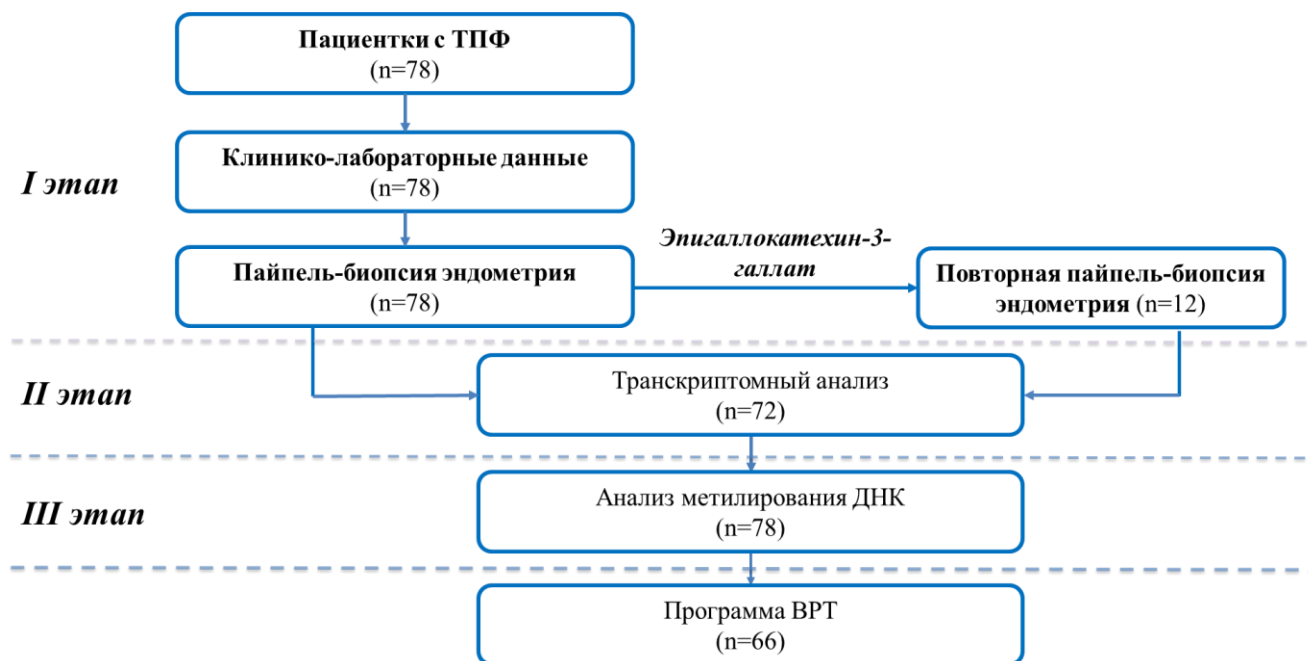


Рисунок 1. Схема дизайна исследования

Критерии включения:

- нормальный кариотип супругов;
- возраст от 18 до 40 лет;
- ИМТ 18,5–29,9 кг/м²
- трубно-перитонеальный фактор бесплодия без выраженной патозооспермии у партнера;
- две и более неудачных попыток ЭКО в анамнезе;
- селективный перенос одной нативной бластоцисты лучшего качества на 5-е сутки после трансвагинальной пункции фолликулов;
- единый протокол поддержки посттрансферного периода;
- информированное согласие на включение в исследование.

Критерии невключения:

- наличие противопоказаний к ВРТ;
- наличие генитального эндометриоза III–IV степени; миомы матки больших размеров; миомы, деформирующей полость матки; опухолевых

и опухолевидных образований яичников, преждевременной недостаточности яичников, СПКЯ;

- выраженная патозооспермия у партнера;
- хронический эндометрит, подтвержденный данными ультразвукового и/или гистологического исследований.

Критерии исключения:

- не вступление в программу ВРТ;
- осложнения, возникшие при проведении программы ВРТ (синдром гиперстимуляции яичников (СГЯ) средней или тяжелой степени, воспалительные осложнения, кровотечение в брюшной полости);
- отмена переноса эмбриона в программе ВРТ;
- преимплантационное генетическое тестирование (ПГТ) эмбрионов
- «бедный» ответ на овариальную стимуляцию;
- отсутствие бластоцист отличного качества в данном протоколе ВРТ;
- использование ооцитов донора или суррогатной мамы;
- хронический эндометрит, подтвержденный данными гистологического исследования;
- недостаточное количество полученного материала в результате пайпель-биопсии эндометрия;
- эндометрий, гистологически не соответствующий средней стадии секреции;
- отказ пациентки от участия в исследовании.

Далее всем женщинам (N=78) в цикле, предшествующем стимуляции суперовуляции, была выполнена аспирационная пайпель-биопсия эндометрия в период «окна имплантации». Части пациенток (n=12), у которых в период 6 месяцев до вступления в исследование в анамнезе была диагностирована и пролечена гиперплазия эндометрия, был рекомендован приём ЭГ в дозе 50 мг × 3р/сут в течение 1 месяца согласно инструкции, после чего этим пациенткам повторно была

проведена пайпель-биопсия эндометрия в период «окна имплантации». После проведения пайпель-биопсии пациенткам проводилось лечение методом ВРТ.

Все полученные образцы эндометрия от каждой пациентки были разделены на несколько порций. На втором этапе исследования всем пациенткам был произведен транскриптомный анализ образцов эндометрия. На третьем этапе производился анализ метилирования промоторов генов *HOXA10* и *HOXA11*.

Все результаты, полученные в ходе проведения различных этапов анализа, интерпретировались в зависимости от исходов программ ВРТ у пациенток, включенных в исследование (наступление или ненаступление беременности).

В результате на первом этапе исследования было сформировано 2 группы сравнения в зависимости от эффективности проведенной в дальнейшем программы ВРТ:

- группа 1 (n=25) — пациентки, у которых наступила беременность;
- группа 2 (n=41) — пациентки, у которых беременность не наступила.

Изначально пайпель-биопсия и дальнейшие молекулярно-генетические исследования были сделаны всем 78 пациенткам, однако в последствии на этапе анализа исходов программ ВРТ согласно критериям исключения из исследования было исключено 12 пациенток, из них: 8 пациенток не вступили в программу ВРТ, у 4 пациенток был отменен ПЭ (Рисунок 2).



Рисунок 2. Дизайн исследования для первого этапа

В ходе исследования транскриптома эндометрия поиск потенциальных генов маркеров рецептивности осуществлялся с помощью транскрипционного анализа образцов эндометрия, полученных в результате пайпель-биопсии эндометрия у пациенток групп 3 и 4. Затем проводилась проверка генов в группах 5 и 6 с помощью ПЦР. В зависимости от исходов программы ВРТ все полученные образцы эндометрия были разделены на подгруппы.

Образцы эндометрия, исследованные методом транскрипционного анализа:

- группа 3 (n=9) — образцы эндометрия пациенток, у которых наступила беременность;
- группа 4 (n=6) — образцы эндометрия пациенток с отрицательным исходом программы ВРТ.

Образцы эндометрия, исследованные методом ПЦР:

- группа 5 (n=15) — образцы эндометрия пациенток, у которых наступила беременность;
- группа 6 (n=32) — образцы эндометрия пациенток с отрицательным исходом программы ВРТ (Рисунок 3).

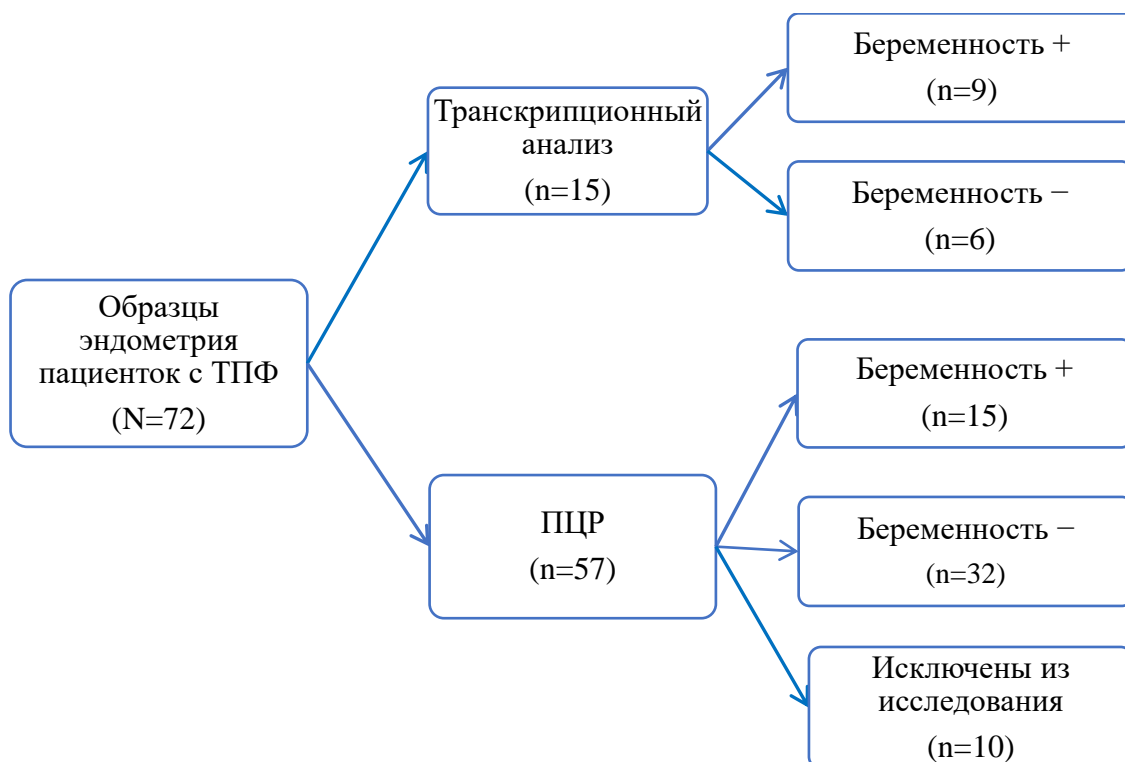


Рисунок 3. Дизайн исследования для анализа транскриптома эндометрия

Кроме того, из исследования было исключено 10 пациенток, из них: 6 пациенток не вступили в программу ВРТ, у 4 пациенток была отмена ПЭ. Следует отметить, что перед исследованием образцов методом транскрипционного анализа и методом ПЦР проводилась независимая последовательная рандомизация пациенток при включении в исследование с помощью таблицы случайных чисел.

На третьем этапе исследования проведен анализ метилирования промоторов генов *HOXA10* и *HOXA11* у всех изначально включенных пациенток (n=78) двумя методами: секвенированием ДНК по Сэнгеру и с применением секвенирования нового поколения — next-generation sequencing (NGS). Для исследования профиля метилирования все пациентки были разделены на подгруппы в зависимости от исхода программы ВРТ:

Пациентки, которым проводилось секвенирование по Сэнгеру:

- группа 7 (n=14) — пациентки, у которых наступила беременность;
- группа 8 (n=23) — пациентки с отрицательным исходом программы

ВРТ (Рисунок 4)

Пациентки, которым проводилось NGS:

- группа 9 (n=20) — пациентки, у которых наступила беременность;
- группа 10 (n=29) — пациентки с отрицательным исходом программы

ВРТ (Рисунок 5).

При анализе данных, в соответствии с критериями исключения было исключено 10 пациенток (не вступили в программу 6 пациенток, не было ПЭ в рамках программы ВРТ у 4 пациенток). В ряде случаев при недостаточном количестве полученного материала для проведения секвенирования и/или его плохом качестве пациентки исключались из исследования.

Для оценки влияния ЭГ среди включенных в исследование пациенток методом рандомизации было отобрано 12 пациенток с гиперплазией эндометрия в анамнезе. После проведения пайпель-биопсии (пайпель-биопсия I) им был назначен прием ЭГ в дозе 50 мг × 3р/сут в течение 1 месяца согласно инструкции. В следующем менструальном цикле после окончания приема препарата на 5–7 день

после произошедшей овуляции производилась повторная пайпель-биопсия эндометрия (пайпель-биопсия II) (Рисунок 6). Таким образом, для проведения исследования было изучено 24 образца эндометрия от 12 пациенток. Проводилось сравнение метилирования промоторов генов у пациенток до и после приема ЭГ. После повторной пайпель-биопсии пациенткам проводилось лечение бесплодия методом ВРТ.

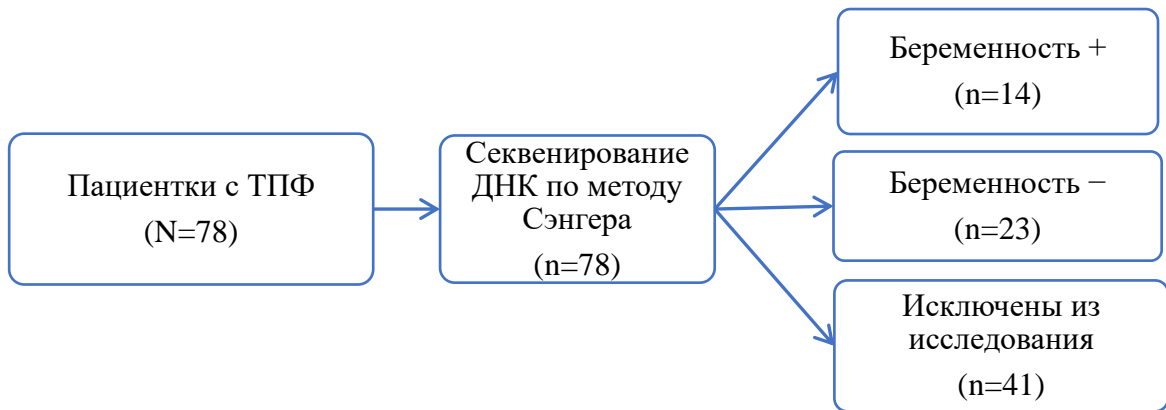


Рисунок 4. Дизайн исследования для секвенирования по Сэнгеру

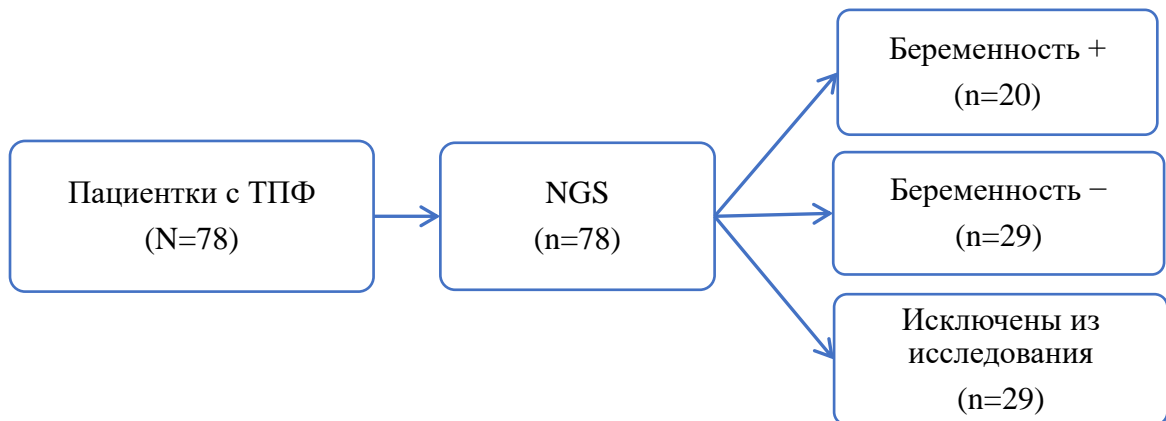


Рисунок 5. Дизайн исследования для проведения NGS



Рисунок 6. Дизайн исследования для оценки влияния ЭГ

2.3. Методы исследования

Предварительное обследование супружеской пары перед проведением программы ВРТ проводилось в амбулаторных условиях. Обследование включало обязательные и специальные методы исследования, а также исследования по медицинским показаниям.

Обязательные исследования для обоих супругов (партнеров):

- анализ крови на антитела класса М/Г к вирусу иммунодефицита человека 1, 2 (ВИЧ 1, 2), определение в крови антител к бледной трепонеме (RW) и к антигенам вирусного гепатита В и С (HBsAg, HCV);
- микроскопическое исследование отделяемого половых органов на аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы, на грибы рода *Candida*, паразитологическое исследование на атрофозоиты трихомонад;
- исследование соскоба методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на хламидии, микоплазму, уреаплазму, вирус простого герпеса (ВПГ) I и II типов, ВПЧ, цитомегаловирус (ЦМВ);
- определение кариотипа супругов.

Обязательные исследования для женщин:

- определение группы крови и резус-фактора;
- клинический и биохимический анализы крови, коагулограмма;
- общий анализ мочи;
- микроскопия влагалищных мазков;
- цитологическое исследование соскоба эндоцервикса и экзоцервикса;
- определение в крови антител М и G к TORCH-инфекциям: *Toxoplasma gondii*, вирус краснухи, цитомегаловирус, ВПГ I и II типов;
- УЗИ органов малого таза и оценка эндометрия на 5–8 день менструального цикла;
- гормональное исследование крови (на 2–3 день менструального цикла): ФСГ, ЛГ, эстрадиол, тиреотропный гормон (ТТГ), свободный тироксин (Т4св),

пролактин, тестостерон, антимюллеров гормон (АМГ), дегидроэпиандростерон-сульфат (ДГАЭС), кортизол, соматотропный гормон (СТГ), прогестерон (22 день менструального цикла);

- УЗИ щитовидной железы;
- флюорография легких (для женщин, не проходивших это исследование в более 12 месяцев);
- электрокардиография (ЭКГ);
- заключение терапевта о состоянии соматического здоровья пациентки и отсутствии противопоказаний к проведению программы ВРТ, беременности и родам.

Обязательным исследованием для мужчины был анализ эякулята.

Исследования по показаниям:

- исследование состояния матки и маточных труб (гистеросальпингография или гистеросальпингоскопия и лапароскопия)
- консультация смежных специалистов (эндокринолога, уролога).

2.3.1. Общеклинические методы обследования

При первичном обращении пациенток осуществлялся подробный сбор анамнеза, который включал краткие биографические данные (год рождения, в какой семье родилась, каким ребенком по счету, как росла и развивалась; образование), наличие профессиональных и бытовых вредностей, вредных привычек (курение, употребление алкоголя и наркотиков). Также отмечались особенности питания и физической активности. При первичном осмотре производились измерения роста и веса пациентки, и на основании этих данных рассчитывался индекс массы тела по формуле (1):

$$\text{ИМТ} = \frac{\text{масса тела (кг)}}{\text{рост}^2 (\text{м}^2)} \quad (1)$$

Также при первой консультации оценивалось артериальное давление и пульс.

Собирались сведения о наследственных заболеваниях. Отмечалось наличие у ближайших родственников злокачественных новообразований, сердечно-сосудистых и эндокринных заболеваний.

В хронологическом порядке отмечались все перенесенные заболевания, операции и травмы с указанием длительности и тяжести этих заболеваний, их осложнений и проводившегося лечения. Отдельно отмечалось наличие в анамнезе перенесенных инфекционных заболеваний: туберкулез, гепатиты В и С, венерические болезни.

Уточнялись данные о наличии непереносимости пищевых продуктов с указанием характера болезненных явлений при их употреблении. При анализе реакций лекарственной гиперчувствительности отмечались препараты, которые их вызывают, и клинические проявления (сыпь по типу крапивницы, ринит, конъюнктивит).

Отмечалось, если в анамнезе было переливание цельной крови или ее компонентов, а также реакции на эти трансфузии.

Большое внимание уделялось сбору акушерско-гинекологического анамнеза. Подробно оценивались особенности становления и характер менструального цикла (возраст менархе, регулярность и продолжительность менструального цикла, характер менструации, наличие альгодисменореи, нарушения менструального цикла), а также репродуктивный анамнез пациенток и особенности течения беременностей (количество беременностей, наступивших естественным путем и с помощью методов ВРТ; число срочных/преждевременных родов и методы родоразрешения; количество абортов, самопроизвольных выкидышей, неразвивающихся и внематочных беременностей; осложнения во время беременностей и родов; наличие живых детей и их развитие), уточнялось, наступали беременности с настоящим или иным половым партнером. Отмечался возраст начала половой жизни, ее регулярность, методы контрацепции, количество половых партнеров. Также уточнялось наличие гинекологических заболеваний в

прошлом, методы лечения (особенное внимание уделялось оперативным методам лечения и объему вмешательства на органах малого таза).

Уточнялись данные о длительности бесплодия, о проведенных мероприятиях по диагностике и лечению бесплодия. Отмечалось наличие программ ВРТ в анамнезе, а также их особенности. Особое внимание уделялось протоколам стимуляции суперовуляции (тип протокола стимуляции, применяемые препараты и их дозы, длительность стимуляции), эмбриологические данные и исходы программ ВРТ.

Общий осмотр включал определение типа телосложения (нормостенический, гиперстенический, астенический); типа распределения подкожной жировой клетчатки (андроидный или гиноидный); состояния кожных покровов и видимых слизистых (стрии, наличие негроидного акантоза); степени и типа оволосения; степени развития и состояния молочных желез путем осмотра и пальпации.

Гинекологический осмотр включал осмотр наружных половых органов, бимануальное влагалищное исследование и исследование с помощью влагалищных зеркал. В ходе этих исследований оценивали состояние наружных половых органов, влагалища и шейки матки; размеры, положение, плотность, подвижность и болезненность тела матки, состояние придатков матки, характер выделений из половых путей.

Все данные заносились в индивидуальную регистрационную карту пациентки.

2.3.2. Ультразвуковое исследование малого таза

Ультразвуковое исследование (УЗИ) органов малого таза проводилось всем женщинам на 5–7 день менструального цикла на этапе предварительного обследования с целью определения возможных противопоказаний к применению методов ВРТ. Оценивались положение и размеры матки, наружный контур матки; структура миометрия; толщина, эхогенность и структура эндометрия, наличие

образований в полости матки, размеры и объем яичников, наличие или отсутствие объемной патологии яичников; число антральных фолликулов в обоих яичниках, наличие или отсутствие объемных образований в полости малого таза.

Следующее УЗИ органов малого таза проводилось после предполагаемой овуляции (на 14–16 день менструального цикла) для подтверждения произошедшей овуляции. При этом оценивалась структура яичников, наличие ан- или гипозоногенного включения, его контуры; наличие свободной жидкости в позадиматочном пространстве и параовариальных областях.

Далее УЗИ проводилось в период «окна имплантации» (через 5–7 дней после овуляции). Особенное внимание при этом уделялось толщине, эхогенности и структуре эндометрия, наличию образований в полости матки, размерам и структуре яичников, наличию или отсутствию объемной патологии яичников.

В дальнейшем, УЗ-мониторинг проводили на 2–3 день менструального цикла при вступлении пациентки в программу ЭКО для выбора оптимального препарата для стимуляции и его дозы, с учетом возраста пациентки, результатов анализа крови на гормоны и количества антральных фолликулов. Далее УЗИ выполнялось по мере необходимости в течение программы ЭКО для оценки динамики фолликулогенеза и состояния эндометрия с целью своевременной коррекции дозы вводимых гонадотропинов, а также определения даты введения антагониста гонадотропин-рилизинг-гормона (ант-ГнРГ) и даты введения триггера овуляции, и назначения времени трансвагинальной пункции яичников (ТВП). Под контролем УЗИ проводилась ТВП и ПЭ. При положительном результате анализа крови на β -хорионический гонадотропин (β -ХГ) УЗИ органов малого таза выполняли на 21 день после ПЭ в полость матки с целью визуализации плодного яйца в полости матки. Следующее УЗИ органов малого таза проводили через 5–6 недель после ПЭ в полость матки с целью определения сердцебиения эмбриона.

Исследование выполнялось с помощью ультразвукового аппарата компании «ВК Medical» (Дания) с использованием трансвагинального датчика с частотой 3,5–7,5 МГц.

2.3.3. Гормональное исследование

В цикле, предшествующем стимуляции функции яичников, оценивался гормональный профиль пациенток в период ранней фолликулярной фазы (2–5 день менструального цикла) с целью оценки функционального состояния эндокринной системы и овариального резерва. В плазме крови были исследованы концентрация таких гормонов, как: ФСГ, ЛГ, эстрадиол, ТТГ, Т4св, пролактин, тестостерон, ДГАЭС, кортизол, СТГ, прогестерон (на 22 день менструального цикла). Для оценки состояния овариального резерва в плазме крови методом ИФА на 2–3 день МЦ дополнительно проводили измерение уровня антимюллерова гормона (АМГ). Сниженный овариальный резерв расценивался при уровне АМГ менее 1,0 нг/мл, высокий — более 2,5 нг/мл.

2.3.4. Исследования эякулята

Партнерам пациенток перед вступлением в программу ВРТ проводился анализ эякулята. Эякулят собирался путем мастурбации спустя 3–4 дня полового воздержания в стерильный пластмассовый контейнер для сбора эякулята. Проводилось определение количественных, качественных и морфологических параметров спермы с оценкой концентрации, формы и подвижности сперматозоидов. Интерпретация результатов исследования проводилась с учетом норм, определенных в Руководстве Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) по оценке и анализу эякулята [151] (Таблица 1).

Анализ эякулята производился в рамках подготовки супружеской пары к программе ВРТ и в день проведения ТВП. Отклонение от нормативных значений каких-либо показателей является патозооспермией.

Таблица 1 — Нормативные показатели спермограммы (ВОЗ, 5-е издание, 2010)

Показатель	Норматив, единицы измерения
<i>Макроскопическое исследование</i>	
Общий объем эякулята, мл	≥ 1,5
Цвет	белый, серый
Консистенция	жидкая, умер. вязк.
pH	≥ 7,2
Вязкость, см	0,1–2
Время разжижения, мин	< 60
<i>Микроскопическое исследование</i>	
Концентрация сперматозоидов, млн/мл	≥ 15
Общее количество сперматозоидов, млн	≥ 39
Подвижность сперматозоидов, %:	
а) общая подвижность (PR+NR; A+B+C)	≥ 40
б) прогрессивно подвижные (PR; A+B)	≥ 32
с) непрогрессивно подвижные (NR; C)	
д) неподвижные (IM; D)	
Жизнеспособность сперматозоидов, % живых	≥ 58
<i>Морфология сперматозоидов, %:</i>	
Нормальные сперматозоиды	≥ 4
Дефекты головки	< 96
Дефекты шейки	
Дефекты хвоста	
Круглые клетки, млн/мл	< 1
Лейкоциты, млн/мл	< 1
Эпителиальные клетки	отсутствуют
Лецитиновые зерна	много
Агглютинация сперматозоидов	отсутствует
Агрегация сперматозоидов	отсутствует
MAR-тест (наличие/отсутствие антиспермальных антител)	< 50%

2.3.5. Пайпель-биопсия эндометрия

Всем женщинам в цикле, предшествующем стимуляции суперовуляции, или до начала приема препарата эпигаллокатехина-3-галлат была выполнена аспирационная биопсия эндометрия инструментом Pipelle de Cornier (Laboratoire CCD, Франция) в период «окна имплантации» (на 5–7 день после произошедшей овуляции). Факт произошедшей овуляции устанавливали при динамическом ультразвуковом контроле в течение изучаемого цикла и определении пика ЛГ с помощью мочевого теста на овуляцию Clear Blue (Unipath Ltd, Великобритания). Части пациенток в рамках проводимого исследования повторно проводилась пайпель-биопсия эндометрия в период «окна имплантации» (после приема ЭГ). После получения биоптата эндометрия каждый образец разделялся на несколько частей для проведения гистологического исследования, секвенирования, транскрипционного анализа.

2.3.6. Гистологическое исследование эндометрия

Гистологическое исследование эндометрия проводилось в патологоанатомическом отделении ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России (зав. отделением — д. м. н., профессор Щеголев А. И.).

Материалы биоптатов фиксировали в 10% нейтральном формалине и заливали в парафиновые блоки. Затем на микротоме Leica (Germany) изготавливали срезы толщиной 4–5 мкм для дальнейшего морфологического исследования и затем окрашивали гематоксилином и эозином (обзорная окраска).

2.3.7. Овариальная стимуляция и трансвагинальная пункция фолликулов

Стимуляция функции яичников проводилась со 2–3 дня менструального цикла по протоколу с ант-ГнРГ препаратами рекомбинантного ФСГ (рФСГ). Выбор

стартовой дозы гонадотропинов осуществлялся индивидуально в зависимости от возраста пациентки, гормонального статуса и параметров овариального резерва, оцененных при проведении УЗИ органов малого таза, и составлял от 150 до 300 МЕ/сут. Далее проводился ультразвуковой динамический контроль за развитием фолликулов и эндометрия с коррекцией дозы препаратов.

С целью предотвращения преждевременного выброса ЛГ по достижении диаметра фолликулов 14 мм вводился препарат ант-ГнРГ в дозе 0,25 мг/сутки подкожно для предотвращения эндогенных «паразитарных» пиков ЛГ. Затем препарат ант-ГнРГ вводился ежедневно, в том числе и в день назначения триггера овуляции.

Для финального созревания ооцитов при достижении лидирующими фолликулами диаметра 17 мм по данным УЗИ вводился триггер овуляции. В качестве триггера овуляции применяли препарат человеческого хорионического гонадотропина (чХГ) в дозе 8000–10000 МЕ однократно внутримышечно.

В асептических условиях в малой операционной отделения под кратковременной внутривенной анестезией и ультразвуковым контролем через 35–36 часов после введения триггера овуляции осуществлялась трансвагинальная пункция фолликулов с использованием одноразовых пункционных игл (Vitrolife, США) (Рисунок 7). Аспирация фолликулярной жидкости проводилась с помощью вакуумной помпы. Проводилась последующая оценка качества ооцитов и оплодотворение спермой партнера.

2.3.8. Морфологическая оценка ооцитов и этап оплодотворения

Сразу после получения фолликулярного аспирата он изучался эмбриологом с помощью установленного в стерильном ламинарном боксе стереомикроскопа с регулируемым освещением и нагретым предметным столом. Содержимое каждой пробирки с фолликулярной жидкостью помещалось в чашку Петри, и эмбриолог изучал содержимое на предмет присутствия в нем ооцитов в фолликулярной ткани

и, затем, определялось количество полученных ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК). После этого ооциты отмывались от фолликулярной жидкости и помещались в стерильные планшеты с культуральной средой для предварительной инкубации в течение 2–3 часов.

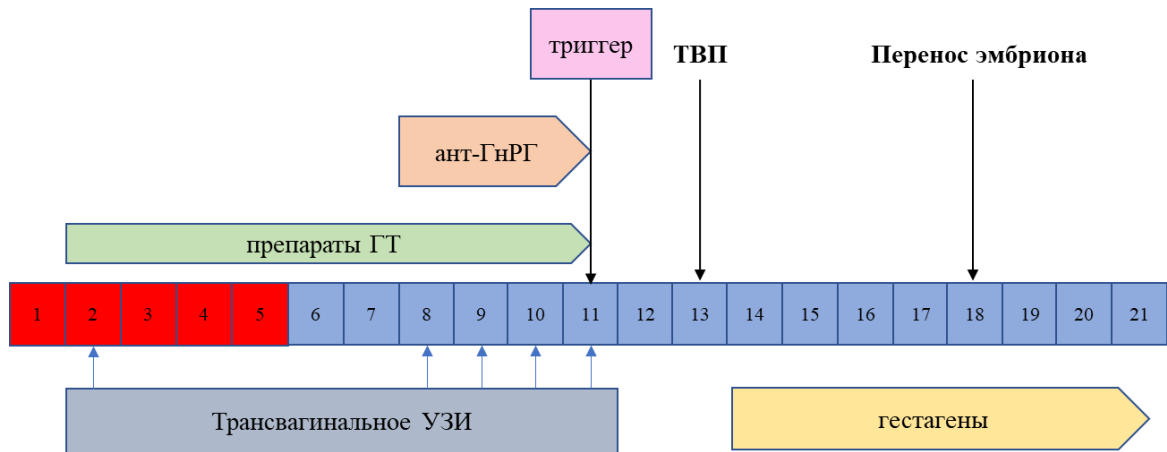


Рисунок 7. Схема стимуляции овуляции с ант-ГнРГ.

Условные обозначения: ГТ — гонадотропины; ТВП — трансвагинальная пункция фолликулов; 1, 2 и т. д. — дни менструального цикла; 1–5 — дни менструации

После окончания этапа предварительной инкубации производилось денудирование ооцитов, то есть ферментативное и механическое удаление клеток кумулюса из препарата. Вначале ОКК помещались на 20 секунд в планшеты для денудирования в раствор гиалуронидазы, после чего отмывались от фермента в буферной среде и возвращались на 30 минут в исходную культуральную среду — в планшет, где проводилась преинкубация. Через 30 минут оставшиеся клетки кумулюса удалялись механическим путем (путем пипетирования). После энзимной и механической обработки ооцитов оценивалась степень их зрелости:

- стадия зародышевого пузырька (GV, germinal vesicle)
- в цитоплазме ооцита визуализируется ядро и отсутствует полярное тельце;
- стадия метафазы первого мейотического деления (MI)
- в цитоплазме ооцита отсутствует ядро и полярное тельце;
- стадия метафазы второго мейотического деления (MII)

- в перивителлиновом пространстве визуализируется полярное тельце, что свидетельствует о завершении процессов созревания ооцита.

Параллельно с очисткой ооцитов производилось центрифугирование, флотирование и обработка спермы партнера. Все зрелые ооциты подвергались оплодотворению методом интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в ооцит (ИКСИ).

После проведения оплодотворения методом ИКСИ ооциты незамедлительно переносились в культуральную среду для дальнейшего культивирования. Через 16–18 часов после проведения ИКСИ проводилась оценка оплодотворения. При этом о нормальном течении оплодотворения свидетельствовало присутствие двух пронуклеусов (2PN) в цитоплазме зиготы с симметрично расположенными проядрышками и двух полярных телец (2PB) в перивителлиновом пространстве. При отсутствии пронуклеусов в цитоплазме ооцит считался не оплодотворившимся. В случае наличия одного или трех и более пронуклеусов в цитоплазме оплодотворение расценивалось как аномальное. Этап культивирования был произведен с использованием сред культивирования СООК (Австралия).

2.3.9. Морфологическая оценка эмбрионов

Оценка эмбрионов проводилась через 120–122 часа (на 5-е сутки) культивирования с помощью инвертированного микроскопа в условиях, обеспечивающих сохранение необходимых показателей температуры и pH. В основе системы оценки эмбрионов лежали морфологические характеристики, по совокупности которых делалось заключение о возможности эмбриона к дальнейшему развитию. Учитывались морфологические критерии оценки развития эмбрионов, предложенные Д.К. Гарднером: степень развития бластоцисты, состояние внутриклеточной массы (ВКМ) и трофобластодермы (ТФЭ) [63].

Оценка степени развития бластоцисты:

- 1 — ранняя бластоциста: полость бластоцисты занимает менее половины объема эмбриона;
- 2 — бластоциста: полость бластоцисты больше половины объема эмбриона;
- 3 — полная бластоциста: полость заполняет весь объем эмбриона;
- 4 — расширенная (экспандированная) бластоциста: полость заполняет весь эмбрион, начинается истончение блестящей оболочки;
- 5 — вылупляющаяся бластоциста: ТФЭ начинает проникать через блестящую оболочку;
- 6 — вылупившаяся бластоциста: бластоциста полностью освобождается от блестящей оболочки.

Оценка ВКМ:

- А — много плотно упакованных клеток;
- В — несколько свободно сгруппированных клеток;
- С — незначительное число клеток ВКМ.

Оценка ТФЭ:

- А — много клеток, формирующих единый эпителиальный слой;
- В — несколько клеток, формирующих неплотный эпителиальный слой;
- С — незначительное число клеток ТФЭ.

К эмбрионам отличного качества относились бластоцисты 4–5 классов с ВКМ категории А и ТФЭ категории А.

2.3.10. Перенос эмбрионов в полость матки и ведение посттрансферного периода

В асептических условиях манипуляционной под контролем УЗ осуществлялся ПЭ в полость матки на 5-е сутки после ТВП с помощью «мягкого» (гибкого) катетера Wallace (Portex Ltd., UK) или катетера фирмы-производителя Cook (Cook Inc., Bloomington, IN, USA). В полость матки переносили один эмбрион

лучшего качества. Оставшиеся эмбрионы хорошего качества с согласия пациентки витрифицировались.

Ведение посттрансферного периода осуществлялось согласно принятым в клинической практике протоколам с назначением вагинального микронизированного прогестерона в дозе 600 мг/сут. Через 14 дней после ПЭ в полость матки определялась концентрация β -ХГ в сыворотке крови пациентки. Тест на беременность считался положительным, если уровень β -ХГ составлял более 20 МЕ/л. Через 21 день после ПЭ проводилась диагностика клинической беременности. При визуализации плодного яйца в полости матки регистрировалась клиническая беременность.

2.4. Специальные методы исследования

2.4.1. Выделение ДНК, бисульфитная конверсия и секвенирование по Сэнгеру

Из образцов биопсии эндометрия, замороженных в жидком азоте в сухой пробирке, производили выделение ДНК для последующей бисульфитной конверсии и секвенирования по Сэнгеру. Образец ткани измельчали с помощью скальпеля со сменным одноразовым лезвием и гомогенизировали с помощью Lysing Matrix D (MP Biomedicals, США) в приборе FastPrep-24 (MP Biomedicals, США).

Гомогенизированный образец переносили в реакционную пробирку и выделяли ДНК с помощью набора реагентов innuCONVERT Bisulfite All-In-One Kit (Analytik Jena, Германия) по протоколу производителя для свежей ткани. Концентрацию выделенной ДНК измеряли флуориметрически с использованием стандартного набора Qubit dsDNA HS Assay Kit на флуориметре Qubit 2.0 (Life Technologies, США).

По 150 нг выделенной из образцов эндотелия ДНК подвергали бисульфитной конверсии с использованием набора innuCONVERT Bisulfite All-In-One Kit (Analytik Jena, Германия) по протоколу производителя для высокой чистоты элюируемой ДНК. Концентрацию ДНК определяли с помощью спектрофотометра Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, США).

После бисульфитной конверсии и очистки конвертированной ДНК амплифицировали целевые участки промоторов генов *HOXA10* и *HOXA11* с помощью ПЦР набором реагентов EpiMark Hot Start Taq DNA Polymerase по протоколу производителя (New England Biolabs, США). Последовательности прямого и обратного праймера для генов *HOXA10* и *HOXA11* приведены ниже (Таблица 2).

Таблица 2 — Последовательности праймеров для амплификации целевых участков промоторов генов *HOXA10* и *HOXA11*

Праймер	Последовательность
HOXA10 прямой	5'-TATGATATTGTTGTGGGATAATTTG-3'
HOXA10 обратный	5'-САТАААСАСССАСТТАТТААСТАС-3'
HOXA11 прямой	5'-АТТАГТАТТТТТТТТГТТААГГАТГГГ-3'
HOXA11 обратный	5'-ССТАСАААСААТСТСТАТАСАС-3'

Амплификацию проводили по следующей программе: начальная денатурация при 95°C в течение 30 с, затем 40 циклов, включающих денатурацию при 95°C в течение 30 с, отжиг праймеров при 54°C (для *HOXA10*) или 57°C (для *HOXA11*) в течение 30 с и элонгацию при 68°C в течение 60 с. Финальный этап элонгации производился при 68°C в течение 5 мин.

После проведения ПЦР продукты амплификации подвергали электрофорезу в 2,5% агарозном геле. Продукты амплификации выделяли из блоков геля с помощью набора реагентов GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, США) по протоколу производителя в варианте с меньшим расходом реагентов. Концентрацию выделенных продуктов амплификации измеряли флуориметрически с использованием стандартного набора Qubit dsDNA HS Assay Kit на флуориметре Qubit 2.0 (Life Technologies, США). В отдельные пробирки

отмеряли объем раствора продуктов амплификации, содержащий 16 пг вещества, и высушивали в центрифужном испарителе Concentrator plus (Eppendorf, США).

Секвенирование осуществлялось в ЦКП «ГЕНОМ» на базе Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН по стандартному протоколу с использованием 16 пг выделенных из геля ПЦР-продуктов, прямых праймеров и набора реагентов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) на автоматическом секвенаторе 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, США).

Статистический анализ результатов секвенирования проводили с использованием программного обеспечения DNA Sequencing Analysis Software 5.1 (Applied Biosystems, США) и онлайн-сервиса Quantification Tool for Methylation Analysis (quma.cdb.riken.jp). Уровень ДНК-метиляции оценивали количественно по доле метилированных CpG-островков в промоторах генов.

2.4.2. Выделение ДНК, бисульфитная конверсия и секвенирование нового поколения

Образцы, полученные для NGS, измельчали хирургическим скальпелем и гомогенизировали. Выделение ДНК проводили набором DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, США). По 1 мкг геномной ДНК каждого образца подвергали бисульфитной конверсии с использованием набора EZ DNA Methylation-Gold Kit (ZymoResearch, США). ДНК-амплификация проводилась при общем объеме реакции 25 мкл, содержащем смесь объемом 1 мкл прямых и обратных праймеров (10 мкмоль) и 2 мкл ДНК после бисульфитного конвертирования. Было использовано 2 праймера из работы [21], которые подобраны к CpG-богатому фрагменту в промоторе *HOXA10* на 5'-конце выше экзона I (F I регион).

Прямой: 5'-TGGGGTAGTTTTTATAGTTTTTG-3'.

Обратный: 5'-AACCSTTTСТААСТААСТТТСТТ-3'
(биотинилированный).

Для амплификации CpG-богатого фрагмента в промоторе гена *HOXA11* использовали праймеры из работы [82].

Прямой: 5'-ATTTTATATGTAAGAAATTG-3'

Обратный: 5'-AAAGTTTCCATTCTAAACAAT-3'

Амплификацию проводили по следующей программе: 95°C в течение 1 минуты, после чего — 40 циклов при 95°C в течение 30 сек, 55 °C в течение 30 сек и 72°C в течение 30 сек. Конечное воздействие температуры 72°C было в течение 10 минут. Наличие ПЦР-продуктов и их длину определяли с помощью электрофореза в 2,5% агарозном геле с маркерами молекулярного веса 261 bp.

Амплифицированные фрагменты секвенировали с использованием полупроводникового секвенирования на приборе Ion S5 (Thermo Fisher Scientific, США). Приготовление библиотек для секвенирования и секвенирование проводили согласно инструкции производителя.

Для определения степени метилирования проводили выравнивание полученных в результате секвенирования прочтений на референсную последовательность с использованием программы bowtie2 [99]. После этого подсчитывали количество нуклеотидов С и Т (т. е. метилированных и неметилированных нуклеотидов в изначальной последовательности) для каждого CpG-островка.

Для контроля уровня бисульфитной конвертации подсчитывали соотношение нуклеотидов Т к С в каждой позиции вне CpG-островков, где до конвертации был нуклеотид С. Статус конвертации для всего образца был определен как среднее значение для всех позиций и составил не менее 95%.

2.4.3. Выделение РНК для транскриптомного исследования и ПЦР-РВ

Из образцов биопсии эндометрия, замороженных в жидком азоте в пробирках с раствором, который содержит гуанидинтиоцианат для предотвращения деградации РНК, производили выделение РНК для последующего

транскриптомного анализа и ПЦР-РВ. Выделение тотальной РНК осуществляли по принципу гуанидинтиоцианат-фенол-хлороформной экстракции с помощью набора реагентов RNeasy Mini Kit с использованием Qiazol Lysis Reagent (Qiagen, Германия) по протоколу производителя.

Оценку концентрации РНК осуществляли с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, США). Качество выделенной РНК оценивали с помощью набора реагентов Agilent RNA 6000 Pico Kit на приборе 2100 Bioanalyzer (Agilent, США) по протоколу производителя. Использовали образцы РНК с показателем целостности РНК (RIN) не менее 7.

2.4.4. Полногеномный транскриптомный анализ

Для полногеномного транскриптомного анализа использовали наборы реагентов GeneChip WT PLUS Reagent Kit и GeneChip Hybridization, Wash and Stain Kit с микрочипами GeneChip Human Gene 2.0 ST Array (Thermo Fisher Scientific) по протоколу производителя. На один чип использовали 500 нг образца тотальной РНК, выделенной из биопсийного материала.

Обработку транскриптомных данных осуществляли с помощью программного обеспечения Transcriptome Analysis Console v.4.0.1.36 (Thermo Fisher Scientific) с использованием статистической опции eBayes. Построение и визуализация сети взаимосвязей генов осуществлялась с помощью плагина GeneMANIA 3.5.1 для Cytoscape 3.7.2.

2.4.5. Полимеразная цепная реакция с детекцией продуктов амплификации в реальном времени

Проводили обратную транскрипцию с образцами тотальной РНК (по 500 нг на реакцию) с помощью набора реагентов для ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в реальном времени (ДНК-технология, Россия).

Полученные образцы кДНК использовали для определения экспрессии 16 функциональных генов из построенной сети взаимосвязей генов (*MSX1/HOX7*, *HOXA10*, *HOXA11*, *PAEP*, *DPP4*, *HABP2*, *HLA-DOB*, *FOS*, *FOSB*, *DUSP1*, *TMEM45B*, *TP53I3*, *VCAN*, *SCGB1D2*, *CD68*, *CD69*) и 3 референсных генов (*B2M*, *GUSB* и *TBP*) с помощью ПЦР-РВ.

ПЦР-РВ проводили в двух повторах для каждой точки по следующей программе: предварительная денатурация при 95°C в течение 5 мин, затем 40 циклов из трех шагов каждый: денатурация при 94°C в течение 20 с, отжиг при 64°C в течение 10 с, элонгация при 72°C в течение 15 с; фиксацию флуоресцентного сигнала осуществляли в режиме реального времени на стадии элонгации. После 40 циклов ПЦР строили кривую плавления.

2.5. Статистическая обработка полученных данных

Статистическая обработка данных выполнялась на персональном компьютере с помощью программы Microsoft Excel, пакета статистических программ Statistica 12 (StatSoft, США) и SPSS Statistics 23 (IBM, США).

Учитывая небольшой объем выборки, использованы непараметрические статистические методы. При анализе непрерывных и дискретных данных определялось значение медианы и межквартильный размах. Для оценки значимости различий непрерывных данных производилось сравнение медианы распределения признака с определением U-критерия Манна-Уитни (Mann-Whitney) для независимых выборок.

Для качественных данных определяли частоту выявления признака (%). Для сравнения категориальных (бинарных) данных проводили построение таблиц сопряженности с 1 степенью свободы (2x2) и в качестве меры сравнения использовали отношение шансов (ОШ) с расчетом границ 95% доверительного интервала (ДИ) и с использованием двустороннего точного критерия Фишера (Fisher exact test). Для сравнения пациенток до и после приема препарата и оценки

различий использовался непараметрический Т-критерий Уилкоксона (Wilcoxon) для связанных выборок.

Для расчета вероятности наступления беременности производилось построение модели на основе метода логистической регрессии с учетом относительного вклада предикторов с использованием метода χ^2 . Для построения классификаторов на основе одновременного анализа экспрессии двух или трех генов по данным полногеномного транскриптомного исследования и ПЦР-РВ использовали метод опорных векторов и проводили ROC-анализ с расчетом площади под ROC-кривой (AUC) с 95% ДИ. Проводилась оценка информативности диагностических критериев — чувствительности, специфичности, прогностической значимости.

Различия между статистическими величинами считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

С целью уменьшения ошибки репрезентативности были использованы строгие критерии отбора пациентов в исследование. Для минимизации системной ошибки выборки при проведении исследования для всех пациенток 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 И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Клинико-лабораторная характеристика пациенток, включенных в исследование

В исследование было включено 78 пациенток, обратившихся для лечения бесплодия методами ВРТ. Все пациентки соответствовали критериям включения в исследование. Пациентки с выявленными критериями исключения не включались в дальнейший анализ (8 пациенток не вступили в программу ВРТ, у 4 пациенток была отмена ПЭ). В зависимости от эффективности проведенной программы ЭКО/ИКСИ было сформировано 2 группы сравнения:

группа 1 (n=25) — пациентки, у которых беременность наступила;

группа 2 (n=41) — пациентки, у которых беременность не наступила

(Рисунок 8).



Рисунок 8. Стратификация пациенток на группы

Проведен анализ клинико-анамнестических и лабораторных характеристик включенных в исследование пациенток с неоднократными неудачами ВРТ. Было показано, что все пациентки были сопоставимы по возрасту. Возраст пациенток, включенных в исследование, значительно не различался и находился в пределах 22–40 лет. Медиана возраста пациенток в группе 1 составила 33 года (межквартильный

размах 27–39 лет), а в группе 2 — 35 лет (межквартильный размах 32–39 лет) ($p>0,05$) (Таблица 3).

Таблица 3 — Возраст, антропометрические характеристики и образ жизни изучаемых групп пациенток

Параметр	Группа 1 (беременные) n=25	Группа 2 (небеременные) n=41	ОШ [95% ДИ]	p-уровень значимости
Возраст, лет*	33 (31–35)	35 (32–39)	—	0,117
Возраст партнера, лет*	35 (33–38)	35 (33–39)	—	0,379
Антропометрические характеристики*				
Рост, м	1,68 (1,65–1,70)	1,65 (1,62–1,70)	—	0,575
Масса тела, кг	60 (55–71)	64 (54–70)	—	0,972
ИМТ, кг/м ²	21,7 (19,5–25,3)	23,1 (20,4–25,7)	—	0,117
Образ жизни**				
Курение	1 (4%)	4 (10%)	0,39 [0,04;3,66]	0,642
Употребление алкоголя	3 (12%)	4 (10%)	1,26 [0,26;6,17]	1,000
Регулярная физическая активность	11 (44%)	23 (56%)	0,62 [0,23;1,68]	0,447

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

**Данные представлены как абсолютные значения и %, точный двусторонний критерий Фишера

При распределении пациенток по возрастным группам больше всего пациенток было в возрастной группе 30–35 лет (Таблица 4). Возраст партнеров пациенток, включенных в исследование, значимо не различался, и медиана возраста в обеих группах составила 35 лет ($p>0,05$). При анализе антропометрических данных статистически значимых различий выявлено не было. В каждой из групп преобладали пациентки с нормальным весом (ИМТ от 18,5 до 24,9): в группе 1 18 (72%) пациенток имели нормальный вес, а в группе 2 — 28 (68%) пациенток; у остальных пациенток отмечался избыточный вес (ИМТ от 25 до 29,9) (ОШ=0,83, 95% ДИ [0,27;2,56]; точный двусторонний критерий Фишера $p=0,778$).

Практически все пациентки принадлежали к среднему социально-экономическому классу, имели среднее или высшее образование; условия их труда не были связаны с профессиональными вредностями. Значимых различий в образе

жизни (курение, употребление алкоголя, регулярная физическая активность) выявлено не было.

Таблица 4 — Распределение пациенток изучаемых групп по возрастам

Возрастная группа	Группа 1 (n=25, беременные)*	Группа 2 (n=41, небеременные)*	ОШ [95% ДИ]	Точный двусторонний критерий Фишера
22–29 лет	5 (20%)	6 (15%)	1,46 [0,39;5,39]	0,735
30–35 лет	14 (56%)	19 (46%)	1,47 [0,54;4,01]	0,612
36–40 лет	6 (24%)	16 (39%)	2,03 [0,67;6,16]	0,284

*Данные представлены как абсолютные значения и %

Был проведен сравнительный анализ структуры соматической патологии у пациенток с наступившей и ненаступившей в результате программы ВРТ беременностью (Таблица 5). В обеих группах частота перенесенных детских инфекционных заболеваний (корь, краснуха, ветряная оспа) была высокой и составила 76% (19/25) в группе 1 и 68% (28/41) в группе 2 (p=0,583).

Таблица 5 — Соматические заболевания у пациенток групп 1 и 2

Параметр	Группа 1* (беременные) n=25	Группа 2* (небеременные) n=41	ОШ [95% ДИ]	Двусторонний точный критерий Фишера
Детские инфекционные заболевания	19 (76%)	28 (68%)	1,47 [0,48;4,55]	0,583
Аллергические заболевания	1 (4%)	4 (10%)	0,39 [0,04;3,69]	0,642
Заболевания сердечно-сосудистой системы	2 (8%)	5 (12%)	0,63 [0,11;3,50]	0,283
Заболевания органов дыхательной системы	1 (4%)	2 (5%)	0,81 [0,07;9,45]	1,000
Заболевания желудочно-кишечного тракта	2 (8%)	4 (10%)	0,80 [0,14;4,75]	1,000
Заболевания мочевыделительной системы	1 (4%)	4 (10%)	0,39 [0,04;3,66]	0,642
Заболевания эндокринной системы	8 (32%)	8 (24%)	1,90 [0,62;6,08]	0,375

*Данные представлены как абсолютные значения и %

Аллергические заболевания выявлены у 1 (4%) пациентки группы 1 и у 4 (10%) пациенток группы 2 ($p=0,642$). Среди аллергических заболеваний отмечались аллергический ринит, атопический дерматит и лекарственная аллергия. Реакции лекарственной гиперчувствительности отмечались на местные анестетики и антибиотики пенициллинового ряда.

Заболевания сердечно-сосудистой системы выявлены у 2 (8%) пациенток группы 1 и у 5 (12%) пациенток группы 2 ($p=0,283$). В структуре заболеваний сердечно-сосудистой системы наиболее часто встречался пролапс митрального клапана без гемодинамически значимой регургитации, вегетососудистую дистонию по гипотоническому типу, гипертоническую болезнь.

Заболевания органов дыхательной системы выявлены у 1 (4%) пациентки группы 1 и у 2 (5%) пациенток группы 2 ($p=1,000$). Среди заболеваний верхних дыхательных путей у пациенток отмечались хронический ринит и хронический тонзиллит.

Статистически значимых отличий по наличию в анамнезе заболеваний мочевыделительной системы (хронический цистит, хронический пиелонефрит) и заболеваний желудочно-кишечного тракта (хронический гастрит, хронический панкреатит, дискинезия желчевыводящих путей) между группами пациенток выявлено не было ($p=0,642$ и $p=1,000$ соответственно).

Заболевания эндокринной системы были скорректированы перед началом программы ВРТ. Наиболее часто у пациенток обеих групп встречалась патология щитовидной железы, в том числе аутоиммунного генеза. Статистически значимых отличий по наличию эндокринной патологии между группами выявлено не было ($p=0,375$).

Менструальная и сексуальная функции не отличалась между группами ($p>0,05$, U-тест Манна-Уитни). У пациенток обеих групп менструальный цикл установился сразу и имел регулярный характер. Все пациентки отмечали интенсивность менструации как умеренную. Сравнительный анализ показателей

менструальной и сексуальной функции пациенток продемонстрирован ниже (Таблица 6).

Таблица 6 — Особенности менструальной и половой функции у пациенток с положительным и отрицательным исходом программ ВРТ

Параметр	Группа 1 (беременные)* n=25	Группа 2 (небеременные)* n=41	p-уровень значимости
Возраст менархе, лет	13 (12–14)	13 (12–14)	0,531
Длительность менструации, дней	5 (5–5)	5 (4–5)	0,475
Длительность менструального цикла, дней	28 (28–30)	28 (28–28)	0,377
Возраст начала половой жизни, лет	18 (18–19)	18 (17–19)	0,075

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

Структура гинекологической заболеваемости у пациенток группы 1 и 2 была представлена заболеваниями, передающимися половым путем, наружного генитального эндометриоза (НГЭ) и аденомиоза 1–2 стадии, эрозией шейки матки интрамуральной миомой матки малых размеров, гиперплазией эндометрия и полипами эндометрия в анамнезе. В структуре гинекологических заболеваний преобладали заболеваниями, передающимися половым путем — у 12 (48%) пациенток группы 1 и у 20 (49%) пациенток группы 2. По различным гинекологическим заболеваниям в анамнезе обе группы пациенток были сопоставимы, однако количество пациенток с полипом эндометрия в анамнезе в группе 2 было несколько больше, но выявленная зависимость имела пограничную статистическую значимость (двусторонний точный критерий Фишера $p=0,055$). При этом шанс ненаступления беременности у пациенток с полипом эндометрия в анамнезе был в 3,7 раз выше, чем таковые шансы у пациенток без полипа эндометрия в анамнезе (Таблица 7).

Таблица 7 — Структура гинекологической заболеваемости у пациенток с положительным и отрицательным исходом программ ВРТ

Параметр	Группа 1 (беременные)* n=25	Группа 2 (небеременные)* n=41	ОШ [95% ДИ]	Двусторонний точный критерий Фишера
Заболевания, передающиеся половым путем	12 (48%)	20 (49%)	0,97 [0,36;2,62]	1,000
Наружный генитальный эндометриоз	3 (12%)	7 (17%)	0,66 [0,16;2,84]	0,730
Аденомиоз	2 (8%)	4 (10%)	0,80 [0,14;4,75]	1,000
Эрозия шейки матки	6 (24%)	7 (17%)	1,53 [0,45;5,23]	0,535
Гиперплазия эндометрия	2 (8%)	3 (7%)	1,000 [0,17;7,09]	1,000
Полип эндометрия	4 (16%)	17 (41%)	0,27 [0,08;0,93]	0,055
Миома матки	4 (16%)	8 (20%)	0,79 [0,21;2,94]	1,000

* Данные представлены как абсолютные значения и %

Оперативные вмешательства на органах малого таза встречались у пациенток обеих групп, структура их представлена ниже (Таблица 8). Оперативные вмешательства были представлены полостными операциями (лапаротомическим или лапароскопическим методом) и малоинвазивными операциями на органах малого таза (гистероскопия с выполнением полипэктомии или отдельного диагностического выскабливания [РДВ]). При сравнительной оценке частоты выполненных оперативных вмешательств мы не выявили статистически значимых межгрупповых различий (двусторонний точный критерий Фишера $p > 0,05$). Оперативное вмешательство на яичниках во всех случаях было ограничено цистэктомией по поводу функциональных кист яичников. Все миомэктомии, выполненные у пациенток обеих групп, проводились без вскрытия полости матки.

Все пациентки, включенные в исследование, имели трубно-перитонеальный фактор бесплодия. При этом около половины пациенток в каждой группе имели непроходимость маточных труб (56% и 44% в группе 1 и 2 соответственно), а у

другой половины пациенток в анамнезе было оперативное вмешательство с удалением одной или нескольких маточных труб. В обеих группах чаще встречалась двусторонняя тубэктомия: 28% (7/11) в группе 1 и 32% (13/23) в группе 2. Также учитывалось проведение сальпингоовариолизиса у пациенток с сохраненными маточными трубами, по частоте данного оперативного вмешательства также не было выявлено статистически значимых межгрупповых различий (двусторонний точный критерий Фишера $p > 0,05$).

Таблица 8 — Структура оперативных вмешательств на органах малого таза в анамнезе у пациенток с положительным и отрицательным исходом программ ВРТ

Параметр	Группа 1* (беременные) n=25	Группа 2* (небеременные) n=41	ОШ [95% ДИ]	Двусторонний точный критерий Фишера
Полипэктомия, РДВ	13 (52%)	30 (73%)	0,40 [0,14;1,13]	0,111
Полостные операции	19 (76%)	36 (88%)	0,44 [0,12;1,63]	0,308
Сальпингоовариолизис	6 (24%)	8 (20%)	1,30 [0,39;4,32]	0,760
Миомэктомия в анамнезе	3 (12%)	4 (10%)	1,26 [0,26;6,17]	1,000
Тубэктомия в анамнезе	11 (44%)	23 (56%)	0,62 [0,23;1,68]	0,447
Из них тубэктомия: односторонняя	4 (36%)	10 (43%)	0,74 [0,17;3,26]	0,729
двусторонняя	7 (64%)	13 (57%)		
Коагуляция очагов наружного генитального эндометриоза	1 (4%)	5 (12%)	0,30 [0,03;2,73]	0,396
Вмешательства на яичниках	4 (16%)	9 (22%)	0,68 [0,19;2,49]	0,752

* Данные представлены как абсолютные значения и %

Обращают на себя внимание выявленные значимые различия между группами пациенток по числу внутриматочных вмешательств (Таблица 9). При их анализе рассматривались все проводимые у пациенток в анамнезе манипуляции: РДВ, полипэктомии, инструментальное удаление плодного яйца.

Таблица 9 — Число различных видов оперативных вмешательств на органах малого таза в анамнезе у пациенток групп 1 и 2

Параметр	Группа 1 (n=25, беременные)*	Группа 2 (n=41, небеременные)*	p-уровень значимости
Число внутриматочных вмешательств	1 (0–1)	1 (1–2)	0,027
Число полостных вмешательств	2 (1–2)	2 (1–2)	0,624

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

Среди пациенток групп 1 и 2 был проведен анализ подгрупп по количеству внутриматочных вмешательств (Рисунок 9).

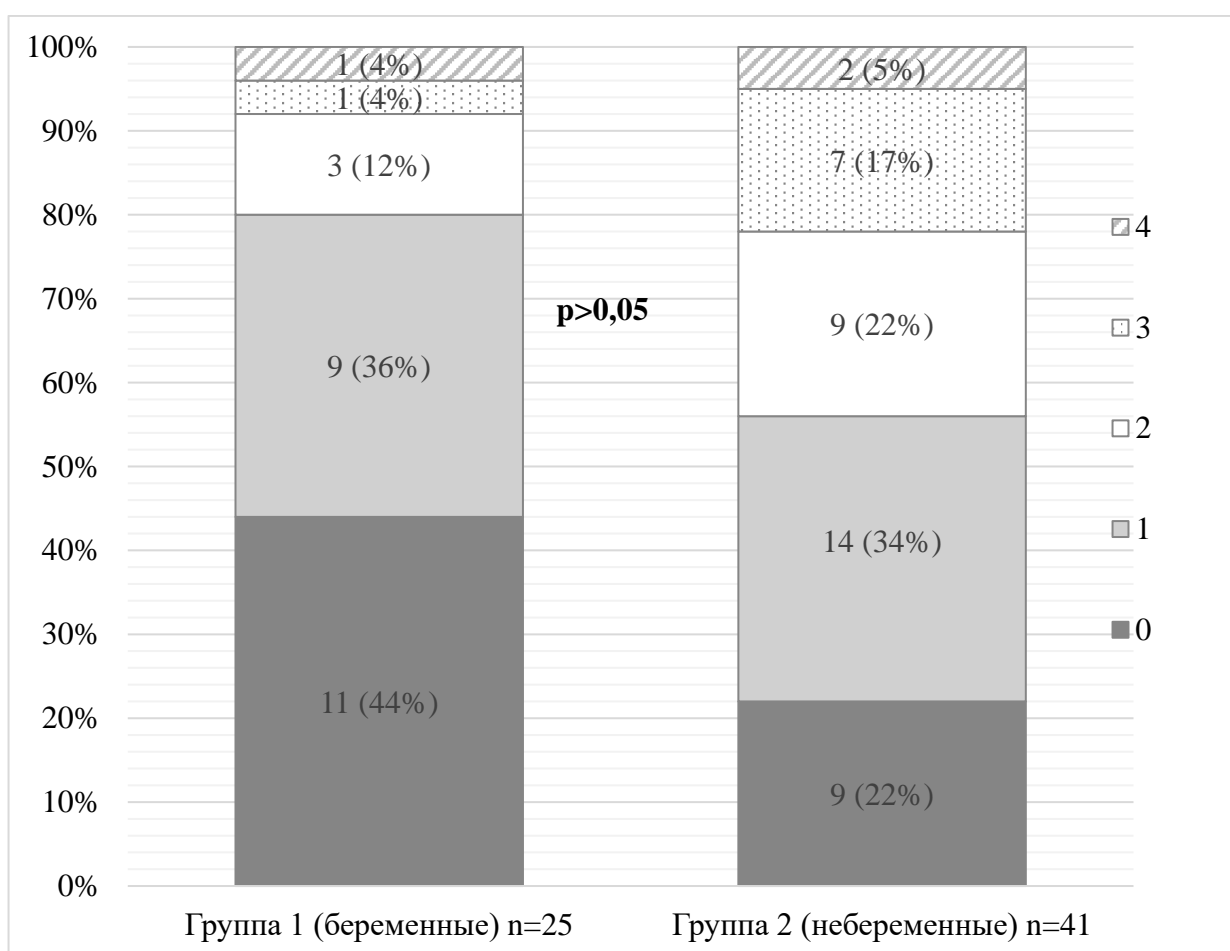


Рисунок 9. Распределение количества внутриматочных вмешательств у пациенток группы 1 и 2

Было выявлено, что у пациенток, участвующих в исследовании, было не более четырех внутриматочных вмешательств в анамнезе. По крайней мере одно вмешательство в группе 1 было у 14 (56%) пациенток, а в группе 2 — у 32 (78%) пациенток (точный двусторонний критерий Фишера $p=0,096$)

И в группе 1, и в группе 2 преобладали женщины с однократным внутриматочным вмешательством в анамнезе (36% и 34% соответственно), а меньше всего женщин в каждой из групп имели в анамнезе 4 внутриматочных вмешательства (4% и 5% соответственно). Однако различия групп были статистически незначимыми (Таблица 10).

Таблица 10 — Подгруппы сравнения по количеству внутриматочных вмешательств

Подгруппы сравнения по количеству внутриматочных вмешательств	ОШ [95% ДИ]	Двусторонний точный критерий Фишера
0 против 1–4 вмешательства	2,79 [0,95;8,24]	0,096
0–1 против 2–4 вмешательства	3,13 [0,98;9,97]	0,064
0–2 против 3–4 вмешательства	3,23 [0,64;16,40]	0,185
0–3 против 4 вмешательства	1,23 [0,11;14,32]	1,000

В структуре бесплодия в группе 1 преобладало первичное бесплодие — 14 пациенток (56%), в то время как в группе 2 первичное бесплодие отмечалось у 17 (41%) пациенток, однако данные различия не были статистически значимыми (ОШ 1,80, 95% ДИ [0,66;4,91], $p=0,313$). В обеих группах около половины пациенток имели в дополнение к трубно-перитонеальному фактору бесплодия мужской фактор: 11 (41%) пациенток в группе 1 и 20 (49%) пациенток в группе 2 (ОШ 0,83, 95% ДИ [0,30;2,24], двусторонний точный критерий Фишера $p=0,801$). Во всех случаях патозооспермия не была выраженной. Ниже представлены данные акушерского анамнеза и анамнеза бесплодия пациенток групп 1 и 2 (Таблица 11). Статистически значимых различий между группами пациенток обнаружено не было.

При анализе количества неудачных попыток ЭКО было выявлено, что большинство пациенток группы 1 и 2 имело 2 неудачные попытки ЭКО в анамнезе (18 (72%) и 29 (71%) соответственно, ОШ=1,06, 95% ДИ [0,35; 3,20], двусторонний точный критерий Фишера $p=1,000$). Меньше всего было пациенток с 5 и более неудачными попытками ЭКО в анамнезе: в группе 1 — 3 (12%) пациентки, в группе

2 — 2 (5%) пациентки (ОШ=0,27, 95% ДИ [0,03;2,25], двусторонний точный критерий Фишера $p=0,305$) (Рисунок 10).

Таблица 11 — Акушерско-гинекологический анамнез пациенток групп 1 и 2

Параметр	Группа 1 (беременные) n=25	Группа 2 (небеременные) n=41	p-уровень значимости
Число беременностей	1 (0–2)	1 (0–2)	0,686
Число самопроизвольных беременностей	0 (0–1)	0 (0–1)	0,453
Число родов	0 (0–0)	0 (0–0)	0,457
Число самопроизвольных выкидышей	0 (0–0)	0 (0–0)	0,524
Число искусственных прерываний беременности	0 (0–0)	0 (0–0)	0,061
Число внематочных беременностей	0 (0–1)	0 (0–1)	0,954
Длительность бесплодия, лет	5 (4–7)	5 (4–10)	0,600
Число попыток ЭКО или ЭКО/ИКСИ	2 (2–3)	2 (2–3)	0,940
Число беременностей в результате программ ЭКО или ЭКО/ИКСИ	0 (0–0)	0 (0–0)	0,126

Данные представлены как медиана, 25–75 перцентили; U-тест Манна-Уитни

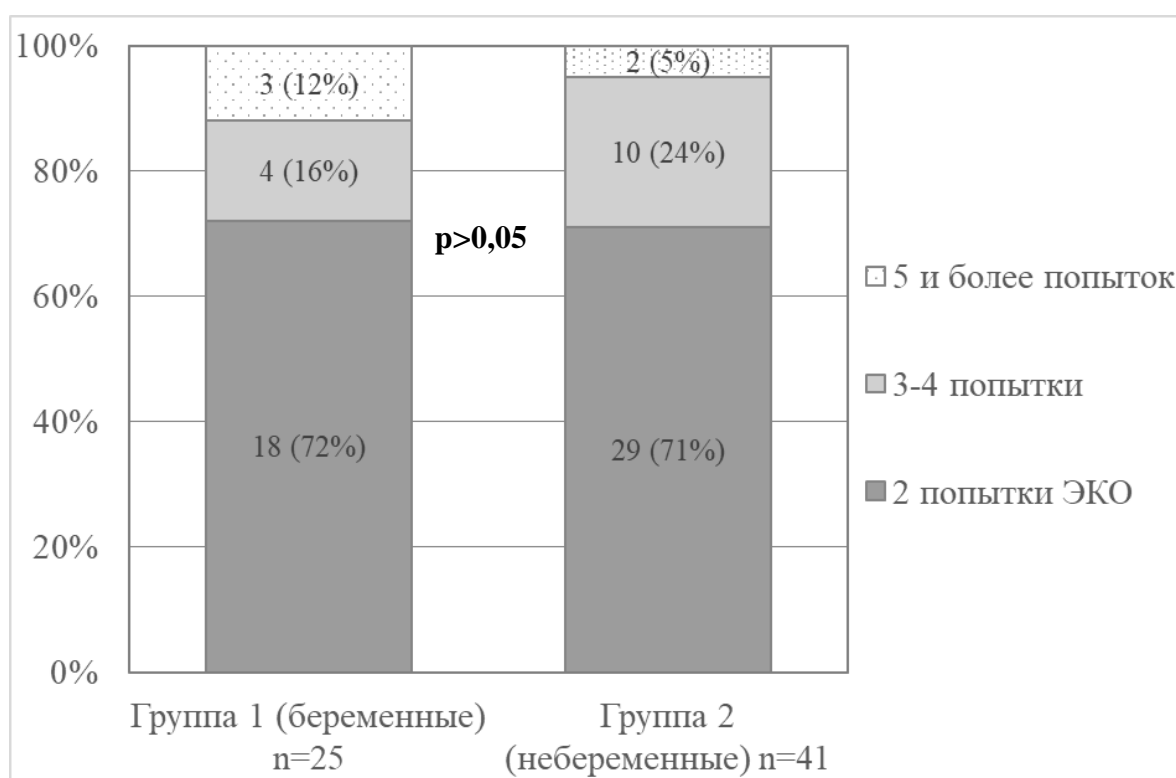


Рисунок 10. Количество неудачных попыток ЭКО в анамнезе у обследуемых пациенток

Результаты гормонального скрининга, проведенного на 2–3 и 21–22 дни менструального цикла отражены ниже (Таблица 12). Концентрации гормонов у пациенток обеих групп на момент вступления в программу ЭКО находились в пределах нормативных значений, принятых в лаборатории, выполнившей данный анализ. Статистически значимых отличий в концентрации гормонов между пациентками группы 1 и 2 выявлено не было ($p>0,05$).

Таблица 12 — Концентрация гормонов в сыворотке крови у пациенток с положительным и отрицательным исходом программ ВРТ

Параметр	Группа 1 (беременные) n=25	Группа 2 (небеременные) n=41	p-уровень значимости
ФСГ, МЕ/л	7,20 (6,05–9,55)	7,20 (6,32–9,55)	0,867
ЛГ, МЕ/л	6,10 (5,20–7,37)	4,39 (3,68–7,30)	0,086
Эстрадиол, пмоль/л	87 (54–191)	123 (92–192)	0,104
Прогестерон, нмоль/л	24,7 (4,6–45,3)	29,4 (7,9–51,4)	0,413
Пролактин, мМЕ/л	269 (203–416)	281 (211–409)	0,839
АМГ, нг/мл	3,43 (1,14–4,29)	2,01 (1,21–2,78)	0,095
Тестостерон	1,28 (0,69–1,89)	1,12 (0,88–1,71)	0,919
ТТГ, мМЕ/л	1,61 (1,18–2,75)	1,84 (1,09–2,89)	0,937
Т4св, пмоль/л	13,64 (11,00–15,20)	14,03 (12,41–16,01)	0,433
17–ОП, нмоль/л	2,12 (0,87–3,10)	2,92 (1,64–4,07)	0,089
ДГАЭС, мкмоль/л	5,8 (3,3–8,0)	4,29 (3,85–8,20)	0,856

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

Для прогнозирования наступления беременности в программе ВРТ с учетом клинико-anamnestических показателей использовался метод множественного логистического регрессионного анализа с использованием метода χ^2 . В качестве предикторов оценивались следующие категориальные и количественные переменные: возраст, ИМТ, наличие/отсутствие искусственного и самопроизвольного прерывания беременности в анамнезе, количество родов, наличие воспалительных заболеваний в анамнезе, уровень АМГ, длительность бесплодия. Никакие предикторы попарно не коррелировали. Модель считалась статистически значимой при $p<0,05$. Построение логистической регрессионной

модели осуществлялось методом пошагового исключения прогностических факторов с определением минимального набора предикторов. Таким образом, было выявлено, что итоговая модель была статистически значимой ($p=0,009$) при включении в неё следующих параметров: возраст пациентки, наличие воспалительных заболеваний органов малого таза в анамнезе, уровень антимюллерова гормона (АМГ) и длительность бесплодия. В основе итоговой модели лежит формула (2). Данная модель, построенная с учетом только клиничко-анамнестических показателей, позволяет объяснить лишь 42,6% наблюдаемой дисперсии. Учитывая достаточно низкую предсказательную способность данной модели, в дальнейшем был проведен анализ молекулярно-генетических особенностей эндометрия для прогнозирования исходов программ ВРТ.

$$P(B) = \frac{\text{Exp} [-3,9 - 0,4 \times B - 1,8 \times \text{Восп} + 1,2 \times \text{АМГ} - 0,06 \times D]}{1 + \text{Exp} [-3,9 - 0,4 \times B - 1,8 \times \text{Восп} + 1,2 \times \text{АМГ} - 0,06 \times D]} \quad (2)$$

где $P(B)$ — вероятность наступления беременности, Exp — экспонента, B — возраст пациентки в годах, Восп — наличие воспалительных заболеваний органов малого таза в анамнезе, АМГ — значения АМГ в сыворотке крови в нг/мл, D — длительность бесплодия в годах.

3.2. Характеристика циклов ЭКО и переноса эмбрионов

3.2.1. Характеристика протоколов стимуляции в программе ЭКО в исследуемых группах пациенток

Всем пациенткам стимуляция функции яичников проводилась препаратами рФСГ с ант-ГнРГ. Данные показателей стимуляции функции яичников представлены ниже (Таблица 13). Представленные данные демонстрируют отсутствие статистически значимых различий в дозах вводимых препаратов и длительности проводимой стимуляции ($p>0,05$). В качестве триггера овуляции у

всех пациенток обеих групп применялся препарат чХГ в дозе 8000–10000 МЕ однократно внутримышечно.

Таблица 13 — Особенности овариальной стимуляции пациенток групп 1 и 2

Параметр	Группа 1 (беременные) n=25	Группа 2 (небеременные) n=41	р-уровень значимости
Суммарная доза препарата, МЕ/сут	1800 (1575–2100)	1875 (1425–2250)	0,624
Длительность стимуляции, дни	9 (8–10)	9 (8–9)	0,102

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

3.2.2. Характеристика фолликулогенеза, оогенеза и раннего эмбриогенеза

Основные параметры эмбриологического этапа проведенной программы ВРТ отражены ниже (Таблица 14). Как следует из приведенных данных, общее количество полученных ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК), количество ооцитов МП и количество полученных эмбрионов на стадии двух пронуклеусов (2PN) значимо не отличались у пациенток с положительным и отрицательным исходом программы ВРТ ($p > 0,05$).

Фертилизация ооцитов у всех пациенток обеих групп проводилась методом ИКСИ. Криоконсервация эмбрионов проведена у 14 (56%) пациенток группы 1 и у 18 (45%) пациенток группы 2, при этом различия были статистически незначимыми (ОШ=1,63, 95% ДИ [0,60;4,43], точный двусторонний критерий Фишера = 0,447).

Таблица 14 — Характеристики эмбриологического этапа программы ВРТ у пациенток групп 1 и 2

Параметр	Группа 1 (беременные) n=25	Группа 2 (небеременные) n=41	р-уровень значимости
Общее количество полученных ОКК	8 (6–12)	8 (6–9)	0,146
Количество ооцитов МП	7 (5–8)	7 (5–7)	0,241
Количество эмбрионов 2PN	7 (5–8)	6 (5–7)	0,238

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

Частота наступления беременности на ПЭ у включенных в исследование пациенток составила 32%. В группе пациенток с наступившей беременностью был проведен анализ частоты репродуктивных потерь из расчета на ПЭ. Также оценивалась конечная цель лечения бесплодия — частота родов. Структура исходов программы ВРТ у пациенток группы 1 представлена ниже (Таблица 15). Прерывания беременности, наступившей в результате программы ВРТ, были на ранних сроках (до 12 недель), причем у 1 (4%) пациентки произошел полный самопроизвольный выкидыш, а у 6 (24%) пациенток была диагностирована неразвивающаяся беременность, в связи с чем была выполнена вакуум-аспирация или инструментальное удаление плодного яйца и выскабливание стенок полости матки. Все родившиеся дети были здоровыми.

Таблица 15 — Структура исходов программы ЭКО у пациенток группы 1

Параметр	Абсолютные значения (%)
Частота наступления биохимической беременности	1 (4%)
Частота наступления клинической беременности	24 (96%)
Частота прерывания беременности до 12 недель	7 (28%)
Частота родов	17 (68%)

Данные представлены как абсолютные значения и %

3.3. Особенности транскриптома эндометрия при повторных неудачных попытках ЭКО с различными исходами

На следующем этапе проведения исследования было случайным образом отобрано 15 пациенток. Для анализа генетических факторов, которые могут быть связаны с исходами программы ВРТ у женщин с неудачными попытками ЭКО в анамнезе, в образцах пайпель-биопсии эндометрия в «окно имплантации» определяли профиль экспрессии генов на уровне транскриптома с помощью микрочипов GeneChip Human Gene 2.0 ST.

Все пациентки были стратифицированы в группы в зависимости от исхода последующей программы ВРТ: группу 3 составили пациентки с положительным

исходом программы ЭКО/ИКСИ (n=9), в группу 4 вошли пациентки с отрицательным исходом программы ЭКО/ИКСИ (n=6).

Клинико-anamнестические данные пациенток обеих групп представлены ниже (Таблица 16).

Таблица 16 — Клинико-anamнестическая характеристика пациенток групп 3 и 4

Параметр	Группа 3 (беременные) n=9	Группа 4 (небеременные) n=6	ОШ [95% ДИ]	p-уровень значимости
Возраст, лет*	33 (29–36)	23 (21–26)	—	0,502
<i>Антропометрические характеристики</i>				
Рост, м*	1,62 (1,57–1,70)	1,67 (1,63–1,72)	—	0,449
Масса тела, кг*	56 (49–60)	63 (59–72)	—	0,129
ИМТ, кг/м ² *	21,3 (19,4–22,3)	22,6 (20,1–25,9)	—	0,344
<i>Особенности менструальной функции</i>				
Возраст менархе, лет*	13 (13–14)	13 (12–13)	—	0,174
Длительность менструации, дней*	5 (5–6)	5 (4–6)	—	0,486
Длительность менструального цикла, дней*	28 (28–30)	28 (27–28)	—	0,100
Возраст начала половой жизни, лет*	19 (18–19)	18 (17–19)	—	0,360
<i>Гинекологические заболевания</i>				
Заболевания, передающиеся половым путем **	3 (33%)	1 (17%)	2,50 [0,19;32,20]	0,604
Наружный генитальный эндометриоз**	1 (11%)	1 (17%)	0,63 [0,03;12,41]	1,000
Миома матки**	2 (22%)	2 (33%)	0,57 [0,06;5,78]	1,000
Патология эндометрия (гиперплазия эндометрия, полипы эндометрия)**	2 (22%)	3 (50%)	0,29 [0,03;2,69]	0,329
Эрозия шейки матки**	3 (33%)	1 (17%)	2,50 [0,19;32,20]	0,604
Число внутриматочных вмешательств*	1 (1–1)	2 (2–3)	—	0,061
Тип бесплодия**:				
Первичное	6 (67%)	3 (50%)	2,00 [0,24;16,61]	0,622
Вторичное	3 (33%)	3 (50%)		

Продолжение таблицы 16

Параметр	Группа 3 (беременные) n=9	Группа 4 (небеременные) n=6	ОШ [95% ДИ]	p-уровень значимости
Длительность бесплодия, лет*	5,0 (4,0–10,0)	5,0 (3,0–10,0)	—	0,128
Число беременностей*	0 (0–0)	1 (0–1)	—	0,398
Число попыток ЭКО*	3 (2–6)	3 (2–5)	—	0,920
Число искусственных прерываний беременности*	0 (0–0)	0 (0–1)	—	0,257
Число самопроизвольных прерываний беременности*	0 (0–0)	0 (0–0)	—	0,571
Число родов*	0 (0–1)	0 (0–0)	—	0,289

* Данные представлены как медиана (25–75 процентиля), тест Манна-Уитни

** Данные представлены как абсолютные значения (%), двусторонний точный тест Фишера

Возраст, антропометрические данные, акушерский и гинекологический анамнез были сопоставимы, не было выявлено статистически значимых различий ($p > 0,05$).

Значимым считалось изменение экспрессии генов не менее чем в 2 раза при p -значении $< 0,05$. Ниже представлена визуализация распределения транскриптов по экспрессии в группах 3 и 4 (Рисунок 11А). Также представлена визуализация распределения транскриптов по кратности различий экспрессии в двух группах и значимости данных различий (Рисунок 11В). Транскрипты, различие экспрессии которых не является статистически значимым, представлены на указанных рисунках серым цветом; транскрипты, экспрессия которых выше в группе 3, обозначены красным цветом, а транскрипты, экспрессия которых выше в группе 4, — зеленым цветом.

Было показано, что в эндометрии пациенток из группы 4 (отрицательный исход программы ВРТ) статистически значимо ниже экспрессия 524 транскриптов и значимо выше — 480. При этом следует отметить, что экспрессия достаточно большого числа транскриптов отличалась с p -значением $< 0,05$, однако кратность различий была < 2 . Для меньшего количества транскриптов встречалась ситуация,

когда различие экспрессии в группах превышало 2, но данное различие не было статистически значимым по р-значению.

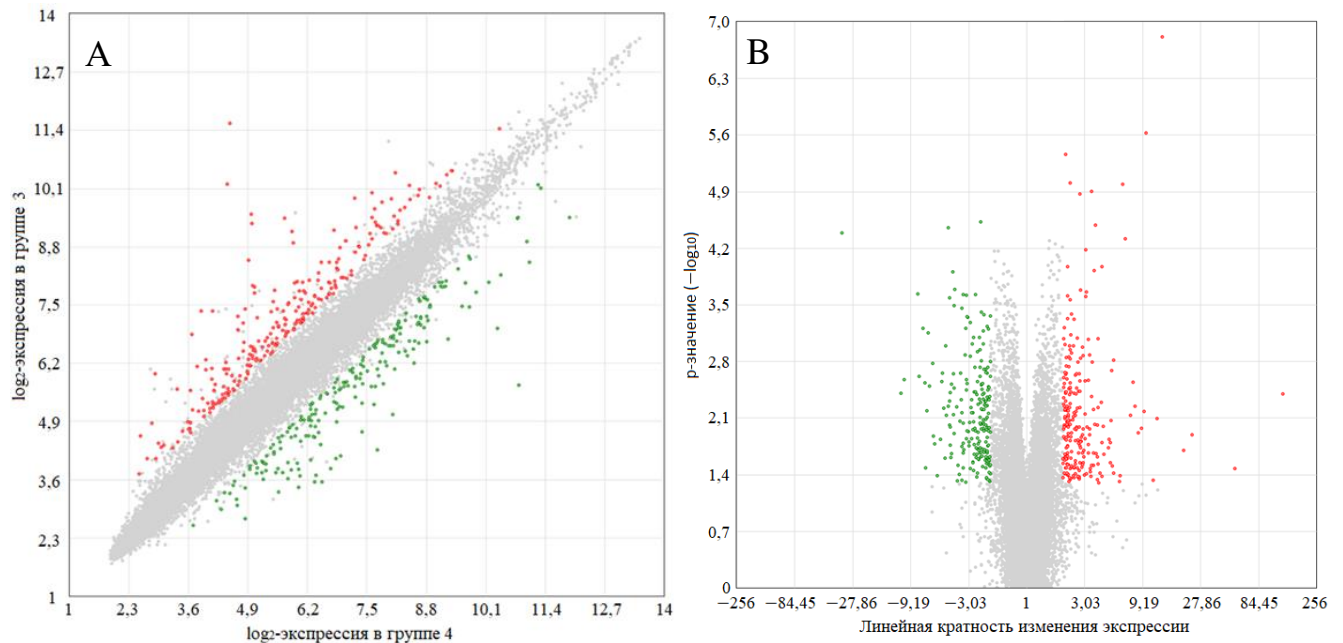


Рисунок 11. Распределение транскриптов по уровню экспрессии в эндометрии пациенток из групп 3 и 4 (А) и «вулканная диаграмма», отражающая значимые различия в экспрессии транскриптов в группах 3 и 4 (В)

С помощью программного обеспечения Transcriptome Analysis Console (Thermo Fisher Scientific, США) был проведен анализ всех образцов эндометрия с помощью метода главных компонент. Благодаря применению данного метода можно кластеризовать все проанализированные образцы, изучив их разделение по группам (Рисунок 12). Из представленных данных можно сделать вывод, что образцы из групп 3 и 4 можно значимо отличить друг от друга с помощью метода главных компонент.

Для дальнейшей кластеризации образцов эндометрия пациенток из групп 3 и 4 была построена тепловая карта на основе экспрессии основных транскриптов (Рисунок 13). Дихотомическая классификация показала четкое разделение групп образцов, за исключением одного образца, но даже выпадающий образец находится на границе двух групп, наименее отличаясь от остальных образцов своей группы по сравнению с образцами другой группы.

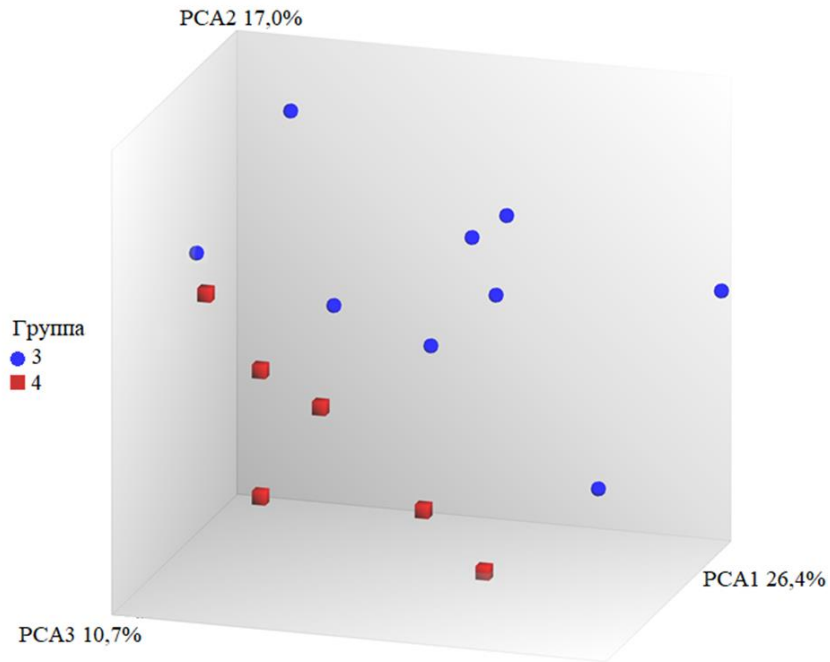


Рисунок 12. Диаграмма распределения образцов из групп 3 и 4 при использовании метода главных компонент

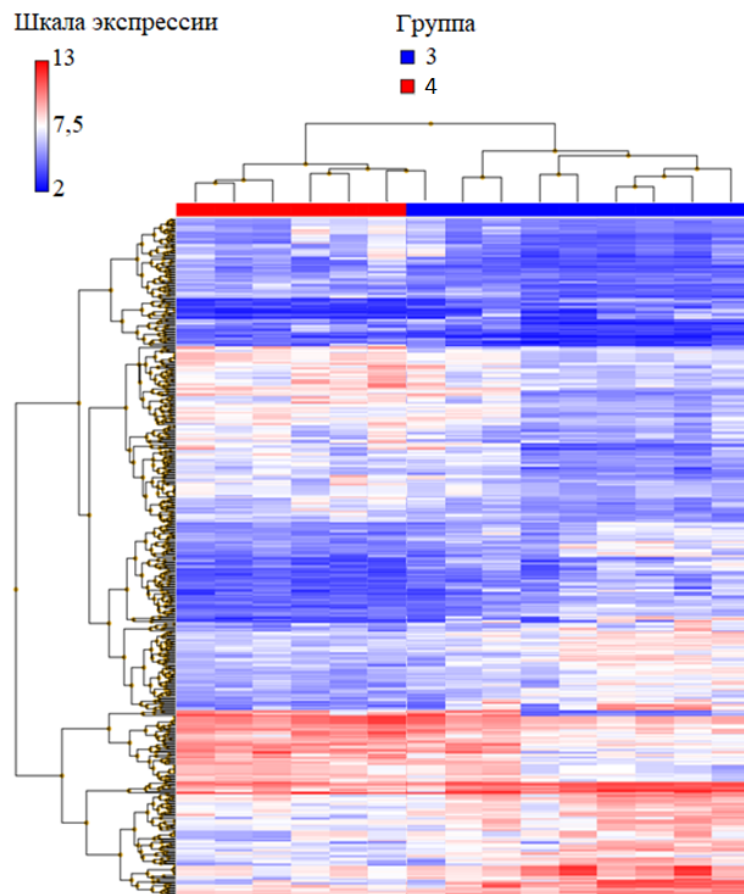


Рисунок 13. Тепловая карта, отражающая кластеризацию образцов эндометрия пациенток из групп 3 и 4

Гены, экспрессия которых значимо отличалась в двух группах более чем в 10 раз, представлены ниже (Таблица 17).

Таблица 17 — Гены с наибольшими различиями экспрессии в Группках 3 и 4

Ген	Средний сигнал, \log_2		Насколько ниже (-) или выше (+) экспрессия в группе 3	<i>p</i> -значение
	в группе 3	в группе 4		
<i>PAEP</i>	11,6	4,0	+192,2	<0,0001
<i>SLC15A1</i>	10,6	4,7	+61,0	<0,0001
<i>CATSPERB</i>	9,0	3,5	+44,2	0,0014
<i>C4BPA</i>	8,9	3,7	+37,0	0,0001
<i>DPP4</i>	9,5	4,7	+27,0	0,0000
<i>DLGAP1-AS3</i>	6,9	2,6	+18,9	<0,0001
<i>CXCL14</i>	11,0	7,0	+15,7	0,0002
<i>HABP2</i>	7,8	3,9	+14,2	<0,0001
<i>FOS</i>	8,9	5,1	+14,0	0,0003
<i>NABP1</i>	7,5	3,8	+13,1	0,0004
<i>SLC1A1</i>	9,7	6,1	+12,0	<0,0001
<i>AOX1</i>	6,6	3,1	+11,6	<0,0001
<i>IRX3</i>	9,1	5,7	+11,1	0,0002
<i>SLCO4C1</i>	7,3	3,9	+10,6	0,0023
<i>PKHD1L1</i>	7,4	10,8	-10,5	0,0018
<i>HLA-DOB</i>	4,3	7,9	-11,9	0,0031
<i>TFPI2</i>	8,2	11,8	-12,2	0,0001
<i>ROS1</i>	3,3	7,0	-13,1	0,0069
<i>SERPINB9</i>	5,8	9,6	-13,7	0,0051
<i>TM4SF4</i>	3,4	7,3	-15,2	0,0015
<i>SULT1E1</i>	3,7	7,7	-16,2	0,0032
<i>CYP26A1</i>	4,9	8,9	-16,2	0,0022
<i>TRPM6</i>	5,1	9,3	-19,1	0,0010
<i>CAPN6</i>	6,8	11,2	-21,3	0,0032
<i>LOC101927987</i>	3,6	8,2	-24,2	0,0014
<i>LOC105377265</i>	3,2	7,9	-27,3	0,0005
<i>XDH</i>	3,9	9,5	-47,1	0,0002
<i>MMP26</i>	5,5	11,2	-53,6	0,0001

Был проведен литературный обзор с целью определить функции генов с максимальными различиями экспрессии в двух группах.

РАЕР (Progesterone-Associated Endometrial Protein) или гликоделин — гликопротеин, регулирующий ключевые этапы оплодотворения и имплантации эмбриона, а также оказывающий иммуномодулирующие эффекты. С этим геном ассоциированы такие заболевания, как эндометриоз и внематочная беременность. В репродуктивной системе было описано 4 гликоформы данного белка: гликоделин-А (имеет контрацептивную и иммуносупрессивную активность; может защищать сперматозоиды от иммунной реакции со стороны материнского организма), гликоделин С (стимулирует связывание сперматозоидов с *zona pellucida* ооцитов), гликоделин F (ингибирует связывание сперматозоидов с *zona pellucida* ооцитов и значительно угнетает прогестерон-индуцированную акросомную реакцию) и гликоделин-S (его присутствие в семенной плазме говорит о присутствии некапацитированных сперматозоидов с интактной акросомой). При нормальном овуляторном менструальном цикле секреция прогестерона желтым телом стимулирует секрецию железами эндометрия гликоделина-А. Экспрессия мРНК РАЕР значительно возрастает в среднюю и позднюю секреторную фазы менструального цикла. В частности, в одном из исследований было показано, что экспрессия РАЕР в эндометрии во время «окна имплантации» выше в 104 раза, чем в раннюю секреторную фазу [143].

Ген *SLC15A1* кодирует белок-транспортер, ответственный за котранспорт протонов и олигопептидов, а также пептидоподобных препаратов, преимущественно в энтероцитах тонкого кишечника. Связь с эндометрием малоизучена. В одном из исследований было проведено сравнение экспрессии различных генов в эндометрии здоровых женщин до периода «окна имплантации» и непосредственно во время «окна имплантации» для получения набора генов, специфичных для высокорепрезентивного эндометрия. Ген *SLC15A1* был отмечен среди значимо гиперэкспрессированных во время окна имплантации, что может указывать на его связь с РЭ [17]. Прием женщинами мифепристона, блокатора прогестероновых рецепторов эндометрия, приводит к снижению РЭ и был ассоциирован с понижением экспрессии *SLC15A1*, кроме того, уровень экспрессии

этого гена был выше в рецептивном эндометрии по сравнению с пролиферативным [46,53].

Уровень экспрессии гена *CATSPERB* в нашем исследовании был примерно в 44 раза выше у женщин, которые забеременели. По данным ряда исследований в рецептивном эндометрии по сравнению с пролиферативным эндометрием уровень экспрессии данного гена также повышен [46,62]. Ранее выявлена роль этого белка в образовании Ca^{2+} -каналов в сперматозоидах млекопитающих и обеспечении подвижности сперматозоидов и мужской фертильности [29]. Однако функция данного белка в эндометрии остается неизученной.

Экспрессия гена *C4BPA* была повышена в эндометрии женщин с удачным исходом программы ЭКО в нашем исследовании. Схожие результаты наблюдались в другом исследовании, в котором уровень экспрессии данного гена значительно отличался у женщин с повторными неудачами имплантации по сравнению с группой, имевшей по крайней мере один удачный цикл ВРТ, и с группой здоровых женщин с по крайней мере одной удачной естественной беременностью [32]. Белковый продукт данного гена связан с функционированием системы комплемента и может влиять на прикрепление и инвазию зародыша.

Уровень экспрессии гена *MMP26*, кодирующего матриксную металлопротеиназу 26, был ниже в эндометрии женщин, забеременевших в результате проведения программы ВРТ. Уровень *MMP26* в эндометрии является эстроген-зависимым и выше всего в раннюю секреторную фазу, постепенно снижаясь к поздней секреторной фазе [105]. Было показано, что уровень *MMP26* был значительно повышен в эндометрии женщин с бесплодием неясного генеза [52]. Уровень *MMP26* был значительно снижен в среднюю секреторную фазу по сравнению с ранней [53] и в рецептивном эндометрии по сравнению с пролиферативным [46]. Кроме того, *MMP26* является геном-мишенью, регулируемым транскрипционным фактором *NOXA10* [22].

Экспрессия гена *XDH*, кодирующего ксантин-гидроксигеназу, в эндометрии забеременевших женщин в 47,1 раза ниже, чем у незабеременевших.

Ксантингидроксигеназа является ферментом, гидроксилирующим гипоксантин и ксантин с образованием мочевой кислоты, мощного внеклеточного антиоксиданта. В то же время ксантингидроксигеназа в организме может конвертироваться в ксантиноксидазу, продуцирующую такие активные формы кислорода, как супероксид анион и пероксид водорода, что напротив обуславливает оксидативный стресс и ишемические повреждения. Ранее было показано, что активность ксантиноксидазы повышена в эндометрии женщин с эндометриозом [58], при преэклампсии [35], плацентарной недостаточности [59] и других гипоксических состояниях. Также ксантиноксидаза была повышена в плаценте матерей с гестационным сахарным диабетом [134]. В целом ксантиноксидаза является маркером оксидативного стресса и отражает состояние ишемии женских половых органов, что часто связано с бесплодностью и неоднократными неудачными попытками забеременеть [111]. Можно предположить, что низкая экспрессия гена *XDH* у женщин, которые забеременели в нашем исследовании, связана с накоплением ксантингидроксигеназы с конверсией в оксигеназу и развитием оксидативного стресса.

Таким образом, кластеризация с учетом полного транскриптома позволяет достаточно точно разделять пациенток по исходам. В эндометрии женщин с трубно-перитонеальным фактором бесплодия и неудачными попытками ЭКО в анамнезе в случае наступления после текущей программы ВРТ беременности наблюдалось отличие в экспрессии более чем 1000 транскриптов по сравнению с эндометрием женщин, у которых беременность не наступила. Наибольшие отличия наблюдались в экспрессии генов, кодирующих регуляторные гликопротеины эндометрия, клеточные транспортеры, матриксные металлопротеиназы, компоненты комплемента и антиоксидантной системы организма. Вместе с тем для разработки релевантного способа предсказания исхода программы ВРТ необходимо свести количество анализируемых генов к минимально возможному, позволяющему при этом получить приемлемую диагностическую точность. В

связи с этим был проведен поиск классификаторов, опирающихся на экспрессию сочетаний из пар и троек генов.

3.4. Модель на основе экспрессии нескольких генов для предсказания исхода программы ВРТ

3.4.1. Предварительный отбор генов с помощью полногеномного транскриптомного анализа

Один из подходов к определению маркеров и предикторов определенных состояний и вмешательств заключается в построении классификатора, обладающего способностью разделять наблюдения с двумя вариантами исходов на основе анализа экспрессии нескольких генов одновременно, например, сочетаний из двух или трех генов. При этом экспрессия отдельных генов в составе пар и троек может не различаться значимо в двух группах наблюдений с разными исходами, однако совместный учет экспрессии данных генов позволяет построить эффективный классификатор. С биологической точки зрения данное наблюдение может объясняться тем, что гены в составе пар и троек могут относиться к взаимосвязанным процессам и сигнальным путям в клетке, поэтому статистически незначимое изменение экспрессии каждого гена может приводить к выраженному суммарному биологическому эффекту.

Микрочипы Affymetrix GeneChip Human Gene 2.0 ST Array имеют специфичные пробы, соответствующие 40 716 транскриптам из базы данных RefSeq. Из комбинаторики известно, что количество различных сочетаний из n объектов (в нашем случае 40 716 транскриптов) по k объектов в каждом сочетании (в нашем случае $k = 2$ для сочетаний из двух генов) определяется формулой (3):

$$C_n^k = \frac{n!}{(n-k)! \cdot k!} = \frac{40716!}{40714! \cdot 2!} = \frac{40715 \cdot 40716}{2} = 828\,875\,970 \text{ сочетаний} \quad (3)$$

По указанной формуле можно подсчитать, что для сочетаний по 3 гена существует примерно в 13,5 тыс. раз больше вариантов. Для анализа такого количества сочетаний транскриптов необходимо использование суперкомпьютера. В связи с этим на заключительном этапе был произведен предварительный отбор генов, которые потенциально могут играть роль в определении исходов программ ЭКО. Биологический смысл анализа сочетаний по 2 и 3 гена может заключаться в выявлении суммации эффектов изменения экспрессии нескольких генов с взаимосвязанной функцией, совместной экспрессией, колокализацией, генетическим или физическим взаимодействием, участием в общих сигнальных путях, наличием общих белковых доменов и т. п., в связи с чем был проведен функциональный анализ, в результате которого отобрали 16 генов, образующих сеть взаимосвязей и играющих роль в определении РЭ (Рисунок 14).

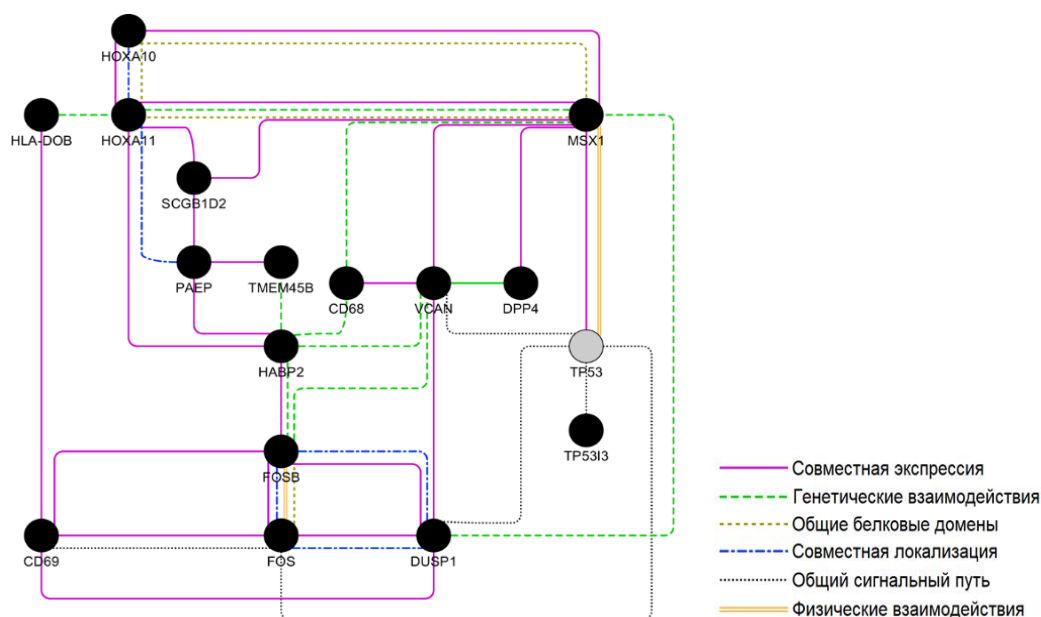


Рисунок 14. Сеть взаимодействий генов, на основе которых производилось построение классификатора из пар и троек генов

Из 16 отобранных генов — *MSX1* (*HOX7*), *HOXA10*, *HOXA11*, *PAEP*, *DPP4*, *HABP2*, *HLA-DOB*, *FOS*, *FOSB*, *DUSP1*, *TMEM45B*, *TP53I3*, *VCAN*, *SCGB1D2*, *CD68*, *CD69* — можно составить 120 пар и 560 троек генов. Для экспрессий данных генов на микрочипах Affymetrix с помощью метода опорных векторов были построены классификаторы, способные линейно разделять пациенток по исходу программы ЭКО (наступление и ненаступление беременности). Ни одно из

сочетаний по 2 гена не позволяло достичь чувствительности и специфичности выше 70%. В то же время 235 из 560 сочетаний по 3 гена обладали 100% чувствительностью и специфичностью.

После отбора потенциальных сочетаний генов для модели с использованием микрочипов Affymetrix на выборке из 15 образцов ткани эндометрия дальнейшая валидация троек генов производилась по результатам ПЦР-РВ на 16 отобранных генов с использованием РНК, выделенной из 47 образцов эндометрия.

3.4.2. Валидация модели на основе сочетаний генов с помощью ПЦР-РВ

Всего с помощью метода ПЦР-РВ было проанализировано 47 образцов пайпель-биопсии эндометрия, из них 15 образцов от женщин, у которых наступила беременность (группа 5), и 32 образца от женщин, у которых не наступила беременность (группа 6).

При сравнении клинико-anamнестических данных пациенток двух групп (Таблица 18) оценивались возраст и антропометрические данные пациенток, менструальная функция, гинекологический и акушерский анамнез. Не было выявлено статистически значимых межгрупповых различий по вышеуказанным характеристикам ($p > 0,05$).

Таблица 18 — Клинико-anamнестическая характеристика пациенток групп 5 и 6

Параметр	Группа 5 (беременные) n=15	Группа 6 (небеременные) n=32	ОШ [95% ДИ]	p-уровень значимости
Возраст, лет*	33 (31–36)	34 (32–39)	—	0,291
<i>Антропометрические характеристики</i>				
Рост, м*	1,68 (1,65–1,69)	1,65 (1,62–1,70)	—	0,362
Масса тела, кг*	68,5 (56,0–76,0)	64,0 (52,0–70,0)	—	0,264
ИМТ, кг/м ² *	25,0 (19,6–26,6)	22,0 (20,1–25,7)	—	0,615
<i>Особенности менструальной функции</i>				
Возраст менархе, лет*	13 (12–14)	13 (12–14)	—	0,569
Длительность менструации, дней*	5 (5–5)	5 (4–5)	—	0,719

Продолжение таблицы 18

Параметр	Группа 5 (беременные) n=15	Группа 6 (небеременные) n=32	ОШ [95% ДИ]	p-уровень значимости
Длительность менструального цикла, дней*	28 (27–30)	28 (28–29)	—	0,597
Возраст начала половой жизни, лет*	18 (17–19)	18 (17–18)	—	0,145
<i>Гинекологические заболевания</i>				
Заболевания, передающиеся половым путем **	7 (47%)	18 (56%)	0,68 [0,20;2,33]	0,681
Наружный генитальный эндометриоз**	2 (13%)	5 (16%)	0,83 [0,14;4,87]	1,000
Миома матки**	1 (7%)	6 (19%)	0,34 [0,03;2,83]	0,404
Патология эндометрия (гиперплазия эндометрия, полипы эндометрия)**	3 (20%)	12 (38%)	0,42 [0,10;1,78]	0,404
Эрозия шейки матки**	2 (13%)	6 (19%)	0,67 [0,12;3,77]	1,000
Число внутриматочных вмешательств*	0 (0–1)	1 (1–3)	—	0,069
Тип бесплодия**:				
Первичное	6 (40%)	14 (44%)	0,86 [0,25;2,98]	1,000
Вторичное	9 (60%)	18 (56%)		
Длительность бесплодия, лет*	5,0 (4,0–10,0)	5,0 (3,0–10,0)	—	0,909
Число беременностей*	1 (0–2)	1 (0–2)	—	0,867
Число беременностей после ЭКО*	0 (0–1)	0 (0–0)	—	0,145
Число искусственных прерываний беременности*	0 (0–0)	0 (0–0)	—	0,109
Число самопроизвольных прерываний беременности*	1 (0–2)	1 (0–2)	—	0,864
Число родов*	0 (0–1)	0 (0–0)	—	0,263

* Данные представлены как медиана (25–75 процентиля), тест Манна-Уитни

** Данные представлены как абсолютные значения (%), двусторонний точный тест Фишера

Результаты анализа крови на гормоны, проведенного при предварительном обследовании пациенток на 2–3 и 21–22 дни нестимулированного менструального

цикла представлены ниже (Таблица 19). Как следует из приведенных данных, различия концентрации гормонов у пациенток двух групп не были статистически значимы ($p > 0,05$).

Таблица 19 — Концентрация гормонов сыворотки крови пациенток групп 5 и 6

Параметр	Группа 5 (беременные)* n=15	Группа 6 (небеременные)* n=32	p-уровень значимости
ФСГ, МЕ/л	7,20 (6,70–8,81)	7,20 (6,32–9,20)	0,724
ЛГ, МЕ/л	5,77 (4,40–6,50)	4,39 (3,64–7,15)	0,362
Эстрадиол, пмоль/л	92 (61–189)	122 (88–192)	0,246
Прогестерон, нмоль/л	16,9 (1,3–51,9)	27,2 (5,2–50,0)	0,512
Пролактин, мМЕ/л	249 (100–348)	273 (178–409)	0,527
АМГ, нг/мл	3,00 (1,14–4,21)	1,99 (1,20–2,76)	0,376
Тестостерон	1,49 (0,72–2,08)	1,16 (0,84–1,85)	0,663
ТТГ, мМЕ/л	1,89 (1,20–2,90)	1,88 (1,09–2,89)	0,837
Т4св, пмоль/л	13,60 (11,00–15,02)	13,99 (12,41–16,01)	0,352
17–ОП, нмоль/л	2,12 (1,50–3,16)	2,92 (1,91–4,07)	0,302
ДГАЭС, мкмоль/л	4,3 (2,7–6,0)	4,8 (3,9–9,0)	0,250

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

Для 235 сочетаний по 3 гена, достигавших идеального разделения при полногеномном транскриптомном анализе, с помощью метода опорных векторов также были рассчитаны модели, позволяющие предсказывать исходы программ ВРТ по данным ПЦР-РВ. Порог 70% по чувствительности и специфичности превысило только одно сочетание из 3 генов, включающее гены *MSX1* (*НОХ7*), *НОХА11* и *ТР5313*. Метод опорных векторов при анализе сочетаний по 3 гена позволяет построить такую плоскость, которая наилучшим способом разделяет два исхода программы ЭКО. Визуализация наилучшей плоскости для двух выбранных троек представлена ниже (Рисунок 15).

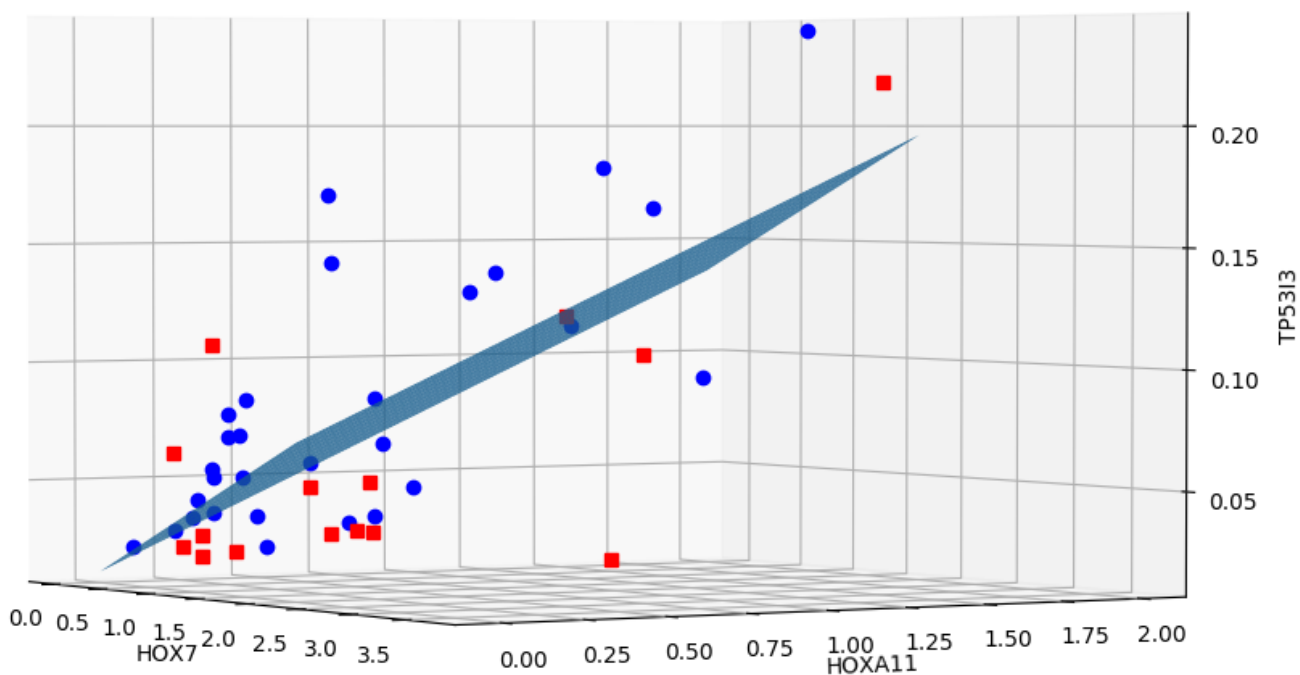


Рисунок 15. Наилучшая плоскость, полученная с использованием метода опорных векторов для классификатора на основе генов *MSX1* (*HOX7*), *HOXA11* и *TP53I3*

Для тройки генов *MSX1*, *HOXA11*, *TP53I3* чувствительность классификатора, в основе которого лежит формула (4), составила 73%, специфичность — 71%, а площадь под ROC-кривой (AUC) — 0,74 (95% ДИ 0,58–0,90). Прогностическая ценность отрицательного результата составила 85%, а положительного — 55%.

$$A=0,741 \times \text{Expr}_{MSX1} + 1,544 \times \text{Expr}_{HOXA11} - 24,769 \times \text{Expr}_{TP53I3} + 0,287, \quad (4)$$

Ниже представлена полученная ROC-кривая (Рисунок 16). Также была построена диаграмма размаха («ящик с усами»), отражающая распределение значений классификатора в 2 группах (Рисунок 17).

Был проведен анализ биологической функции генов, входящих в тройку классификатора, и оценена их возможная связь с бесплодием.

Ген *MSX1* (*HOX7*) относится к семейству генов, содержащих гомеобокс, и кодирует транскрипционный фактор, взаимодействующий с основным транскрипционным комплексом и другими гомеопротеинами в процессе эмбриогенеза и онтогенеза. Было выявлено, что экспрессия гена *MSX1* отличается в ткани пререцептивного и рецептивного эндометрия [144].

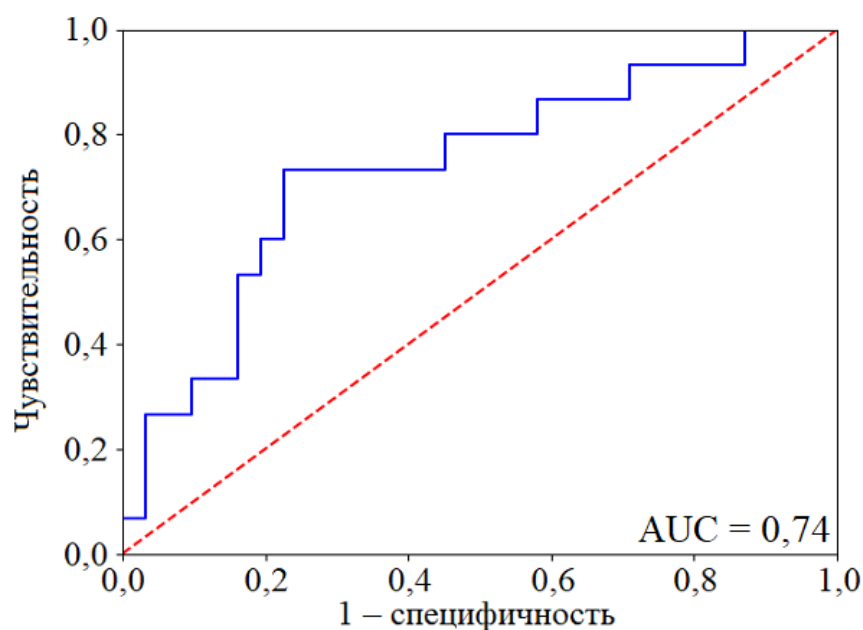


Рисунок 16. ROC-кривая для классификатора на основе генов *MSX1*, *HOXA11* и *TP53*

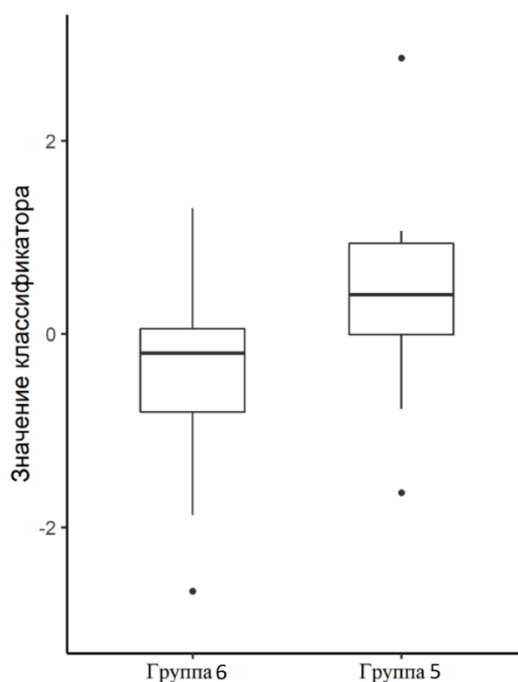


Рисунок 17. Диаграмма размаха («ящик с усами»), отражающая распределение значений классификатора, построенного на основе генов *MSX1*, *HOXA11* и *TP53*. Жирной горизонтальной линией обозначена медиана, края «ящика» обозначают верхний и нижний квартиль, «усы» отражают наблюдаемый максимум и минимум, а точки означают выбросы

Ген *MSX1* участвует в регуляции РЭ, а его сниженная экспрессия в эндометрии была ассоциирована с бесплодием [123]. Данное наблюдение

согласуется с формулой классификатора, согласно которой увеличение экспрессии гена *MSX1* коррелирует с наступлением беременности в программах ВРТ.

Белок, закодированный в гене *TP53I3*, сходен с оксидоредуктазами, ферментами, вовлеченными в клеточный ответ на оксидативный стресс и облучение. Данный ген индуцируется опухолевым супрессором p53 и, по-видимому, вовлечен в p53-опосредованную клеточную гибель. Экспрессия проапоптотического гена *TP53I3* была повышена в нерцептивном эндометрии по сравнению с рецептивным [26]. При наличии воспаления в тканях эндометрия отмечалась повышенная экспрессия гена *TP53I3* [34]. Согласно формуле классификатора, пониженная экспрессия *TP53I3* коррелирует с наступлением беременности в циклах ВРТ, что согласуется с приведенными выше результатами исследований.

Ген *HOXA11* относится к семейству гомеобокс-содержащих генов. Согласно данным литературы ген *HOXA11* относится к числу ключевых регуляторов процессов РЭ [9]. Известно, что ген экспрессируется как в ядрах эпителия желез эндометрия, так и в строме эндометрия в различных участках матки. Кроме того, в процессе трансформации эндометрия в середине цикла в клетках эндометрия значительно увеличивается экспрессия гена *HOXA11* [125]. Известно, что снижение уровня продукта того или иного гена может быть вызвано как генетическими причинами (полиморфизмом гена или мутацией), так и эпигенетической регуляцией. В частности, метилирование промоторного участка гена может приводить как к снижению экспрессии гена, так и к полной его инактивации («эпигенетическое молчание»). Ряд работ демонстрирует, что метилирование промотора гена *HOXA11* приводит к снижению его экспрессии и снижению РЭ [41].

Таким образом, в результате исследования транскрипционных профилей у пациенток с трубно-перитонеальным фактором бесплодия и неоднократными неудачными попытками ЭКО была выявлена тройка генов *MSX1* (*HOX7*), *HOXA11* и *TP53I3*, которая позволила классифицировать образцы в соответствии со статусом «беременность» или «отсутствие беременности». По данным литературы

данные гены связаны с РЭ и могут участвовать в определении «окна имплантации», что и определяет их значимость при классификации исходов программ ВРТ.

3.5. Анализ метилирования генов *HOXA10* и *HOXA11* при повторных неудачных попытках ЭКО

На основании литературных данных при планировании исследования было сделано предположение, что у пациенток с положительным и отрицательным исходом программ ВРТ при повторных неудачных попытках ЭКО может различаться метилирование промоторов генов *HOXA10* и *HOXA11*, что может влиять на экспрессию данных генов и, как следствие, на РЭ. Промотор гена включает в себя несколько участков последовательности ДНК, в которых рядом находятся цитозинный и гуаниновый остатки, — CpG-островков. Известно, что ферменты, осуществляющие метилирование ДНК (ДНК-метилтрансферазы), могут присоединять метильную группу к цитозину только в области CpG-островков. С метилированием CpG-островков в промоторе гена в итоге связано снижение экспрессии этого гена и подавление его функции.

Метилирование ДНК можно выявить с помощью химической реакции бисульфитной конверсии. В одноцепочечной ДНК бисульфит воздействует на остатки цитозина, что приводит в итоге к их превращению в урацил. Однако в случае присутствия метильной группы на остатке цитозина такая конверсия произойти не может. Зная последовательность нуклеотидов в нормальном геноме человека и последовательность ДНК после проведения бисульфитной конверсии, можно определить, какие CpG-островки были метилированы, а какие нет. Для определения последовательности после конверсии может быть использован ряд методов, например, метилспецифическая полимеразная цепная реакция (ПЦР), секвенирование по Сэнгеру, секвенирование следующего поколения (NGS, next generation sequencing). При этом при анализе статуса метилирования большого количества CpG-островков с помощью метилспецифической ПЦР требуется

подбор большого количества праймеров для анализа каждого CpG-островка, что делает более предпочтительным секвенирование последовательности. Секвенирование по Сэнгеру является более дешевым вариантом по сравнению с NGS, но не позволяет определить точное соотношение метилированных и неметилированных участков ДНК в смеси из ДНК разных клеток. NGS является более дорогим методом, но позволяет точно и быстро определить в смеси последовательность всех присутствующих последовательностей ДНК. В связи с этим в представленном исследовании секвенирование по Сэнгеру использовалось в качестве начального скрининга для выявления взаимосвязи метилирования промоторов генов *HOXA10* и *HOXA11* с исходами программ ВРТ у женщин с неоднократными неудачами ЭКО в анамнезе, а метод NGS использовался для дальнейшего выявления процентного уровня метилирования каждого CpG-островка в смеси ДНК, выделенной из образца аспирационной биопсии.

3.5.1. Анализ метилирования генов с использованием секвенирования по Сэнгеру

На следующем этапе работы части пациенток после проведения пайпель-биопсии эндометрия в дальнейшем был проведен анализ метилирования генов с использованием секвенирования по Сэнгеру (n=37). В зависимости от исхода последующей программы ВРТ пациентки были разделены на две группы: с наступившей беременностью (n=14, группа 7) и с отсутствием беременности (n=23, группа 8). При сравнении клинико-анамнестических характеристик пациенток этих двух групп (Таблица 20). не было выявлено статистически значимых отличий.

Таблица 20 — Клинико-анамнестическая характеристика пациенток групп 7 и 8

Параметр	Группа 7 (беременные) n=14	Группа 8 (небеременные) n=23	ОШ [95% ДИ]	p-уровень значимости
<i>Возраст и антропометрические характеристики</i>				
Возраст, лет*	33 (31–34)	35 (31–39)	—	0,167
Возраст партнера, лет	35 (33–38)	35 (33–39)	—	0,894

Продолжение таблицы 20

Параметр	Группа 7 (беременные) n=14	Группа 8 (небеременные) n=23	ОШ [95% ДИ]	p-уровень значимости
Рост, см*	1,68 (1,65–1,72)	1,65 (1,62–1,70)	—	0,336
Масса тела, кг*	70 (60–76)	62 (54–68)	—	0,115
ИМТ, кг/м ² *	24,9 (21,3–26,6)	21,9 (20,4–24,8)	—	0,230
<i>Экстрагенитальные заболевания</i>				
Аллергические заболевания**	1 (7%)	2 (9%)	0,81 [0,07;9,82]	1,000
Заболевания сердечно-сосудистой системы**	0 (0%)	3 (13%)	0,20 [0,01;4,22]	0,275
Заболевания органов дыхательной системы**	0 (0%)	1 (4%)	0,52 [0,02;13,58]	1,000
Заболевания желудочно-кишечного тракта**	1 (7%)	1 (4%)	1,69 [0,10;29,12]	1,000
Заболевания мочевыделительной системы**	1 (7%)	1 (4%)	1,69 [0,10;29,42]	1,000
Заболевания эндокринной системы**	10 (71%)	18 (78%)	0,69 [0,15;3,19]	0,705
<i>Менструальная и половая функция</i>				
Возраст менархе, лет*	13 (12–14)	13 (12–14)	—	0,514
Длительность менструации, дней*	5 (5–5)	5 (4–5)	—	0,328
Длина цикла, дней*	28 (27–30)	28 (28–28)	—	0,570
Возраст начала половой жизни, лет*	18 (18–19)	18 (17–19)	—	0,357
<i>Гинекологический и акушерский анамнез</i>				
Заболевания, передающиеся половым путем**	8 (57%)	12 (52%)	1,22 [0,32;4,66]	1,000
Наружный генитальный эндометриоз**	2 (14%)	4 (17%)	0,79 [0,13;5,01]	1,000
Эрозия шейки матки**	4 (29%)	3 (13%)	2,67 [0,50;14,29]	0,390
Гиперплазия эндометрия**	0 (0%)	3 (13%)	0,20 [0,01;4,22]	0,275
Полип эндометрия**	4 (29%)	7 (30%)	0,91 [0,21;3,94]	1,000
Миома матки**	2 (14%)	3 (13%)	1,11 [0,16;7,63]	1,000

Продолжение таблицы 20

Параметр	Группа 7 (беременные) n=14	Группа 8 (небеременные) n=23	ОШ [95% ДИ]	p-уровень значимости
Число внутриматочных вмешательств*	1 (0–2)	1 (0–2)	—	0,346
Число полостных вмешательств*	1 (0–2)	2 (1–3)	—	0,084
<i>Структура оперативных вмешательств на органах малого таза</i>				
Полипэктомия, РДВ**	4 (29%)	8 (35%)	0,75 [0,18;3,17]	1,000
Сальпингоовариолизис**	5 (36%)	6 (26%)	1,574 [0,375;6,616]	0,713
Миомэктомия в анамнезе**	2 (14%)	2 (9%)	1,75 [0,08;1,28]	0,625
Тубэктомия в анамнезе**	4 (29%)	11 (48%)	0,44 [0,11;1,80]	0,314
Коагуляция очагов наружного генитального эндометриоза**	1 (7%)	2 (9%)	0,81 [0,07;9,82]	1,000
<i>Анамнез бесплодия</i>				
Длительность бесплодия, лет*	5 (3–7)	5 (2–10)	—	0,925
Число беременностей*	1 (0–2)	1 (0–2)	—	0,882
Число самопроизвольных беременностей*	1 (0–1)	0 (0–2)	—	0,812
Число родов*	0 (0–0)	0 (0–0)	—	0,329
Число самопроизвольных выкидышей*	0 (0–0)	0 (0–0)	—	0,524
Число искусственных прерываний беременности*	0 (0–0)	0 (0–0)	—	0,110
Число внематочных беременностей*	0 (0–1)	0 (0–2)	—	0,691
Число попыток ЭКО или ЭКО/ИКСИ*	2 (2–2)	2 (2–3)	—	0,408

* Данные представлены как медиана (25–75 процентиля), тест Манна-Уитни

** Данные представлены как абсолютные значения (%), двусторонний точный тест Фишера

При проведении сравнительной оценки концентрации гормонов у пациенток перед вступлением в программу ВРТ статистически значимых различий выявлено не было (Таблица 21).

При анализе результатов секвенирования было выявлено, что метилирование в промоторном участке гена *HOXA10* наблюдалось у 75,7% (28) пациенток, а гена

HOXA11 — у 100,0% (37) пациенток. Уровни метилирования генов *HOXA10* и *HOXA11* статистически значимо между группами не различались (Таблица 22).

Таблица 21 — Концентрация гормонов сыворотки крови пациенток групп 7 и 8

Параметр	Группа 7 (беременные) n=14	Группа 8 (небеременные) n=23	p-уровень значимости
ФСГ, МЕ/л	8,00 (6,70–9,74)	7,37 (6,59–9,70)	0,887
ЛГ, МЕ/л	5,77 (4,35–6,54)	5,00 (3,90–7,30)	0,887
Эстрадиол, пмоль/л	80 (55–109)	113 (97–144)	0,646
Прогестерон, нмоль/л	10,1 (1,7–26,0)	27,8 (10,6–49,6)	0,202
Пролактин, мМЕ/л	237 (150–366)	244 (150–371)	0,927
АМГ, нг/мл	3,00 (1,10–3,80)	2,03 (1,01–2,32)	0,339
Тестостерон	1,34 (0,51–1,89)	0,94 (0,79–1,28)	0,982
ТТГ, мМЕ/л	1,79 (1,20–2,60)	1,60 (0,80–2,89)	0,711
Т4св, пмоль/л	13,34 (6,10–15,60)	14,30 (12,40–16,01)	0,711
17–ОП, нмоль/л	2,12 (0,64–3,10)	2,90 (1,82–4,06)	0,299
ДГАЭС, мкмоль/л	2,1 (0,6–3,1)	4,8 (3,9–8,2)	0,777

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

Таблица 22 — Уровень метилирования промоторов генов *HOXA10* и *HOXA11*

	Группа 7 (беременные)	Группа 8 (небеременные)	p-уровень значимости
Метилирование промотора <i>HOXA10</i> , %	12,07 (0,00–32,00)		0,658
	12,07 (0,00–21,14)	11,90 (0,00–33,24)	
Метилирование промотора <i>HOXA11</i> , %	72,56 (55,56–84,21)		0,150
	80,65 (57,89–94,74)	68,42 (51,47–78,71)	

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

При выделении ДНК из образцов аспирационной пайпель-биопсии эндометрия в образец попадают молекулы ДНК из разных клеток, в части из которых определенные CpG-островки могут быть метилированы, а в другой части — неметилированы. Метод секвенирования по Сэнгеру не позволяет определить точного соотношения метилированных и неметилированных участков молекул ДНК, что может объяснять отсутствие различий в метилировании промоторов генов *HOXA10* и *HOXA11*, в связи с чем на следующем этапе было

проведено изучение метилирования промоторов этих генов с помощью метода NGS.

3.5.2. Анализ метилирования генов с использованием секвенирования следующего поколения

На следующем этапе части пациенток после проведения пайпель-биопсии эндометрия был проведен анализ метилирования генов с использованием секвенирования нового поколения (n=49). В зависимости от наступления или ненаступления беременности в результате последующей программы ВРТ пациентки были стратифицированы на 2 группы (группа 9 и группа 10 соответственно, Таблица 23), при сравнении клинических характеристик пациенток этих двух групп статистически значимых отличий выявлено не было.

Таблица 23 — Клинико-анамнестическая характеристика пациенток групп 9 и 10

Параметр	Группа 9 (беременные) n=20	Группа 10 (небеременные) n=29	ОШ [95% ДИ]	p-уровень значимости
<i>Возраст и антропометрические характеристики</i>				
Возраст, лет*	34 (31–36)	34 (32–37)	—	0,500
Возраст партнера, лет	35 (33–38)	36 (33–39)	—	0,472
Рост, см*	1,68 (1,65– 1,71)	1,65 (1,62–1,70)	—	0,413
Масса тела, кг*	63 (55–71)	62 (52–69)	—	0,586
ИМТ, кг/м ² *	22,2 (19,5– 25,6)	21,7 (20,0–25,2)	—	0,918
<i>Экстрагенитальные заболевания</i>				
Аллергические заболевания**	1 (5%)	3 (10%)	0,46 [0,04;4,73]	0,636
Заболевания сердечно- сосудистой системы**	2 (10%)	2 (7%)	1,50 [0,19;11,64]	1,000
Заболевания органов дыхательной системы**	0 (0%)	1 (3%)	0,46 [0,02;11,96]	1,000
Заболевания желудочно- кишечного тракта**	2 (10%)	2 (7%)	1,50 [0,19;11,64]	1,000

Продолжение таблицы 23

Параметр	Группа 9 (беременные) n=20	Группа 10 (небеременные) n=29	ОШ [95% ДИ]	p-уровень значимости
Заболевания мочевыделительной системы**	0 (0%)	3 (10%)	0,19 [0,02;3,78]	0,260
Заболевания эндокринной системы**	7 (35%)	7 (24%)	1,69 [0,48;5,92]	0,524
<i>Менструальная и половая функция</i>				
Возраст менархе, лет*	13 (13–14)	13 (12–14)	—	0,191
Длительность менструации, дней*	5 (5–5)	5 (4–5)	—	0,595
Длина цикла, дней*	28 (28–30)	28 (28–28)	—	0,532
Возраст начала половой жизни, лет*	19 (18–19)	18 (16–18)	—	0,431
<i>Гинекологический и акушерский анамнез</i>				
Заболевания, передающиеся половым путем**	10 (50%)	16 (55%)	0,81 [0,26;2,55]	0,777
Наружный генитальный эндометриоз**	3 (15%)	4 (14%)	1,10 [0,22;5,57]	1,000
Эрозия шейки матки**	3 (15%)	4 (14%)	1,10 [0,22;5,57]	1,000
Гиперплазия эндометрия**	2 (10%)	3 (10%)	0,96 [0,15;6,36]	1,000
Полип эндометрия**	4 (20%)	11 (38%)	0,91 [0,11;1,54]	0,221
Миома матки**	3 (15%)	5 (17%)	0,85 [0,18;4,03]	1,000
Число внутриматочных вмешательств*	1 (0–2)	1 (1–2)	—	0,1206
Число полостных вмешательств*	2 (1–2)	2 (1–2)	—	0,358
<i>Структура оперативных вмешательств на органах малого таза</i>				
Полипэктомия, РДВ**	6 (30%)	12 (41%)	0,61 [0,18;2,03]	0,550
Сальпингоовариолизис**	5 (25%)	7 (24%)	1,05 [0,28;3,93]	1,000
Миомэктомия в анамнезе**	3 (15%)	2 (7%)	2,38 [0,36;15,76]	0,387
Тубэктомия в анамнезе**	8 (40%)	18 (62%)	0,41 [0,13;1,31]	0,155

Продолжение таблицы 23

Параметр	Группа 9 (беременные) n=20	Группа 10 (небеременные) n=29	ОШ [95% ДИ]	p-уровень значимости
Коагуляция очагов наружного генитального эндометриоза**	1 (5%)	2 (7%)	0,71 [0,06;8,41]	1,000
<i>Анамнез бесплодия</i>				
Длительность бесплодия, лет*	6 (5–7)	8 (4–10)	—	0,631
Число беременностей*	0 (0–2)	1 (0–2)	—	0,448
Число самопроизвольных беременностей*	0 (0–1)	0 (0–2)	—	0,345
Число родов*	0 (0–0)	0 (0–0)	—	0,405
Число самопроизвольных выкидышей*	0 (0–0)	0 (0–0)	—	0,715
Число искусственных прерываний беременности*	0 (0–0)	0 (0–0)	—	0,075
Число внематочных беременностей*	0 (0–1)	0 (0–2)	—	0,345
Число попыток ЭКО или ЭКО/ИКСИ*	2 (2–3)	2 (2–3)	—	0,958

* Данные представлены как медиана (25–75 процентиля), тест Манна-Уитни

** Данные представлены как абсолютные значения (%), двусторонний точный тест Фишера

При сравнении концентраций гормонов у пациенток групп 9 и 10 статистически значимых различий также не было выявлено (Таблица 24).

В связи с тем, что при выделении ДНК из образца ткани после пайпель-биопсии происходит лизирование большого числа клеток, в конечную смесь могут попадать различные молекулы ДНК, в части из которых определенный CpG-островок метилирован, а в другой части — нет. NGS позволяет определить наличие в смеси всех возможных вариантов последовательностей, в связи с чем результаты анализа метилирования каждого CpG-островка выдаются в виде процентного содержания молекул ДНК в общей смеси, в которой конкретный CpG-островок метилирован.

Ниже представлены результаты сравнения профилей метилирования промоторов генов *HOXA10* (Рисунок 18А) и *HOXA11* (Рисунок 18В) при анализе методом NGS.

Таблица 24 — Концентрация гормонов сыворотки крови пациенток групп 9 и 10

Параметр	Группа 9 (беременные) n=20	Группа 10 (небеременные) n=29	p-уровень значимости
ФСГ, МЕ/л	7,20 (6,05–9,57)	7,20 (6,32–9,55)	0,850
ЛГ, МЕ/л	6,40 (5,41–7,45)	5,00 (3,68–7,30)	0,121
Эстрадиол, пмоль/л	81 (52–165)	140 (97–192)	0,085
Прогестерон, нмоль/л	25,8 (5,8–45,3)	29,4 (5,2–50,0)	0,526
Пролактин, мМЕ/л	314 (237–543)	289 (217–409)	0,468
АМГ, нг/мл	3,00 (1,10–4,26)	2,00 (1,20–2,50)	0,397
Тестостерон	1,28 (0,72–2,08)	1,16 (0,77–1,85)	0,679
ТТГ, мМЕ/л	1,68 (1,21–2,75)	1,89 (1,10–2,89)	0,794
Т4св, пмоль/л	13,30 (10,90–15,02)	14,03 (12,79–16,01)	0,265
17–ОП, нмоль/л	2,00 (0,75–2,53)	2,92 (1,82–4,06)	0,075
ДГАЭС, мкмоль/л	5,8 (3,4–7,5)	4,1 (3,8–7,7)	0,761

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

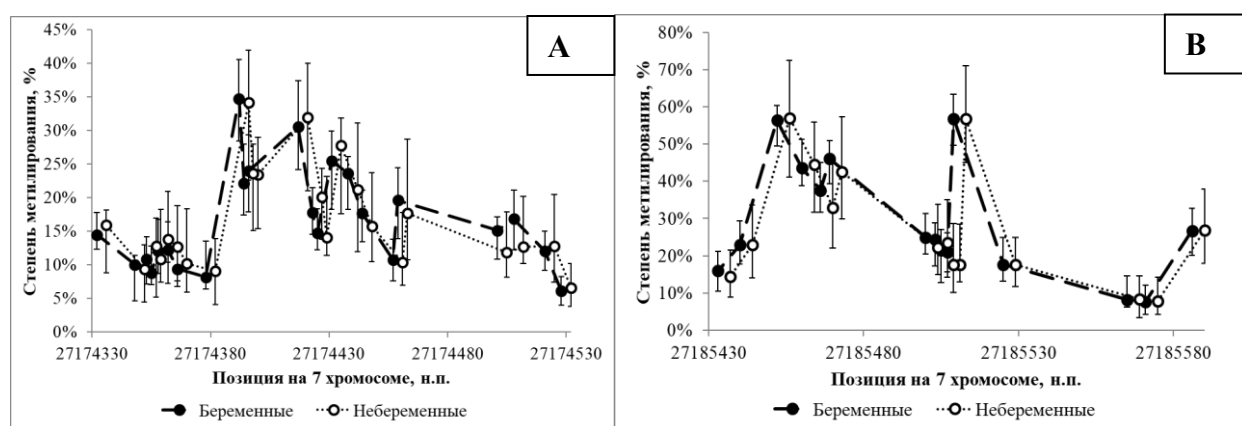


Рисунок 18. График сравнения профилей метилирования CpG-островков в промоторе генов *NOXA10* (А) и *NOXA11* (В) в группах 9 и 10 (для наглядности профили метилирования у разных групп сдвинуты по горизонтали)

Всего в ходе исследования было проанализировано метилирование 23 CpG-островков промоторного участка гена *NOXA10* и 15 CpG-островков гена *NOXA11*. В результате при использовании NGS не было выявлено значимого различия метилирования ни для одного из CpG-островков обоих генов.

Полученные результаты позволяют предположить, что в исследованных группах пациенток с повторными неудачными попытками ЭКО в анамнезе

метилирование отдельных CpG-островков в промоторах генов *HOXA10* и *HOXA11* является довольно консервативным параметром и, по-видимому, не вносит вклада в определение исходов программ ЭКО. Однако результаты секвенирования по Сэнгеру показали, что суммарное метилирование островков промоторов генов *HOXA10* и *HOXA11* может играть роль в определении исходов программы ВРТ, что требует дальнейшего изучения

3.6. Влияние эпигаллокатехин-3-галлата на транскриптом и эпигенетические характеристики эндометрия

3.6.1. Влияние эпигаллокатехин-3-галлата на метилирование промоторов генов *HOXA10* и *HOXA11*

В ряде исследований показано, что ЭГ обладает эпигенетической активностью и может снижать степень метилирования ДНК, в том числе в ткани эндометрия. Среди показаний к приему ЭГ в том числе указывается гиперплазия эндометрия. Кроме того, было показано противовоспалительное действие данного вещества и роль в улучшении исходов программ ВРТ у пациенток с хроническим эндометритом, в том числе за счет влияния на метилирование промоторов генов *HOXA10* и *HOXA11*. В связи с этим на следующем этапе работы у пациенток с ТПФ бесплодия, неоднократными неудачными попытками ЭКО и гиперплазией эндометрия в анамнезе с помощью NGS было изучено изменение статуса метилирования промоторов генов *HOXA10* и *HOXA11* при приеме ЭГ в дозе по 1 капсуле 3 раза в день в течение 1 месяца в соответствии с инструкцией биологически активной добавки Эпигаллат. Ниже представлена картина метилирования CpG-островков генов *HOXA10* (Рисунок 19А) и *HOXA11* (Рисунок 19В).

Среднее относительное изменение метилирования по всему промотору *HOXA10* составляет $-22,9\%$ (95% ДИ $-55,0\%$; $9,2\%$), а по промотору *HOXA11* — $0,3\%$ (95% ДИ $-58,2\%$; $58,8\%$). Таким образом, нельзя сделать вывод, что прием ЭГ

приводит к статистически значимому изменению общего уровня метилирования промоторов генов *HOXA10* и *HOXA11*. Также было проведено сравнение метилирования отдельных CpG-островков промоторов до и после приема препарата.

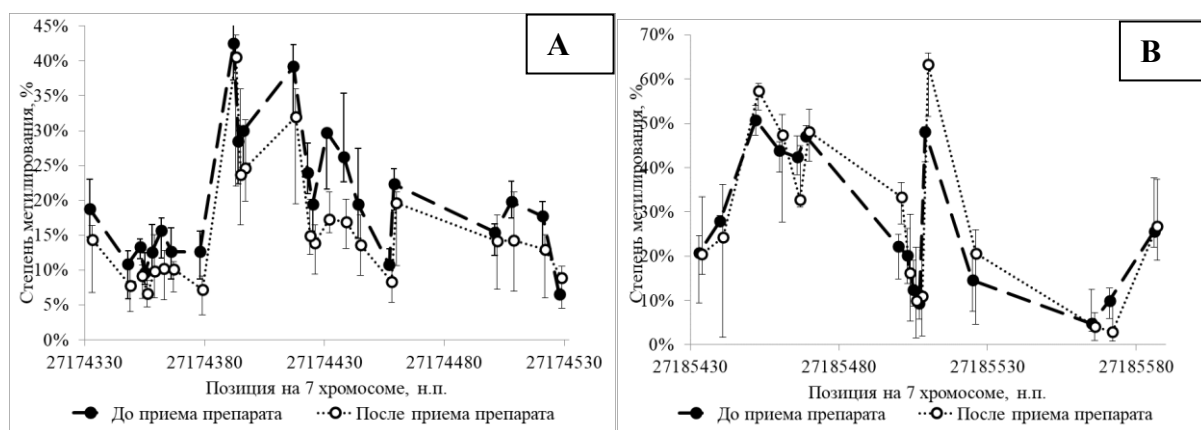


Рисунок 19. Сравнение профилей метилирования CpG-островков в промоторе генов *HOXA10* (А) и *HOXA11* (В) до и после приема ЭГ

Поскольку метилирование анализировалось у каждой пациентки до и после приема препарата, сравнение различий в метилировании отдельных CpG-островков проводилось с помощью критерия Уилкоксона для связанных выборок. Ниже представлены уровни метилирования и значимость различий для генов *HOXA10* (Таблица 25) и *HOXA11* (Таблица 26).

Таблица 25 — Сравнение метилирования отдельных CpG-островков промотора гена *HOXA10* до и после приема ЭГ

Позиция на 7 хромосоме, н. п.	Степень метилирования* до приема препарата, %	Степень метилирования* после приема препарата, %	р-значение**
27174528	6,5 (6,3–7,2)	8,9 (4,5–10,5)	0,600
27174521	17,7 (12,6–19,7)	12,9 (6–15)	0,173
27174508	19,8 (17,4–22,7)	14,2 (7–21,1)	0,345
27174501	15,3 (12,1–16,6)	14,1 (7,2–17,8)	0,753
27174459	22,3 (18,5–24,5)	19,6 (10,5–21,1)	0,173
27174457	10,7 (10–13)	8,2 (5,3–10,7)	0,116
27174444	19,4 (14,5–27,4)	13,5 (9,2–17,9)	0,753
27174438	26,2 (22,6–35,3)	16,9 (13–20,1)	0,116
27174431	29,7 (21,6–30)	17,2 (15,3–21,2)	0,116

Продолжение таблицы 25

27174425	19,4 (15,5–20)	13,9 (9,4–16,5)	0,463
27174423	23,9 (20,9–28,2)	14,9 (12,2–20,1)	0,249
27174417	39,2 (32,2–42,3)	31,9 (19,4–36)	0,173
27174396	29,9 (24,4–30,6)	24,6 (19,8–31,5)	0,917
27174394	28,5 (22,3–29,9)	23,7 (16,4–35,9)	0,917
27174392	42,5 (37,2–45,6)	40,5 (21,9–43,7)	0,173
27174378	12,6 (8,7–15,5)	7,2 (3,5–9,1)	0,075
27174366	12,6 (8,7–16)	10 (6,8–11,2)	0,046
27174362	15,6 (11,7–17,4)	10,2 (5,7–12,8)	0,173
27174358	12,6 (10,1–16,4)	9,8 (6–15,1)	0,600
27174355	9,6 (7,9–12,4)	6,6 (4,6–8,4)	0,028
27174353	13,2 (11,6–14,4)	9,1 (5,9–10,6)	0,249
27174348	10,8 (5,8–12,7)	7,7 (4–11)	0,917
27174332	18,8 (14,7–23)	14,3 (6,7–16,3)	0,116

* Данные представлены как медиана (25–75 процентиля)

** Критерий Уилкоксона для связанных выборок

Таблица 26 — Сравнение метилирования отдельных CpG-островков промотора гена *HOXA11* до и после приема ЭГ

Позиция на 7 хромосоме, н. п.	Степень метилирования* до приема препарата, %	Степень метилирования* после приема препарата, %	р-значение**
27185586	25,6 (22–37,6)	26,7 (19,1–37,2)	0,753
27185571	9,9 (5,9–12,7)	2,8 (0,8–10)	0,600
27185565	4,7 (3–12,5)	4 (0,9–7,1)	0,463
27185525	14,5 (7,4–20,5)	20,5 (4,5–25,9)	0,600
27185509	48 (41,2–49,2)	63,3 (51,5–65,8)	0,917
27185507	9,3 (5,8–13)	10,8 (1,9–21,3)	0,917
27185505	12,4 (8,6–19)	9,9 (1,5–22)	0,917
27185503	20,2 (13,7–26,2)	16,1 (5,2–29,4)	0,753
27185500	22,1 (14,8–24,9)	33,3 (27,3–36,6)	0,173
27185469	47 (46,1–49,4)	48,1 (41,4–53,1)	0,917
27185466	42,4 (38,4–47,1)	32,8 (31,1–44,9)	0,463
27185460	43,8 (39–45,8)	47,3 (27,6–52)	0,917
27185452	50,8 (47,2–53,9)	57,2 (53–58,9)	0,345
27185440	27,9 (27,3–29,1)	24,2 (1,6–36,2)	0,345
27185433	20,7 (9,4–24,5)	20,4 (15,8–33,4)	0,753

* Данные представлены как медиана (25–75 процентиля)

** Критерий Уилкоксона для связанных выборок

Из представленных данных можно сделать вывод, что значимых различий в степени метилирования отдельных CpG-островков в промоторе гена *HOXA11* до и после приема ЭГ не наблюдается. В то же время для гена *HOXA10* наблюдается значимое снижение степени метилирования CpG-островков в позициях 27174355 и 27174366, а также тенденция к снижению метилирования в положении 27174378 ($p=0,075$).

Поскольку было показано, что метилирование промоторов генов *HOXA10* и *HOXA11* может быть фактором в составе многофакторной модели, связанной с исходами программ ВРТ, а ЭГ приводил к снижению метилирования ряда CpG-островков в составе промотора гена *HOXA10*, то дальнейшее изучение роли данного препарата в улучшении исходов программ ВРТ на выборке большего размера может являться перспективной темой исследований.

3.6.2. Влияние эпигаллокатехин-3-галлата на транскриптом эндометрия

Поскольку было показано, что ЭГ может снижать воспаление в эндометрии и улучшать исходы беременности при хроническом эндометрите, то было сделано предположение, что прием ЭГ может приводить к определенным изменениям в транскриптоме клеток, повышая РЭ. В связи с этим был проведен анализ профиля экспрессии генов в биопсийных образцах эндометрия до и после приема препарата.

Ниже представлены гены с наибольшим изменением экспрессии после приема ЭГ (Таблица 27). Следует отметить, что после приема препарата наибольшему повышению в уровне экспрессии подвергаются те же гены, экспрессия которых выше в группе 5 (женщины, забеременевшие в результате проведения ЭКО) по сравнению с группой 6 (женщины, у которых в результате проведения ЭКО беременность не наступила), а именно такие гены, как *PAEP*, *SLC15A1*, *CATSPERB*, *C4BPA*, *DPP4*, *DLGAP1-AS3*, *CXCL14*, *HABP2*, *FOS*, *NABP1*, *SLC1A1*. Аналогичным образом наибольшее снижение экспрессии после приема препарата отмечено для генов, уровень которых выше в группе 6 по сравнению с

группой 5 (Таблица 27), а именно для таких генов, как *MMP26*, *XDH*, *LOC105377265*, *LOC101927987* (*CTNNA2-AS1*), *CAPN6*, *TRPM6*, *CYP26A1*, *SULT1E1*, *TM4SF4*, *SERPINB9*, *ROS1*, *HLA-DOB*.

Таблица 27 — Гены с наибольшими различиями экспрессии до и после приема ЭГ

Ген	Средний сигнал, log ₂		Насколько ниже (-) или выше (+) экспрессия после приема препарата	p- значение
	до приема препарата	после приема препарата		
<i>PAEP</i>	4,4	11,1	+104,0	<0,001
<i>SLC15A1</i>	5,0	10,6	+50,5	0,006
<i>C4BPA</i>	4,2	9,7	+43,4	0,003
<i>CXCL14</i>	7,2	11,2	+15,8	0,008
<i>CATSPERB</i>	4,9	8,8	+15,7	0,026
<i>CLDN1</i>	4,7	8,4	+13,3	0,036
<i>NABP1</i>	4,1	7,9	+13,2	0,022
<i>FOS</i>	5,6	9,3	+12,7	0,013
<i>DPP4</i>	4,9	8,4	+11,9	0,009
<i>DLGAP1-AS3</i>	2,9	6,5	+11,8	0,036
<i>SLC1A1</i>	6,4	9,9	+11,4	0,013
<i>EDNRB</i>	5,2	8,7	+10,8	0,009
<i>ADGRF1</i>	3,6	6,9	+9,9	0,002
<i>C3</i>	6,7	9,9	+9,7	<0,001
<i>MUC16</i>	5,6	8,9	+9,7	<0,001
<i>TMC5</i>	4,7	7,9	+9,3	<0,001
<i>HABP2</i>	4,6	7,8	+9,3	<0,001
<i>CYP26A1</i>	8,8	5,6	-9,0	0,012
<i>PLA2G4F</i>	7,8	4,6	-9,2	0,016
<i>GGTA1P</i>	7,0	3,7	-9,4	<0,001
<i>ROS1</i>	7,2	3,9	-10,3	<0,001
<i>HLA-DOB</i>	8,2	4,7	-11,0	0,015
<i>SERPINB9</i>	10,1	6,5	-11,7	<0,001
<i>FAR2P3</i>	7,4	3,4	-16,6	0,032
<i>SULT1E1</i>	8,6	4,5	-16,6	0,008
<i>CAPN6</i>	11,5	7,4	-17,6	<0,001
<i>TM4SF4</i>	8,5	4,2	-19,1	0,014
<i>TRPM6</i>	9,7	5,3	-21,4	<0,001
<i>XDH</i>	10,3	5,1	-36,2	0,001
<i>LOC105377265</i>	8,6	3,5	-36,7	0,004
<i>LOC101927987</i>	9,0	3,7	-39,1	<0,001
<i>MMP26</i>	11,5	5,7	-56,9	0,006

Значимым считалось изменение экспрессии не менее чем в 2 раза при $p < 0,05$. Было проведено сравнение списков генов, экспрессия которых значимо повышена у забеременевших после ЭКО (Группа 5) и после приема ЭГ (Рисунок 20А), а также списков генов, экспрессия которых значимо понижена у забеременевших после ЭКО (Группа 5) и после приема препарата (Рисунок 20Б).

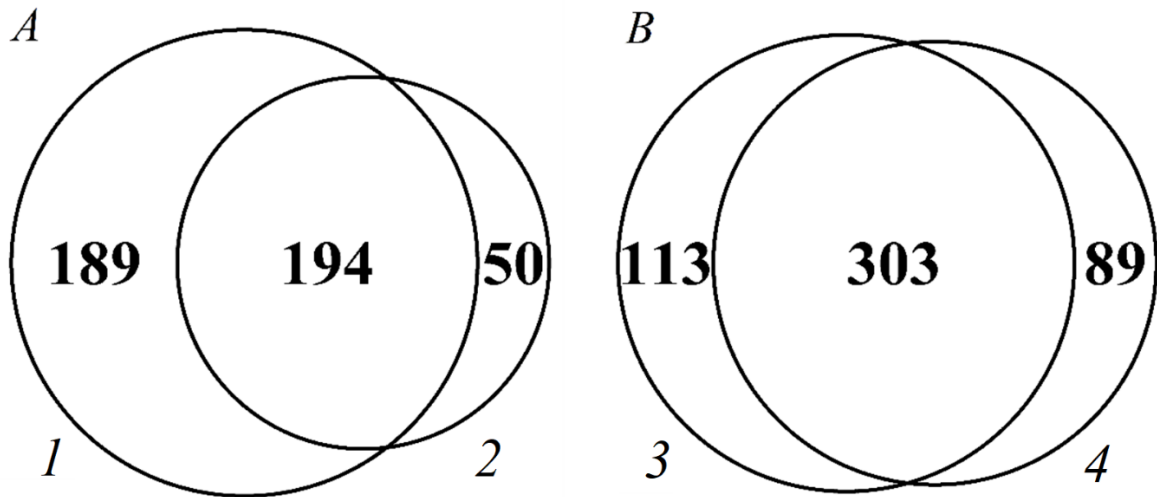


Рисунок 20. Диаграмма Венна. *A* — количество генов, экспрессия которых повышена в группе забеременевших после ЭКО (1) и в группе после приема ЭГ (2). *B* — количество генов, экспрессия которых понижена в группе после приема ЭГ (3) и в группе забеременевших после ЭКО (4)

При сравнении списков генов было обнаружено значительное пересечение, что может указывать на потенциальное благоприятное влияние эригаллокатехин-3-галлата на состояние эндометрия у женщин с ТПФ бесплодия и неудачными попытками ЭКО в анамнезе.

С помощью онлайн-сервиса DAVID [84,85] был проведен анализ обогащения по функциональной принадлежности для генов, экспрессия которых значимо повышалась (Таблица 28) и понижалась (Таблица 29) как у забеременевших после ЭКО женщин, так и после приема ЭГ. Из результатов анализа обогащения по функциональной принадлежности можно сделать вывод, что в группе забеременевших после ЭКО и в группе после приема препарата повышается экспрессия генов, кодирующих секретлируемые внеклеточные факторы, трансмембранные белки, компоненты иммунного ответа и системы комплемента,

молекулы адгезии и цитоскелета, а также компоненты сигнальных путей эпидермального фактора роста и инсулиноподобного фактора роста. В то же время в группе забеременевших после ЭКО и в группе после приема препарата понижается экспрессия генов, связанных с окислительно-восстановительными процессами в клетке, трансмембранными белками, метаболизмом липидов, холестерина и стероидов и кальций-зависимой регуляцией в клетке.

Таблица 28 — Анализ обогащения по функциональной принадлежности для генов, экспрессия которых повышена как в группе забеременевших после ЭКО, так и в группе после приема ЭГ

Аннотационный кластер	<i>p</i> -значение	Аннотационный термин
1	<0,001	внеклеточное пространство
		N-гликозилирование
		секретируемый
		гликопротеин
		дисульфидная связь
		сигнальный пептид
2	0,001	клеточная мембрана
		внеклеточный домен
		цитоплазматический домен
		трансмембранный регион
		трансмембранная спираль
3	0,005	система комплемента
		врожденный иммунитет
		иммунитет
		каскад коагуляции
		положительная регуляция апоптотического клиренса клеток
		альфа-2-макроглобулин
		воспалительный ответ
4	0,025	ЭФР-подобный кальций-связывающий домен
		белок, связывающий инсулиноподобный фактор роста
		связывание ионов кальция

Продолжение таблицы 28

5	0,040	тетраспанины
6	0,045	фокальная адгезия
		дифференцировка мезодермальных клеток
		организация внеклеточного матрикса
		интегрины
		регуляция миграции эпителиальных клеток
		клеточная адгезия
		сигнальный путь PI3K-Akt
		регуляция актинового цитоскелета

Таблица 29 — Анализ обогащения по функциональной принадлежности для генов, экспрессия которых понижена как в группе забеременевших после ЭКО, так и в группе после приема ЭГ

Аннотационный кластер	р-значение	Аннотационный термин
1	<0,001	процесс окисления-восстановления
		оксидоредуктазы
		НАД
		НАДФ
2	0,001	клеточная мембрана
		трансмембранная спираль
		трансмембранный регион
		внеклеточный домен
		цитоплазматический домен
3	0,006	биосинтез стероидов
		метаболизм стероидов
		процесс биосинтеза холестерина
		метаболизм холестерина
		биосинтез липидов
4	0,013	кальций-связывающий домен
		кальций-зависимое мембранное воздействие
		связывание ионов кальция
5	0,017	метаболизм жирных кислот
		наружная мембрана митохондрий
		бета-окисление жирных кислот
		сигнальный путь PPAR
		сигнальный путь адипоцитокина
6	0,023	ФАД, флавопротеины

При анализе обогащения по функциональной принадлежности генов, экспрессия которых значимо повысилась только в группе пациенток, забеременевших после ЭКО, было выявлено 7 аннотационных кластеров (Таблица 30). Данные кластеры свидетельствуют, что происходит изменение экспрессии генов, связанных с трансмембранными белками, везикулярным транспортом в клетку, кальций-опосредованным поглощением фосфолипидов, окислительно-восстановительными процессами, в том числе ассоциированными с железом, гемом и ФАД, секретлируемыми сигнальными молекулами и клеточной адгезией, опосредованной доменами анкирина и фибронектина III типа.

Таблица 30 — Анализ обогащения по функциональной принадлежности для генов, экспрессия которых повышена только в группе забеременевших после ЭКО

Аннотационный кластер	<i>p</i> -значение	Аннотационный термин
1	0,024	клеточная мембрана
		трансмембранная спираль
		трансмембранный регион
		внеклеточный домен
		цитоплазматический домен
		рецептор
2	0,028	связывание клатрина
		кальций-зависимое связывание фосфолипидов
		регуляция ионно-зависимого экзоцитоза Ca ²⁺
		Ca ²⁺ -зависимое мембранное воздействие
		слияние пузырьков
		связывание синтаксина
3	0,029	ионы железа
		гем
		сайт связывания ионов металлов
		оксидоредуктазы
		процесс окисления-восстановления
		мембрана эндоплазматического ретикулула
4	0,033	сигнальный пептид
		секреция
		дисульфидная связь

Продолжение таблицы 30

		гликопротеин
		внеклеточное пространство
		N-гликозилирование
5	0,035	белки, содержащие домен с анкириновыми повторами
6	0,041	связывание ФАД
		флавопротеин
		активность переносчиков электронов
		оксидоредуктазы
		процесс окисления-восстановления
7	0,048	белки, содержащие домен фибронектина типа 3

В то же время гены, экспрессия которых значимо повысилась только в группе пациенток, принимавших ЭГ, значимо объединялись только в 2 аннотационных кластера, свидетельствующих об активности процессов транспорта синтезируемых в клетке компонентов внеклеточного матрикса, сигнальных и/или других молекул из эндоплазматического ретикулума в комплекс Гольджи и далее во внеклеточное пространство (Таблица 31).

Таблица 31 — Анализ обогащения по функциональной принадлежности для генов, экспрессия которых повышена только в группе после приема ЭГ

Аннотационный кластер	p-значение	Аннотационный термин
1	0,012	мембрана комплекса Гольджи
		мембрана эндоплазматического ретикулума
		везикулы, покрытые белком COPII
		транспорт из эндоплазматического ретикулума в комплекс Гольджи
2	0,044	внеклеточное пространство
		дисульфидная связь
		белковый внеклеточный матрикс
		гликопротеин
		сигнальный пептид
		секреция
		N-гликозилирование

При анализе обогащения по функциональной принадлежности генов, экспрессия которых значимо понижена только в группе пациенток,

забеременевших после ЭКО, был выявлен лишь один функциональный кластер, связанный с биосинтезом стероидных гормонов, эндоплазматическим ретикулумом и микросомами (Таблица 32), что пересекается с одним из кластеров для генов, экспрессия которых понижена и у забеременевших, и после приема препарата (Таблица 28). В то же время гены, экспрессия которых понижена только в группе принимавших препарат, объединяются в 2 аннотационных кластера, один из которых связан с липидным обменом и метаболизмом жирных кислот (схожий кластер наблюдался и среди генов, пониженных как после приема препарата, так и у забеременевших женщин), а второй связан с АТФ-зависимой активностью протеинкиназ и трансфераз и регуляцией апоптотического процесса (Таблица 33).

Таблица 32 — Анализ обогащения по функциональной принадлежности для генов, экспрессия которых понижена только в группе забеременевших после ЭКО

Аннотационный кластер	p-значение	Аннотационный термин
1	0,035	биосинтез стероидных гормонов
		внутриклеточные мембраносвязанные органеллы
		эндоплазматический ретикулум
		микросомы

Таблица 33 — Анализ обогащения по функциональной принадлежности для генов, экспрессия которых понижена только в группе после приема ЭГ

Аннотационный кластер	p-значение	Аннотационный термин
1	0,019	метаболизм жирных кислот
		липидный обмен
2	0,044	связывание АТФ
		связывание нуклеотидов
		трансферазы
		киназы
		фосфорилирование белков
		отрицательная регуляция апоптотического процесса
		протеинкиназы
убиквитинилирование		

Таким образом, в результате проведенных исследований было выявлено, что препарат ЭГ может влиять на эпигенетические и генетические характеристики эндометрия. При анализе уровня метилирования CpG-островков промоторов генов *HOXA10* и *HOXA11* была отмечена тенденция к снижению общего уровня метилирования промотора гена *HOXA10*, а для ряда CpG-островков снижение метилирования было статистически значимым. В то же время отсутствуют убедительные данные, которые могли бы свидетельствовать, что ЭГ влияет на уровень метилирования промотора гена *HOXA11*. При анализе транскриптома эндометрия до и после приема препарата было выявлено, что наибольшему изменению под воздействием ЭГ подвергается экспрессия тех генов, экспрессия которых отличала пациенток, забеременевших после программы ЭКО, от пациенток с неудачным исходом. При этом функциональная кластеризация общих генов выявила, что они кодируют белки, которые связаны с такими важными процессами, как окисление и восстановление в клетке, метаболизм липидов, стероидов, передача сигналов через трансмембранные белки-рецепторы, секреция сигнальных молекул, иммунитет, адгезия и внутриклеточная передача сигналов. Анализ генов, значимо отличавшихся только в группе забеременевших после ЭКО или только в группе получавших препарат, не выявил большого количества принципиально отличающихся аннотационных кластеров. Всё это может указывать на благоприятное воздействие приема ЭГ на эпигенетические и генетические характеристики эндометрия, выражающееся в появлении признаков улучшения РЭ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проблема бесплодия остается одной из центральных проблем в акушерстве и гинекологии. Выявление и коррекция причин бесплодия может приводить к естественному наступлению беременности, однако в ряде случаев требуется применение вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Вместе с тем следует отметить, что даже при проведении программ ВРТ частота наступления беременности составляет 30–45%. В связи с этим актуальным является поиск и изучение факторов, определяющих рецептивность эндометрия (РЭ) и прогноз исходов программ ВРТ, а также разработка методов коррекции данных факторов и оптимизация тактики ведения программ ВРТ с их учетом. Отдельный интерес представляет изучение указанных проблем у женщин с трубно-перитонеальным фактором бесплодия и неоднократными неудачными попытками ЭКО в анамнезе, поскольку исключение основных причин бесплодия у данных пациенток требует дополнительного поиска изменений, лежащих в основе наблюдаемых репродуктивных проблем.

Ранее было показано, что РЭ женщины, то есть способность принимать эмбрион и поддерживать его нормальное развитие, может быть напрямую связана с морфологическим строением и особенностями экспрессии белков и сигнальных молекул в клетках эндометрия. Однако в основе данных проявлений лежат молекулярно-генетические особенности клеток, включая генетические и эпигенетические факторы. Было показано, что экспрессия генов *НОХА10* и *НОХА11*, которые играют важную роль в эмбриональном развитии и ассоциированы в онтогенезе с телом и шейкой матки, циклически изменяется в течение менструального цикла и максимальна в период так называемого «окна имплантации». Снижение экспрессии данных генов, в том числе за счет эпигенетического механизма повышенного метилирования промоторов, часто ассоциировано с заболеваниями женского репродуктивного тракта и бесплодием.

В данной диссертационной работе было изучено метилирование промоторов генов *HOXA10* и *HOXA11* в ранее плохо охарактеризованной в этом плане группе пациенток с трубно-перитонеальным фактором бесплодия и неоднократными неудачными попытками ЭКО в анамнезе. Хотя значимых различий по относительной степени метилирования отдельных CpG-островков промоторов *HOX*-генов в образцах аспирационной биопсии эндометрия при использовании бисульфитной конверсии и секвенирования нового поколения выявлено не было, однако это может указывать как на консервативность метилирования генов *HOXA10* и *HOXA11*, так и на одинаковое соотношение клеток с метилированными и неметилированными CpG-островками в образцах биопсии. Кроме того, клеток, которые действительно определяют РЭ, может быть значительно меньше остальных клеток, играющих лишь второстепенную роль, и на этом фоне невозможно увидеть значимые различия в эпигенетическом статусе *HOX*-генов. Данное предположение согласуется с результатами оценки метилирования с помощью бисульфитной конверсии и секвенирования по Сэнгеру: если считать метилированными те CpG-островки, для которых метилирование отмечено хотя бы в какой-то доли всех фрагментов ДНК, выделенных из образцов аспирационной биопсии, то методом множественного логистического регрессионного анализа можно получить модель, которая позволяет значимо ($p=0,009$) предсказывать исходы программ ВРТ с учетом возраста пациенток, наличия воспалительных заболеваний в анамнезе, уровня антимюллера гормона (АМГ), длительности бесплодия и уровня метилирования генов *HOXA10* и *HOXA11*. При этом процент корректных предсказаний наступления беременности составляет 80,0%, а ненаступления беременности — 88,24%. Общий процент корректных предсказаний — 85,19%. При исключении из прогностических факторов метилирования генов *HOXA10* и *HOXA11* наблюдается ухудшение общего процента корректных предсказаний до 70,37–77,78%.

Одним из подходов к изучению маркеров РЭ и прогнозированию исходов программ ВРТ является выявление панелей генов, ассоциированных со статусом

РЭ или успешностью ВРТ. Как правило, на первом этапе подобных исследований выявляют списки генов, экспрессия которых наиболее отличается между изучаемыми группами образцов и/или пациентов. Затем на основе экспрессии данных генов могут формироваться модели и классификаторы, целью которых является оценка РЭ и исхода программ ВРТ. Одним из самых известных тестов на основе экспрессии генов эндометрия является тест рецептивности эндометрия (от англ. Endometrial Receptivity Analysis, ERA), основанный на экспрессии 238 генов.

В представленном исследовании было проведено полногеномное транскриптомное исследование образцов эндометрия от женщин с трубно-перитонеальным фактором бесплодия и неоднократными неудачными попытками ЭКО в анамнезе. У женщин из этой группы, которые смогли забеременеть в очередном цикле ЭКО, при сравнении с женщинами, которые не забеременели, была выявлена значимо более высокая экспрессия 524 транскриптов и значимо более низкая экспрессия 480 транскриптов. При этом в данные списки входило 109 генов из теста ERA. Гены, экспрессия которых изменилась более чем в 20 раз, включали *PAEP*, *SLC15A1*, *CATSPERB*, *C4BPA*, *DPP4*, *CAPN6*, *XDH* и *MMP26*. Для всех этих генов ранее была показана связь с РЭ и/или бесплодием. Разделение образцов от пациенток, которые смогли и не смогли забеременеть в текущем цикле ЭКО, с использованием метода главных компонент или иерархической кластеризации и тепловой карты на основе экспрессии всего транскриптома позволяет отличать исходы программ ВРТ, что согласуется с результатами других ученых.

Такие анализы, как тест ERA, позволяют оценивать эндометрий как пререцептивный, рецептивный или пострецептивный, а на основе данной оценки дается рекомендация по индивидуальному выбору дня ПЭ в программах ВРТ. Однако остается противоречивым вопрос, могут ли эти индивидуальные рекомендации значимо улучшать исходы программ ВРТ. Альтернативным подходом могло бы являться терапевтическое воздействие, изменяющее генетические и эпигенетические характеристики эндометрия.

Ранее было показано, что вещество ЭГ, полифенольное соединение из зеленого чая, обладает антиоксидантным и противовоспалительным эффектом и может влиять на метилирование ДНК. В представленном исследовании было изучено влияние данного вещества на метилирование промоторов генов *HOXA10* и *HOXA11* и на профиль экспрессии генов в образцах эндометрия. Был сделан вывод, что ЭГ может снижать уровень метилирования промотора гена *HOXA10*, в то время как значимого влияния на ген *HOXA11* выявлено не было. Однако в образцах эндометрия у женщин, принимавших ЭГ, наблюдалось наиболее выраженное изменение тех же генов, экспрессия которых была выше у женщин с трубно-перитонеальным фактором бесплодия и неоднократными неудачными попытками ЭКО в анамнезе, которые забеременели в очередном цикле ЭКО, и наоборот, после приема препарата наиболее сниженная экспрессия наблюдалась для тех же генов, что и для генов, уровень которых был у забеременевших женщин значимо ниже, чем у незабеременевших.

Сравнение и анализ обогащения по функциональной принадлежности для всех генов, экспрессия которых значимо отличалась у забеременевших и незабеременевших женщин и до и после приема ЭГ, выявили, что одинаковые гены в этих списках относились к функциональным кластерам, связанным с секретлируемыми внеклеточными молекулами и факторами роста, трансмембранными белками, компонентами иммунного ответа и системы комплемента, молекулами адгезии и цитоскелета, окислительно-восстановительными процессами, метаболизмом липидов и стероидов. Для всех этих функциональных кластеров характерна связь с РЭ, имплантацией и развитием беременности.

Следует отметить, что большинство классификаторов и моделей на основе экспрессии генов основывается на списке генов, экспрессия которых значимо отличается между исследуемыми группами образцов или пациентов, то есть каждый из этих генов обладает определенной индивидуальной информативностью. Однако существует теория, что из генов с низкой индивидуальной

информативностью (то есть с низкой экспрессией и/или незначимыми различиями в экспрессии) можно составить классификаторы с высокой совокупной информативностью. С биологической точки зрения это может объясняться рядом причин, например, что эти гены влияют на одни и те же процессы и сигнальные пути, характеризуются совместной экспрессией, взаимодействуют на генетическом или физическом уровне и т. п., поэтому небольшое изменение экспрессии каждого из этих генов может приводить к выраженному совокупному эффекту. Ранее данный подход не применялся для прогноза исходов программ ВРТ у женщин с трубно-перитонеальным фактором бесплодия и неоднократными неудачными попытками ЭКО в анамнезе.

На основе данного подхода в представленной работе был проведен поиск генов, которые могут быть связаны совместной экспрессией, генетическим или физическим взаимодействием, гомологией, совместной локализацией или влиянием на общие пути, после чего из этих генов были составлены классификаторы на основе сочетаний по 2 и 3 гена, предсказывающих исходы программ ВРТ. Отбор сочетаний производился на основе полногеномного транскриптомного профилирования, а затем производилась валидация с помощью ПЦР-РВ. Наилучшая классификация исходов достигалась при одновременном анализе экспрессии генов *MSX1 (HOX7)*, *HOXA11* и *TP53I3*. Чувствительность модели составила 73%, специфичность — 71%, а площадь под ROC-кривой (AUC) — 0,738 (95% ДИ 0,577–0,898). Прогностическая ценность отрицательного результата составила 85%, а положительного — 55%. Таким образом, примененный подход показал перспективность в изучаемой группе и необходимость проведения дальнейших исследований на более крупной выборке.

Таким образом, в результате проведения представленного диссертационного исследования была раскрыта тема реализации программ ВРТ у пациенток с трубно-перитонеальным фактором бесплодия с учетом особенностей метилирования промоторов и профиля экспрессии генов в образцах эндометрия. Впервые проведена оценка метилирования промоторов генов *HOXA10* и *HOXA11* в

указанной популяции, выявлены специфичные изменения транскриптома. Оценен терапевтический потенциал вещества ЭГ и разработан классификатор исходов программ ВРТ, основанный на экспрессии функционально и гомологично связанных генов без предварительного отбора генов с наибольшей индивидуальной прогностической ценностью и дифференциальной экспрессией. На основании полученных результатов был разработан и оптимизирован алгоритм персонализированного ведения программ ВРТ с учетом возраста, наличия воспалительных заболеваний в анамнезе, уровня антимюллера гормона, длительности бесплодия, уровня метилирования промоторов генов *HOXA10* и *HOXA11* в эндометрии, а также экспрессии генов *MSX1 (HOX7)*, *HOXA11* и *TP53I3* в эндометрии (Рисунок 21).

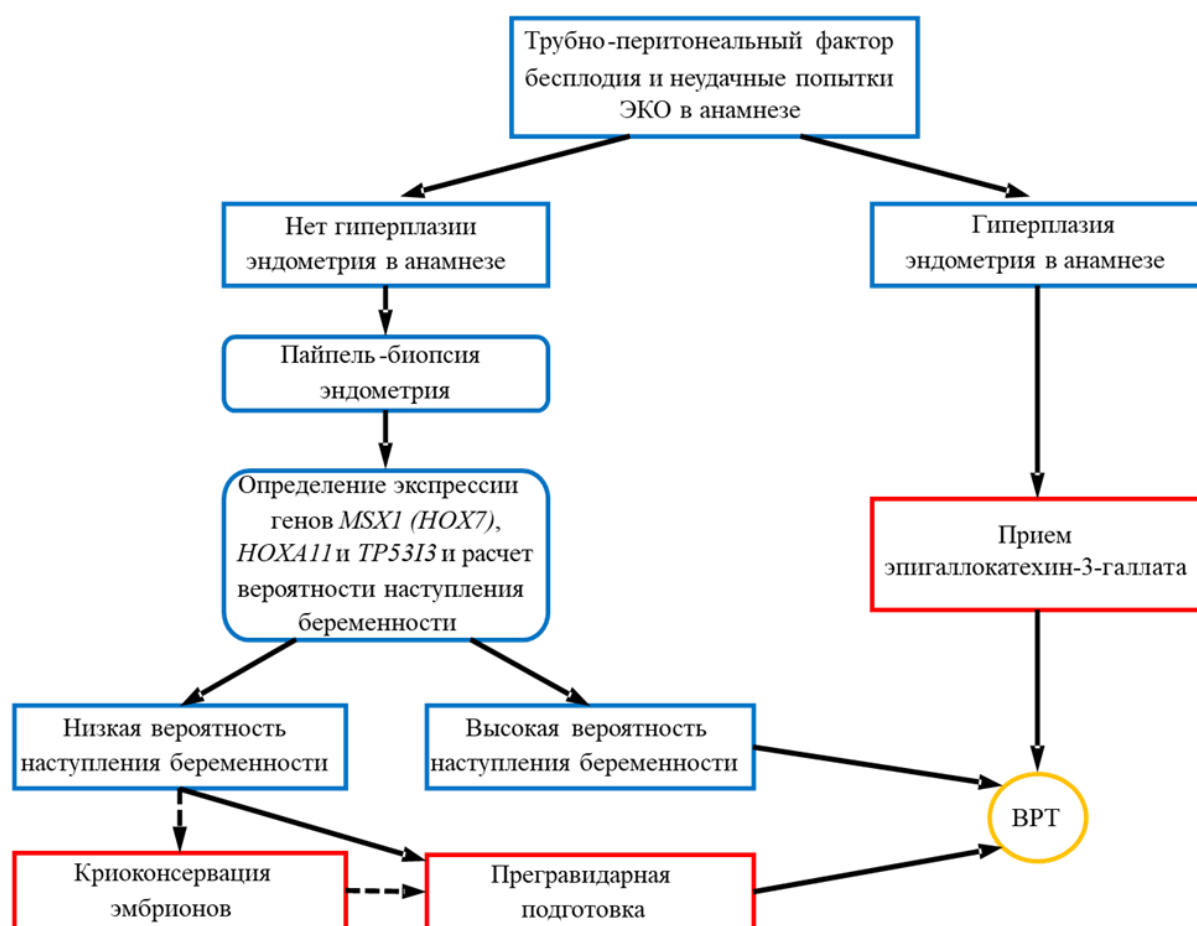


Рисунок 21. Алгоритм персонализированного ведения программы ВРТ с учетом возраста, наличия воспалительных заболеваний в анамнезе, уровня антимюллера гормона, длительности бесплодия, уровня метилирования промоторов генов *HOXA10* и *HOXA11* и экспрессии генов *MSX1 (HOX7)*, *HOXA11* и *TP53I3* в эндометрии

ВЫВОДЫ

1. Исходы программ ВРТ у 42,6% пациенток с трубно-перитонеальным фактором бесплодия и неудачными попытками ЭКО в анамнезе могут быть предсказаны с помощью модели, учитывающей возраст пациентки, наличие воспалительных заболеваний в анамнезе, уровень АМГ, длительность бесплодия.

2. У пациенток с трубно-перитонеальным фактором бесплодия и неудачными попытками ЭКО в анамнезе, у которых наступила беременность в данном цикле ВРТ, в эндометрии не менее чем в 2 раза выше экспрессия 524 транскриптов и не менее чем в 2 раза ниже экспрессия 480 транскриптов по сравнению с пациентками, у которых беременность не наступила в данном цикле ВРТ.

3. Метилирование отдельных CpG-островков в промоторах генов *HOXA10* и *HOXA11* в исследуемой группе пациенток с трубно-перитонеальным фактором бесплодия и неудачными попытками ЭКО в анамнезе является консервативным параметром и не вносит вклада в определение исходов программ ВРТ.

4. Эпигаллокатехин-3-галлат статистически значимо снижает метилирование CpG-островков в промоторной области гена *HOXA10* в эндометрии; не менее чем в 2 раза повышает экспрессию генов *PAEP*, *SLC15A1*, *CATSPERB*, *C4BPA*, *DPP4*, *DLGAP1-AS3*, *CXCL14*, *HABP2*, *FOS*, *NABP1*, *SLC1A1* и понижает экспрессию генов *MMP26*, *XDH*, *LOC105377265*, *LOC101927987 (CTNNA2-AS1)*, *CAPN6*, *TRPM6*, *CYP26A1*, *SULT1E1*, *TM4SF4*, *SERPINB9*, *ROS1*, *HLA-DOB* у пациенток с наступившей беременностью.

5. Модель прогноза эффективности программ ВРТ у пациенток с трубно-перитонеальным фактором бесплодия и неудачными попытками ЭКО в анамнезе на основе экспрессии генов *MSX1 (HOX7)*, *HOXA11* и *TP53I3* в эндометрии характеризуется площадью под ROC-кривой 0,74, чувствительностью 73% при специфичности 71%, прогностической ценностью отрицательного результата 85% при прогностической ценности положительного результата 55%.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Определение вероятности наступления беременности в программах ВРТ у пациенток с ТПФ бесплодия и неоднократными неудачными попытками ЭКО в анамнезе может быть осуществлено на основе модели, которая учитывает возраст пациентки, наличие воспалительных заболеваний в анамнезе, уровень антимюллера гормона, длительность бесплодия.

2. Для расчета вероятности наступления беременности в программах вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток с ТПФ бесплодия и неоднократными неудачными попытками ЭКО в анамнезе рекомендуется оценивать не только клиничко-анамнестические данные пациенток, но и профиль экспрессии генов *MSX1*, *HOXA11* и *TP53I3* в образцах эндометрия, полученных с помощью аспирационной пайпель-биопсии эндометрия, проведенной на 5-7 день после овуляции. Расчет вероятности наступления беременности может проводиться в лаборатории с помощью ОТ-ПЦР по формуле:

$$A=0,741*E_{xrg_{MSX1}} + 1,544*E_{xrg_{HOXA11}} - 24,769*E_{xrg_{TP53I3}} + 0,287,$$

где $E_{xrg_{MSX1}}$, $E_{xrg_{HOXA11}}$ и $E_{xrg_{TP53I3}}$ — это экспрессия генов *MSX1*, *HOXA11* и *TP53I3* соответственно, нормированная на экспрессию референсных генов *B2M*, *GUSB* и *TBP*

При значении A больше 0 вероятность забеременеть у пациентки в программе ВРТ выше.

3. Прием эпигаллокатехин-3-галлата по 50 мг 3 раза в день в течение 1 месяца согласно инструкции к применению препарата рекомендуется пациенткам с ТПФ бесплодием с неоднократными неудачными попытками ЭКО и гиперплазией эндометрия в анамнезе.

4. Пациенткам с низкой вероятностью наступления беременности в программах ВРТ, определенной по формуле на основе экспрессии генов *MSX1*, *HOXA11* и *TP53I3*, целесообразно отложить лечение методом ВРТ и провести дополнительную прегравидарную подготовку.

5. При низкой вероятности наступления беременности и наличии дополнительных факторов, снижающих эффективность программ ВРТ (старший репродуктивный возраст, низкий овариальный резерв, выраженная патозооспермия у партнера и др.), рекомендовано проведение сегментации цикла ВРТ с криоконсервацией всех полученных эмбрионов и проведение прегравидарной подготовки.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АМГ — антимюллеров гормон
- ант-ГнРГ — антагонист гонадотропин-рилизинг гормона
- ВКМ — внутриклеточная масса
- ВОЗ — Всемирная организация здравоохранения
- ВПГ — вирус простого герпеса
- ВРТ — вспомогательные репродуктивные технологии
- ГТ — гонадотропины
- ДГЭАС — дегидроэпиандростерон сульфат
- ДИ — доверительный интервал
- ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота
- ЗГТ — заместительная гормональная терапия
- ИГХ — иммуногистохимия
- ИКСИ — интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида
- ИМТ — индекс массы тела
- ИФР — инсулиноподобный фактор роста
- ЛГ — лютеинизирующий гормон
- МЕ — международная единица
- мРНК — матричная рибонуклеиновая кислота
- ОКК — ооцит-кумулюсный комплекс
- ОТ-ПЦР — полимеразная цепочечная реакция с обратной транскрипцией
- ОШ — отношение шансов
- ПЦР — полимеразная цепная реакция
- ПЦР-РВ — полимеразная цепная реакция в реальном времени
- ПЭ — перенос эмбриона
- РДВ — раздельное диагностическое выскабливание
- РНК — рибонуклеиновая кислота
- РКИ — рандомизированное контролируемое исследование

- рФСГ — рекомбинантный фолликулостимулирующий гормон
- РЭ — рецептивность эндометрия
- СГЯ — синдром гиперстимуляции яичников
- СПКЯ — синдром поликистозных яичников
- СТГ — соматотропный гормон
- Т₄св — свободный тироксин
- ТВП — трансвагинальная пункция фолликулов
- ТТГ — тиреотропный гормон
- ТФЭ — трофоэктодерма
- УЗИ — ультразвуковое исследование
- ФСГ — фолликулостимулирующий гормон
- ХГ — хорионический гонадотропин
- ЦМВ — цитомегаловирус
- чМГ — человеческий менопаузальный гонадотропин
- чХГ — человеческий хорионический гонадотропин
- ЭГ — эпигаллокатехин-3-галлат
- ЭКО — экстракорпоральное оплодотворение
- ЭКГ — электрокардиография
- βХГ — β-фракция хорионического гонадотропина
- AUC — площадь под ROC-кривой
- СК15 — цитокератин 15
- CRMPI — белок-медиатор ответа на коллапсин
- DES — диэтилстилбестрол
- DNMT — ДНК-метилтрансфераза
- DPYSL2 — дигидропиримидиназоподобный белок 2
- ERA — тест эндометриальной восприимчивости
- FGF2 — фактор роста фибробластов 2
- ITGB3 — интегрин β3
- НОХ-гены — гомеобокс-содержащие гены

- LIF — ингибирующий лейкемию фактор
- MI — стадия метафазы первого мейотического деления
- MII — стадия метафазы первого мейотического деления
- MKP2 — митоген-активируемая фосфатаза протеинкиназы 2
- MMP — матриксные металлопротеиназы
- MMP26 — матриксная металлопротеиназа 26
- NGS — секвенирование нового поколения
- p300/CBP — ассоциированный фактор p/CAF
- PAEP — прогестаген-ассоциированный эндометриальный протеин
- TGF β — трансформирующий фактор роста β
- TGFBR2 — рецептор трансформирующего фактора роста β
- TXNIP — тиоредоксин-взаимодействующий белок

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аномальное гипермети́лирование генов HOXA10 и HOXA11 при бесплодии, ассоциированном с хроническим эндометритом / Г. Т. Сухих, А. И. Осипьянц, Л. И. Мальцева [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2015. – № 12. – С. 69–74.
2. Возможности улучшения результативности программ экстракорпорального оплодотворения у «трудных» пациенток / Е. Б. Рудакова, Т. В. Стрижова, Е. А. Федорова, Л. Ю. Замаховская // Лечащий врач. – 2019. – № 12. – С. 14–19.
3. Женское бесплодие: традиционные методы лечения и экстракорпоральное оплодотворение у пациенток с эндокринными нарушениями / Е. Б. Рудакова, Т. В. Стрижова, Е. А. Федорова, Л. Ю. Замаховская // Лечащий врач. – 2020. – № 3. – С. 37–42.
4. Киселев, В. И. Регуляция активности генов и новые лекарственные средства / В. И. Киселев, М. А. Пальцев // Вестник Российской академии наук. – 2016. – Т. 86, № 6. – С. 512.
5. Корсак, В. С. Регистр ВРТ Российской Ассоциации Репродукции Человека. Отчет за 2017 год / В. С. Корсак, А. А. Смирнова, О. В. Шурыгина // Проблемы репродукции. – 2019. – Т. 25, № 6. – С. 9–21.
6. Краснопольская, К. В. Клинические аспекты лечения бесплодия в браке / К. В. Краснопольская, Т. А. Назаренко. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014. – 376 с.
7. Морфологический и молекулярный субстрат нарушения рецептивности эндометрия у бесплодных пациенток с наружно-генитальным эндометриозом / Е. А. Коган, Е. А. Калинина, А. В. Колотовкина [и др.] // Акушерство и Гинекология. – 2014. – № 8. – С. 47–52.
8. Мужское бесплодие в Российской Федерации: статистические данные за 2000–2018 годы / Г. С. Лебедев, Н. А. Голубев, И. А. Шадеркин [и др.] // Экспериментальная и клиническая урология. – 2019. – № 4. – С. 4–12.

9. Роль НОХ-генов при заболеваниях репродуктивной системы женщины, ассоциированных с бесплодием / Е. А. Князева, Е. А. Калинина, А. А. Быстрицкий [и др.] // *Акушерство и гинекология*. – 2017. – № 11. – С. 16–22.
10. Сухих, Г. Т. Хронический эндометрит / Г. Т. Сухих, А. В. Шуршалина. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. - 64 с.
11. Тапильская, Н. И. Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор как ключевой регулятор инвазивного потенциала эмбриона и рецептивности эндометрия / Н. И. Тапильская, А. М. Гзгзян, И. Ю. Коган // *Журнал акушерства и женских болезней*. – 2019. – Т. 68, № 1. – С. 83–92.
12. Тапильская, Н. И. Скрытые причины репродуктивных неудач. Вирусные инфекции в развитии хронического эндометрита / Н. И. Тапильская, А. М. Гзгзян, И. Ю. Коган // *StatusPraesens. Гинекология, акушерство, бесплодный брак*. – 2019. – № 4 (59). – С. 118–124.
13. Тапильская, Н. И. Хронический эндометрит - субклиническое воспалительное заболевание органов малого таза / Н. И. Тапильская, С. А. Карпеев, И. В. Кузнецова // *Гинекология*. – 2014. – Т. 16, № 1. – С. 104–109.
14. Тапильская, Н. И. Эндометриоз: либерализация лечебных парадигм / Н. И. Тапильская, С. А. Маклецова, С. А. Дьяконов // *StatusPraesens. Гинекология, акушерство, бесплодный брак*. – 2018. – № 3 (47). – С. 39–45.
15. Шуршалина, А. В. Морфо-функциональные перестройки эндометрия в «окно имплантации» / А. В. Шуршалина, Т. А. Демуря // *Акушерство и гинекология*. – 2011. – № 7–2. – С. 9–13.
16. Эффективность терапии хронического эндометрита эпигаллокатехин-3-галлатом у женщин с нарушением репродуктивной функции / Л. И. Мальцева, В. И. Киселев, А. А. Полозников [и др.] // *Практическая медицина*. – 2019. – Т. 17, № 4. – С. 62–67.
17. A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature / P. Díaz-Gimeno, J. A. Horcajadas, J. A. Martínez-Conejero [et al.] // *Fertil. Steril*. – 2011. – Vol. 95, № 1. – P. 50-60.e15.

18. Abdominal B (AbdB) Hoxa genes: regulation in adult uterus by estrogen and progesterone and repression in müllerian duct by the synthetic estrogen diethylstilbestrol (DES) / L. Ma, G. V Benson, H. Lim [et al.] // *Dev. Biol.* – 1998. – Vol. 197, № 2. – P. 141–154.
19. Aberrant expression of deoxyribonucleic acid methyltransferases DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B in women with endometriosis / Y. Wu, E. Strawn, Z. Basir [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2007. – Vol. 87, № 1. – P. 24–32.
20. Aberrant methylation at HOXA10 may be responsible for its aberrant expression in the endometrium of patients with endometriosis / Y. Wu, G. Halverson, Z. Basir [et al.] // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2005. – Vol. 193, № 2. – P. 371–380.
21. Aberrant methylation at HOXA10 may be responsible for its aberrant expression in the endometrium of patients with endometriosis / Y. Wu, G. Halverson, Z. Basir [et al.] // *Am. J. Obstet. Gynecol.* – 2005. – Vol. 193, № 2. – P. 371–380.
22. Activation of matrix metalloproteinase-26 by HOXA10 promotes embryo adhesion in vitro / Y. Jiang, G. Yan, H. Zhang [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2014. – Vol. 445, № 3. – P. 622–628.
23. Activation of stem-cell specific genes by HOXA9 and HOXA10 homeodomain proteins in CD34+ human cord blood cells / C. M. Ferrell, S. T. Dorsam, H. Ohta [et al.] // *Stem Cells.* – 2005. – Vol. 23, № 5. – P. 644–655.
24. Aghajanova, L. Leukemia inhibitory factor and human embryo implantation / L. Aghajanova // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2004. – Vol. 1034. – P. 176–183.
25. Altered expression of HOXA10 in endometriosis: potential role in decidualization / J. J. Kim, H. S. Taylor, Z. Lu [et al.] // *Mol. Hum. Reprod.* – 2007. – Vol. 13, № 5. – P. 323–332.
26. Bovine pretransfer endometrium and embryo transcriptome fingerprints as predictors of pregnancy success after embryo transfer / D. Salilew-Wondim, M. Hölker, F. Rings [et al.] // *Physiol. Genomics.* – 2010. – Vol. 42, № 2. – P. 201–218.
27. Cakmak, H. Implantation failure: molecular mechanisms and clinical treatment / H. Cakmak, H. S. Taylor // *Hum. Reprod. Update.* – 2011. – Vol. 17, № 2. –

P. 242–253.

28. Cakmak, H. Molecular mechanisms of treatment resistance in endometriosis: the role of progesterone-hox gene interactions / H. Cakmak, H. S. Taylor // *Semin. Reprod. Med.* – 2010. – Vol. 28, № 1. – P. 69–74.

29. CatSperbeta, a novel transmembrane protein in the CatSper channel complex / J. Liu, J. Xia, K.-H. Cho [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282, № 26. – P. 18945–18952.

30. Cloning of an *X. laevis* gene expressed during early embryogenesis coding for a peptide region homologous to *Drosophila* homeotic genes / A. E. Carrasco, W. McGinnis, W. J. Gehring, E. M. De Robertis // *Cell.* – 1984. – Vol. 37, № 2. – P. 409–414.

31. Development of a new comprehensive and reliable endometrial receptivity map (ER Map/ER Grade) based on RT-qPCR gene expression analysis / M. Enciso, J. P. Carrascosa, J. Sarasa [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2018. – Vol. 33, № 2. – P. 220–228.

32. Differences in the endometrial transcript profile during the receptive period between women who were refractory to implantation and those who achieved pregnancy / A. Tapia, L. M. Gangi, F. Zegers-Hochschild [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2008. – Vol. 23, № 2. – P. 340–351.

33. Differential cell-specific modulation of HOXA10 by estrogen and specificity protein 1 response elements / R. Martin, M. B. Taylor, G. Krikun [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2007. – Vol. 92, № 5. – P. 1920–1926.

34. Differentially Gene Expression Profile Related to Inflammation in Endometrial Cells Induce by Lipopolysaccharide / L. Qin, R. Wang, S. Li, C. Li // *J. Reprod. Contracept.* – 2009. – Vol. 20, № 1. – P. 27–34.

35. Disbalance of redox processes in amniotic fluid at pre-eclampsia / T. N. Pogorelova, V. O. Gunko, A. A. Nikashina [et al.] // *Klin. Lab. Diagn.* – 2018. – Vol. 63, № 8. – P. 483–489.

36. DNA Methylation Machinery in the Endometrium and Endometrial Cancer / V. Caplakova, E. Babusikova, E. Blahovcova [et al.] // *Anticancer Res.* – 2016. – Vol.

36, № 9. – P. 4407–4420.

37. DNA methylation of HOXA10 in eutopic and ectopic endometrium / K. L. Andersson, C. Bussani, M. Fambrini [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2014. – Vol. 29, № 9. – P. 1906–1911.

38. Does the endometrial receptivity array really provide personalized embryo transfer? / R. Bassil, R. Casper, N. Samara [et al.] // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2018. – Vol. 35, № 7. – P. 1301–1305.

39. Doherty, L. F. Leiomyoma-derived transforming growth factor- β impairs bone morphogenetic protein-2-mediated endometrial receptivity / L. F. Doherty, H. S. Taylor // *Fertil. Steril.* – 2015. – Vol. 103, № 3. – P. 845–852.

40. Du, H. The Role of Hox Genes in Female Reproductive Tract Development, Adult Function, and Fertility / H. Du, H. S. Taylor // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* – 2015. – Vol. 6, № 1. – P. a023002.

41. Du, H. The Role of Hox Genes in Female Reproductive Tract Development, Adult Function, and Fertility / H. Du, H. S. Taylor // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* – 2016. – Vol. 6, № 1. – P. a023002.

42. Effect of an Intrauterine Device on the Gene Expression Profile of the Endometrium / J. A. Horcajadas, A. M. Sharkey, R. D. Catalano [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2006. – Vol. 91, № 8. – P. 3199–3207.

43. Effect of controlled ovarian hyperstimulation in IVF on endometrial gene expression profiles / J. A. Horcajadas, A. Riesewijk, J. Polman [et al.] // *MHR Basic Sci. Reprod. Med.* – 2004. – Vol. 11, № 3. – P. 195–205.

44. Effect of folic acid in preventing aberrant methylation of fetal endometriosis susceptibility gene HOXA10 / M. Liu, X. Huang, S. Xu, L. Li // *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* – 2013. – Vol. 33, № 6. – P. 926–929.

45. Effect of intramural myomectomy on endometrial HOXA10 and HOXA11 mRNA expression at the time of implantation window / Z. Alizadeh, S. Faramarzi, M. Saidijam [et al.] // *Iran. J. Reprod. Med.* – 2013. – Vol. 11, № 12. – P. 983–988.

46. Effect of mifepristone on the transcriptomic signature of endometrial

receptivity / C. von Grothusen, P. G. Lalitkumar, M. Ruiz-Alonso [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2018. – Vol. 33, № 10. – P. 1889–1897.

47. Effects of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on in vitro maturation and fertilization of porcine oocytes / M. Spinaci, S. Volpe, M. De Ambrogi [et al.] // *Theriogenology*. – 2008. – Vol. 69, № 7. – P. 877–885.

48. Effects of epigallocatechin-3-gallate on the developmental competence of parthenogenetic embryos in the pig / M. Yavari, H. Naoi, Y. Kaedei [et al.] // *Ital. J. Anim. Sci.* – 2010. – Vol. 9, № 4. – P. e73.

49. Ehrlich, M. Expression of various genes is controlled by DNA methylation during mammalian development / M. Ehrlich // *J. Cell. Biochem.* – 2003. – Vol. 88, № 5. – P. 899–910.

50. Endometrial Expression of Homeobox Genes and Cell Adhesion Molecules in Infertile Women With Intramural Fibroids During Window of Implantation / A. Makker, M. M. Goel, D. Nigam [et al.] // *Reprod. Sci.* – 2016.

51. Endometrial expression of Leukemia Inhibitory Factor (LIF), LIF-receptor and HOXA-11 but not HOXA-10 is significantly impaired in women with unexplained infertility during implantation window / C. Margioulas-Siarkou, S. Petousis, S. Miliadis [et al.] // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* – 2016. – Vol. 206. – P. e165–e166.

52. Endometrial gene expression analysis at the time of embryo implantation in women with unexplained infertility / S. Altmäe, J. A. Martínez-Conejero, A. Salumets [et al.] // *Mol. Hum. Reprod.* – 2010. – Vol. 16, № 3. – P. 178–187.

53. Endometrial receptivity revisited: endometrial transcriptome adjusted for tissue cellular heterogeneity / M. Suhorutshenko, V. Kukushkina, A. Velthut-Meikas [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2018. – Vol. 33, № 11. – P. 2074–2086.

54. Epigenetic disorder may cause downregulation of HOXA10 in the eutopic endometrium of fertile women with endometriosis / H. Lu, X. Yang, Y. Zhang [et al.] // *Reprod. Sci.* – 2013. – Vol. 20, № 1. – P. 78–84.

55. E-selectin, resistin and reactive oxygen species levels in GnRH -agonist and -antagonist protocols in IVF/ICSI: a prospective cohort study / C. Siristatidis, M.

Askoxylaki, C. Varounis [et al.] // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2015. – Vol. 32, № 6. – P. 959–967.

56. Expression of Endometrial Receptivity Genes Increase After Myomectomy of Intramural Leiomyomas not Distorting the Endometrial Cavity / C. Unlu, O. Celik, N. Celik, B. Otlu // *Reprod. Sci.* – 2016. – Vol. 23, № 1. – P. 31–41.

57. Expression of HOXA11 in the mid-luteal endometrium from women with endometriosis-associated infertility / M. Szczepańska, P. Wirstlein, J. Skrzypczak, P. P. Jagodziński // *Reprod. Biol. Endocrinol.* – 2012. – Vol. 10. – P. 1.

58. Expression Profiling of Endometrium from Women with Endometriosis Reveals Candidate Genes for Disease-Based Implantation Failure and Infertility / L. C. Kao, A. Germeyer, S. Tulac [et al.] // *Endocrinology.* – 2003. – Vol. 144, № 7. – P. 2870–2881.

59. Features of redox processes in the amniotic fluid at placental insufficiency / T. N. Pogorelova, A. A. Nikashina, V. O. Gunko [et al.] // *Biomed. Khim.* – 2018. – Vol. 64, № 3. – P. 290–297.

60. FKBP4 is regulated by HOXA10 during decidualization and in endometriosis / H. Yang, Y. Zhou, B. Edelshain [et al.] // *Reproduction.* – 2012. – Vol. 143, № 4. – P. 531–538.

61. Functional endometrial polyps in infertile asymptomatic patients: a possible evolution of vascular changes secondary to endometritis / F. M. Carvalho, F. N. Aguiar, R. Tomioka [et al.] // *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* – 2013. – Vol. 170, № 1. – P. 152–156.

62. Functional genomic analysis of the human receptive endometrium transcriptome upon administration of mifepristone at the time of follicle rupture / S. Lira-Albarrán, C. C. Vega, M. Durand [et al.] // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 2019. – Vol. 485. – P. 88–96.

63. Gardner, D. K. Culture and transfer of human blastocysts / D. K. Gardner, W. B. Schoolcraft // *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* – 1999. – Vol. 11, № 3. – P. 307–311.

64. Gellersen, B. Cyclic decidualization of the human endometrium in

reproductive health and failure / B. Gellersen, J. J. Brosens // *Endocr. Rev.* – 2014. – Vol. 35, № 6. – P. 851–905.

65. Gene profiling the window of implantation: Microarray analyses from human and rodent models / J. L. Herington, Y. Guo, J. Reese, B. C. Paria // *J. Reprod. Heal. Med.* – 2016.

66. Global Gene Profiling in Human Endometrium during the Window of Implantation / L. C. Kao, S. Tulac, S. Lobo [et al.] // *Endocrinology.* – 2002. – Vol. 143, № 6. – P. 2119–2138.

67. Highly informative marker sets consisting of genes with low individual degree of differential expression / V. V Galatenko, M. Y. Shkurnikov, T. R. Samatov [et al.] // *Sci. Rep.* – 2015. – Vol. 5. – P. 14967.

68. Holland, P. W. H. Evolution of homeobox genes / P. W. H. Holland // *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* – 2013. – Vol. 2, № 1. – P. 31–45.

69. Horcajadas, J. A. Wide genomic analysis of human endometrial receptivity: new times, new opportunities / J. A. Horcajadas, A. Pellicer, C. Simón // *Hum. Reprod. Update.* – 2007. – Vol. 13, № 1. – P. 77–86.

70. HoxA10 activates CDX4 transcription and Cdx4 activates HOXA10 transcription in myeloid cells / L. Bei, W. Huang, H. Wang [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 286, № 21. – P. 19047–19064.

71. HoxA10 activates transcription of the gene encoding mitogen-activated protein kinase phosphatase 2 (Mkp2) in myeloid cells / H. Wang, Y. Lu, W. Huang [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282, № 22. – P. 16164–16176.

72. HOXA-10 and E-cadherin expression in the endometrium of women with recurrent implantation failure and recurrent miscarriage / Y. Yang, X. Chen, S. H. Saravelos [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2017. – Vol. 107, № 1. – P. 136-143.e2.

73. HOXA-10 expression in the mid-secretory endometrium of infertile patients with either endometriosis, uterine fibromas or unexplained infertility / S. Matsuzaki, M. Canis, C. Darcha [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2009. – Vol. 24, № 12. – P. 3180–3187.

74. HoxA10 influences protein ubiquitination by activating transcription of

ARIH2, the gene encoding Triad1 / H. Wang, L. Bei, C. A. Shah [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 286, № 19. – P. 16832–16845.

75. HOXA10 promotes cell invasion and MMP-3 expression via TGF β 2-mediated activation of the p38 MAPK pathway in pancreatic cancer cells / X.-P. Cui, C.-K. Qin, Z.-H. Zhang [et al.] // *Dig. Dis. Sci.* – 2014. – Vol. 59, № 7. – P. 1442–1451.

76. HoxA10 protein regulates transcription of gene encoding fibroblast growth factor 2 (FGF2) in myeloid cells / C. A. Shah, L. Bei, H. Wang [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2012. – Vol. 287, № 22. – P. 18230–18248.

77. HoxA10 regulates transcription of the gene encoding transforming growth factor beta2 (TGFbeta2) in myeloid cells / C. A. Shah, H. Wang, L. Bei [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 286, № 4. – P. 3161–3176.

78. HoxA10 represses gene transcription in undifferentiated myeloid cells by interaction with histone deacetylase 2 / Y. Lu, I. Goldenberg, L. Bei [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278, № 48. – P. 47792–47802.

79. HOXA10 suppresses p/CAF promoter activity via three consecutive TTAT units in human endometrial stromal cells / H. Sun, L. Chen, G. Yan [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2009. – Vol. 379, № 1. – P. 16–21.

80. HOXA10, EMX2 and TENM1 expression in the mid-secretory endometrium of infertile women with a Müllerian duct anomaly / Y. Zhu, M. Luo, H. Huang [et al.] // *Reprod. Biomed. Online.* – 2016. – Vol. 32, № 4. – P. 388–393.

81. HoxA-11 and FOXO1A cooperate to regulate decidual prolactin expression: towards inferring the core transcriptional regulators of decidual genes / V. J. Lynch, K. Brayer, B. Gellersen, G. P. Wagner // *PLoS One.* – 2009. – Vol. 4, № 9. – P. e6845.

82. HOXA11 gene is hypermethylation and aberrant expression in gastric cancer / Y. Bai, N. Fang, T. Gu [et al.] // *Cancer Cell Int.* – 2014. – Vol. 14. – P. 79.

83. HOXA-11 mediated dysregulation of matrix remodeling during implantation window in women with endometriosis / S. K. Jana, P. Banerjee, R. Mukherjee [et al.] // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2013. – Vol. 30, № 11. – P. 1505–1512.

84. Huang, D. W. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the

comprehensive functional analysis of large gene lists / D. W. Huang, B. T. Sherman, R. A. Lempicki // *Nucleic Acids Res.* – 2009. – Vol. 37, № 1. – P. 1–13.

85. Huang, D. W. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources / D. W. Huang, B. T. Sherman, R. A. Lempicki // *Nat. Protoc.* – 2009. – Vol. 4, № 1. – P. 44–57.

86. Hypermethylation of HOXA10 gene in mid-luteal endometrium from women with ovarian endometriomas / M. Fambrini, F. Sorbi, C. Bussani [et al.] // *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* – 2013. – Vol. 92, № 11. – P. 1331–1334.

87. In search of candidate genes critically expressed in the human endometrium during the window of implantation / S. Mirkin, M. Arslan, D. Churikov [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2005. – Vol. 20, № 8. – P. 2104–2117.

88. In vitro fertilization with personalized blastocyst transfer versus frozen or fresh blastocyst transfer: a multicenter, randomized clinical trial / C. Simon, C. Gomez, S. Cabanillas [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2019. – Vol. 112, № 3. – P. e56–e57.

89. Ischemia-modified albumin as an oxidative stress biomarker in early pregnancy loss / H. Cengiz, H. Dagdeviren, A. Kanawati [et al.] // *J. Matern. Fetal. Neonatal Med.* – 2016. – Vol. 29, № 11. – P. 1754–1757.

90. Jaslow, C. R. Uterine factors / C. R. Jaslow // *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* – 2014. – Vol. 41, № 1. – P. 57–86.

91. Kallen, A. N. HOXA10 Regulates Expression of Cytokeratin 15 in Endometrial Epithelial Cytoskeletal Remodeling / A. N. Kallen, K. Haines, H. S. Taylor // *Reprod. Sci.* – 2014. – Vol. 21, № 7. – P. 892–897.

92. Kibanov, M. V. In search for an ideal marker of endometrial receptivity: from histology to comprehensive molecular genetics-based approaches / M. V. Kibanov, G. M. Makhmudova, Y. A. Gokhberg // *Alm. Clin. Med.* – 2019. – Vol. 47, № 1. – P. 12–25.

93. Kim, J. E. Epigallocatechin-3-gallate prevents heat shock-induced MMP-1 expression by inhibiting AP-1 activity in human dermal fibroblasts / J. E. Kim, M. H. Shin, J. H. Chung // *Arch. Dermatol. Res.* – 2013. – Vol. 305, № 7. – P. 595–602.

94. Kiselev, V. I. Gene activity regulation and new drugs / V. I. Kiselev, M. A. Pal'tsev // *Her. Russ. Acad. Sci.* – 2016. – Vol. 86, № 3. – P. 174–180.
95. Kliman, H. J. Clinical approach to recurrent implantation failure: evidence-based evaluation of the endometrium / H. J. Kliman, D. Frankfurter // *Fertil. Steril.* – 2019. – Vol. 111, № 4. – P. 618–628.
96. Knox, A. Fibroids and fertility: a review of the evidence / A. Knox, N. McClure // *Expert Rev. Obstet. Gynecol.* – 2012. – Vol. 7, № 1. – P. 31–39.
97. Kulp, J. L. Aberrant HOXA10 Methylation in Patients With Common Gynecologic Disorders: Implications for Reproductive Outcomes / J. L. Kulp, R. Mamillapalli, H. S. Taylor // *Reprod. Sci.* – 2016. – Vol. 23, № 4. – P. 455–463.
98. Kulp, J. L. HOX Genes and Endometriosis / J. L. Kulp, H. Cakmak, H. S. Taylor // *Endometriosis: Science and Practice* / ed. Giudice L.C., Evers J.L.H., Healy D.L. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2012. – P. 184–189.
99. Langmead, B. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 / B. Langmead, S. L. Salzberg // *Nat. Methods.* – 2012. – Vol. 9, № 4. – P. 357–359.
100. Laparoscopic endometrioma resection increases peri-implantation endometrial HOXA-10 and HOXA-11 mRNA expression / O. Celik, C. Unlu, B. Otlu [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2015. – Vol. 104, № 2. – P. 356–365.
101. Lee, B. Experimental murine endometriosis induces DNA methylation and altered gene expression in eutopic endometrium / B. Lee, H. Du, H. S. Taylor // *Biol. Reprod.* – 2009. – Vol. 80, № 1. – P. 79–85.
102. Leukemia inhibitory factor in human reproduction / A. Lass, W. Weiser, A. Munafo, E. Loumaye // *Fertil. Steril.* – 2001. – Vol. 76, № 6. – P. 1091–1096.
103. Lewis, E. B. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila* / E. B. Lewis // *Nature.* – 1978. – Vol. 276, № 5688. – P. 565–570.
104. Milán, M. Gene-Regulatory Logic to Induce and Maintain a Developmental Compartment / M. Milán // *PLoS Genet.* – 2015. – Vol. 11, № 10. – P. e1005543.
105. MiR-125b regulates endometrial receptivity by targeting MMP26 in women undergoing IVF-ET with elevated progesterone on HCG priming day / C. Chen, Y. Zhao,

Y. Yu [et al.] // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 25302.

106. Molecular determinants of uterine receptivity / Z. Tu, H. Ran, S. Zhang [et al.] // *Int. J. Dev. Biol.* – 2014. – Vol. 58, № 2–4. – P. 147–154.

107. Natural therapies assessment for the treatment of endometriosis / A. G. Ricci, C. N. Olivares, M. A. Bilotas [et al.] // *Hum. Reprod.* – 2013. – Vol. 28, № 1. – P. 178–188.

108. Neonatal diethylstilbestrol exposure alters the metabolic profile of uterine epithelial cells / Y. Yin, C. Lin, G. M. Veith [et al.] // *Dis. Model. Mech.* – 2012. – Vol. 5, № 6. – P. 870–880.

109. New insights into mechanisms behind miscarriage / E. C. Larsen, O. B. Christiansen, A. M. Kolte, N. Macklon // *BMC Med.* – 2013. – Vol. 11, № 1. – P. 154.

110. Novel biomarkers in cancer: The whole is greater than the sum of its parts / T. R. Samatov, V. V Galatenko, A. Block [et al.] // *Semin. Cancer Biol.* – 2017. – Vol. 45. – P. 50–57.

111. Pathological Roles of Oxidative Stress (OS) in Diseases Related to Female Reproductive System / S. Gupta, G. Ahmad, M. Tran [et al.] // *Oxidative Stress in Human Reproduction*. Cham: Springer International Publishing, 2017. – P. 107–127.

112. Paulson, R. J. Introduction: Endometrial receptivity: evaluation, induction and inhibition / R. J. Paulson // *Fertil. Steril.* – 2019. – Vol. 111, № 4. – P. 609–610.

113. PCAF impairs endometrial receptivity and embryo implantation by down-regulating $\beta 3$ -integrin expression via HOXA10 acetylation / L. Zhu, L. Sun, Y. Hu [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2013. – Vol. 98, № 11. – P. 4417–4428.

114. Pina Carvalho, L. F. Endometriosis and infertility: biomarkers affecting implantation rate / L. F. Pina Carvalho, C. Y. Hui, A. Agarwal // *Expert Rev. Obstet. Gynecol.* – 2013. – Vol. 8, № 5. – P. 467–473.

115. Ping, L. Effect of HOXA10 Gene Expression on Embryonic Implantation in Patients with Endometriosis / L. Ping, C. Xia // *J. Int. Reprod. Heal. Plan.* – 2013. – Vol. 32, № 6. – P. 506–508.

116. Purohit, P. Fibroids and Infertility / P. Purohit, K. Vigneswaran // *Curr.*

Obstet. Gynecol. Rep. – 2016. – Vol. 5. – P. 81–88.

117. Quinonez, S. C. Human HOX gene disorders / S. C. Quinonez, J. W. Innis // Mol. Genet. Metab. – 2014. – Vol. 111, № 1. – P. 4–15.

118. Rackow, B. W. Endometrial polyps affect uterine receptivity / B. W. Rackow, E. Jorgensen, H. S. Taylor // Fertil. Steril. – 2011. – Vol. 95, № 8. – P. 2690–2692.

119. Reactive oxygen species in the follicular fluid of subfertile women undergoing In Vitro Fertilization: a short narrative review / M. Askoxylaki, C. Siristatidis, C. Chrelias [et al.] // J. Endocrinol. Invest. – 2013. – Vol. 36, № 11. – P. 1117–1120.

120. Recent insights on the genetics and epigenetics of endometriosis / B. Borghese, K. T. Zondervan, M. S. Abrao [et al.] // Clin. Genet. – 2017. – Vol. 91, № 2. – P. 254–264.

121. Recombineering-based dissection of flanking and paralogous Hox gene functions in mouse reproductive tracts / A. M. Raines, M. Adam, B. Magella [et al.] // Development. – 2013. – Vol. 140, № 14. – P. 2942–2952.

122. Reduced expression of HOXA10 in the midluteal endometrium from infertile women with minimal endometriosis / M. Szczepańska, P. Wirstlein, M. Luczak [et al.] // Biomed. Pharmacother. – 2010. – Vol. 64, № 10. – P. 697–705.

123. Reduced homeobox protein ghj1 in human endometrial tissue is linked to infertility / A. D. Bolnick, J. M. Bolnick, B. A. Kilburn [et al.] // Hum. Reprod. – 2016. – Vol. 31, № 9. – P. 2042–2050.

124. Regulation of endometrial receptivity by the highly expressed HOXA9, HOXA11 and HOXD10 HOX-class homeobox genes / B. Xu, D. Geerts, Z. Bu [et al.] // Hum. Reprod. – 2014. – Vol. 29, № 4. – P. 781–790.

125. Regulation of inflammatory and angiogenesis mediators in a functional model of decidualized endometrial stromal cells / A. Bourdieu, S.-F. Ahmad, A. Lachhab, A. Akoum // Reprod. Biomed. Online. – 2016. – Vol. 32, № 1. – P. 85–95.

126. Reik, W. Epigenetic reprogramming in mammalian development / W. Reik, W. Dean, J. Walter // Science. – 2001. – Vol. 293, № 5532. – P. 1089–1093.

127. Retinoids and Hox genes / H. Marshall, A. Morrison, M. Studer [et al.] // *FASEB J.* – 1996. – Vol. 10, № 9. – P. 969–978.
128. Riesewijk, A. Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+2 versus LH+7 by microarray technology / A. Riesewijk // *Mol. Hum. Reprod.* – 2003. – Vol. 9, № 5. – P. 253–264.
129. Role of HOX genes associated with infertility in female reproductive system diseases / E. A. Knyazeva, E. A. Kalinina, A. A. Bystritsky [et al.] // *Akush. Ginekol. (Moscow)*. – 2017. – № 11. – P. 16–22.
130. Salpingectomy and proximal tubal occlusion for hydrosalpinx prior to in vitro fertilization: a meta-analysis of randomized controlled trials / Y. Zhang, Y. Sun, Y. Guo [et al.] // *Obstet. Gynecol. Surv.* – 2015. – Vol. 70, № 1. – P. 33–38.
131. Salpingectomy increases peri-implantation endometrial HOXA10 expression in women with hydrosalpinx / G. S. Daftary, U. Kayisli, E. Seli [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2007. – Vol. 87, № 2. – P. 367–372.
132. Sarno, J. L. HOXA10, Pbx2, and Meis1 protein expression in the human endometrium: formation of multimeric complexes on HOXA10 target genes / J. L. Sarno, H. J. Kliman, H. S. Taylor // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2005. – Vol. 90, № 1. – P. 522–528.
133. Sex steroids mediate HOXA11 expression in the human peri-implantation endometrium / H. S. Taylor, P. Igarashi, D. L. Olive, A. Arici // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 1999. – Vol. 84, № 3. – P. 1129–1135.
134. Shang, M. Correlation of adipokines and markers of oxidative stress in women with gestational diabetes mellitus and their newborns / M. Shang, X. Dong, L. Hou // *J. Obstet. Gynaecol. Res.* – 2018. – Vol. 44, № 4. – P. 637–646.
135. Surgery for Benign Gynecological Disorders Improve Endometrium Receptivity: A Systematic Review of the Literature / O. Celik, M. Acet, T. Kucuk [et al.] // *Reprod. Sci.* – 2016.
136. Taylor, H. S. The role of HOX genes in human implantation / H. S. Taylor // *Hum. Reprod. Update.* – 2000. – Vol. 6, № 1. – P. 75–79.

137. The accuracy and reproducibility of the endometrial receptivity array is superior to histology as a diagnostic method for endometrial receptivity / P. Díaz-Gimeno, M. Ruiz-Alonso, D. Blesa [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2013. – Vol. 99, № 2. – P. 508–517.

138. The cellular immunity and oxidative stress markers in early pregnancy loss / K. Daglar, E. Biberoglu, A. Kirbas [et al.] // *J. Matern. Fetal. Neonatal Med.* – 2016. – Vol. 29, № 11. – P. 1840–1843.

139. The endometrial receptivity array for diagnosis and personalized embryo transfer as a treatment for patients with repeated implantation failure / M. Ruiz-Alonso, D. Blesa, P. Díaz-Gimeno [et al.] // *Fertil. Steril.* – 2013. – Vol. 100, № 3. – P. 818–824.

140. The influence of menstrual cycle and endometriosis on endometrial methylome / M. Saare, V. Modhukur, M. Suhorutshenko [et al.] // *Clin. Epigenetics.* – 2016. – Vol. 8. – P. 2.

141. The role of the endometrial receptivity array (ERA) in patients who have failed euploid embryo transfers / J. Tan, A. Kan, J. Hitkari [et al.] // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2018. – Vol. 35, № 4. – P. 683–692.

142. The three-dimensional architecture of Hox cluster silencing / M. A. Ferraiuolo, M. Rousseau, C. Miyamoto [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2010. – Vol. 38, № 21. – P. 7472–7484.

143. Transcription profile analysis of the endometrium revealed molecular markers of the personalized ‘window of implantation’ during in vitro fertilization / O. V. Burmenskaya, V. K. Bozhenko, V. Y. Smolnikova [et al.] // *Gynecol. Endocrinol.* – 2017. – Vol. 33, № sup1. – P. 22–27.

144. Transcription profile analysis of the endometrium revealed molecular markers of the personalized “window of implantation” during in vitro fertilization / O. V. Burmenskaya, V. K. Bozhenko, V. Y. Smolnikova [et al.] // *Gynecol. Endocrinol.* – 2017. – Vol. 33, № sup1. – P. 22–27.

145. Underexpression of HOXA11 Is Associated with Treatment Resistance and Poor Prognosis in Glioblastoma / Y.-B. Se, S. H. Kim, J. Y. Kim [et al.] // *Cancer Res. Treat.* – 2017. – Vol. 49, № 2. – P. 387–398.

146. Upper control limit of reactive oxygen species in follicular fluid beyond which viable embryo formation is not favorable / S. K. Jana, N. B. Karuputhula, R. Chattopadhyay [et al.] // *Reprod. Toxicol.* – 2010. – Vol. 29, № 4. – P. 447–451.
147. Uterine leiomyoma: available medical treatments and new possible therapeutic options / M. S. Islam, O. Protic, S. R. Giannubilo [et al.] // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* – 2013. – Vol. 98, № 3. – P. 921–934.
148. Vitiello, D. Gene expression profiling reveals putative HOXA10 downstream targets in the periimplantation mouse uterus / D. Vitiello, R. Pinard, H. S. Taylor // *Reprod. Sci.* – 2008. – Vol. 15, № 5. – P. 529–535.
149. Wang, Z. Improvement in bovine embryo production in vitro by treatment with green tea polyphenols during in vitro maturation of oocytes / Z. Wang, S. Yu, Z. Xu // *Anim. Reprod. Sci.* – 2007. – Vol. 100, № 1–2. – P. 22–31.
150. Wetendorf, M. Progesterone receptor signaling in the initiation of pregnancy and preservation of a healthy uterus / M. Wetendorf, F. J. DeMayo // *Int. J. Dev. Biol.* – 2014. – Vol. 58, № 2–4. – P. 95–106.
151. World Health Organization reference values for human semen characteristics / T. G. Cooper, E. Noonan, S. von Eckardstein [et al.] // *Hum. Reprod. Update.* – 2010. – Vol. 16, № 3. – P. 231–245.
152. Zhang, J. Epigenetics: an emerging research field of infertility associated with endometriosis / J. Zhang, F. Huang // *Int J Clin Exp Med.* – 2016. – Vol. 9, № 10. – P. 18883–18889.
153. Zhu, K. Collinear Hox-Hox interactions are involved in patterning the vertebrate anteroposterior (A-P) axis / K. Zhu, H. P. Spaink, A. J. Durston // *PLoS One.* – 2017. – Vol. 12, № 4. – P. e0175287.