

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2021

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

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Калинина Елена Анатольевна

кандидат медицинских наук

Донников Андрей Евгеньевич

Официальные оппоненты:

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

Тапильская Наталья Игоревна – доктор медицинских наук, профессор, отделение вспомогательных репродуктивных технологий Научно-исследовательского института акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д. О. Отта, ведущий научный сотрудник.

Ведущая организация: ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии».

Защита диссертации состоится «___» _____ 2021 года в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 208.125.01 на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова» по адресу 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В. И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.) и на сайте:

https://science.ncagp.ru/upfiles/pdf/Knyzeva%20E.A.-dissertation_1.pdf

Автореферат разослан «___» _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Калинина Елена Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

В основе многих случаев бесплодия лежит нарушение рецепторных взаимодействий между бластоцистой и эндометрием (Рудакова Е. Б. и др., 2020). В научной литературе часто используется понятие «рецептивность эндометрия» (РЭ), обозначающее процесс интеграции и взаимодействия между эндометрием и эмбрионом. Нарушения данного процесса могут произойти на любом из его этапов, приводя к нарушению имплантации эмбриона (Тапильская Н. И. и др., 2019). Эмбрион имеет возможность имплантироваться в подготовленный эндометрий, причём это возможно только в определенный 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) (Paulson R. J., 2019). В эндометрии экспрессия молекулярных и иммуногистохимических маркёров «окна имплантации» сочетается с ключевыми морфологическими изменениями ткани.

Одним из подходов к поиску маркеров РЭ и предсказания исходов программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) является полногеномный транскриптомный анализ с выявлением сочетаний генов, которые обладают совокупной предсказательной ценностью. Одним из наиболее известных наборов генов для анализа РЭ является тест ERA (от англ. Endometrial receptivity analysis). Он основан на определении экспрессии 238 генов эндометрия, участвующих в процессах имплантации, каждый из которых значимо отличается по экспрессии в пререцептивном, рецептивном и пострецептивном эндометрии (Diaz-Gimeno P. et al., 2011). Однако данный тест был валидирован только на небольшой выборке в циклах циклической гормональной терапии и в естественных циклах и не был оценен в циклах овариальной стимуляции у пациенток с многократными неудачными попытками переноса эмбрионов в анамнезе (Diaz-Gimeno P. et al., 2013, Ruiz-Alonso M. Et al., 2013). Более того, выбор индивидуального дня переноса

эмбриона в соответствии с результатами теста ERA не приводил к значимым изменениям частоты наступления беременности (Bassil R. et al., 2018).

В связи с этим становится актуальным поиск диагностических и прогностических панелей генов с высокой совокупной предсказательной ценностью. Выявление таких панелей генов может позволить повысить эффективность программ ВРТ за счет персонализированного протокола лечения.

Известно, что многие гены, традиционно считавшиеся регуляторами эмбрионального развития, участвуют также в контроле циклической трансформации эндометрия в течение менструального цикла. Большое внимание в настоящее время уделяется роли семейства *HOX*-генов. В последние годы была показана важная роль продуктов экспрессии *HOXA10* и *HOXA11* генов в реализации репродуктивного потенциала у женщин. Наивысшая экспрессия генов *HOXA10* и *HOXA11* приходится именно на период «окна имплантации», что позволяет предположить важную роль продуктов экспрессии данных генов в определении РЭ (Du H., Taylor H. S., 2016).

По данным литературы бесплодие, ассоциированное с такими причинами, как эндометриоз, хронический эндометрит, миома матки может ассоциироваться с пониженной экспрессией генов *HOXA10* и *HOXA11* (Сухих Г. Т. и др., 2015; Kulr J. L. et al., 2016; Purohit P. et al., 2016). Было обнаружено несколько механизмов регуляции экспрессии *HOX*-генов, однако основной причиной снижения экспрессии *HOX*-генов считается повышенное метилирование промоторов этих генов по сравнению со здоровыми женщинами репродуктивного возраста. Снижение экспрессии этих генов приводит к нарушению регуляции других связанных генов-мишеней.

Одним из потенциальных способов модификации уровня метилирования промоторов генов в эндометрии и изменения транскриптома эндометрия может являться применение полифенолов зеленого чая, включая эпигаллокатехин-3-галлат (ЭГ), для которого было показано выраженное антиоксидантное и противовоспалительное действие, а также положительное влияние на качество эмбрионов и частоту наступления беременности (Daglar K. et al., 2016; Kiselev V. I.,

Pal'tsev M. A., 2016). Дальнейшее изучение данного вещества у женщин с трубно-перитонеальным фактором (ТПФ) бесплодия может помочь выявить его влияние на эпигенетическое состояние генов эндометрия.

Всё это делает актуальным и своевременным дальнейший поиск маркеров рецептивности эндометрия и эффективности программ ВРТ, особенно в группе пациенток с неоднократными неудачными попытками экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) в анамнезе, чему посвящено данное диссертационное исследование.

Степень разработанности темы исследования

Успешность программ ВРТ определяется как характеристиками эмбриона, так и свойствами эндометрия. Значительная часть неудач лечения методами ВРТ обусловлена нарушениями имплантации. Известно, что эмбрион имеет возможность имплантироваться только в подготовленный к этому эндометрий. При наличии эмбриона хорошего качества рецепторный статус эндометрия является ключевым фактором, определяющим наступление беременности. РЭ определяется целым рядом факторов, включая молекулярно-генетические особенности эндометрия. Отсутствие точных тест-систем, оценивающих РЭ, не позволяет определить вероятность наступления беременности в программах ВРТ, а также, при необходимости, провести необходимую прегравидарную подготовку. Поиск маркеров РЭ, способных помочь в прогнозировании исходов программ ВРТ, является актуальной задачей для разработки алгоритмов улучшения результативности проводимых программ.

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 ретроспективное и проспективное обследование супружеских пар, обратившихся для лечения методами ВРТ. Пациенты были обследованы в соответствие с приказом Минздрава России №107н от 30.08.2012 г. «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению». Аспирационная пайпель-биопсия эндометрия проводилась всем пациенткам в цикле, предшествующем стимуляции суперовуляции, в период «окна имплантации» (на 5–7 день после произошедшей овуляции) с проведением гистологического исследования эндометрия, транскриптомного анализа и анализа метилирования промоторных участков генов.

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 клинико-анамнестических данных, обследование и сопровождение пар на всех этапах лечения бесплодия методом ВРТ; принимал непосредственное участие в клинико-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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Обследованы 78 пациенток с ТПФ бесплодия и неоднократными неудачными попытками ЭКО в анамнезе. Критериями включения в исследование были: возраст пациентки 18–40 лет, индекс массы тела пациентки 18,5–29,9 кг/м², нормальный кариотип супругов, ТПФ без выраженной патоспермии у партнера, две и более неудачных попытки ЭКО в анамнезе, селективный перенос одной нативной бластоцисты лучшего качества на 5-е сутки после трансвагинальной пункции фолликулов (ТВП), единый протокол поддержки посттрансферного периода, информированное добровольное согласие на включение в исследование.

Специальные методы исследования включали пайпель-биопсию эндометрия в «окно имплантации» в цикле, предшествующем стимуляции суперовуляции, с проведением гистологического исследования эндометрия; полногеномного транскриптомного анализа образцов эндометрия; анализа метилирования промоторов генов *HOXA10* и *HOXA11*. Дополнительное УЗИ проводилось в цикле, предшествующему циклу овариальной стимуляции: в I фазу менструального цикла (на 5–8-й день) и в период «окна имплантации» (через 5–7 дней после овуляции).

После проведения пайпель-биопсии эндометрия пациенткам проводилось лечение бесплодия методом ВРТ. В зависимости от исходов программ ВРТ все пациентки были разделены на группы: пациентки, у которых в результате программы ВРТ наступила беременность, и пациентки, не забеременевшие в результате программы ВРТ.

Отдельную группу составили 12 пациенток, у которых в период 6 месяцев до вступления в исследование была выявлена и пролечена гиперплазия эндометрия (ГПЭ). После проведения пайпель-биопсии эндометрия им был назначен эпигаллокатехин-3-галлат в дозе 50 мг × 3р/сут в течение 1 месяца согласно инструкции, после чего в «окно имплантации» повторно была проведена пайпель-биопсия эндометрия. Далее начинали лечение методом ВРТ.

Все включенные в исследование пациентки были обследованы согласно приказу Минздрава России №107н от 30.08.2012 г. «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению».

Овариальная стимуляция проводилась со 2–3 дня менструального цикла по стандартному протоколу с ант-ГнРГ препаратами рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона (рФСГ). В качестве триггера овуляции использовался человеческий хорионический гонадотропин в дозе 8000–10000 МЕ. Все зрелые ооциты были оплодотворены методом интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в ооцит (ИКСИ). Оценку морфологии эмбрионов проводили на 5-е сутки культивирования по классификации Гарднера. Перенос 1 эмбриона на стадии бластоцисты в полость матки производился на 5-е сутки после

ТВП. Ведение посттрансферного периода и диагностика беременности проводилась по стандартным методикам.

В работе применены следующие молекулярно-генетические исследования:

1. Выделение ДНК и РНК из образцов эндометрия.
2. Бисульфитная конверсия и секвенирование следующего поколения (NGS, next generation sequencing) для определения уровня метилирования промоторов генов *HOXA10* и *HOXA11*.
3. Полногеномный транскриптомный анализ с микрочипами GeneChip Human Gene 2.0 ST Array (Thermo Fisher Scientific) по протоколу производителя.
4. Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) для оценки уровня экспрессии генов (ДНК-технология, Россия).

Статистическая обработка данных выполнялась с помощью программы «Microsoft Excel» и пакета статистических программ Statistica 12 (StatSoft, США) и SPSS Statistics 23 (IBM, США). Для всех видов анализа статистически значимыми считали значения $p < 0,05$.

Для расчета вероятности наступления беременности производилось построение модели с учетом клинико-anamнестических данных на основе метода логистической регрессии с использованием метода χ^2 . Для построения классификаторов на основе экспрессии двух или трех генов по данным полногеномного транскриптомного исследования и ОТ-ПЦР-РВ использовали метод опорных векторов и проводили ROC-анализ с расчетом площади под ROC-кривой (AUC) с 95% доверительным интервалом (ДИ).

Для оценки среднего относительного изменения метилирования по всему промотору генов *HOXA10* и *HOXA11* для каждого CpG-островка вычислялась разность уровня метилирования после и до приема ЭГ, после чего рассчитывалось среднее арифметическое данных разностей с 95% ДИ.

Результаты исследования и их обсуждение

На первом этапе исследования были проанализированы клинико-лабораторные данные, особенности овариальной стимуляции и эмбриологические характеристики всех пациенток. Не было выявлено статистически значимых различий между группами забеременевших и незабеременевших в результате программы ВРТ пациенток, что свидетельствует об однородности и сопоставимости анализируемых параметров.

Для прогнозирования наступления беременности в программе ВРТ с учетом клинико-anamnestических показателей использовался метод множественного логистического регрессионного анализа. Итоговая модель была статистически значима ($p=0,009$) при включении 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 (1):

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

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

Данная модель, построенная с учетом только клинико-anamnestических показателей, позволяет объяснить лишь 42,6% наблюдаемой дисперсии. Учитывая достаточно низкую предсказательную способность данной модели, на втором этапе исследования был проведен полногеномный транскриптомный анализ образцов эндометрия 15 случайным образом отобранных пациенток из числа всех вступивших в исследование. Проведена оценка зависимости наступления беременности в программе ВРТ от уровня экспрессии генов эндометрия. Было показано, что в эндометрии пациенток с отрицательным исходом программы ВРТ статистически значимо ниже экспрессия 524 генов и значимо выше — 480 ($p < 0,05$, кратность различий > 2). Наибольшие отличия наблюдались в экспрессии генов, кодирующих регуляторные гликопротеины эндометрия, клеточные транспортеры,

матриксные металлопротеиназы, компоненты комплемента и антиоксидантной системы организма. Однако для разработки более простого и точного способа предсказания исхода программы ВРТ необходимо свести количество анализируемых генов к минимально возможному, позволяющему при этом получить приемлемую диагностическую точность.

В результате функционального анализа генов были отобраны 16 генов, образующих сеть взаимосвязей и играющих роль в определении РЭ (Рисунок 1). Из данных генов — *MSX1* (*HOX7*), *HOXA10*, *HOXA11*, *PAEP*, *DPP4*, *HABP2*, *HLA-DOB*, *FOS*, *FOSB*, *DUSP1*, *TMEM45B*, *TP53I3*, *VCAN*, *SCGB1D2*, *CD68*, *CD69* — с помощью метода опорных векторов были построены классификаторы на основе сочетаний экспрессии двух и трех генов, способные линейно разделять пациенток по исходу программы ВРТ (наступление и ненаступление беременности). Для одного наилучшего сочетания, включающего гены *MSX1* (*HOX7*), *HOXA11* и *TP53I3*, чувствительность и специфичность оказались выше 70%.

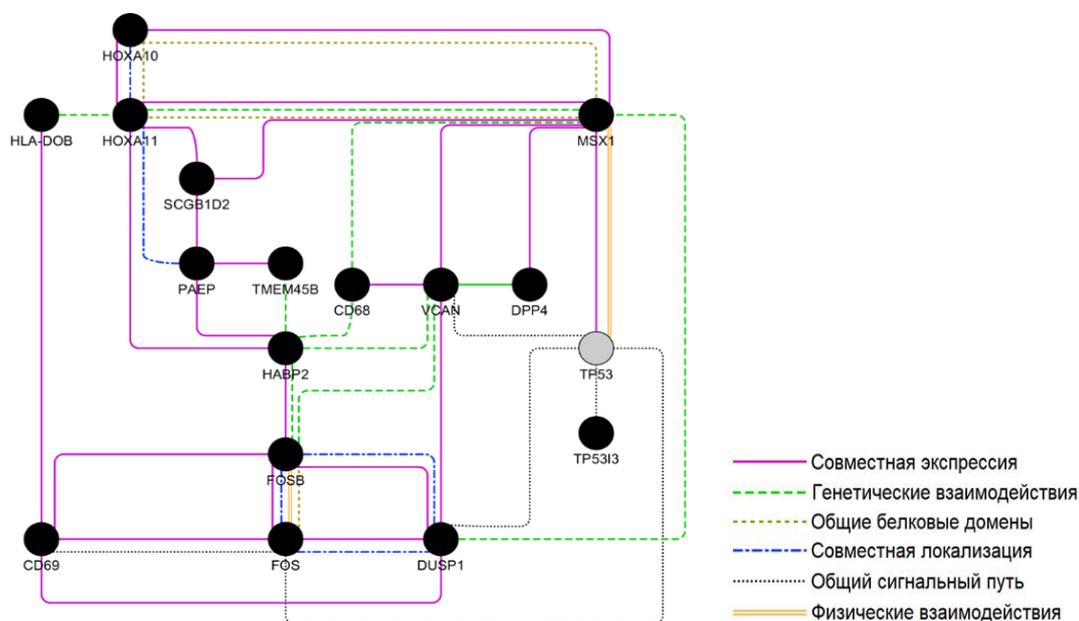


Рисунок 1. Сеть взаимодействий генов, на основе которых производилось построение классификаторов из двух и трех генов

Для тройки генов *MSX1*, *HOXA11*, *TP53I3* чувствительность классификатора, в основе которого лежит формула (2), составила 73%, специфичность — 71%, а площадь под ROC-кривой (AUC) — 0,74 (95% доверительный интервал (ДИ) 0,58–

0,90). Прогностическая ценность отрицательного результата составила 85%, а положительного — 55%.

$$A=0,741 \times \text{Expr}_{MSX1} + 1,544 \times \text{Expr}_{HOXA11} - 24,769 \times \text{Expr}_{TP53I3} + 0,287, \quad (2)$$

где Expr_{MSX1} , Expr_{HOXA11} и Expr_{TP53I3} — это экспрессия генов *MSX1*, *HOXA11* и *TP53I3* соответственно, нормированная на экспрессию референсных генов *B2M*, *GUSB* и *TBP*, при этом у забеременевших после ЭКО женщин значение формулы, согласно классификатору, должно быть выше 0

Таким образом, в результате исследования транскрипционных профилей у пациенток с ТПФ бесплодия и неоднократными неудачными попытками ЭКО была выявлена тройка генов *MSX1* (*HOX7*), *HOXA11* и *TP53I3*, которая позволила прогнозировать исходы программ ВРТ в данной группе пациенток. По данным литературы (Burmenskaya O. V. et al., 2017; Bolnick A. D. et al., 2016) данные гены связаны с РЭ и могут участвовать в определении «окна имплантации», что и определяет их значимость при классификации исходов программ ВРТ.

Ранее в ряде исследований была показана связь метилирования промоторов гена *HOXA11* и родственного ему гена *HOXA10* с различными факторами бесплодия и рецептивностью эндометрия (Knyazeva E. A. et al., 2017; Мальцева Л. И. и др., 2019), однако при ТПФ бесплодия роль метилирования промоторов этих генов в составе многофакторных моделей не анализировалась. В связи с этим на третьем этапе работы была проведена оценка статуса метилирования промоторов генов *HOXA10* и *HOXA11* с использованием метода NGS.

Полученные результаты позволяют предположить, что у пациенток с ТПФ и повторными неудачными попытками ЭКО в анамнезе метилирование отдельных CpG-островков в промоторах генов *HOXA10* (Рисунок 2А) и *HOXA11* (Рисунок 2В) является довольно консервативным параметром и, по-видимому, не вносит вклада в определение исходов программ ВРТ в исследуемой группе пациенток.

Было показано, что эпигаллокатехин-3-галлат обладает эпигенетической активностью и может снижать степень метилирования ДНК, в том числе в ткани эндометрия (Kiselev V. I., Pal'tsev M. A., 2016). Среди ряда показаний к приему ЭГ в инструкции к препарату указывается гиперплазия эндометрия. Кроме того, было

отмечено противовоспалительное действие данного вещества и роль в улучшении исходов программ ВРТ у пациенток с хроническим эндометритом, за счет влияния на метилирование промоторов генов *HOXA10* и *HOXA11* (Мальцева Л. И. и др., 2019). В связи с этим на следующем этапе работы у пациенток с ТПФ бесплодия, неоднократно неудачными попытками ЭКО и ГПЭ в анамнезе с помощью NGS было изучено изменение статуса метилирования промоторов генов *HOXA10* (Рисунок 3А) и *HOXA11* (Рисунок 3В), получающих ЭГ в соответствии с инструкцией к применению.

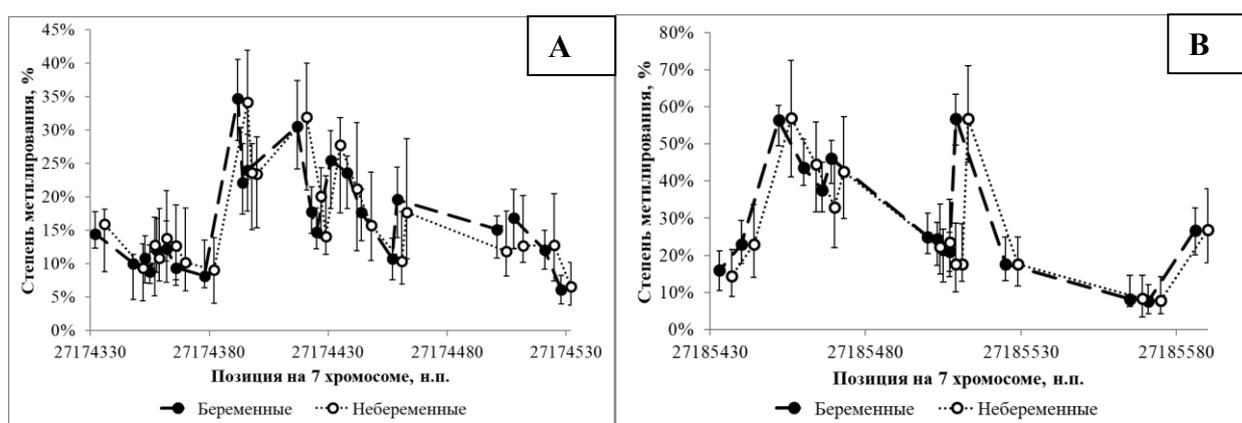


Рисунок 2. Графики сравнения профилей метилирования CpG-островков в промоторе гена *HOXA10* (А) и гена *HOXA11* (В) в группах забеременевших и незабеременевших пациенток (для наглядности профили метилирования у разных групп сдвинуты по горизонтали) (метод NGS)

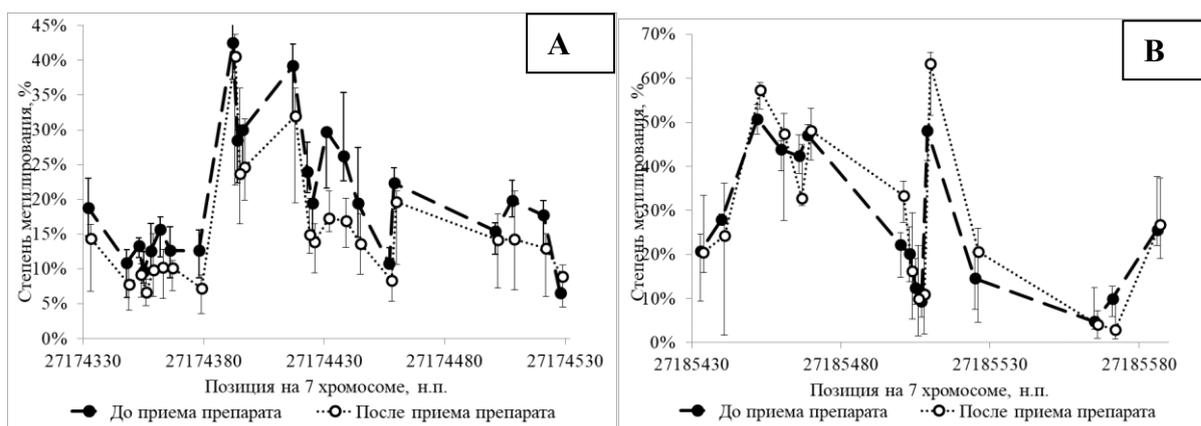


Рисунок 3. Сравнение профилей метилирования CpG-островков в промоторе гена *HOXA10* (А) и гена *HOXA11* (В) до и после приема ЭГ

Была проведена оценка изменения общего уровня метилирования промоторов по всем CpG-островкам в совокупности и по каждому CpG-островку в отдельности. Среднее относительное изменение метилирования по всему промотору *HOXA10*

составило $-22,9\%$ (95% ДИ $-55,0\%$; $+9,2\%$), а по промотору *HOXA11* — $+0,3\%$ (95% ДИ $-58,2\%$; $+58,8\%$), что означает отсутствие статистически значимого изменения общего уровня метилирования промоторов генов *HOXA10* и *HOXA11* в ответ на прием ЭГ у этой группы пациенток. При анализе метилирования отдельных CpG-островков в промоторе гена *HOXA11* значимых различий в степени метилирования до и после приема ЭГ не наблюдается. В то же время для гена *HOXA10* наблюдается статистически значимое снижение степени метилирования CpG-островков в позиции 27174355 с $9,6\%$ (95% ДИ $7,9-12,4\%$) до $6,6\%$ (95% ДИ $4,6-8,4\%$) и позиции 27174366 с $12,6\%$ (95% ДИ $8,7-16,0\%$) до $10,0\%$ (95% ДИ $6,8-11,2\%$), а также тенденция к снижению метилирования в положении 27174378 с $12,6\%$ (95% ДИ $8,7-15,5\%$) до $7,2\%$ (95% ДИ $3,5-9,1\%$), $p=0,075$.

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 1).

Таблица 1 — Гены с наибольшими различиями экспрессии до и после приема ЭГ

Ген	Средний сигнал (\log_2) до и после приема препарата		Насколько выше экспрессия после приема препарата	p	Ген	Средний сигнал (\log_2) до и после приема препарата		Насколько выше экспрессия после приема препарата	p
	до	после				до	после		
<i>PAEP</i>	4,4	11,1	+104,0	<0,001	<i>CYP26A1</i>	8,8	5,6	-9,0	0,012
<i>SLC15A1</i>	5,0	10,6	+50,5	0,006	<i>PLA2G4F</i>	7,8	4,6	-9,2	0,016
<i>C4BPA</i>	4,2	9,7	+43,4	0,003	<i>GGTA1P</i>	7,0	3,7	-9,4	<0,001
<i>CXCL14</i>	7,2	11,2	+15,8	0,008	<i>ROSI</i>	7,2	3,9	-10,3	<0,001
<i>CATSPERB</i>	4,9	8,8	+15,7	0,026	<i>HLA-DOB</i>	8,2	4,7	-11,0	0,015
<i>CLDN1</i>	4,7	8,4	+13,3	0,036	<i>SERPINB9</i>	10,1	6,5	-11,7	<0,001
<i>NABP1</i>	4,1	7,9	+13,2	0,022	<i>FAR2P3</i>	7,4	3,4	-16,6	0,032
<i>FOS</i>	5,6	9,3	+12,7	0,013	<i>SULT1E1</i>	8,6	4,5	-16,6	0,008
<i>DPP4</i>	4,9	8,4	+11,9	0,009	<i>CAPN6</i>	11,5	7,4	-17,6	<0,001
<i>DLGAP1-AS3</i>	2,9	6,5	+11,8	0,036	<i>TM4SF4</i>	8,5	4,2	-19,1	0,014
<i>SLCIA1</i>	6,4	9,9	+11,4	0,013	<i>TRPM6</i>	9,7	5,3	-21,4	<0,001
<i>EDNRB</i>	5,2	8,7	+10,8	0,009	<i>XDH</i>	10,3	5,1	-36,2	0,001
<i>ADGRF1</i>	3,6	6,9	+9,9	0,002	<i>LOC105377265</i>	8,6	3,5	-36,7	0,004
<i>C3</i>	6,7	9,9	+9,7	<0,001	<i>LOC101927987</i>	9,0	3,7	-39,1	<0,001
<i>MUC16</i>	5,6	8,9	+9,7	<0,001	<i>MMP26</i>	11,5	5,7	-56,9	0,006

Следует отметить, что после приема препарата наибольшему повышению в уровне экспрессии подвергаются те же гены, экспрессия которых выше у женщин, забеременевших в результате проведения программы ВРТ, по сравнению с незабеременевшими женщинами, а именно такие гены, как *PAEP*, *SLC15A1*, *CATSPERB*, *C4BPA*, *DPP4*, *DLGAP1-AS3*, *CXCL14*, *HABP2*, *FOS*, *NABP1*, *SLC1A1*.

Аналогичным образом после приема препарата наибольшее снижение экспрессии отмечено для генов, уровень которых выше у женщин, не забеременевших в результате проведения программы ВРТ, по сравнению с забеременевшими: *MMP26*, *XDH*, *LOC105377265*, *LOC101927987 (CTNNA2-AS1)*, *CAPN6*, *TRPM6*, *CYP26A1*, *SULT1E1*, *TM4SF4*, *SERPINB9*, *ROS1*, *HLA-DOB*. 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 в результате проведения программы ВРТ пациенток и после приема ЭГ (Рисунок 4А), а также списков генов, экспрессия которых значимо понижена у забеременевших после ВРТ и после приема препарата (Рисунок 4В).

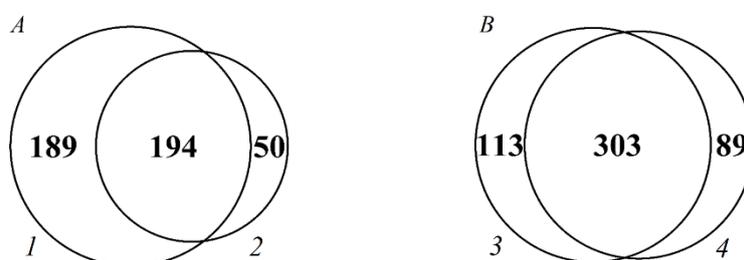


Рисунок 4. Диаграмма Венна. *A* — количество генов, экспрессия которых повышена в группе забеременевших после ЭКО (1) и в группе после приема ЭГ (2). *B* — количество генов, экспрессия которых понижена в группе после приема ЭГ (3) и в группе забеременевших после ЭКО (4)

При сравнении списков генов было обнаружено значительное пересечение, что может указывать на потенциальное благоприятное влияние эпигаллокатехин-3-галлата на состояние эндометрия у женщин с ТПФ бесплодия с неудачными попытками ЭКО и ГПЭ в анамнезе. В группе забеременевших после ЭКО и в группе после приема препарата в эндометрии 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 в эндометрии понижается экспрессия генов, связанных с окислительно-восстановительными процессами в клетке, трансмембранными белками, метаболизмом липидов, холестерина и стероидов и кальций-зависимой регуляцией в клетке.

Таким образом, в результате проведенных исследований было выявлено, что ЭГ может влиять на эпигенетические и генетические характеристики эндометрия у исследуемых пациенток. При анализе уровня метилирования CpG-островков промоторов генов *HOXA10* и *HOXA11* была отмечена тенденция к снижению общего уровня метилирования промотора гена *HOXA10*, 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* у этих пациенток. При анализе транскриптома эндометрия до и после приема препарата было выявлено, что наибольшему изменению под воздействием ЭГ подвергается экспрессия тех же генов, экспрессия которых отличала пациенток, забеременевших в результате лечения методом ВРТ, от пациенток с неудачным исходом. Это может указывать на благоприятное воздействие приема ЭГ на молекулярно-генетические характеристики эндометрия у данной категории пациенток.

На основании полученных данных был разработан алгоритм персонализированной подготовки и проведения программы ВРТ у пациенток с ТПФ бесплодия и неоднократными неудачными попытками ЭКО в анамнезе (Рисунок 5).

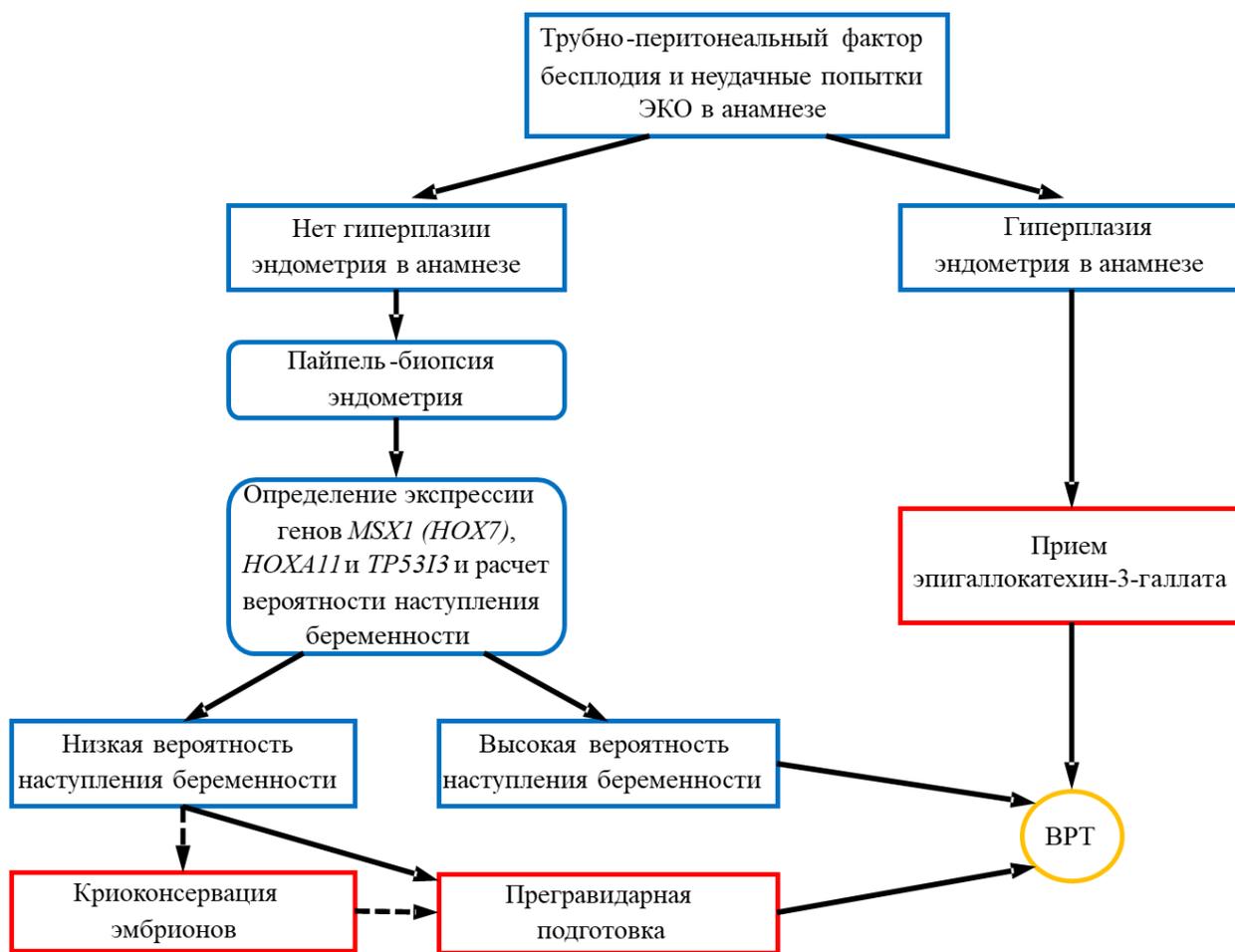


Рисунок 5. Алгоритм персонализированной подготовки и проведения программы ВРТ у пациенток с ТПФ бесплодия и неоднократными неудачными попытками ЭКО в анамнезе

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 антимюллерова 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:

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

где $Expr_{MSX1}$, $Expr_{HOXA11}$ и $Expr_{TP53I3}$ — 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. 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.
2. **Князева, Е. А.** Яичниковая беременность после программы ЭКО у пациентки со сниженной рецептивностью эндометрия / **Е. А. Князева**, К. У. Алиева, Е. А. Калинина // Акушерство и гинекология. – 2018. – № 8. – С. 180–185.
3. The role of abnormal hypermethylation of the *HOXA10* and *HOXA11* promoters in implantation failures in IVF programs / Т. А. Nazarenko, Е. А. Kalinina, **Е. А. Knyazeva** [et al.] // Gynecological Endocrinology. – 2019. – Vol.35, № S1. – P. 31–34.
4. Экспрессия генов *MSX1*, *HOXA11* и *TP53I3* в эндометрии, связанная с наступлением беременности после неоднократных неудачных попыток экстракорпорального оплодотворения у пациенток с трубно-перитонеальным фактором бесплодия / **Е. А. Князева**, М. В. Кузнецова, О. В. Бурменская [и др.] // Гинекология. – 2020. – Т.22, № 1. – С. 23–28.
5. Особенности метилирования генов *HOXA10* и *HOXA11* у пациенток с трубно-перитонеальным фактором бесплодия и неудачными попытками ЭКО в анамнезе / **Е. А. Князева**, М. В. Кузнецова, Е. С. Шубина [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2020. – № 4. – С. 140–147.