

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ  
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

*На правах рукописи*



Путило Анастасия Олеговна

**Роль определения генетических маркёров в эндометрии у пациенток с  
нарушением репродуктивной функции**

3.1.4. Акушерство и гинекология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор

Джибладзе Теа Амирановна

Москва – 2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ... ..	13
1.1. Актуальность проблемы нарушения репродуктивной функции .....	13
1.2. Факторы риска развития женского бесплодия... ..	15
1.3. Этиологические и патогенетические аспекты .....	19
1.4. Традиционные и современные методы диагностики.....	25
1.5. Особенности молекулярно-генетических методов обследования. ....	26
ГЛАВА 2. ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	36
2.1. Дизайн исследования... ..	36
2.2. Общая клиническая характеристика больных .....	37
2.3. Методы исследования... ..	39
2.4. Методы оперативного лечения.....	41
2.5. Генетические методы исследования .....	42
2.6. Общая характеристика пациенток... ..	43
2.7. Статистические методы и анализ исследования.....	45
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ .....	48
3.1. Клиническая характеристика I группы .....	48
3.2. Клиническая характеристика II группы .....	51
3.3. Клиническая характеристика III группы .....	55
3.4. Результаты гистологического и морфогенетического методов исследования... ..	57
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	72
ВЫВОДЫ... ..	90
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ .....	92
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	93
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	95

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность темы исследования**

Одним из приоритетных направлений современной гинекологии является исследование патологии эндометрия как главного участника процесса имплантации, проблема нарушения которого стоит наиболее остро ввиду того, что распространенность бесплодия среди пар репродуктивного возраста не снижается и колеблется от 12,6% до 17,5% во всем мире. Это означает, что примерно каждый шестой молодой человек в мире страдает бесплодием и нуждается в высококачественных методах его диагностики и лечения [96].

Прогрессирующее ухудшение репродуктивного здоровья населения позволяет признать проблему infertility одним из основных медицинских, социальных, демографических и экономических направлений. При этом сочетание различных факторов бесплодия, неоднозначная трактовка результатов диагностики приводят к трудностям в поиске его ведущих причин. Зачастую даже после полного клиничко-лабораторного обследования преобладающий фактор нарушения фертильности остается не определен, и пара считается соматически здоровой. Чаще всего это связано с тем, что традиционные методы диагностики, применяемые в современном акушерстве и гинекологии, не обладают достаточной информативностью.

Даже при установлении диагноза бесплодия дальнейшее ведение пары претерпевает значительные трудности, так как при существующем алгоритме обследования и лечения полученные результаты редко включают информацию об изменениях на молекулярно-генетическом уровне. В то же время дополнительные методы оценки структуры и функции эндометрия могут существенно облегчить задачу прогнозирования репродуктивных успехов или неудач.

По данным метаанализа 2022 г., который включил 32 исследования с низким риском систематической ошибки с участием 124 556 женщин, общая распространённость женского бесплодия составила 46,3% среди всех обследованных пациенток. В то же время стоит отметить, что доля первичного бесплодия оказалась выше (51,5%) в сравнении с вторичным (48,5%) [86].

С 2011 по 2021 г. статистические показатели женского бесплодия в Российской Федерации выросли на треть и в 2021 г. по стране составили 789,1 случаев на 100 тыс. женщин (данные Минздрава России, заболеваемость по данным обращаемости, отчетная форма ФСН №12) [21]. В 2023г. в Российской Федерации, согласно данным формы №12 федерального статистического наблюдения, число женщин с бесплодием составило 254,8 тыс. человек, из них с впервые установленным диагнозом – 66,8 тыс. человек.

Причиной женского бесплодия может стать как одна, так и сочетание нескольких факторов, которые могут быть связаны с эндокринными, внутриматочными, трубно-перитонеальными, иммунологическими, генетическими, психологическими нарушениями, или женское бесплодие остаётся неясного генеза [2]. При этом известно, что бесплодие зачастую ассоциировано с нарушением процесса имплантации, причиной которой становится либо неспособность эмбрионов к nidации эмбриона (эмбриональный фактор), либо снижение рецептивности эндометрия (эндометриальный фактор) [27]. Таким образом диагностика причины нарушения рецептивности эндометрия у женщин с внутриматочной патологией является стратегически верной для пациенток с маточным фактором бесплодия.

Одна из основных позиций в структуре нарушения женской репродуктивной функции отведена внутриматочной патологии [8, 25]. Как сообщает Ниг С. и соавторы, маточная форма бесплодия встречается у 1 из 500 женщин репродуктивного возраста [92]. Систематический обзор, целью которого явилось изучение распространенности маточной формы бесплодия в мире, проведённый на основании 188 исследований и выполненный в соответствии с критериями PRISMA, продемонстрировал, что на долю данной формы приходится

от 2,1 до 16,7% причин женского бесплодия [159]. Маточный фактор бесплодия определяется как состояние, возникающее в результате врожденных аномалий или дефекта имплантации яйцеклетки, являющейся многоэтапным процессом, регуляция которого происходит за счёт межмолекулярных и межклеточных взаимодействий. Нарушение имплантации оплодотворенной яйцеклетки в современной научной литературе определяется как бесплодие неясного генеза, и в большинстве своём оно связано с расстройством регулирующих его клеточно-молекулярных механизмов [159].

Успех процесса зависит от синхронности развития эмбриона и изменений в эндометрии. Эндометрий является непосредственным ложем для оплодотворённой яйцеклетки и, благодаря его реципрокному взаимодействию с бластоцистой, играет ведущую роль в обеспечении условий для имплантации эмбриона. Внутренняя слизистая оболочка тела матки первой контактирует с бластоцистой, в результате чего в ней происходят анатомические и молекулярные изменения, обеспечивающие восприимчивость к имплантации эмбриона.

Так как в процессе успешной имплантации участвует большой каскад молекул, который обеспечивает передачу сигналов между клетками и внутри них, то часто изменения касаются всего сигнального пути. Предметом специального изучения является определение полиморфизма генов, участвующих в патогенезе нарушения репродуктивной функции. При изучении ультраструктуры эндометрия и экспрессии ряда сигнальных молекул, в частности, была выявлена корреляция уровня экспрессии фактора, ингибирующего лейкемию (LIF), и присутствия пиноподий в середине секреторной фазы менструального цикла [131]. На сегодняшний день доказано участие фактора, ингибирующего лейкемию (LIF), в подготовке эндометрия к имплантации с последующим развитием эмбриона [39, 131]. В условиях недостаточной продукции LIF бластоциста не способна к имплантации.

Перспективным методом диагностики стало применение общегеномного секвенирования и в популяционной диагностике позволило выявить генетическую предрасположенность к нарушениям, в том числе влияющим на результаты

программ экстракорпорального оплодотворения и репродуктивный потенциал. Действительно, секвенирование генома у пар с бесплодием неясного генеза в анамнезе привело к открытию новых генов и вариантов, участвующих в специфических фенотипах бесплодия человека, которые влияют на доступность и функциональность женских гамет путем изменения уникальных механизмов, необходимых для созревания яйцеклетки и раннего развития эмбриона. Текущие достижения в области аналитических и биоинформационных исследований для изучения генетических детерминант репродуктивной способности яйцеклетки могут предоставить биологические доказательства, необходимые не только для улучшения диагностики изолированного женского бесплодия, но и для разработки новых профилактических и терапевтических подходов к репродуктивной недостаточности [123].

Таким образом, актуальность проблемы связана с тем, что до сих пор наличие врождённых и приобретённых мутаций в генах, влияющих на фертильность, а также определение маркеров бесплодия остаются недостаточно изученными в условиях постоянно обновляющихся данных о новых генах и их свойствах. В связи с этим перспективными направлениями на данный момент являются исследования, направленные на обнаружение новых генетических маркеров бесплодия.

### **Степень разработанности темы исследования**

Часть продуктивного рецепторного взаимодействия эмбриона и бластоцисты у пациенток с нарушением репродуктивной функции и доброкачественными заболеваниями матки, необходимого для удачной имплантации, остаются без ответа. В успешной имплантации эмбриона участвует широкий спектр молекул для передачи сигналов как между клетками, так и внутри них. Несоответствие в регуляции активности иммунокомпетентных клеток при различных морфологических изменениях эндометрия и миометрия, а также увеличение продукции ими цитокинов являются одной из причин несостоявшейся имплантации или нарушения развития эмбриона с последующим прерыванием

беременности, как правило, на этапе эмбриогенеза.

В последние годы генетические исследования продемонстрировали взаимосвязь некоторых генов (менее 200) с нарушением репродуктивной функции. С недавних пор применение секвенирования генома у пациенток с бесплодием позволило выявить новые варианты генов, участвующих в процессах имплантации. Вместе с тем наличие врождённых и приобретённых мутаций в генах, влияющих на фертильность, а также определение маркёров бесплодия остаётся недостаточно изученными в условиях постоянно обновляющихся данных о новых генах и их свойствах. В этой связи перспективными направлениями на данный момент являются исследования, направленные на обнаружение новых генетических маркёров бесплодия. Мутации в генах сигнального пути TP53 играют существенную роль в этиологии бесплодия у женщин с нарушением репродуктивной функции и доброкачественными заболеваниями матки.

### **Цель и задачи исследования**

Повысить эффективность комплексной диагностики причин нарушения имплантационной функции эндометрия на основании выявления полиморфизма генов сигнального пути TP53.

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

- 1) выявить взаимосвязь клинических, конституциональных и генетических факторов с бесплодием у женщин с доброкачественными заболеваниями эндометрия;
- 2) определить значение нуклеотидных полиморфизмов, расположенных в генах сигнального пути TP53 (LIF (rs41281637; Val64Met), LIF (rs929271; 1414A>C), MDM2 (rs2279744; 309T>G), MDM4 (rs1563828; 572A>G), TP53 (rs1042522; Arg72Pro)), у женщин с бесплодием и доброкачественными заболеваниями эндометрия как дополнительного фактора риска нарушения репродуктивной функции;
- 3) определить у женщин с нарушением репродуктивной функции нуклеотидные

полиморфизмы различных генов сигнального пути TP53 в эндометрии и выделить наиболее информативные из них для первичного и вторичного бесплодием;

- 4) установить взаимосвязь нуклеотидных полиморфизмов различных генов сигнального пути TP53 в эндометрии у женщин с бесплодием и сопутствующей различной доброкачественной внутриматочной патологией;
- 5) разработать метод комплексной диагностики маточного фактора бесплодия на основании клиничко-анамнестических, инструментальных, морфологических и молекулярно-генетических методов исследования.

### **Научная новизна**

Впервые в эндометрии у женщин с бесплодием были выделены полиморфизмы генов сигнального пути TP53 (LIF (rs41281637; Val64Met), LIF (rs929271; 1414A>C), MDM2 (rs2279744; 309T>G), MDM4 ( rs1563828; 572A>G), TP53 (rs1042522; Arg72Pro)), играющие роль в нарушении репродуктивной функции.

Впервые определены наиболее информативные нуклеотидны полиморфизмы генов в эндометрии у женщин с доброкачественными заболеваниями матки и бесплодием.

Выявлена корреляционная зависимость полиморфизмов различных генов сигнального пути TP53 у женщин с первичным и вторичным бесплодием и доброкачественными заболеваниями эндометрия.

Разработаны дополнительные генетические методы диагностики состояния эндометрия у женщин с бесплодием, которые могут определить тактику в восстановлении репродуктивной функции женщин.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Проведенное исследование позволяет предложить рациональный алгоритм

комплексной лабораторной диагностики причин бесплодия у пациенток с доброкачественными заболеваниями матки.

Выделение молекулярно-генетических маркёров нарушения процессов имплантации в образцах эндометрия позволяет повысить информативность методов диагностики и обосновать целесообразность персонализированного подхода в тактике ведения пациенток.

Выявление нуклеотидных полиморфизмов генов сигнального пути TP53 в образцах эндометрия свидетельствует о его вероятной причине у пациенток с бесплодием неясного генеза.

Наличие генетических маркёров первичного бесплодия при неоднократных неудачных попытках наступления беременности в анамнезе позволит прогнозировать исходы программ вспомогательных репродуктивных технологий с учётом молекулярно-генетических особенностей эндометрия у пациенток с внутриматочной патологией.

### **Методология и методы исследования**

Проведено проспективное поперечное исследование в параллельных группах у пациенток с нарушением репродуктивной функции и доброкачественными заболеваниями эндометрия, обратившихся в Клинику акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирёва Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) для диагностики и лечения. В рамках подготовки к оперативному лечению проводилось полноценное клинико-лабораторное обследование в соответствии с Приказом МЗ от 01.11.2012г. №572н «Об утверждении порядка оказания медицинской помощи по профилю «Акушерство и гинекология» (за исключением использования вспомогательных репродуктивных технологий)» и Приказом МЗ от 20.10.2020 г. №1130н "Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи по профилю "акушерство и гинекология». Каждой пациентке было проведено оперативное лечение в объёме гистероскопии или

гистерорезектоскопии, отдельное диагностическое выскабливание с последующим проведением гистологического исследования. В полученных образцах ткани эндометрия были выделены геномные ДНК с последующим генотипированием методом секвенирования по Сэнгеру. После получения результатов лабораторной диагностики произведён анализ полученных данных.

### **Личный вклад автора**

Автор участвовал в выборе научного направления и темы работы, разработке дизайна исследования, формировании цели и задач. Автором был проведён обзор актуальной научной литературы, осуществлён сбор клинико-анамнестических данных пациентов и образцов биоматериала для гистологического и генетического этапов. Автором проведена аналитическая и статистическая обработка полученных данных, а также их систематизация с последующей подготовкой материалов к публикациям. Автором сформулированы основные положения и выводы диссертационной работы.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Пациентки с первичным и вторичным бесплодием, ассоциированным с доброкачественными заболеваниями эндометрия, на основании выделения молекулярно-генетических маркёров сигнального пути TP53 могут быть включены в группу высокого риска повторных неудач имплантации в естественном цикле или с использованием программ вспомогательных репродуктивных технологий.

2. У пациенток с доброкачественными заболеваниями эндометрия подтверждена роль генетических полиморфизмов генов сигнального пути TP53: LIF (rs929271) и MDM4 в развитие первичного женского бесплодия, а MDM2 и TP53 — вторичного бесплодия.

3. Определение гена LIF (rs41281637) у пациенток с доброкачественными заболеваниями эндометрия, а также при сочетании с первичным или вторичным

бесплодием нецелесообразно ввиду отсутствия корреляционной зависимости.

4. Определение нуклеотидных полиморфизмов генов сигнального пути TP53 может быть рекомендовано как дополнительный метод лабораторной диагностики у пациенток с сочетанием нарушения репродуктивной функции и внутриматочной патологии.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Научные положения диссертации соответствуют паспорту научной специальности 3.1.4. Акушерство и гинекология (3. Медицинские науки). Результаты проведенного исследования относятся к области исследования специальности, а именно, п.4 «Разработка и усовершенствование методов диагностики, лечения и профилактики осложненного течения беременности и родов, гинекологических заболеваний» и п.5 «Экспериментальная и клиническая разработка методов оздоровления женщины в различные периоды жизни, вне и во время беременности и внедрение их в клиническую практику» паспорта научной специальности.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Основные положения диссертационной работы были представлены на межклинической конференции. Диссертация апробирована и рекомендована к защите на заседании апробационной комиссии кафедры акушерства и гинекологии №1 Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовского Университета).

Материалы диссертации были доложены на XXI Всероссийском научно-образовательном форуме «Мать и Дитя – 2020»; XXVII Всероссийском конгрессе с международным участием и специализированной выставочной экспозицией «Амбулаторно-поликлиническая помощь в эпицентре женского здоровья от

менархе до менопаузы», 2021г.; World Gynecology & Obstetrics Congress (WGOC-2022), Madrid, Spain; «XVII Международном конгрессе по репродуктивной медицине», 2023г.

Клинические исследования, анализ и интерпретация данных проведены автором самостоятельно. По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ.

### **Публикации по теме диссертации**

По теме диссертационной работы опубликовано 7 научных работ, в том числе 3 оригинальные научные статьи в изданиях, индексируемых в международной базе Scopus, 1 иная публикация, 3 публикации в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

### **Структура и объём диссертации**

Диссертация изложена на 111 страницах компьютерной вёрстки, иллюстрирована 17 таблицами, 7 рисунками, 11 диаграммами и 1 схемой. Работа состоит из списка сокращений и условных обозначений, введения, обзора литературы, двух глав, посвящённых материалам и методам и собственным результатам, заключения, выводов, практических рекомендаций. Список литературы включает 171 источник, из них 29 отечественных и 142 зарубежных авторов.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Актуальность проблемы нарушения репродуктивной функции

Несмотря на стремительно развивающиеся медицинские технологии в диагностике и лечении различных форм нарушений женской репродуктивной функции, проблема бесплодного брака по-прежнему остаётся в ряде особо значимых медико-социальных и демографических проблем. Общая распространённость женского бесплодия составляет 46,3%. При этом доля первичного бесплодия выше (51,5%) в сравнении с вторичным (48,5%) [86].

С 2011 по 2021 г. статистические показатели женского бесплодия в Российской Федерации выросли на треть и в 2021 г. по стране составили 789,1 случаев на 100 тыс. женщин (данные Минздрава России, заболеваемость по данным обращаемости, отчетная форма ФСН №12). Стоит отметить, что потери беременностей за счет бесплодия (как у женщин, так и у мужчин) суммарно составляют 17—21% [21].

Продолжая накапливать опыт в изучении причин бесплодия, в современном научном обществе на сегодняшний день есть множество работ, посвящённых этиологии, факторам риска, патогенезу, клинической характеристике, а также диагностики и лечению. При этом по мере развития клинико-лабораторной диагностики и современных медицинских технологий появилась возможность изучать заболевания на молекулярно-генетическом уровне, постепенно разбираясь в тонкостях каждого заболевания. Поэтому изучая факторы, которые приводят к формированию нарушения репродуктивной функции на уровне молекул и генов, такие как сигнальные пути, позволит впоследствии предложить каждой паре наиболее персонализированные способы преодоления бесплодия.

Сигнальные пути представляют собой каскад химических реакций, происходящих в определённом порядке и обеспечивающих передачу сигнала от одной молекулы к другой с момента связывания сигнальной молекулы с рецептором клетки и до активации последней молекулы в ряду превращений. Сигнальные пути являются частью системы контроля функций клетки и её гомеостаза. Ключевая роль клеточной сигнализации в биологических системах, известная как сигнальная трансдукция, заключается в передаче внеклеточных сигналов с целью регулирования внутриклеточной экспрессии генов. Процесс передачи сигнала обычно инициируется связыванием лиганда с рецептором, после чего запускается каскад межклеточных реакций благодаря множеству киназ, что в конечном итоге влияет на то, как факторы транскрипции регулируют последующую экспрессию генов [123]. Скоординированная работа различных сигнальных путей внутри нескольких типов клеток и между ними является основой многих важных биологических процессов: формирование новых клеток и тканей, развитие онкологических клеток и другие [157, 170].

Активация различных сигнальных путей может приводить к многочисленным физиологическим или клеточным реакциям: клеточной пролиферации, гибели, дифференцировке и поддержанию внутриклеточного метаболизма [91, 146]. По сообщениям многих авторов на сегодняшний момент известно, что любое прерывание, возникающее в этих цепочках вне- или внутриклеточной связи, приводит к формированию патологического состояния, включая нарушения репродуктивной функции и развитие онкологического процесса [97, 98, 161, 169]. И напротив, четкое понимание деятельности сигнальных путей и взаимодействия между ними может помочь разработать рациональные стратегии лечения заболеваний [140]. Поэтому важно понимать сигнальные пути, которые активируются в тканях, участвующих в процессах размножения, чтобы обеспечить основу для понимания генетических изменений, которые впоследствии привели к развитию патологического процесса.

На рисунке 1 представлен фрагмент взаимодействия сигнальных путей, участвующих в процессе реализации репродуктивной деятельности живых



невозможно определить при традиционных морфологических и иммуногистохимических исследованиях [89, 168]. Поиск причин бесплодия продолжает Weiss R.V. et al., рассматривая в своём обзоре варианты диагностики и лечения различных эндокринологических причин, которые приводят к ановуляторным проблемам, соответственно, к нарушению имплантационной функции эндометрия и составляют от 25% до 50% причин [164].

Одним из наиболее распространенных факторов риска, связанных с образом жизни, является ожирение. Все эти состояния изменяют специфический гормональный профиль и могут нарушать нижестоящие сигнальные пути. У женщин, страдающих ожирением, исследования продемонстрировали прямую зависимость между увеличением индекса массы тела (ИМТ) и увеличением частоты ановуляторных менструальных циклов, а также между неудачными попытками экстракорпорального оплодотворения [29, 41]. Влияние ожирения – пандемии XXI века – на реализацию репродуктивной функции неумолимо возрастает. Broughton D.E. и соавторы полагают, что у женщин с ожирением из-за нарушения функции в системе «гипоталамус-гипофиз-яичники» вероятность овуляторной дисфункции значительно выше. Авторы предполагают, что ожирение влияет на яйцеклетку и формирующийся эмбрион, нарушая образование мейотического веретена деления и изменяя деятельность митохондрий. Избыток свободных жирных кислот может оказывать токсическое действие на репродуктивные ткани, приводя к повреждению клеток и хроническому слабо выраженному воспалительному процессу [47]. Talmor A. совместно с Dunphy B. подчёркивают, что различные маркёры, включая С-реактивный белок, интерлейкин-6 (ИЛ-6), фактор некроза опухоли-альфа (ФНО-α), ингибитор активатора плазминогена (ИАПГ-1), обнаруженные у пациенток с ожирением, оказывают пагубное влияние на репродуктивный цикл [147]. В дополнение к этому, хочется отметить работу Butler M.G., в которой в табличной форме были представлены значимые корреляции в фенотипе ожирения и связанных с ним бесплодия и репродукции человека в виде расположения генов на хромосомных идеограммах наряду с описанием гена и его положением [48]. В работах Bellver J.

et al., показано, что увеличение ИМТ на одну единицу снижает вероятность беременности на 0,84 в случаях экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) [126].

В литературе, посвящённой бесплодию, значительное место отводится обсуждению возраста реализации репродуктивного потенциала. Снижение фертильности женщин возникает в результате прогрессирующего снижения функции яичников, связанного с увеличением возраста матери [99]. Hansen K.R. и Broekmans F.J. в своих работах объясняют, что снижение функции яичников происходит к концу репродуктивного периода у женщины из-за истощения примордиального пула [46, 120]. Данное утверждение находит подтверждение и в российской литературе в работах Боярского К.Ю., Кахиани Е.И. и Петрова И.А. [1, 14, 24].

По мнению Warburton D., качество фолликулов ухудшается в результате кумулятивного повреждения ооцитов, веретенообразных волокон и изменения свойств гранулёзных клеток [163]. В исследовании Rubio C. было показано, что анеуплоидии являлись наиболее часто встречаемыми хромосомными аномалиями у пар с привычным невынашиванием беременности по сравнению с контрольной группой [138]. Crawford N.M. считает, что пациенты старше 35 лет должны получить оперативную оценку причин бесплодия в течение 6 месяцев после последней неудачной попытки зачатия [58].

По оценкам Marshburn P.V. и соавторов, увеличение частоты наступления беременности у пары с проблемой бесплодия неясного генеза возможно достичь индукцией овуляции и внутриматочной инсеминацией с последующим использованием программ ЭКО. Однако увеличение возраста матери может сказываться не только на качестве ооцитов, но и на возникновении функциональных проблем эндометрия [113].

Carby R. совместно с коллегами, анализируя свой собственный опыт лечения нарушения репродуктивной функции у пациентов старше 40 лет, приходит к выводу, что вероятность положительного эффекта ВМИ составила менее 5%, в то время как ЭКО и ИКСИ остаются более эффективными вариантами для сохранения текущего уровня рождаемости на 10-15%. Вспомогательные репродуктивные

технологии могут преодолеть барьеры на пути к фертильности, вызванные заболеванием маточных труб и низким качеством спермы партнёра, но достигнут незначительный прогресс в снижении влияния увеличения возраста на функцию яичников [49]. В ближайшие 5-10 лет, вероятно, будет наблюдаться дальнейшее увеличение рождаемости у женщин с бесплодием, повышение осведомленности о факторах образа жизни и возможное совершенствование существующих методов вспомогательной репродукции и разработка новых [72]. При этом Bashiri A. добавляет, что повторные неудачи имплантации относятся к случаям, когда у женщин было две или три неудачных попытки экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) с использованием эмбрионов хорошего качества [42].

Снижение фертильности у женщин начинается уже в возрасте 25-30 лет, а средний возраст рождения составляет 40-41 год в большинстве изученных групп населения [160]. Поздний возраст реализации репродуктивного потенциала, образ жизни (ожирение и неправильное питание), курение, чрезмерное потребление алкоголя и кофеина, использование лёгких наркотиков может вызвать генетические и эпигенетические изменения, которые могут вызвать бесплодие, нарушение имплантации, повторяющиеся выкидыши и неблагоприятное течение беременности и перинатальные исходы [38].

В работах Nik Hazlina N.H. et al., посвящённых влиянию курения, было в значительной степени продемонстрирована его связь с бесплодием: нарушение фертильности отмечалось в 1,85 (95% ДИ от 1,08 до 3,14) раза выше у некурящих женщин, чем у тех, которые не курят [86]. Эти данные подтверждают, что никотин как прооксидант влияет на окислительное состояние клеток эндометрия, снижая маркёры антиоксидантной защиты [101]. Окислительный стресс может также привести к фрагментации эмбриона и формированию многочисленных аномалий развития, и считается одной из важных причин самопроизвольного и повторного выкидыша, влияет на успех ВРТ [109].

Большинство случаев трубного фактора бесплодия связаны с заболеваниями, передающимися половым путем, возбудители которых распространяются по репродуктивному тракту и способны вызывать воспаление, повреждение и

рубцевание маточных труб. Фактические данные Tsevat D.G. et al. последовательно демонстрируют воздействие *Chlamydia trachomatis* и *Neisseria gonorrhoeae* как патогенных бактерий, участвующих в заболеваниях репродуктивного тракта, включая бесплодие с маточным фактором и воспалительные заболевания органов малого таза. В медицинской литературе имеется ограниченное количество доказательств того, что другие организмы, передающиеся половым путем, включая *Mycoplasma genitalium*, *Trichomonas vaginalis* и другие микроорганизмы в микробиоме влагалища, могут быть важными факторами, участвующими в патологии бесплодия [156].

### **1.3. Этиологические и патогенетические аспекты**

Около 10% женщин репродуктивного возраста не могут забеременеть или выносить беременность. Только женские факторы являются причиной по меньшей мере 35% всех случаев бесплодия и включают широкий спектр причин, влияющих на развитие яичников, созревание яйцеклеток и способность к оплодотворению, а также на потенциал оплодотворенной яйцеклетки для преимплантационного развития, имплантации и роста плода. Патофизиологическая основа целесообразности исследования прогностического значения сигнальных путей в аспекте нарушения женской репродуктивной функции была исследована разными научными группами.

На схеме 1 представлено взаимодействие однонуклеотидных полиморфизмов генов сигнального пути TP53, участвующих в процессах реализации фертильности. Имплантация бластоцисты зависит от четко скоординированной взаимосвязи факторов роста, специфичных для эндотелиальных клеток сосудов и обменом сигналами между этими клетками нормальной сосудистой сети плаценты [130]. Многие процессы, участвующие в имплантации — апоптоз, ангиогенез, поддержание стабильности генома — являются функциями, регулируемые белком p53 [100]. В период «окна имплантации» нормальная экспрессия генов сигнального пути TP53 отвечает за возможность внедрения бластоцисты в

эндометрий [18]. Известно, что ген TP53 является регулятором качества и созревания ооцитов. По данным Симбирцева А.С., супрессор опухоли p53 (продукт гена TP53) имеет решающее значение для эмбриональной имплантации за счет активации транскрипции LIF - фактора ингибирования лейкозных клеток [23]. Одним из основных регуляторов функции p53 является белок MDM2, а множественные формы клеточного стресса активируют p53 путем ингибирования MDM2-опосредованной деградации p53. Как ближайший аналог MDM2 был идентифицирован ген MDM4 (также MDMX), наиболее известного ингибитора p53 [15, 109].

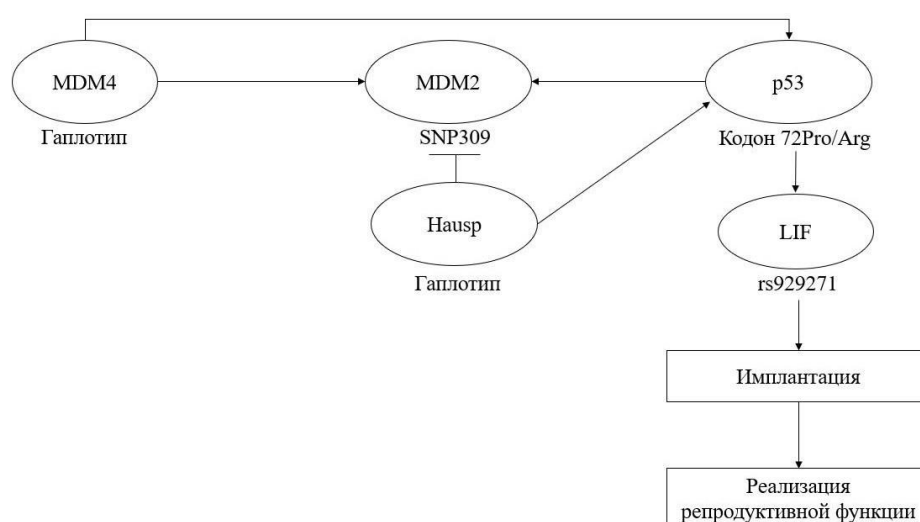


Схема 1 — Однонуклеотидные полиморфизмы в генах сигнального пути TP53, связанные с фертильностью человека [139]

В проводимом нами исследовании внимание уделено цитокину, регулируемому фазу оппозиции и адгезии бластоцисты и являющемуся представителем семейства IL-6 – фактору, ингибирующему лейкемию (LIF). LIF принадлежит семейству цитокинов, включающему онкостатин-М, интерлейкин 6, интерлейкин 11, цилиарный нейротрофический фактор и гранулоцитарный колониестимулирующий фактор. Вышеуказанные факторы схожи по локализации генов на хромосоме и структуре их рецепторов. На сегодняшний момент установлено, что LIF является промежуточным звеном в процессе имплантации.

LIF представляет собой гликопротеин железистого эпителия, который необходим для децидуализации эндометрия. Имеются данные, подтверждающие его опосредованное действие в сигнальном пути, регулирующем целостность клеточных контактов, пролиферацию и дифференцировку клеток стромы [71, 77, 112]. LIF участвует в имплантации у женщин, а также он может вызвать внематочную беременность путем стимуляции адгезии бластоцисты [153].

LIF способствует инвазии трофобластов и влияет на иммунную толерантность во время имплантации. При недостаточной продукции LIF бластоциста не способна к имплантации [5, 6, 36, 145]. В эндометрии фертильных женщин гены сигнального пути TP53 экспрессируются в течение всего менструального цикла, а пик экспрессии приходится на «окно имплантации». На сегодняшний день имеются данные о том, что экспрессия эстроген-чувствительного цитокина LIF снижается в эндометрии женщин с бесплодием [7, 19, 153].

Как сообщают Lucas E.S. совместно с коллегами, во время «окна имплантации» эндометрий становится готовым к переходу в состояние беременности – это процесс, обусловленный дифференцировкой стромальных клеток в децидуальные клетки. Нарушения в этом процессе, называемые децидуализацией, приводят к нарушению взаимодействия плода и матери и выкидышу. Физиологические и молекулярные процессы, инициируемые во время имплантации для успешной реализации процесса оплодотворения чётко скоординированы. Мутации в нуклеотидных полиморфизмах генов в периимплантационный период проявляются в отклонениях в расстоянии между эмбрионами, децидуализации, плацентации и внутриутробном эмбриональном росте, впоследствии развивающиеся в преэклампсию, выкидыши и/или преждевременные роды [134]. Понимание молекулярных сигнальных сетей, которые координируют стратегии успешной имплантации и децидуализации, может привести к подходам к улучшению исхода естественной беременности и беременности, наступившей в результате экстракорпорального оплодотворения [50, 128].

Для зачатия, имплантации и рождения здоровых в развитии детей требуются эуплоидные яйцеклетки и сперматозоиды. В основе воспроизведения эуплоидных яйцеклеток - безошибочный мейоз. Патологические генетические варианты нарушают регуляцию мейотических процессов, которые происходят во время профазы I, возобновления мейоза, сегрегации хромосом и регуляции клеточного цикла. Это нарушение регуляции приводит к формированию анеуплоидных яйцеклеток. В свою очередь, анеуплоидия яйцеклетки приводит к широкому спектру клинических фенотипов бесплодия, включая первичную недостаточность яичников и раннее наступление менопаузы, сбой оплодотворения яйцеклетки и остановку эмбрионального развития или повторные потери беременности [119].

Рецептивный эндометрий морфологически характеризуется наличием апикальных выступов на клетках просветного эпителия, называемых пиноподиями [125]. За пределами пиноподий эпителий просвета псевдомногослойный, столбчатый и поляризованный. Железы большие, очень извилистые и выделяют много жидкости. Строма эндометрия отечная, а ткань сильно васкуляризована. Морфологические изменения рецептивного эндометрия определяют перераспределение молекулярных сигналов, которые в ряде случаев могут стать причиной рецидивирующих неудач [30, 70]. Имеются данные о том, что микроРНК оказывает влияние на экспрессию LIF и формирование пиноподий в эндометриальных клетках. Было высказано предположение Rarani F.Z., что пиноподии являются хорошими маркерами восприимчивости эндометрия во время окна имплантации [131].

В ответ на эмбриональные сигналы клетки эндометрия изменяют экспрессию нескольких генов, включая факторы транскрипции, перераспределяют гликаны и перераспределяют интергрины [40, 52, 93, 129, 171]. Восприимчивый эндометрий модифицируется во время «окна имплантации», а этот процесс, по-видимому, влечёт за собой дальнейшую активацию процессов воспаления. Тогда можно ожидать, что это приведёт к дальнейшему повреждению тканей.

Первоначально развитие эмбриона регулируется материнскими транскриптами, которые синтезируются и сохраняются в цитоплазме ещё во время

созревания яйцеклетки. Эуплоидный материнский геном и компоненты цитоплазмы необходимы для нормального эмбрионального развития. В преимплантационном развитии женские генетические факторы играют три основные роли: ремоделирование конденсированных материнских и отцовских геномов с образованием диплоидной клетки при оплодотворении; постепенная деградация материнской РНК и белков; и активация транскрипции эмбрионального генома. Сбой в любом из этих биологических процессов приводит к женскому бесплодию. На основе моделей на животных многие гены участвуют в реструктурировании хроматина, эпигенетическом перепрограммировании, активации генома эмбриона и спецификации клеток. [166].

Как сообщает Mallerally R. совместно с соавторами, примерно 25-30% пар с идиопатическим бесплодием имеют генетическую этиологию своего состояния [111]. На сегодняшний день секвенирование генома выявило много новых предполагаемых причин бесплодия. Ещё в 2010 году группа авторов во главе с Hulten M. сообщали о том, что по неизвестным причинам женские гаметы более склонны к ошибкам мейотической рекомбинации и более высокой вероятности анеуплоидии [90]. Эти ошибки могут возникать во время хромосомного сближения и/или рекомбинации мейоза I или во время сегрегации хромосом с анафазой I и/или II. Выявление этих цитогенетических ошибок может быть сложным, поскольку ошибки в анафазе I и/или II проявляется в отдельных яйцеклетках с каждым овуляторным циклом. Измененная регуляция метилирования ДНК, функции гистонов и малых кодирующих РНК может способствовать нарушению женской репродуктивной функции. В дополнение к мейотическому преобразованию эпигенетические отклонения накапливаются с возрастом и могут препятствовать фертильности.

На сегодняшний момент изучение сигнальных путей активно происходит на животных моделях. Так, например, Flores D. подтверждает, что для успешного протекания беременности необходимо понимание фундаментальной взаимосвязи между эмбрионом и маткой. Места имплантации матки у мышей не являются ни случайными, ни предопределенными, а определяются количеством эмбрионов,

попадающих в просвет матки. Распределение эмбрионов в полости матки, с одной стороны, зависит от связи между эмбрионом и маткой, зависящей от сигнального пути LPAR3, и не зависит от сокращений адренергических мышц миометрия. В своей работе авторы определяют три различные фазы перед имплантацией: вхождение эмбриона, однонаправленное движение кластеров эмбрионов и двухнаправленное распределение и расстояние между эмбрионами [75].

Недавние исследования Li J. и соавторы показали, что Smad-зависимая передача сигналов TGF- $\beta$  может играть важную роль в процессе имплантации эмбриона. Была определена экспрессия TGF- $\beta$ 1, рецептора TGF- $\beta$  типа I (T $\beta$ RI), Smad3 и p-Smad3 в эндометрии мышей и обнаружено их повышение на 4, 5 и 6 день псевдо-беременности. Затем был введён специфический ингибитор Smad3 (Sis3) в полость матки мышей на 3-й день беременности. Результаты показали снижение экспрессии инсулиноподобного фактора роста-1 (IGFBP-1) и уменьшение количества имплантированных эмбрионов после введения. Кроме того, было обнаружено, что Sis3 снижает секрецию IGFBP-1 в децидуализированных стромальных клетках эндометрия. Результаты проведённого исследования показали, что передача сигналов TGF- $\beta$  / Smad3 участвует в процессе имплантации эмбриона [33].

Первичным бесплодием принято считать состояние, при котором у женщины не было ни одной беременности, несмотря на регулярную половую жизнь в течение года без применения контрацептивных средств. Вторичное бесплодие определяется как состояние, при котором у женщины в прошлом были успешные попытки беременности, однако в течение года регулярной половой жизни без предохранения зачатие более не происходит.

Неспособность женщины к зачатию в репродуктивном возрасте бывает абсолютной, когда полностью исключена возможность беременности (анатомические пороки развития половых органов), и относительной, когда в связи с установленными причинами беременность невозможна, но наступает после устранения их.

Врожденное бесплодие обусловлено наследственной и врожденной

патологией (эндокринные заболевания, пороки развития половых органов), при этом приобретенное бесплодие является чаще всего вторичным и связано чаще всего с перенесенными заболеваниями после рождения ребенка.

#### **1.4. Традиционные и современные методы диагностики**

На сегодняшний день традиционные методы диагностики причин нарушения репродуктивной функции не обладают должной чувствительностью и специфичностью.

После сбора анамнеза необходимо убедиться в отсутствии мужского фактора, получив результаты спермограммы. По завершению объективного осмотра, всем пациенткам было проведено лабораторное обследование в полном объеме: определение группы крови и антигена D системы Резус (резус-фактор), клинический и биохимический анализы крови, коагулограмма, бактериоскопическое исследование отделяемого из влагалища и шейки матки [136, 150], молекулярно-биологического исследования отделяемого слизистых оболочек женских половых органов на возбудители инфекций, передаваемых половым путем [83], цитологического исследования микропрепарата шейки матки [118].

Также пациентке рекомендовано на 2-5 день менструального цикла исследование сыворотки крови на определение уровня фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), лютеинизирующего гормона, тиреотропного гормона, пролактина, эстрадиола, свободного тестостерона по показаниям. Наличие овуляции необходимо подтвердить путем исследования уровня прогестерона в крови через 5-7 дней после предполагаемой овуляции или за 5-7 дней до предполагаемой менструации, а также посредством использования мочевого теста на овуляцию, позволяющего исследовать уровень ЛГ в моче.

В рамках подготовки к программе вспомогательных репродуктивных технологий рекомендовано направлять пациентку и ее партнера на исследование уровня антител классов M, G (IgM, IgG) к вирусу иммунодефицита человека – 1/2 (далее – ВИЧ) и антигена p24 (Human immunodeficiency virus HIV 1/2 + Agp24) в

крови, антител к поверхностному антигену (HBsAg) вируса гепатита В (Hepatitis B virus) в крови или определение антигена (HbsAg) вируса гепатита В (Hepatitis B virus), суммарных антител классов М и G (anti-HCV IgG и anti-HCV IgM) к вирусу гепатита С (Hepatitis C virus), антител класса G (IgG) и класса М (IgM) к вирусу краснухи (Rubella virus) в крови, антител классов М, G (IgM, IgG) к цитомегаловирусу (ЦМВ) (Cytomegalovirus), антител к вирусу простого герпеса (ВПГ) (Herpes simplex virus). Женщинам, вступающим в программу вспомогательных репродуктивных технологий, в дополнение к вышеперечисленным методам проводят исследование уровня антимюллера гормона для оценки возможного ответа на овариальную стимуляцию.

С целью уточнения причины бесплодия всем пациенткам рекомендовано ультразвуковое исследование матки и придатков в раннюю фолликулярную фазу цикла. Пройодимость маточных труб будет оценена после проведения контрастной эхогистеросальпингоскопии или гистеросальпингографии. Кроме того, с целью гистологической верификации диагноза в целях дополнительной диагностики доброкачественных заболеваний матки проводится биопсия эндометрия, гистероскопия или гистерорезектоскопия. В завершении и одновременного хирургического лечения при подозрении на наличие гинекологических заболеваний, требующих оперативного вмешательства, рекомендовано направлять пациентку на проведение диагностической лапароскопии.

### **1.5. Особенности молекулярно-генетических методов обследования**

Одной из ключевых целей современной медицины является более углубленное понимание того, кто подвержен риску конкретных заболеваний. По сравнению с тестами на один ген, мультигенное панельное тестирование или исследование нескольких генов одного сигнального пути представляет возможность более всесторонней и эффективной оценки риска развития бесплодия [55].

Отчёт совещания экспертов ESHG и ESHRE 2018 года для описания

последних разработок в области ВРТ и генетики/геномики включал определение их практического значения для клинического ведения пациентов с генетическими рисками бесплодия. По наблюдениям специалистов, у мышей было выявлено более 500 генов, ассоциированных с бесплодием. Таким образом, изучение генетических маркёров бесплодия у людей является актуальным на сегодняшний момент. По мнению Масут Д. В. и соавторов, будущие исследования в области женской репродукции должны быть направлены на изучение репродуктивных генетических мутаций и нейроэндокринных заболеваний [63].

Вместе с тем остаётся открытым вопрос о поиске генетических маркёров бесплодия. Как показало исследование коллектива авторов совместно с Demain L.A., многие из генов, связанных с дисфункцией митохондрий и бесплодием, играют роль в поддержании мтДНК или в митохондриальной трансляции. Многие исследования представляют противоречивые данные по поводу влияния вариантов мтДНК, но подчёркивают, что ген POLG является особенно интересным геном-кандидатом для мужского и женского бесплодия [65].

В настоящее время известно, что LIF участвует в подготовке эндометрия к имплантации с последующим развитием эмбриона (рисунок 2). LIF принадлежит к семейству провоспалительного цитокина интерлейкина-6 и на поверхности клеток связывается со своим индивидуальным рецептором (LIF-R), формируя комплекс GP130.

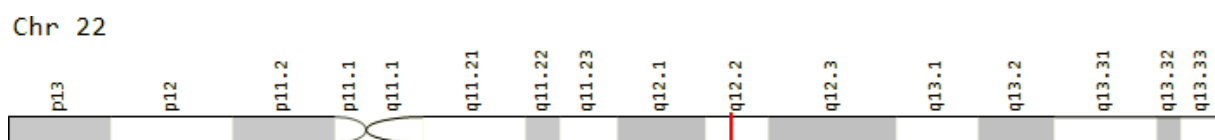


Рисунок 2 — Местоположение гена LIF в хромосоме 22 [79]

В отличие от других цитокинов семейства, наибольшее количество LIF секретируется именно в тот период, когда бластоциста прикрепляется к эндометрию, то есть в так называемое окно имплантации, обеспечивая совместно с интерлейкином-11 экспрессию адгезионных молекул, необходимых для

последующей фиксации бластоцисты. В условиях недостаточной продукции LIF бластоциста не способна к имплантации.

Точечные мутации в полиморфизме rs41281637 гена LIF могут привести к структурным изменениям одноимённого кодируемого белка. Нарушение процесса трансляции может стать причиной снижения взаимодействия LIF с LIF-R, результатом которого в созданных условиях станет нарушение процесса имплантации. В зависимости от уровня транскрипции гена хромосомные aberrации могут иметь различную степень выраженности. При этом особое внимание представляет генотип G/G, который отражает повышенную вероятность успешного завершения процессов оплодотворения, в том числе и после процедур вспомогательных репродуктивных технологий.

Ген MDM2 отвечает за кодирование ядерной убиквитин-лигазы (рисунок 3). Данный фермент является частью убиквитин-протеасомного пути деградации белков протеин-супрессора опухолей p53. Благодаря влиянию на ген LIF, белок p53 участвует не только в процессах подавления развития опухолей, но и в нарушениях репродуктивной функции у женщин. Между геном MDM2 и белком p53 отмечается обратная зависимость: чем выше активность гена, тем ниже экспрессия кодируемого белка. Таким образом, изменения в процессе трансляции белка p53 могут стать причиной повышенного риска нарушения имплантации после процедур ЭКО или риска формирования нарушения репродуктивной функции.

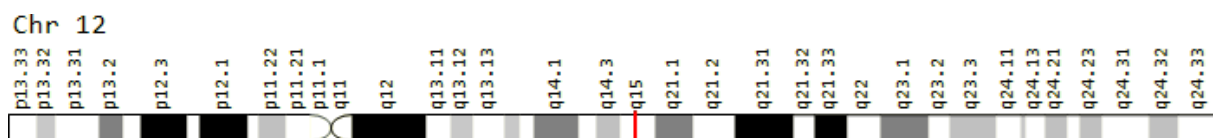


Рисунок 3 — Местоположение гена MDM2 в хромосоме 12 [80]

Уже известно, что путь Mdm2-p53 в клетках гранулы кумулюса транскрипционно контролировал стероидогенный фактор 1 сиротского ядерного рецептора (SF1), ключевой регулятор функции яичников. Важно отметить, что

уровни MDM2 и SF1 в клетках гранулезы кумулюса человека были положительно связаны с исходом созревания и оплодотворения яйцеклеток у пациентов, проходящих лечение от бесплодия. Эти данные свидетельствуют о том, что ось Mdm2-p53-SF1 в клетках гранулезной оболочки кумулюса яичников управляет функцией яичников, влияя на качество соседних яйцеклеток [116]. Так, например, в исследовании Winship A. совместно с коллегами подчеркивается потенциальный новый механизм, с помощью которого микроРНК miR-661, секретлируемая blastocистами человека, снижает адгезию эпителиальных клеток эндометрия посредством подавления MDM2. Эти данные свидетельствуют о том, что MDM2 способствует адгезии эндометрия к blastocисте, имплантации и бесплодию у женщин [124].

MDM4 участвует в кодировании белка MDM4, который связывает протеин-супрессор опухолей p53 и имеет схожее строение с белком MDM2 (рисунок 4). Они участвуют в подавлении активности p53, при этом MDM4 взаимодействует с активатором транскрипции p53 в отличие от MDM2, который ассоциирован с разрушением белка. Таким образом, замена одного нуклеотидного основания в гене может стать причиной его излишней активности, что приведёт к повышенной экспрессии белка MDM4 и сниженной экспрессии белка p53. Как и в случае с MDM2, единичные изменения в гене приведут к безуспешной попытке процесса имплантации. Palomares A.R. вместе с соавторами продемонстрировали различия в результатах ЭКО после переноса эмбрионов. Вариант гена Arg72Pro (rs1042522) был связан с изменениями в показателях имплантации и клинической беременности. Полиморфизмы USP7 (rs1529916) и MDM4 (rs1563828) были связаны с различной частотой продолжающихся беременностей и различными случаями выкидышей, соответственно. Это исследование подчеркивает связь между полиморфизмами генов, связанных с функцией P53, и их влиянием на репродуктивные результаты ЭКО.

Вариант Arg72Pro может влиять на ранние события, поскольку у гомозиготных по аллелю Pro72 были обнаружены более низкие показатели имплантации. Напротив, варианты генов MDM4 (rs1563828) и USP7 (rs1529916)

были связаны с более поздним сохранением беременности [78].

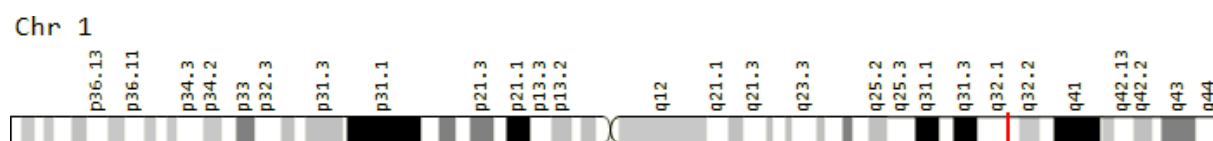


Рисунок 4 — Местоположение гена MDM4 в хромосоме 1 [81]

Ген TP53 кодирует одноимённый белок. В зависимости от типа клеток и условий, в которых происходит трансляция, белок-супрессор становится причиной торможения биологических процессов, происходящих на молекулярно-генетическом уровне (рисунок 5). Протеин p53 участвует в транскрипции гена LIF. Поэтому абберрация в гене может привести к изменению толщины эндометрия за счёт влияния на процесс апоптоза в клетках трофобласта.

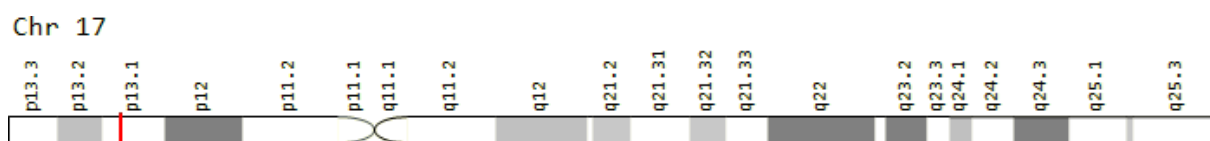


Рисунок 5 — Местоположение гена TP53 в хромосоме 17 [82]

Было изучено влияние однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) TP53 rs1625895, TP73 rs3765730, MMP9 rs17576 и MTHFR rs868014 на овариальный резерв у бесплодных пациенток. В заключении авторы пришли к выводу, что наличие генотипов TP53-T/T, TP73-G/G, MMP9-Gln/Gln и MTHFR-A/A увеличивает вероятность развития сниженного овариального резерва у женщин по сравнению с представителями общей популяции. Эти полиморфизмы могут быть полезны в качестве генетических маркеров низкого овариального резерва у бесплодных пациенток [57].

В таблице 1 представлена информация об исследуемых нами генов сигнального пути TP53.

На сегодняшний день обобщена роль семейства белков p53 и связанных с ним белков в репродуктивной функции у женщин. Сообщалось, что некоторые

однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) белков p53, MDM2, MdmX и путь p53 связаны с риском нарушения репродуктивной функции у женщин. p53 регулирует уровень экспрессии лейкемического ингибиторного фактора посредством своего ДНК-связывающего домена (DBD) и, таким образом, способствует репродукции самки, влияя на процесс имплантации эмбрионов. Белки MDM2, MDMX и HAUSP регулируют уровень и активность белка p53, которые являются критическими для соответствующего ответа p53 в процессе имплантации эмбрионов [154].

Предметом специального изучения является определение полиморфизма генов, участвующих в патогенезе нарушения репродуктивной функции. По сообщениям Smith S.K. совместно с соавторами, выдвинуто предположение, что аномальная экспрессия LIF или родственного цитокина интерлейкина-6 (IL-6) в эндометрии может лежать в основе некоторых форм бесплодия человека [141]. Чуйкин И.А. в работе, посвящённой изучению сигнальных путей, влияющих на пролиферативную активность эмбриональных стволовых клеток мыши, показал, что внутренняя клеточная масса не нуждается в факторе LIF, если эмбриональное развитие протекает без задержки на стадии бластоцисты [28]. Противоположное мнение высказывает Margioulas-Siarkou С. и его коллеги, которые изучили экспрессию LIF и LIFR в эндометрии с помощью иммуногистохимии (ИГХ) во время «окна имплантации» в различных подгруппах бесплодных женщин, разделённых по причине бесплодия.

Анализ полученных данных показал, что экспрессии LIFR была снижена во всех подгруппах бесплодных женщин. Таким образом, автор приходит к выводу, что экспрессия LIF отмечалась только у женщин с необъяснимыми причинами бесплодия, а экспрессия LIFR была снижена во всех подгруппах бесплодных женщин [107].

Важная роль LIF в имплантации, как сообщает Aghajanova L., была показана на мышцах, нокаутированных по LIF, у которых впоследствии имплантация эмбрионов не произошла. В эндометрии здоровых женщин мРНК LIF, LIFR и gp130 экспрессируются в течение всего МЦ с большим увеличением в середине секреторной фазы, совпадающим с предполагаемым окном имплантации. LIF

действует на клетки, связываясь с LIFR и gp130.

Таблица 1 — Общие свойства исследуемых генов, участвующих в сигнальном пути TP53

Ген	Продукт гена	Функция	Орган (ткань), где преимущественно наблюдается экспрессия
LIF (rs41281637)	фактор LIF	Имплантация бластоцисты	Желчный пузырь, червеобразный отросток, эпителий мочевого пузыря, эпителий желёз эндометрия
LIF (rs929271)	фактор LIF	Имплантация бластоцисты	Желчный пузырь, червеобразный отросток, эпителий мочевого пузыря, эпителий желёз эндометрия
MDM2 (rs2279744)	убиквитин- лигаза	Регуляция активности протеин- супрессора опухолей p53	Толстая кишка, щитовидная железа, костный мозг
MDM4 (rs1563828)	протеин MdmX	Регуляция активности p53	Костный мозг, кожа, лимфатические узлы, селезёнка
TP53 (rs1042522)	фактор транскрипции p53	Регуляция транскрипции гена LIF	Лимфатические узлы, селезенка, кожа, плацента, эпителий желёз эндометрия

Бластоцисты человека экспрессируют мРНК для LIF-R и gp130, активно участвуя в установлении связи с эндометрием. Эндометрий бесплодных женщин экспрессирует значительно меньше LIF в течение периода имплантации. Роль

мутаций гена LIF при бесплодии и нарушениях имплантации у пациенток с неудачными попытками ЭКО пока неясна. Однако у бесплодных пациенток наблюдалось снижение секреции LIF-R и gp130 по сравнению с группой контроля, состоящих из фертильных женщин, во время окна имплантации. Автор предлагает использовать рекомбинантный человеческий LIF в целях улучшения частоты имплантации у женщин с необъяснимым бесплодием [35]. Сходные данные по экспрессии LIF были получены и в исследовании, проведённом в Китае в 2013 году Wu M. совместно с соавторами [151].

Тем не менее, как утверждает Aghajanova L., данные об экспрессии и секреции LIF эндометрия у бесплодных женщин достаточно противоречивы. Несмотря на то, что высокая экспрессия LIF является показателем рецептивного эндометрия у фертильных женщин, обнаружение только LIF недостаточно для оценки имплантационного потенциала у женщин с необъяснимым бесплодием, даже при исключении других причин бесплодия (трубный, эндокринный, андрогенный факторы и эндометриоз) [37].

Значительный интерес представляют работы по оценке LIF для прогнозирования репродуктивного исхода. В проспективном исследовании, проведённом в Польше, была проведена оценка LIF в качестве предиктора репродуктивного успеха. В результате 65,4% пациентов, которые вернули анкеты, забеременели. Концентрация LIF в точке отсечения составила 2,31 пг/мл, имела чувствительность 95,7% и специфичность 81,8% в прогнозировании репродуктивного исхода [121].

В литературе также имеются единичные работы, посвящённые оценке распространённости генных изменений LIF у женщин с бесплодием и с повторными неудачными попытками имплантации после ЭКО и переноса эмбрионов. Потенциально функциональные мутации в гене LIF могут играть существенную роль в этиологии бесплодия у женщин с нарушением репродуктивной функции неясного генеза, однако они встречаются нечасто, поэтому рутинный скрининг мутаций и полиморфизмов LIF у таких женщин не оправдан из-за низкой распространённости генных изменений [105].

Влиянию генных мутаций LIF у женщин с различными причинами бесплодия на исходы лечения было посвящено ретроспективное исследование Novotný Z. с соавторами [104]. Анализируя данные 15 бесплодных женщин с однонуклеотидным полиморфизмом (переход азотистых оснований гуанина в аденин), авторы утверждают, что у мутации - положительных женщин с идиопатическим бесплодием и эндометриозом отмечается негативный исход при лечении методом ЭКО. Другие исследователи при изучении потенциального участия мутаций гена LIF в неудачных попытках имплантации выявили, что у женщин с необъяснимым бесплодием и с повторными неудачными попытками имплантации после лечения ЭКО не подтверждена гипотеза о том, что мутации гена LIF могут снижать биологическую активность LIF в эндометрии и вызвать неудачу имплантации [35, 103, 105].

На сегодняшний день немало работ посвящается внедрению новых разработанных методов диагностики в рутинную клиническую практику. Сеидова Л.А. констатировала, что у женщин с бесплодием и повторными неудачными попытками ЭКО в анамнезе снижена концентрация LIF и LIF-R в цервикальной слизи (ЦС), а также их экспрессия в эндометрии при ИГХ. Автор утверждает, что определение концентрации LIF и LIFR в ЦС возможно использовать в качестве неинвазивного метода оценки имплантационного потенциала эндометрия [22].

Таким образом, анализируя вышеизложенное, можно сделать заключение, что поиск новых методов диагностики нарушения репродуктивной функции у женщин, приобретающего всё большие масштабы, позволит скорректировать методы лечения и снизить долю бесплодных пар, что имеет высокое медико-социальное значение. В настоящее время в некоторых случаях определить точную причину бесплодия не удаётся даже после комплексного обследования пациентов, но не стоит сбрасывать со счетов генетический фактор бесплодия.

Важность проблемы связана с тем, что до сих пор наличие врождённых и приобретённых мутаций в генах, влияющих на фертильность, а также определение маркёров бесплодия остаётся недостаточно изученными в условиях постоянно обновляющихся данных о новых генах и их свойствах. В этой связи

перспективными направлениями на данный момент являются исследования, направленные на обнаружение новых генетических маркёров бесплодия.

## ГЛАВА 2. ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Дизайн исследования

В клинике акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирёва на кафедре акушерства и гинекологии №1 Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского с 2018 по 2021 годы в рамках проводимого исследования было проведено обследование и лечение 142 пациентки в возрасте от 18 до 49 лет (средний возраст  $35 \pm 4,2$  лет), включающее женщин как с нарушением репродуктивной функции, так и без него. Преобладающей жалобой у женщин, у которых на момент обращения были выявлены признаки внутриматочной патологии (группа I  $n=66$  и группа II  $n=40$ ), стало отсутствие наступления беременности при регулярной половой жизни без использования контрацептивных средств. Для достоверности полученных данных был проведён расчет минимальной необходимой выборки пациентов в группах и использованы методы современного статистического анализа. Для оценки прогностической значимости генетических маркёров были сформированы исследуемые группы.

Для выполнения поставленных задач проведено исследование, в которое были включены пациенты, соответствовавшие критериям включения:

- наличие подписанного информированного согласия;
- наличие нарушения репродуктивной функции для пациенток I и II групп;
- невынашивание беременности или одна и более повторные неудачи имплантации для пациенток II группы;
- возраст участниц 18 до 49 лет;
- нормогонадотропное нормопролактинемическое состояние,
- овуляторный менструальный цикл;
- наличие патологии полости матки в момент обращения;

- ИМТ <30кг/м<sup>2</sup>.

Критерии включения в контрольную группу:

- подписанное информированное добровольное согласие,
- репродуктивный возраст 18—49 лет,
- доброкачественными заболеваниями матки;
- отсутствие нарушений репродуктивной функции в анамнезе;
- отсутствие необходимости в планировании беременности на момент проводимого исследования.

Критерии исключения для всех пациенток:

- аномалии развития органов уrogenитального тракта;
- злокачественные опухоли в анамнезе и/или в настоящее время;
- гормон-продуцирующие опухоли в анамнезе и/или в настоящее время;
- наличие инфекционно-воспалительного процесса органов женской репродуктивной системы на момент проводимого оперативного лечения;
- субмукозный тип миомы матки, включая интрамуральные узлы, выступающие в полость матки как более, так и менее 50% (0-2 типы по классификации FIGO 2011г.);
- гибридный тип миомы матки (по классификации FIGO 2011г.);
- эндометриоз;
- прием препаратов половых гормонов менее чем за 3 мес до включения в исследование соматические заболевания в стадии декомпенсации или нестойкой ремиссии;
- системные аутоиммунные заболевания (за исключением аутоиммунного тиреоидита при эутиреозе).

## **2.2. Общая клиническая характеристика больных**

Клиническая часть работы проводилась в гинекологическом отделении Клиники акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирёва.

Исследование было одобрено комиссией по этике ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

В соответствии с целью нашей работы, все пациентки на основании жалоб были разделены на три группы. В первую группу были включены 66 женщины с первичным бесплодием в возрасте от 26 до 42 лет (средний возраст  $33 \pm 0,5$  лет). Вторую группу составили 40 пациенток в возрасте от 22 до 48 лет (средний возраст  $36 \pm 0,5$  лет) со вторичным бесплодием. Третью группу составили 36 женщин в возрасте от 27 до 45 лет (средний возраст  $35 \pm 0,5$  лет), с наличием доброкачественных заболеваний полости матки и не предъявляющих жалоб на отсутствие беременности. Важно заметить, что часть этих пациенток имела беременности в прошлом, у части пациенток беременностей не было и вопрос деторождения для них был неактуальным на момент обращения. Пациенток этой группы мы расценивали как контрольную группу по отношению к пациенткам с бесплодием.

В ходе проведённого исследования были проанализированы факторы риска у каждой пациентки, собран семейный, аллергический и соматический анамнез, а также оценена предрасположенность к развитию патологии со стороны женских репродуктивных органов.

При сборе гинекологического анамнеза особое внимание уделялось оценке менструальной функции, которая состояла из уточнения возраста наступления первой менструации, характера её становления, регулярности, продолжительности и объёма менструальной кровопотери, а также наличия или отсутствия сопутствующего болевого синдрома. Было уделено особое внимание изменению характера менструального цикла после проведения различных гинекологических вмешательств, родов, прерываний беременности или неудачных её попыток, а также истории развития бесплодия и наличия сопутствующей внутриматочной патологии.

При соматическом обследовании был определён тип телосложения и состояние молочных желёз.

Специализированное акушерско-гинекологическое обследование включало

оценку состояния вульвы и внутренних половых органов. При проведении двуручного бимануального влагалищно-абдоминального исследования определено состояние матки и её придатков.

### **2.3. Методы исследования**

Проводилось подробное изучение анамнеза, полное клиничко-лабораторное обследование, бимануальное влагалищно-абдоминальное исследование. Специализированные методы лабораторной диагностики включали микроскопическое исследование мазков отделяемого наружных половых органов, цитологическое исследование соскобов из эндоцервикса и экзоцервикса, микробиологическое исследование содержимого влагалища и цервикального канала, морфологическое исследование образцов эндометрия. Инструментальные методы обследования включали ультразвуковое исследование органов малого таза в фолликулярную фазу на 5-7 день менструального цикла.

При сборе анамнеза особое внимание уделялось наследственной предрасположенности к развитию доброкачественных заболеваний матки. Принимая во внимание многочисленное количество факторов, приводящих к развитию внутриматочной патологии, уточнялись особенности нарушения со стороны эндокринной, сердечно-сосудистой, репродуктивной системы у ближайших родственников, а также наличие онкологических изменений желудочно-кишечного тракта.

Получали данные о перенесённых инфекциях в детстве, сопутствующей экстрагенитальной патологии, проведённых оперативных вмешательствах, травмах, гемотрансфузиях.

Гинекологический анамнез включал уточнение особенностей менструальной и репродуктивных функций, наличие беременностей и их исход. Учитывая наличие доброкачественной внутриматочной патологии у исследуемых пациенток, уточнялись длительность и особенности течения заболевания, а также проведённые гинекологические диагностические или лечебные манипуляции.

Объективный осмотр включал измерение роста-весовых показателей, индекса массы тела, а также оценку типа телосложения. Особое внимание уделялось оценке состояния молочных желёз.

Гинекологическое обследование включало оценку состояния наружных и внутренних половых органов. При осмотре в гинекологических зеркалах оценивалось состояние слизистых влагалища и шейки матки, наличие структурных изменений или сопутствующей патологии.

Проводилось двуручное бимануально-абдоминальное влагалищное исследование, где были определены размеры, форма и степень подвижности матки и её придатков.

У каждой пациентки производился забор отделяемого из влагалища для лабораторного обследования. Для микроскопического исследования биоматериал был собран ложкой Фолькмана или шпателем Эйра на предметные стекла. После высушивания мазки отправлялись в лабораторию, затем окрашивали одно стекло метиленовым синим, второе - по Грамму. После этого биоматериал исследовали под микроскопом.

Соскобы с использованием Cervix-Brush производились с поверхности влагалищной части шейки матки, из зоны трансформации и из нижней трети цервикального канала.

Биоматериал, собранный стерильным тампоном, помещали в пробирку с транспортной средой для проведения бактериологического исследования. Далее был произведён посев на общепринятые среды. Определение возбудителей половых инфекций в содержимом цервикального канала выявляли культуральным методом также на общепринятые среды с определением чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам.

С целью оценки состояния внутренних женских репродуктивных органов было проведено ультразвуковое исследование малого таза. Использовался ультразвуковой аппарат «Toshiba SSH-140A» с трансвагинальным конвексным датчиком с частотой 6,5 МГц. Всем пациенткам ультразвуковое исследование производилось до начала лечения на 5-7 день менструального цикла; при этом

оценивались положение матки, общие размеры тела матки, структура миометрия и полости матки, состояние шейки матки. Особое внимание уделялось изучению срединного маточного эха (М-ЭХО), представляющие собой отражение от эндометрия и стенок полости матки. При обследовании придатков матки определялись общие размеры яичников с учётом состояния фолликулярного аппарата и наличия желтого тела.

Гистологическое исследование тканей, полученных во время операции, проводилось в лаборатории патоморфологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова.

Биоматериал эндоцервикса и эндометрия фиксировали в спирте-формалине и буферном 10% нейтральном формалине. Взятый биоматериал обрабатывали с помощью гистологической проводки тканей фирмы «Pool Scientific Instruments» (Швейцария) и заливали в парафин. Суммарное время продолжительности фиксации материала, его проводки и заливки в парафин не превышало 1 суток. Для морфологического исследования с каждого блока проводили не менее 10 ступенчатых срезов. Депарафинизированные срезы толщиной 5мкм окрашивали гематоксилином и эозином или пикрофуксином по Ван-Гизону.

#### **2.4. Методы оперативного лечения**

Перед оперативным лечением всем пациенткам в рамках подготовки к нему проводилось клинично-лабораторное обследование в соответствии с Приказом МЗ от 20.10.2020 г. №1130н "Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи по профилю «акушерство и гинекология».

После обработки 5%-ным раствором йода наружных половых органов и внутренней поверхности бедер, шейку матки обнажали с помощью влагалищных зеркал и обрабатывали спиртом. Производили зондирование полости матки. Расширителями Гегара последовательно расширяли цервикальный канал, после чего через цервикальный канал в полость матки вводился гистероскоп. Оперативное лечение осуществляли с помощью жесткого гистероскопа диаметром 7,5 мм фирмы «Karl Storz» (Германия). В качестве жидкой среды использовали

0,9% раствор хлорида натрия.

Во время осмотра производили общий обзор, обращая внимание на величину и форму полости матки, рельеф стенок полости, состояние эндометрия, включая окраску, толщину, складчатость и характер сосудистого рисунка. Отдельно отмечали доступность визуализации и состояние устьев маточных труб.

В зависимости от выявленной патологии пациенткам проводилось оперативное лечение в объёме: гистероскопия, отдельное диагностическое выскабливание; гистероскопия, лазерная полипэктомия; гистероскопия, деструкция внутриматочных синехий. Пациенткам с внутриматочными синехиями, после их деструкции, производилась биопсия эндометрия для гистологического исследования.

## 2.5. Генетические методы исследования

Выделение нуклеотидных полиморфизмов генов сигнального пути TP53 производили в генетической лаборатории ООО «Аллель» и «БиоТех».

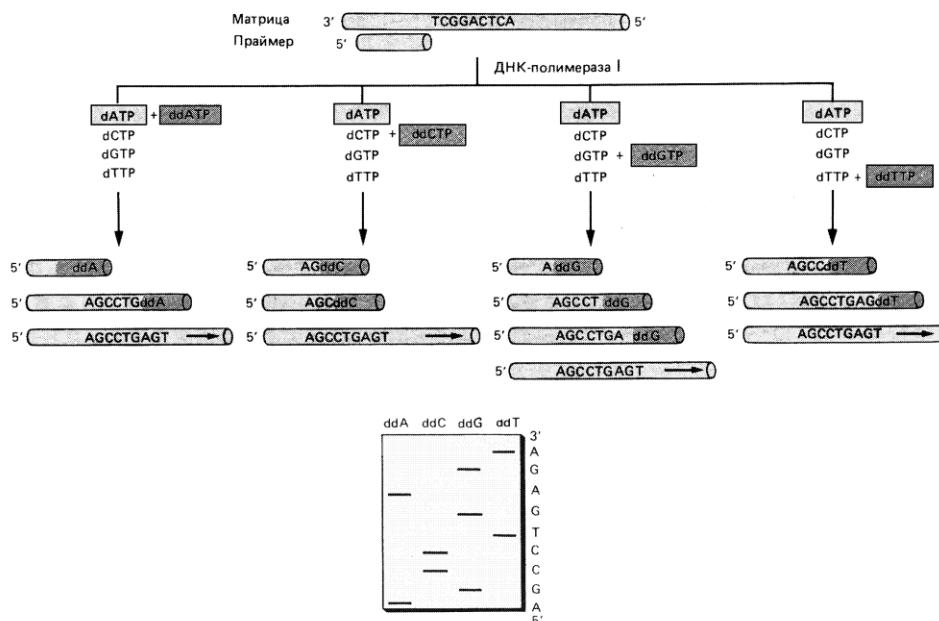


Рисунок 6 — Ферментативный метод секвенирования ДНК [4]

Генетическое исследование включало несколько этапов:

- Выделение геномной ДНК. В качестве биологического материала для выделения геномной ДНК использовались образцы ткани эндометрия. ДНК была выделена с использованием набора для выделения ДНК из широкого спектра биологических образцов, спин-колонки, diaGene (Диаэм, РФ). Чистоту выделенной ДНК проверяли на спектрофотометре NanoDrop OneC, соотношение A260/280 составляло от 1.8 до 1.91, соотношение A260/230 составляло от 1.62 до 2.28. Концентрацию ДНК измеряли с помощью набора dsDNA BR на флуориметре Qubit Flex. Концентрация составила от 15 до 300 нг/мкл, Концентрация всех образцов ДНК была доведена до 2 нг/мкл.

- Генотипирование ДНК. В области исследуемых полиморфных маркеров проводили методом секвенирования по Сэнгеру. Раствор с маркерами и праймерами распределили по четырём пробиркам, в каждую из которых были добавлены четыре разных dNTP и один из флуоресценто-меченных дидезоксинуклеозидтрифосфатов (ddNTP). Удлинение цепи праймера происходило до тех пор, пока не включится ddNTP. На этом месте синтез прерывается, в результате чего в каждой из пробирок образовывался уникальный набор отрицательно заряженных фрагментов разной длины, который заканчивался одним из меченых ddNTP. Дизайн праймеров осуществляли с помощью PrimerBlast.

- Секвенирование. Для реакции секвенирования использовали набор BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, секвенирование проводили на генетическом анализаторе 3500 (Thermo FS).

## **2.6. Общая характеристика пациенток**

В первую группу было включено 66 женщины с первичным бесплодием, во вторую – 40 женщин с вторичным бесплодием. Группа контроля состояла из 36 женщин, не предъявляющих жалобы на нарушения репродуктивной функции. Возраст всех обследованных пациенток распределился от 22 до 48 лет (средний

возраст  $35 \pm 4,2$  лет).

Распределение пациенток по возрасту представлено в таблице 2.

Таблица 2 — Распределение обследованных пациенток по возрасту

Возраст	I группа, n (%)	II группа, n (%)	III группа, n (%)
21 - 30 лет	24 (36,3%)	4 (10%)	8 (22,2%)
31 - 40 лет	36 (54,5%)	30 (75%)	24 (66,7%)
41 – 50 лет	6 (9%)	6 (15%)	4 (11,1%)
Всего	66 (100%)	40 (100%)	36 (100%)
Примечание: * P > 0,05			

Анализ таблицы 2 показал, что во всех трёх группах отмечалось наибольшее количество пациенток в возрасте 31- 40 лет: более половины в I группе (54,5%), во II группе – 30 (75%), в III группе – 24 (66,7%). В возрастной группе 21-30 лет преобладали пациентки с первичным бесплодием, в группе 41-50 лет показатели распределились поровну между первичным (6; 9%) и вторичным бесплодием (6;15%).

Клинико-anamnestическая оценка позволила выявить отсутствие статистически значимых различий между группами по оценке менструальной и репродуктивной функции (возраст менархе, длительность менструаций и всего менструального цикла). После формирования исследуемых групп обратило на себя внимание, что среди пациенток второй группы чаще встречались женщины с избыточной массой тела и ожирением по сравнению с первой. Пациентки с первичным бесплодием чаще всего поступали в клинику с диагнозом полип эндометрия, пациентки со вторичным бесплодием поступали в клинику с диагнозом гиперплазия и/или полип эндометрия, внутриматочные синехии и хронический эндометрит.

Перед оперативным лечением всем пациенткам в рамках подготовки к

оперативному лечению проводилось клинико-лабораторное обследование в соответствии с Приказом МЗ от 20.10.2020 г. №1130н "Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи по профилю «акушерство и гинекология».

Пациентки после проведенного вмешательства находились в стационаре 1-2 койко-дня, выписывались в удовлетворительном состоянии для продолжения назначенной терапии в амбулаторных условиях.

Всем пациенткам в послеоперационном периоде назначали комплексную противовоспалительную, ангиопротекторную, антигипоксическую терапию, при наличии определенных показаний – антибактериальную и гормональную терапию.

## **2.7. Статистические методы и анализ исследования**

При анализе анамнеза и объективного осмотра всех пациенток в проводимом исследовании мы пришли к выводу, что возраст и антропометрические параметры в группах подчинялись закону нормального распределения ( $p > 0,05$ ) на основании критерия Колмогорова–Смирнова. Для достоверности полученных данных оценка нормальности распределения проводится при достаточно большом объеме выборке ( $n \geq 50$ ) и в нашей работе данное условие соблюдено. Однако следует отметить, что в группе пациенток со вторичным бесплодием ( $n=40$ ) и в контрольной группе ( $n=36$ ) количество пациенток не позволяет использовать параметрические критерии. Поэтому принимая во внимание небольшой объем выборки для каждой из групп, мы применяли здесь и далее непараметрические методы расчета (таблицы 3 и 4).

Тест Манна–Уитни не выявил статистически значимых различий по возрасту, характеру менструальной функции (возраст менархе, длительность менструального цикла, продолжительность менструации). Основным показателем, который продемонстрировал статистически значимое отличие стал ИМТ  $> 25$  кг/м<sup>2</sup> - у пациенток с вторичным бесплодием он был выше, кроме того, в контрольной группе не было пациенток с внутриматочными синехиями и хроническим эндометритом.

Для расчета статистической значимости разницы в частотах встречаемости использовались точный двусторонний тест Фишера и критерий Хи-квадрат. Статистические расчеты проводились по доминантной модели (идентификация аллеля риска) и рецессивной модели (идентификация генотипа риска). Далее для групп, где были обнаружены значимые различия, были рассчитаны отношения шансов (ОШ), 95% доверительный интервал и критерий статистической значимости P.

Таблица 3 — Клинико-анамнестическая характеристика пациенток

Анализируемый показатель	Первичное бесплодие (n=66)	Вторичное бесплодие (n=40)	Контрольная группа (n=36)
Возраст менархе	13,2±1,5	12,7±1,4	13,1±1,4
Менструальный цикл	26-34	27-35	26-35
Длительность менструации	4-6	3-6	4-6
ИМТ до 25кг/м <sup>2</sup>	22	9	15
ИМТ > 25 кг/м <sup>2</sup>	11	11	3
Полип эндометрия	19	8	9
Гиперплазия эндометрия	13	4	9
Внутриматочные синехии, хронический эндометрит	2	8	---
Попытки ЭКО в анамнезе	6	8	---
Примечание: P > 0,05			

Для удобства расчета разницы между группами определяли две группы с учетом каждого полиморфизма: 1) пациентки с первичным бесплодием; 2)

пациентки со вторичным бесплодием. Статистический анализ производился с применением программы SNPStats software.

Таблица 4 — Доброкачественные заболевания эндометрия пациенток, включённых в исследование

Изучаемая нозология	В том числе по группам		
	1-я (n=66)	2-я (n=40)	3-я (n=36)
Полип эндометрия	38 (58%)	12 (30%)	26 (72,2%)
Гиперплазия эндометрия	22 (33,3%)	8 (20%)	10 (28%)
Внутриматочные синехии	4 (6%)	16 (40%)	0
Хронический эндометрит	2 (3%)	4 (10%)	0
Примечание: P >0,05			

Таким образом, в проводимом нами исследовании были проанализированы пациентки с сочетанием первичного или вторичного бесплодия с доброкачественной патологией матки. В контрольной группе были исследованы женщины только с внутриматочной патологией, при этом пациентки с внутриматочными синехиями и хроническим эндометритом среди них отсутствовали.

Многофакторный генез развития бесплодия и сложный каскад молекулярно-генетических взаимодействий между сигнальными путями, участвующих в процессе имплантации, требует дальнейшего изучения на больших выборках.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

### 3.1. Клиническая характеристика I группы

I группу составили 66 пациенток с первичным бесплодием в возрасте от 26 до 45 лет, у которых в результате проведённого исследования было определены генетические полиморфизмы генов сигнального пути TP53. Средний возраст пациенток составил  $35,5 \pm 1,01$  лет.

К моменту проводимого исследования продолжительность заболевания у обследуемых пациенток составила от 1 года до 10 лет, что в среднем составило  $4,4 \pm 1,2$  года.

Таблица 5 — Продолжительность бесплодия у пациенток I группы

Продолжительность	n (%)
1 - 2 года	28 (42,4)
2 - 5 лет	26 (39,4)
5 - 10 лет	8 (12,1)
$\geq 10$ лет	4 (6,1)
Всего	66 (100)

Таким образом, продолжительность бесплодия до 2-х лет встречалась в 42,4 % случаев, до 5 лет - в 39,4 % случаев, до 10 лет в 12,1 % случаев. Необходимо отметить, что только у 4 пациенток (6,1%) длительность заболевания составила более 10 лет (таблица 5).

При анализе жалоб пациенток I группы было отмечено, что ключевой жалобой было отсутствие наступления беременности в течение одного года и более при регулярной половой жизни без использования средств контрацепции (66;

100%). Также пациенток с сочетанием бесплодия и гиперплазии эндометрия преимущественно беспокоили периодические тянущие боли внизу живота, возникающие спонтанно, длящиеся не более 48 ч, без иррадиации в другие области и купируемые приёмом анальгетической терапии (32; 48,4%). При сочетании бесплодия с полипом эндометрия количество пациенток было схожим (28; 42,4% соответственно). Нарушения менструального цикла в большинстве случаев отмечали женщины также при сочетании бесплодия и полипа эндометрия и при сочетании бесплодия с гиперплазией эндометрия (56; 84% и 50; 76%). Отсутствие жалоб отмечали пациентки при сочетании бесплодия и полипа эндометрия и при бесплодии и внутриматочных синехиях – по 24 (36,3%).

При сборе анамнеза, было установлено, что среднее время наступления менархе составляло  $12 \pm 1,3$  лет. В 12-13 лет менструации начались у 40 пациенток, что составило 60,6%, в 14-15 лет у 6 пациенток (9%), в 16 лет – у 2 женщин (3%), а до 12 лет – у 18 пациенток (27,2%) (таблица 6). К 16 годам все пациентки имели регулярный характер менструального цикла.

Таблица 6 — Возраст менархе у пациенток I группы

Менархе	N	%
10-11 лет	18	27,2
12-13 лет	40	60,6
14-15 лет	6	9,0
16 лет	2	3,0
Всего	66	100

В ходе клинической оценки особое внимание уделялось экстрагенитальной патологии. Была проанализирована частота сопутствующей соматической патологии и инфекционных заболеваний в репродуктивном возрасте (таблица 7).

Наиболее часто встречались аллергические реакции (39,3%), заболевания дыхательной системы (45,4%) и заболевания эндокринной системы (45,4%).

Таблица 7 — Структура и частота соматической патологии в I группе

Соматическая патология у пациенток I группы (n=66)	n	%
Аллергические реакции	26	39,3
Заболевания желудочно-кишечного тракта	16	24,2
Сердечно-сосудистые заболевания	4	6,0
Заболевания дыхательной системы	30	45,4
Заболевания мочевыделительной системы	10	15,1
Заболевания эндокринной системы	30	45,4

Структуру заболеваний дыхательной системы составляли хронический бронхит, хронический ларингит, хронический тонзиллит. Патология эндокринной системы включала заболевания щитовидной железы и нарушения углеводного и жирового обмена. Данные анализа эндокринной патологии подтверждают ее высокую частоту встречаемости у пациенток с нарушением репродуктивной функции.

Заболевания желудочно-кишечного тракта были представлены такими нозологиями, как хронический гастрит, хронический дуоденит, хронический холецистит, желчнокаменная болезнь, и составляли 24,2%.

В ходе исследования было выявлено 4 случая (6,0%) врождённых пороков сердечно-сосудистой системы.

Заболевания мочевыделительной системы выявились в 15,1% случаев. Их структуру составили: хронический цистит, хронический пиелонефрит, мочекаменная болезнь.

Средний возраст начала половой жизни составил  $20 \pm 6,9$  (от 15 до 32 лет).

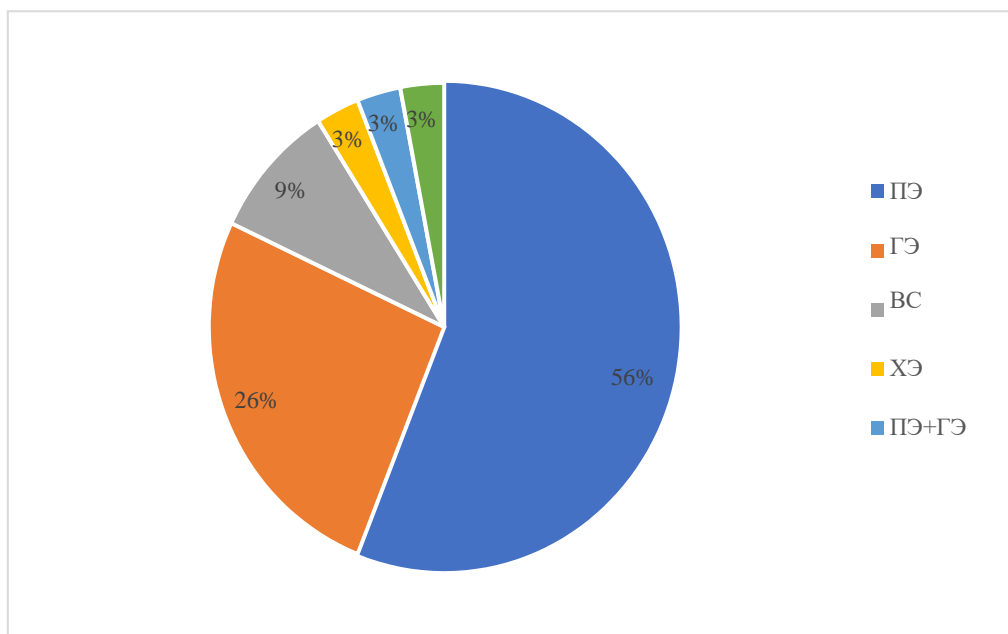


Диаграмма 1 — Клиническая характеристика пациенток I группы

Подробному анализу были подвергнуты сопутствующие доброкачественные заболевания матки (диаграмма 1), относящиеся к факторам, влияющим на формирование нарушений репродуктивной функции у женщин. В проводимом нами исследовании структура распределения сочетанной патологии и первичного бесплодия представляла собой следующие показатели: сочетание бесплодия и полипа эндометрия было представлено в большинстве случаев (56%). Комбинация бесплодия и гиперплазии эндометрия были отмечены в 26% случаев. Внутриматочные синехии и первичное бесплодие определялись у 9% из общего количества пациенток I группы. Сочетание бесплодия с хроническим эндометритом были выявлены у 3% женщин.

### 3.2. Клиническая характеристика II группы

В группу II были включены 40 пациенток с имеющимися беременностями в анамнезе, однако на момент исследования зачатие не наступало в течение одного года и более при регулярной половой жизни без использования средств контрацепции. Средний возраст обследованных пациенток составил  $34,7 \pm 4,0$  лет.

Продолжительность заболевания составила от 1 года до 10 лет, в среднем

составляла  $4,4 \pm 1,2$  года.

Таблица 8 — Продолжительность бесплодия у пациенток II группы

Продолжительность	n (%)
1 - 2 года	26 (65)
2 - 5 лет	8 (20)
5 - 10 лет	4 (10)
$\geq 10$ лет	2 (5)
Всего	40 (100)

Продолжительность нарушения репродуктивной функции во II группе преобладало течение 1-2 лет (65% случаев), от 2 до 5 лет - в 20% случаев, до 10 лет - в 10 % случаев. Необходимо отметить, что в исследовании участвовала только одна женщина с длительностью вторичного бесплодия более 10 лет (5%). Вышеуказанные данные представлены в таблице 8.

Оценка жалоб, полученных при сборе анамнеза у пациенток II группы, показал, что нарушение менструального цикла чаще всего отмечали пациентки с сочетанием вторичного бесплодия и полипа эндометрия (18;45%). Периодические тянущие боли внизу живота, возникающие спонтанно, длящиеся не более 48 ч, без иррадиации в другие области и купируемые приёмом анальгетической терапии тоже чаще всего беспокоили женщин с сочетанием бесплодия и полипа эндометрия (14;35%). Только по 4 пациентки (10% случаев) не предъявляли жалоб как при сочетании бесплодия и полипа эндометрия, так и при сочетании бесплодия и внутриматочных синехий (4;10%) и бесплодия и хронического эндометрита (4;10%).

Среднее время наступления менархе составляло  $12 \pm 2,1$  лет. У большинства пациенток менструальный цикл начался в возрасте 12-13 лет (50%). В возрасте 10-11 лет менструации начались у 14 пациенток, что составило 35% от общего количества. У троих пациенток возраст менархе был в 14-15 лет, что равнялось 15%.

Таблица 9 — Возраст менархе у пациенток II группы

Менархе	N	%
10-11 лет	14	35
12-13 лет	20	50
14-15 лет	6	15
16 лет	0	0
Всего	40	100

При клинической оценке пациенток II группы большое внимание уделялось экстрагенитальной патологии в репродуктивном возрасте (таблица 10). Проведенный анализ выявил, что у большинства женщин наблюдались заболевания эндокринной системы. Аналогично группе I, была выявлена высокая частота встречаемости у пациенток II группы аллергических реакций – 24 (60%).

Хронические заболевания дыхательной системы были преимущественно представлены хроническим тонзиллитом, хроническим бронхитом и хроническим риносинуситом.

Заболевания желудочно-кишечного тракта, представленные в большинстве случаев хроническим гастритом и гастродуоденитом, были отмечены у 8 пациенток, что составило 40%.

Среди патологии мочевыделительной системы преобладали хронические циститы и хронические пиелонефриты, которые были выявлены у трети обследованных – 12 (30%).

Различные клинические формы варикозной болезни составили 8 случаев (20%) среди обследованных женщин II группы.

Подробному анализу у пациенток подлежали доброкачественные заболевания матки, которые являлись основными факторами изменения морфофункциональной структуры эндометрия (диаграмма 2).

Таблица 10 — Структура и частота соматической патологии во II группе

Соматическая патология у пациенток II группы (n=40)	n	%
Аллергические реакции	24	60
Заболевания желудочно-кишечного тракта	16	40
Сердечно-сосудистые заболевания	8	20
Заболевания дыхательной системы	22	55
Заболевания мочевыделительной системы	12	30
Заболевания эндокринной системы	26	65

Согласно изученному гинекологическому анамнезу, самыми частыми заболеваниями в обследованной группе были полип эндометрия (в 42% наблюдений) и внутриматочные синехии (37% случаев). Кроме того, в группе пациенток встречались такие патологии, как гиперпластический процесс эндометрия и хронический эндометрит. Сочетание внутриматочных синехий и хронического эндометрита наблюдалось в 11% случаев. Схожие показатели были отмечены при сочетании полипа эндометрия и гиперплазии эндометрия и в случае изолированного гиперпластического процесса эндометрия – по 5% соответственно.

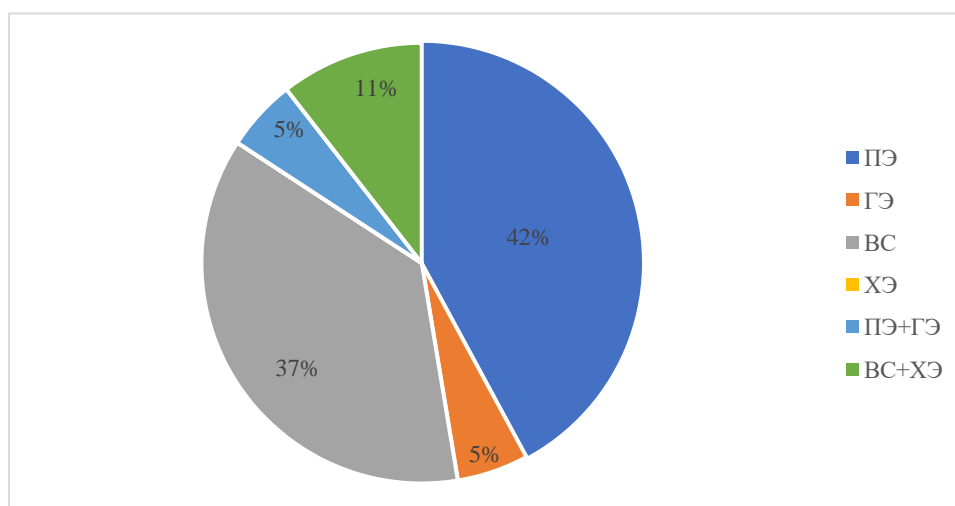


Диаграмма 2 — Клиническая характеристика пациенток II группы

У большинства пациенток группы II было проведено оперативное лечение в объеме гистероскопии, отдельного диагностического выскабливания по поводу

гиперпластических процессов эндометрия и полипа эндометрия.

### 3.3. Клиническая характеристика III группы

В ходе проведённого нами исследования было обследовано 36 пациенток, у которых не было жалоб на нарушение репродуктивной функции, но их обращение было связано с доброкачественными заболеваниями матки. Важно отметить, что на момент проведения исследования вопрос о наступлении беременности для пациенток группы III был неактуальным. Общее количество составило 36 человек в возрасте от 28 до 48 лет. Средний возраст пациенток составил  $35,8 \pm 6,4$  лет.

В ходе проведения клинической диагностики были выявлены гиперпластические процессы эндометрия у 28 пациенток, что составило 78%, и полип эндометрия у 20 пациенток (56%).

Среднее время наступления менархе в контрольной группе составило  $12 \pm 1,1$  лет. У наибольшего количества пациенток менструации начались в 12-13 лет, что соответствовало 44,4%, и поддерживало общую тенденцию вместе с обследованными I и II групп.

Таблица 11 — Возраст менархе у обследованных III группы

Менархе	N	%
10-11 лет	14	39
12-13 лет	16	44,4
14-15 лет	4	11,1
16 лет	2	5,5
Всего	36	100

Экстрагенитальная патология в контрольной группе преобладала в виде заболеваний дыхательной системы (67%). В структуре заболеваемости были отмечены: хронический бронхит, хронический тонзиллит, хронический риносинусит и хронический гайморит (таблица 12).

Основную структуру заболеваний эндокринной системы (56%). составили гипотиреоз, нарушение жирового и углеводного обмена, инсулинорезистентность.

В половине случаев (50%) в ходе анализа анамнеза были отмечены заболевания мочевыделительной системы, представленные хроническими нарушениями почек и мочевого пузыря.

Таблица 12 — Структура и частота соматической патологии в III группе

Соматическая патология у пациенток III группы (n=36)	n	%
Аллергические реакции	18	50
Заболевания желудочно-кишечного тракта	8	22,2
Сердечно-сосудистые заболевания	2	6
Заболевания дыхательной системы	24	67
Заболевания мочевыделительной системы	18	50
Заболевания эндокринной системы	20	56

Средний возраст начала половой жизни составил  $19 \pm 4,2$  (от 15 до 25 лет).

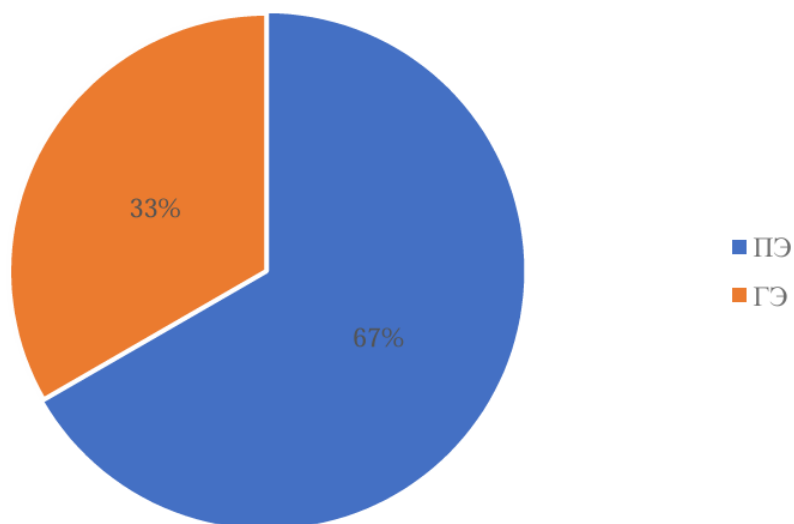


Диаграмма 3 — Клиническая характеристика пациенток III группы

В контрольной группе доброкачественные заболевания матки были распределены исключительно между полипом эндометрия (67%) и гиперплазией эндометрия (33%). Данные представлены на диаграмме 3.

### **3.4. Результаты гистологического и морфогенетического методов исследования**

После проведенного хирургического лечения мы проанализировали данные гистологического и генетических исследований, представленных полиморфизмами генов сигнального пути TP53 в каждой группе (таблицы 13 и 14).

В группе пациенток с первичным бесплодием при гистероскопии был подтвержден диагноз полипа эндометрия в 38 случаях (57,4%), а гиперплазия эндометрия была подтверждена у 18 женщин, что составило 27,2%. Гистологические признаки хронического эндометрита и внутриматочных синехий были выявлены у 8 пациенток (12,1%). В одном случае (3%) был определен эндометрий фазы пролиферации, что соответствовало дню менструального цикла. Это косвенно может свидетельствовать о нарушении функции эндометрия при нормальном гистологическом заключении и требует дальнейшего изучения вопроса.

Большинство случаев у пациенток II группы по результатам гистологического исследования пришлось на полип эндометрия, который был подтвержден у 16 женщин, что соответствует 40% от общего количества пациенток в группе. Хронический эндометрит и фиброзная ткань (внутриматочные синехии) были определены в 14 случаях (35%). Гиперплазия эндометрия была установлена в единственном случае (1;5%), а эндометрий фазы пролиферации был определен у 8 женщин (20%).

Таблица 13 — Результаты гистологического исследования тканей эндометрия у всех обследуемых пациенток

Анализируемый показатель	Первичное бесплодие (n=66)	Вторичное бесплодие (n=40)	Группа контроля (n=36)
Гистологическое заключение			
Железисто-фиброзный полип	32 (48,4%)	12 (30%)	12 (33,3%)
Железистый полип	6 (9%)	4 (10%)	8 (22,2%)
Гиперплазия эндометрия без атипии	18 (27,2%)	2 (5%)	10 (28%)
Эндометрий фазы пролиферации	2 (3%)	8 (20%)	6 (17%)
Гистологические признаки хронического эндометрита	8 (12,1%)	14 (35%)	0
Примечание: P >0,05			

В контрольной группе основной патологией также стал полип эндометрия (20 случаев; 55,5%). Гиперплазия эндометрия была установлена у 10 пациенток (28%). В 6 случаях был определён эндометрий фазы пролиферации, что соответствует 17% от общего количества женщин в III группе.

Нами были проанализированы результаты генетического исследования образцов эндометрия пациенток всех групп (таблица 14).

Таблица 14 — Общие результаты генетического анализа образцов эндометрия

	Первичное бесплодие (n=66)	Вторичное бесплодие (n=40)	Группа контроля (n=36)
<i>LIF</i> rs41281637 (G/A)			
G/G	66 (100%)	40 (100%)	36 (100%)
<i>LIF</i> rs9292271 (T/G)			
T/T	22 (33,3%)	28 (70%)	18 (50%)
T/G	20 (30,3%)	10 (25%)	16 (44,4%)
G/G	24 (36,3%)	2 (5%)	2 (6%)
<i>MDM2</i> rs2279744 (T/G)			
T/T	18 (27,2%)	16 (40%)	18 (50%)
T/G	40 (61%)	18 (45%)	14 (39%)
G/G	8 (12,1%)	6 (15%)	4 (11,1%)
<i>MDM4</i> rs1563828 (A/G)			
A/A	16 (24,2%)	20 (50%)	14 (39%)
A/G	20 (30,3%)	16 (40%)	12 (33,3%)
G/G	30 (45,4%)	4 (10%)	10 (28%)
<i>TP53</i> rs1042522 (G/C)			
G/G	18 (27,2%)	16 (40%)	4 (11%)
G/C	34 (52%)	12 (30%)	28 (78%)
C/C	14 (21,2%)	12 (30%)	4 (11%)

В ходе проведённого исследования было выявлено, что *LIF* rs41281637 (G/A) в эндометрии определяется у всех 142 обследуемых пациенток как с нарушением репродуктивной функции, так и без него. При этом нами было отмечено, что результат генетического исследования *LIF* rs41281637 (G/A) не зависит от формы бесплодия, а также наличия или отсутствия доброкачественных заболеваний матки.

Необходимо отметить, что у всех обследованных пациенток был выявлен гомозиготный вариант гена G/G *LIF* rs41281637 (G/A) [16], в связи с чем из дальнейшего анализа полученных данных вышеуказанный полиморфизм был

исключён.

В первой группе при определении LIF rs9292271 (T/G) были выявлены случаи преимущественно с гомозиготным вариантом гена G/G 24 (36,3%), при этом определение гомозиготного варианта T/T и гетерозиготного варианта T/G было у 22 (33,3%) и 20 (30,3%) пациенток. Полученные данные представлены на диаграмме 4.

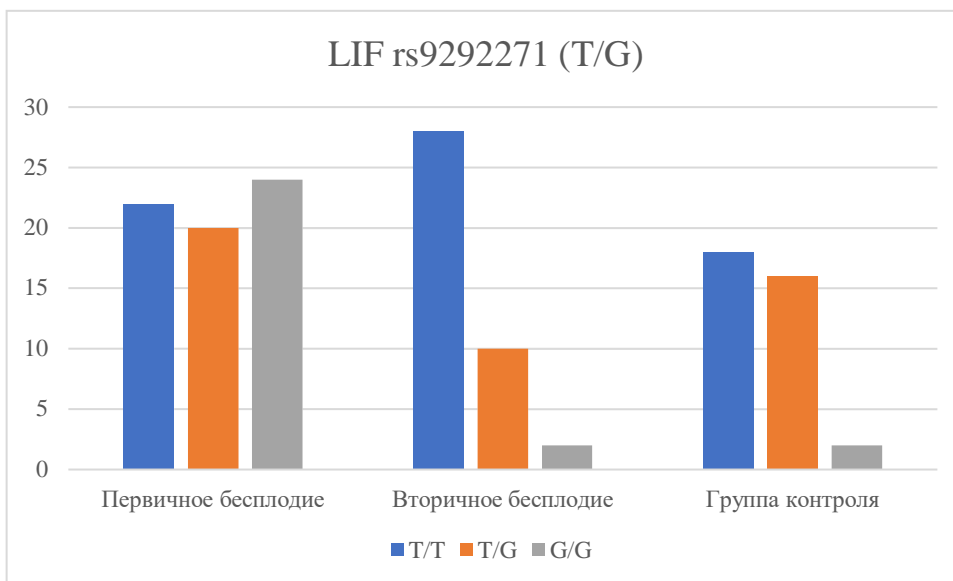


Диаграмма 4 — Результаты генетического исследования LIF rs9292271 (T/G) у обследуемых пациенток ( $p < 0,05$ )

Гетерозиготный вариант гена MDM2 rs2279744 был выделен у 40 пациенток (61%). Гомозиготные варианты гена MDM2 T/T и G/G выделены у 18 (27,2%) и 8 (12,1%) пациенток соответственно (диаграмма 5).

Гомозиготный (G/G) и гетерозиготные (A/G) варианты гена MDM4 rs1563828 определялись каждый менее чем в половине случаев – 30 (45,4%) и 20 (30,3%), в общем составляя 75,7% - 50 пациенток, при этом гомозиготный вариант A/A выделен у 16 (24,2%) женщин (диаграмма 6).

Гетерозиготный вариант TP53 rs1042522 определен у 34 пациенток (52%), тем временем гомозиготные варианты G/G и C/C выявлялись в 18 (27,2%) и 14 (21,2%) случаев. Стоит отметить, что в группе пациенток с вторичным бесплодием и в контрольной группе отмечались слабые взаимосвязи или их отсутствие между

гомозиготными нуклеотидными полиморфизмами по тем же генам (диаграмма 7).

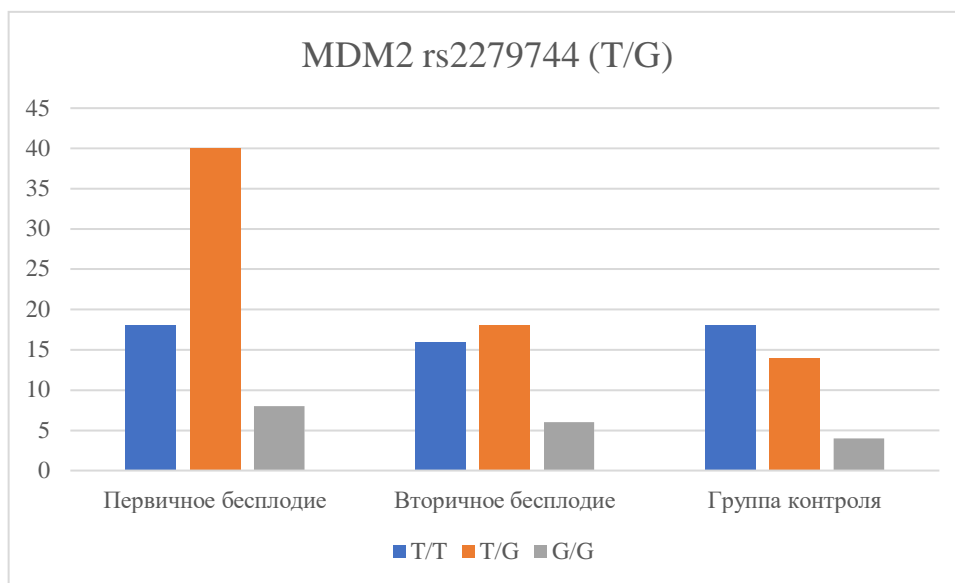


Диаграмма 5 — Результаты генетического исследования MDM2 rs2279744 (T/G) у обследуемых пациенток ( $p < 0,05$ )

Во второй группе из 40 пациенток с вторичным бесплодием при изучении полиморфизма генов гомозиготные варианты гена LIF rs9292271 выделены у 28 пациенток (70%) в случае варианта T/T и 1 (5%) пациентки в случае варианта G/G, в общем составляя 75% - 30 пациенток. В 10 (25%) случаях был выделен гетерозиготный вариант T/G гена LIF rs9292271 (диаграмма 4). При определении однонуклеотидных полиморфизмов гена MDM2 rs2279744 (T/G) было выявлено 18 случаев гетерозиготного варианта T/G (45%). Гомозиготные варианты гена MDM2 rs2279744 распределились следующим образом: 16 случаев варианта T/T (40%) и 6 случая G/G (15%) (диаграмма 5). Гомозиготный вариант гена MDM4 rs1563828 (A/A) определялся в половине случаев – 20 (50%), а на гетерозиготный вариант (A/G) пришлось 16 пациенток, что составило 40% (диаграмма 6). Гомозиготный вариант G/G гена был отмечен лишь у 4 (10%) пациенток с вторичным бесплодием. Большую часть при определении варианта гена TP53 rs1042522 (G/C) составил гомозиготный вариант гена – G/G (18; 27,2%), тогда как на количество женщин с гетерозиготным вариантом G/C и гомозиготным вариантом C/C распределилось поровну (по 12 случаев, составивших по 30% соответственно) (диаграмма 7).

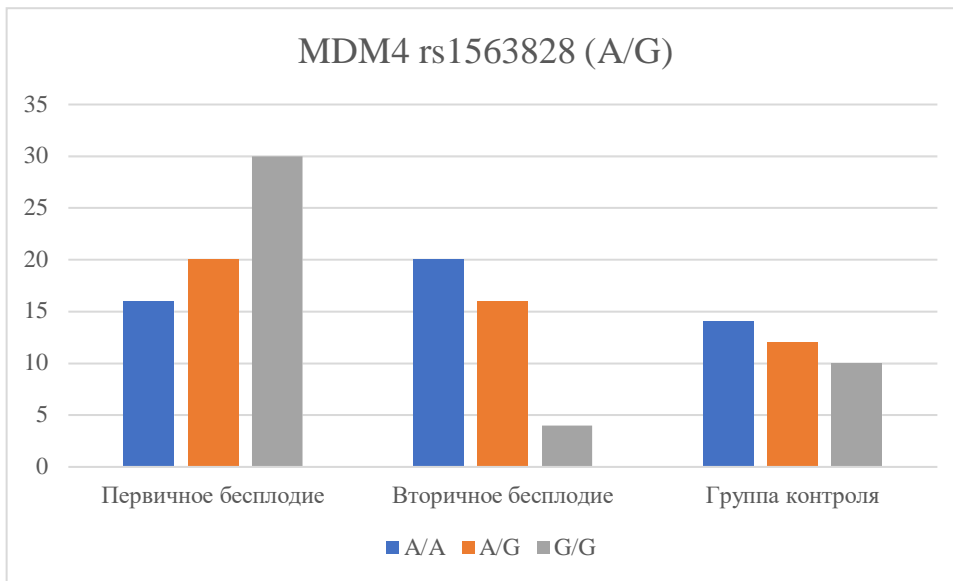


Диаграмма 6 — Результаты генетического исследования MDM4 rs1563828 (A/G) у обследуемых пациенток ( $p < 0,05$ )

Пациентки третьей (контрольной) группы из 36 женщин поступали в стационар с диагнозом гиперплазия или полип эндометрия, после оперативного лечения эти диагнозы были подтверждены гистологически. При анализе полиморфизма у всех пациенток также обнаружен LIF rs41281637 (G/A). Гетерозиготный вариант гена LIF rs9292271 (T/G) выделен у 16 пациенток (44,4%). Половина случаев была представлена гомозиготным вариантом гена (T/T) – 18 (50%) и только в 2 (6%) случаев был выделен гомозиготный вариант G/G гена (диаграмма 4). Гетерозиготный вариант гена MDM2 rs2279744 (T/G) определялся в 39% случаев ( $n=14$ ), а на гомозиготные варианты T/T и G/G пришлось 18 (50%) и 4 (11,1%) случаев (диаграмма 5).

При определении MDM4 rs1563828 (A/G) большинство случаев пришлось на гомозиготный вариант гена A/A - 14 (39%). В меньшем же количестве был выявлен другой гомозиготный вариант гена G/G - 10 (28%), а гетерозиготный вариант A/G был выделен у трети (12; 33,3%) пациенток контрольной группы (диаграмма 6). Гетерозиготный вариант гена TP53 rs1042522 (G/C) определён более чем в половине случаев – 28 (78%), в то время как выявляемость гомозиготных вариантов G/G и C/C распределилась поровну – по 4 случая (11%) каждый (диаграмма 7).

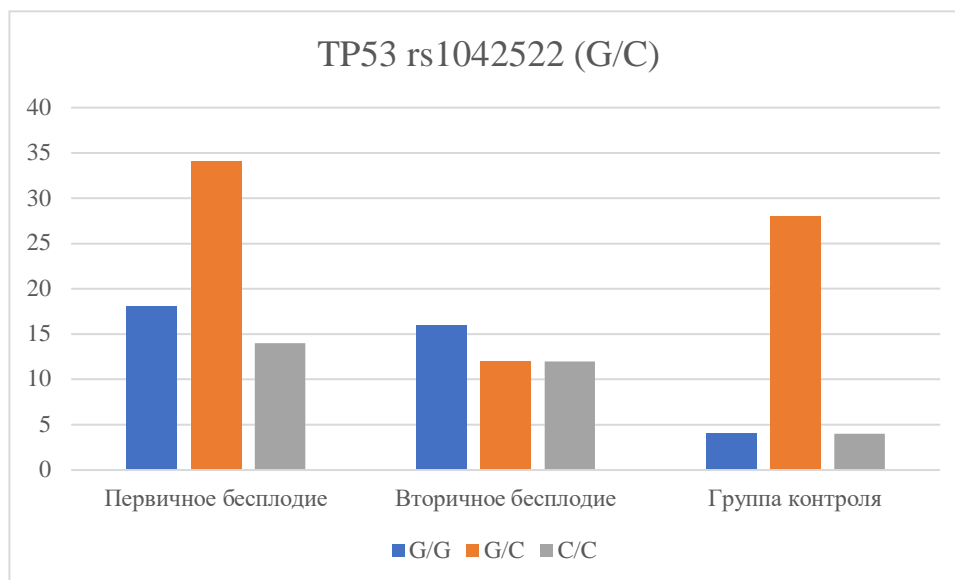


Диаграмма 7 — Результаты генетического исследования TP53 (A/G) у обследуемых пациенток ( $p < 0,05$ )

Таким образом, по результатам морфогенетического обследования было определено, что в группе пациенток с первичным бесплодием крайне высокие взаимосвязи продемонстрировали гетерозиготные варианты генов MDM2 rs2279744, MDM4 rs1563828, TP53 rs1042522, в то время как у группы пациенток с вторичным бесплодием и в контрольной группе отмечались слабые взаимосвязи или их отсутствие между гомозиготными нуклеотидными полиморфизмами по тем же генам.

Для более полного анализа полученных данных нами были определены однонуклеотидные полиморфизмы генов сигнального пути TP53 при различной внутриматочной патологии, которая может являться причиной маточного фактора бесплодия (диаграммы 8-9).

Выделение нуклеотидных полиморфизмов у пациенток с полипом эндометрия продемонстрировало наиболее показательные результаты у пациенток с первичным бесплодием. Наибольшая экспрессия была определена в гетерозиготных вариантах генов MDM2 rs2279744 (T/G) и TP53 rs1042522 (G/C) (диаграмма 8).

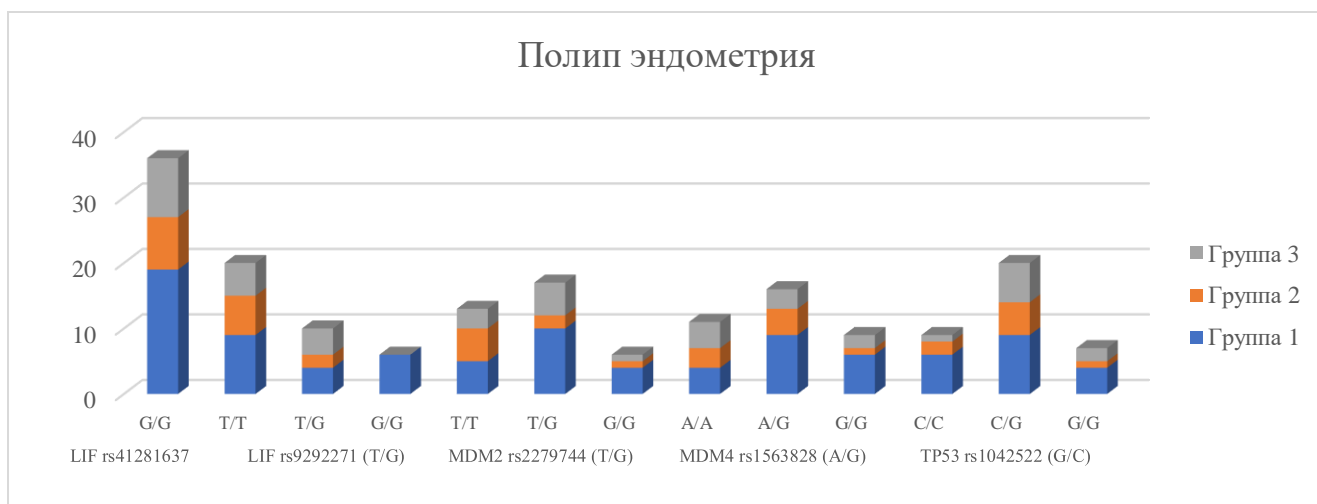


Диаграмма 8 — Распределение нуклеотидных полиморфизмов при полипе эндометрия ( $p < 0,05$ )

При выделении однонуклеотидных полиморфизмов у пациенток с гиперплазией эндометрия были получены следующие данные: наибольшая частота определения гетерозиготных аллелей отмечалась в группе пациенток с первичным бесплодием (MDM2 rs2279744 (T/G) и TP53 rs1042522 (G/C)), гомозиготный вариант гена MDM4 rs1563828 (A/G) преобладал также у пациенток в первой группе (диаграмма 9).

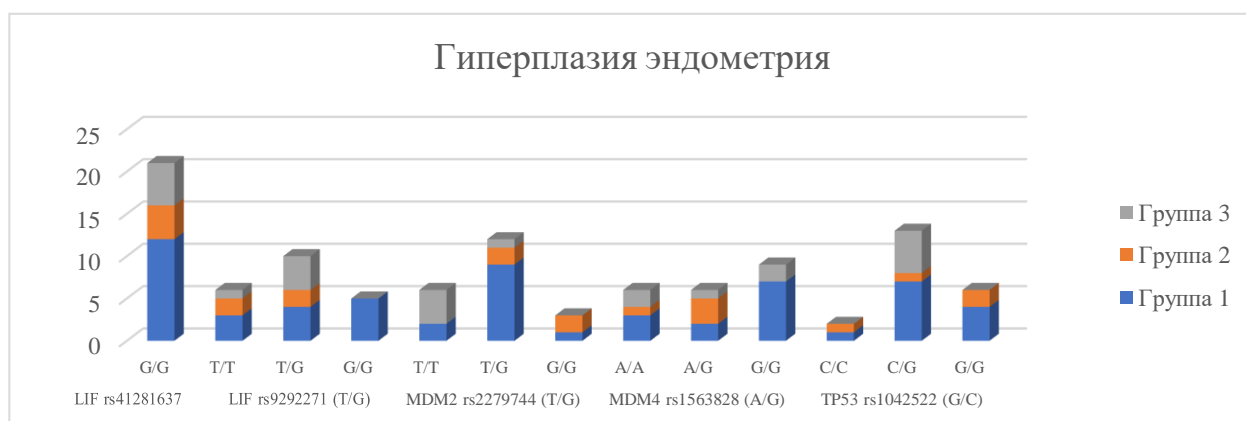


Диаграмма 9 — Распределение нуклеотидных полиморфизмов при гиперплазии эндометрия ( $p < 0,05$ )

Учитывая крайне малую выборку обследуемых пациенток как с внутриматочными синехиями, так и с хроническим эндометритом, достоверно судить о результатах генетического исследования биоматериала тканей эндометрия у них не представилось возможным, поэтому при указанных

состояниях необходимо проведение дальнейших исследований для определения однонуклеотидных полиморфизмов генов сигнального пути TP53.

Для определения достоверности полученных результатов была проведена статистическая обработка данных, по результатам которой сформирована корреляционная матрица (таблица 15). При её анализе получены следующие результаты: исследование генетических полиморфных вариантов продемонстрировало достоверную связь с первичным бесплодием двух генетических вариантов - rs929271 в гене LIF (OR= -0,357, P<0,01) и в гене MDM4 rs1563828 (OR= -0,29, P<0,05), а при вторичном бесплодии – с геном MDM2 rs2279744 (OR = 0,018, P<0,05). Ген фактора ингибирования лейкемии человека LIF, играющий ключевую роль в имплантации, является геном мишенью для белка p53. Мы также получили схожие данные, а именно — у всех 106 пациенток с бесплодием в образцах эндометрия выявлен минорный аллель G/G LIF rs41281637 (G/A). В нашей работе мы проанализировали полиморфизм генов MDM4 и MDM2, которые также играют важную роль в процессе имплантации, а кроме того, избыточно экспрессируются в различных злокачественных опухолях человека. Присутствие аллеля А в полиморфизме rs1563828 гена MDM4 увеличивает экспрессию кодируемого этим геном белка-супрессора p53. Ингибирование p53, в свою очередь, приводит к снижению количества LIF и вероятности имплантации. Полученные нами результаты свидетельствуют о связи полиморфизма гена MDM2 варианта T/G с первичным бесплодием и варианта T/T — с вторичным, полиморфизм гена MDM4 показывает связь варианта G/G с первичным бесплодием, а варианта A/A — с вторичным. При анализе полиморфизма гена TP53 обнаружена связь аллеля G/C с первичным бесплодием, а аллеля G/G — со вторичным (диаграмма 10). Полученные нами экспериментальные данные дополняют имеющиеся в настоящее время литературные и свидетельствуют о важном вкладе генетических полиморфизмов в генах сигнального пути TP53, LIF и MDM4 в развитие первичного, а MDM2 — вторичного бесплодия у женщин. При сравнении полиморфизма генов пациенток с бесплодием и пациенток контрольной группы, в последней не определяется полиморфизма генов, характерных для

первой и второй групп.

После обработки полученных нами данных статистически достоверная связь с вторичным бесплодием доказана у гомозиготного варианта Т/Т гена MDM2 (OR = 0,018, P<0,05).

Для подтверждения статистической взаимосвязи генетических полиморфизмов сигнального пути TP53 с бесплодием была проведена статистическая обработка с формированием регрессионной модели.

Таблица 15 — Корреляционная матрица

	возраст	беспл.	перв. беспл.	втор. беспл.	беремен.	мен.	ПЭ	ГЭ	BC	ХЭ	LIF_2	MDM2	MDM4	TP53
возраст	-													
бесплодие	-0,054	-												
первичное бесплодие	-0,245*	0,543***	-											
вторичное бесплодие	0,220	0,365**	-0,584***	-										
беремен.	-0,093	0,004	0,014	-0,012	-									
менархе	0,224	-0,041	0,060	-0,105	-0,191	-								
ПЭ	-0,162	-0,024	0,076	-0,107	-0,021	-0,081	-							
ГЭ	0,190	-0,073	0,106	-0,188	0,159	0,091	-0,444***	-						
BC	0,119	0,263*	-0,194	0,470***	-0,106	0,001	-0,484***	-	-					
ХЭ	-0,123	0,122	-0,055	0,180	-0,042	-0,011	-0,225	-0,113	0,466***	-				
LIF_2	0,042	-0,099	-0,357**	0,299*	-0,155	0,002	0,161	-	0,198	0,206	-			
MDM2	0,157	-0,141	-0,139	0,018	0,091	-0,160	-0,071	-0,006	-0,001	-0,096	0,041	-		
MDM4	-0,072	-0,049	-0,290*	0,274*	-0,015	-0,068	0,044	-	0,302*	-0,011	0,255*	0,164	-	
TP53	0,185	0,055	0,006	0,047	-0,015	-0,098	-0,130	0,097	0,189	0,187	-0,197	0,080	-0,027	-

Примечание: \* P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001

При изучении регрессионной модели по первичному бесплодию только с генами, положительный LIF rs9292271 (T/G) NG45 статистически значимо уменьшал его риск с отношением шансов 0,106 (95%ДИ 0,031-0,250; p<0,001), как и ген MDM4 - ОШ 0,305 (95%ДИ 0,250-2,5; p=0,887).

Для построения корреляционной матрицы в статистический анализ нами были включены клиничко-анамнестические данные (таблица 16), при анализе которых отмечено, что статистически значимым фактором, увеличивающий риск формирования бесплодия, является возраст - ОШ 0,83 (95%ДИ 0,71 – 0,96;

p=0,016).

Таблица 16 — Анализ клинико-анамнестических данных и генетических факторов у пациенток с бесплодием

Предиктор	Вес	SE	Z	p	Отношение шансов	95% доверительный интервал	
						Нижний	Верхний
константа	3,6144	3,1825	1,1357	0,256	37,1292	0,07258	18994,609
возраст	-0,1836	0,0765	-2,3997	0,016	0,8322	0,71632	0,967
менархе	0,3762	0,2382	1,5795	0,114	1,4567	0,91336	2,323
беремен-сть:							
1 – 0	-0,9136	1,6048	-0,5693	0,569	0,4011	0,01727	9,317
полип:							
1 – 0	1,1576	0,8551	1,3537	0,176	3,1823	0,59547	17,007
гиперплазия:							
1 – 0	0,7529	0,9551	0,7882	0,431	2,1231	0,32656	13,803
синехия:							
1 – 0	-0,1106	1,3126	-0,0843	0,933	0,8953	0,06834	11,729
эндометрит:							
1 – 0	0,7382	1,8987	0,3888	0,697	2,0922	0,05063	86,452
LIF rs9292271:							
1 – 0	-2,8406	1,0629	-2,6724	0,008	0,0584	0,00727	0,469
MDM2:							
1 – 0	0,9285	1,0087	0,9205	0,357	2,5307	0,35047	18,273
MDM4:							
1 – 0	-1,7515	0,7701	-2,2744	0,023	0,1735	0,03835	0,785
TP53:							
1 – 0	0,0916	0,7284	0,1257	0,900	1,0959	0,26285	4,569

Аналогичные закономерности были получены и при построении модели как с генетическими, так и с клинико-анамнестическими данными.

В матрице корреляций (диаграмма 12) можно отметить следующие статистически значимые связи:

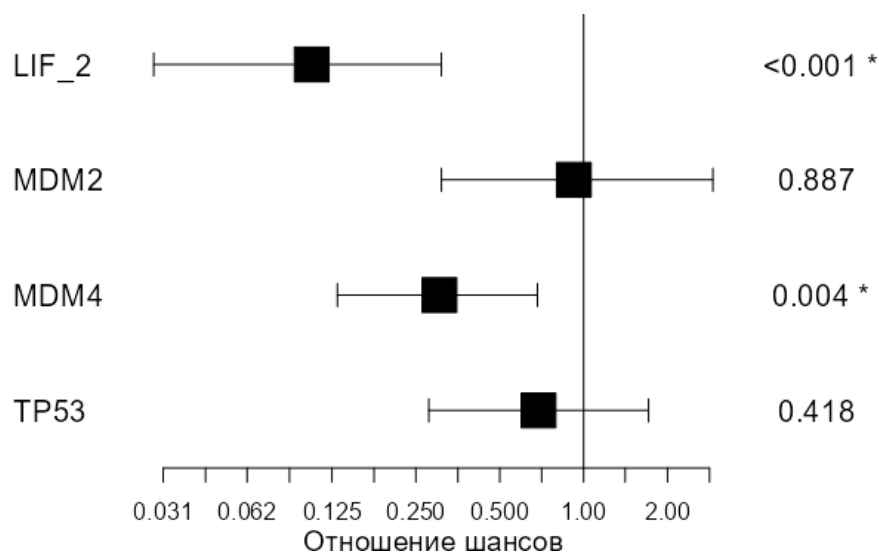
- отрицательная умеренная корреляция между гиперплазией эндометрия и геном MDM4, так как коэффициент корреляции находится в диапазоне от -0.40 или -0.69 ( $r = -0,48$  соответственно,  $p < 0,001$ );

- отрицательная умеренная корреляция между геном LIF rs9292271 (T/G) и первичным бесплодием ( $r = -0,67$ ,  $p < 0,001$ ), так как значение коэффициента корреляции находится в пределах от -0.40 или -0.69;

- отрицательная умеренная корреляция между первичным бесплодием и геном MDM4, так как коэффициент корреляции находится в диапазоне от -0.40 или -0.69 ( $r = -0,45$  соответственно,  $p < 0,001$ );

- положительная умеренная корреляция между вторичным бесплодием и геном MDM4, так как коэффициент корреляции находится в диапазоне от 0.40 до 0.69 ( $r = 0,53$  соответственно,  $p < 0,001$ ).

При статистическом анализе нами были просчитаны отношения шансов генетических факторов при бесплодии (диаграмма 10 и 11). У пациенток с первичным бесплодием ген MDM2 определился с ОШ 0,887 (95%ДИ 0,35-18,2733;  $p = 0,357$ ). При вторичном бесплодии наиболее значимые результаты были представлены при определении MDM2 с ОШ 0,78 (95%ДИ 0,35-18,2733;  $p = 0,357$ ) и TP53 с ОШ 0,304 (95%ДИ 0,26-4,5;  $p = 0,9$ ).



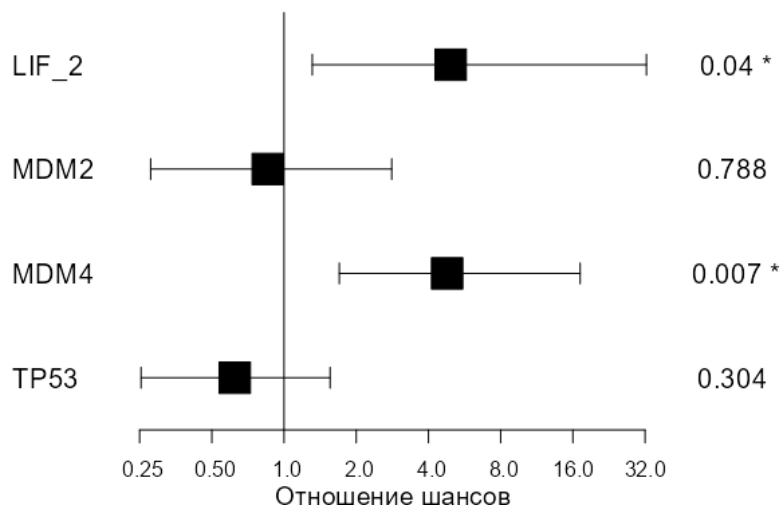
Примечание: \* $P < 0.05$ ; LIF\_2 - LIF rs9292271 (T/G) NG45

Диаграмма 10 — Отношения шансов при первичном бесплодии

Учитывая малую выборку пациенток в проводимом нами исследовании, показатели отношения шансов имеют широкий интервал значений.

При анализе корреляционной зависимости различных изучаемых нами

факторов отмечена слабая статистически достоверная связь наличия гиперплазии эндометрия с геном MDM4 при первичном бесплодии с ОШ 0,004 (95%ДИ 0,03-0,7;  $p=0,02$ ), тогда как с другими не генетическими факторами связи определяемых генетических маркеров не обнаружено.



Примечание: \* $P < 0.05$ ; LIF\_2 - LIF rs9292271 (T/G) NG45

Диаграмма 11 — Отношения шансов при вторичном бесплодии

Однако для более полной оценки и статистически достоверных выводов в дальнейшем необходимо проведение дополнительных исследований с большим количеством обследованных пациенток.

При анализе корреляционной зависимости изучаемых нами факторов при вторичном бесплодии статистически достоверной связи между наличием патологии эндометрия с определяемыми генами обнаружено при определении MDM2 ((95%ДИ 1,2-32,0;  $p=0,788$ ), а также TP53 (95%ДИ 0,25-1,5;  $p=0,3$ ).

Для определения значимости различных диагностических факторов для оценки состояния эндометрия, его рецептивности и прогнозирования успешной имплантации был проведен корреляционный анализ различных показателей.

В ходе проведённого анализа данных отмечается положительная корреляционная связь между вторичным бесплодием, а также ожирением и возрастом как факторами риска. Ожирение нарушает баланс с помощью различных прямых и косвенных механизмов. Можно предположить, что наличие индекса массы тела  $>25 \text{ кг/м}^2$  у пациенток с бесплодием за счёт эпигенетических факторов

может привести к изменениям на молекулярно-генетическом уровне. Фактически, избыток жировой ткани, с одной стороны, препятствует секреции и биодоступности половых гормонов, с другой стороны, способствует избыточной секреции лептина, инсулина и адипокинов, которые негативно действуют на центральном и периферическом уровнях, влияя на развитие и созревание фолликулов. В проведённом нами исследовании, подтверждая данные мировой литературы, определено, что избыточный вес или ожирение могут оказывать негативное влияние на качество и зрелость яйцеклеток, влияя тем самым на успешное преодоление бесплодия. Таким образом, чем выше индекс массы тела, тем больше вероятность перестройки генов, которые приведут к бесплодию. Данное предположение требует дальнейшего изучения и проведения клинических исследований.

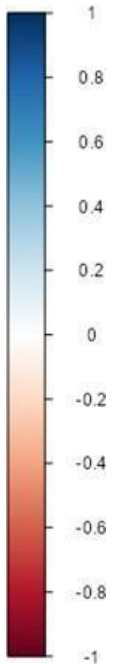
Таким образом, при проведении корреляционного анализа определены факторы, влияющие на развитие первичного или вторичного бесплодия. У пациенток обеих групп провоцирующим фактором, сопутствующим развитию бесплодия, стал возрастной фактор, при этом при вторичном бесплодии ещё отмечается статистически значимая взаимосвязь с увеличенным ИМТ пациенток (таблица 17).

Также следует отметить, что за время проводимого нами исследования были установлены случаи наступившей беременности у обследованных пациенток - у четырёх женщин (2,8%). Нужно подчеркнуть, что беременность во всех случаях наступила самопроизвольно после проведённого хирургического лечения по поводу маточного фактора бесплодия. Все пациентки были в возрасте от 31 до 35 лет (средний возраст  $33 \pm 2$  года). У шести из них было установлено бесплодие: двое с первичным, одна – с вторичным типом нарушения репродуктивной функции. Также беременность наступила у одной пациентки из контрольной группы [16]. Структура маточного фактора бесплодия распределилась поровну между гиперплазией эндометрия ( $n=4$ ) и полипом эндометрия ( $n=4$ ).

Таблица 17 — Корреляционный анализ

	берем.	менархе	ПЭ	ГЭ	синехии	эндометр.	возраст	ИМТ	первич. беспл.	вторич. беспл.	
LIF_2	-0,42 <sup>*</sup>	0,19	0,19	-0,28	0,08	0,26	0,13	0,38 <sup>***</sup>	-0,67 <sup>***</sup>	0,51 <sup>**</sup>	
MDM2	0,21	0,11	-0,38 <sup>*</sup>	0,26	0,15	0,14	0,32 <sup>**</sup>	0,02	0,03	-0,09	
MDM4	0,09	0,03	0,27 <sup>*</sup>	-0,48 <sup>***</sup>	0,5 <sup>**</sup>	-0,03	-0,23 <sup>*</sup>	0,27 <sup>**</sup>	-0,46 <sup>***</sup>	0,53 <sup>***</sup>	
TP53	-0,06	-0,14	-0,12	0,45 <sup>**</sup>	-0,09	0,28	0,17	-0,13	0	-0,24	
первич. беспл.	0,04	0,06	0,12	0,18	-0,37 <sup>**</sup>	-0,16	-0,27 <sup>***</sup>	-0,49 <sup>***</sup>	1	-0,92 <sup>***</sup>	
вторич. беспл.	-0,05	-0,12	-0,18	-0,38 <sup>**</sup>	0,73 <sup>**</sup>	0,45 <sup>*</sup>	0,22 <sup>***</sup>	0,94 <sup>***</sup>	-0,92 <sup>***</sup>	1	

Примечание: \* P <0,1, \*\*P <0,05, \*\*\*P <0,001



Таким образом, в проведённом нами исследовании были получены данные, подтверждающие изменения уровня экспрессии генов сигнального пути TP53 у пациенток с бесплодием и доброкачественными заболеваниями эндометрия. В зависимости от наличия или отсутствия беременности в анамнезе были определены наиболее информативные полиморфизмы, тогда как корреляции с наличием доброкачественных заболеваний матки выявлено не было.

В связи с вышеизложенным целесообразно говорить об информативности определения генетических маркёров в эндометрии у пациенток с первичным и вторичным бесплодием, что может явиться основанием для дальнейшего изучения сочетания внутриматочной патологии и генетических изменений сигнальных путей, участвующих в реализации репродуктивных процессов.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Бесплодие приобрело статус пандемии современного мира. Накапливаемый опыт при изучении причин женского бесплодия свидетельствует о том, что проблема остаётся всё ещё острой в современном мире.

Согласно данным проанализированной литературы, существует прямая корреляция между возрастом, ожирением и формированием нарушения репродуктивной функции. Прогрессирующее ухудшение репродуктивного здоровья населения, особенно повышение статистических показателей по ожирению, а также поздний возраст реализации репродуктивной функции позволяют признать проблему фертильности одним из приоритетных направлений в медицине. Появляется всё больше доказательств того, что ожирение ухудшает женскую фертильность и негативно влияет на репродуктивные результаты человека [41, 42, 48, 126, 146].

Результаты проведенного нами анализа позволяют сделать некоторые частные выводы, представляющие интерес для проведённого исследования. Изучение анамнеза заболевания и жизни обследованных нами пациенток позволило определить факторы риска возникновения доброкачественных заболеваний матки в каждом конкретном случае, которые привели впоследствии к формированию маточного фактора бесплодия. После формирования исследуемых групп было выявлено, что среди пациенток с вторичным бесплодием чаще встречались женщины с избыточной массой тела и ожирением по сравнению с группой женщин с первичным бесплодием. Основным показателем, который продемонстрировал статистически значимое отличие стал ИМТ  $>25$  кг/м<sup>2</sup> - у пациенток с вторичным бесплодием он был выше. Полученные данные подтверждают установленный на сегодняшний день факт о том, что у женщин с ожирением возникают проблемы с имплантацией яйцеклетки за счёт изменений на клеточном и молекулярно-генетическом уровнях.

Вышеуказанные данные подтверждают результаты работы Bala R. и

соавторов, в которой отмечена прямая зависимость между увеличением индекса массы тела (ИМТ) и увеличением частоты ановуляторных менструальных циклов, а также между неудачными попытками экстракорпорального оплодотворения [29, 41]. Помимо прочего, у женщин, страдающих ожирением, отмечается избыток свободных жирных кислот, который оказывает токсическое действие на репродуктивные ткани, приводя к повреждению клеток и хроническому слабо выраженному воспалительному процессу [36]. Вышеуказанные данные подтверждают Talmor A. и Dunphy B., демонстрируя различные маркёры, включая С-реактивный белок, интерлейкин-6 (ИЛ-6), фактор некроза опухоли-альфа (ФНО- $\alpha$ ), ингибитор активатора плазминогена (ИАПГ-1), обнаруженные у пациенток с ожирением, оказывают пагубное влияние на репродуктивный цикл [146].

Известно, что жировая ткань содержит особые иммунные клетки, а воспаление, вызванное ожирением, представляет собой хроническую воспалительную реакцию, вызванную избытком питательных веществ в метаболических клетках [167]. Адипоциты также вырабатывают адипокины, которые способствуют дополнительному высвобождению TNF- $\alpha$  и ИЛ-6. Хроническое воспаление также вызывает окислительный стресс из-за повышенной выработки активных форм кислорода, представляющие собой химически активные химические вещества, содержащие кислород, в основном включая супероксиданион ( $O_2^-$ ), гидроксильный радикал ( $\cdot OH$ ) и перекись водорода ( $H_2O_2$ ). Исследования показали, что избыток активных форм кислорода в яичниках подавляет созревание яйцеклеток, снижает качество яйцеклеток, вызывает апоптоз гранулярных клеток и ускоряет дегенерацию желтого тела [122, 155].

Провоспалительные цитокины и активные формы кислорода влияют на стероидогенез и овуляцию, приводя к изменению менструального цикла. Воспаление и окислительный стресс также нарушают мейотическое и цитоплазматическое созревание яйцеклетки, что снижает ее способность к оплодотворению и предимплантационному развитию эмбриона [142].

Анализ литературы показывает, что проблема влияния ожирения на фертильную функцию рассматривается достаточно широко. Как мы видим,

ожирение оказывает пагубное влияние на реализацию фертильной функции на клеточном уровне. В то же время влияние ожирения на молекулярно-генетическом уровне остается мало разработанным. К этим вопросам можно, прежде всего, отнести изменения в сигнальных путях, участвующих в реализации репродуктивной функции. Безусловно необходимо продолжать исследования, направленные на изучение изменений на молекулярно-генетическом уровне для подтверждения причинно-следственной связи между ожирением и фертильностью, чтобы дать представление о будущей профилактике и преодолении женского бесплодия у каждой конкретной пациентки. Ожирение связано со снижением репродуктивной функции, учащёнными случаями осложнений, увеличением количества повторных потерь беременностей. В связи с пандемией ожирения все большая доля женщин, обращающихся за медицинской помощью по поводу бесплодия, будут иметь избыточный вес или страдать ожирением. Ожирение вовлечено в патогенез синдрома поликистозных яичников (СПКЯ), примерно 40-70% пациенток с СПКЯ имеют избыточный вес или страдают ожирением.

С увеличением возраста реализации репродуктивной функции у пациенток снижается качество биологического материала, что впоследствии может стать причиной невынашивания беременности. Большинство авторов отводят обсуждению возраста одну из ведущих ролей в нарушении женской репродуктивной функции. Снижение фертильности женщин возникает в результате прогрессирующего снижения функции яичников, связанного с увеличением возраста. [46, 99, 120]. В научной литературе имеются данные о снижении функции яичников к концу репродуктивного периода у женщины из-за истощения примордиального пула [14, 24, 46]. Снижение фертильности у женщин начинается уже в возрасте 25-30 лет, а средний возраст реализации репродуктивной функции составляет 40-41 год в большинстве изученных групп населения [160]. Сложившаяся тенденция демонстрирует, что поздний возраст реализации репродуктивного потенциала, образ жизни (ожирение и неправильное питание), курение, чрезмерное потребление алкоголя и кофеина, использование лёгких наркотиков может вызвать генетические и эпигенетические изменения, которые

могут вызвать бесплодие, нарушение имплантации, повторяющиеся выкидыши и неблагоприятное течение беременности и перинатальные исходы [38].

Факторы, относящиеся к этиологии бесплодия, наряду с воздействиями окружающей среды, ожирением и старшим репродуктивным возрастом, в сочетании с генетическими мутациями в сигнальных путях, отвечающих за реализацию репродуктивной функции, непосредственно влияют на плацентацию и имплантацию. Это приводит к неблагоприятным исходам во время беременности и на пути к её достижению.

Pisarska M.D. с коллективом автором утверждают, что обнаруженные мутации даже одного гена приводят к бесплодию. Тем не менее совсем недавно однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) были отнесены к состояниям, вызывающим бесплодие. Вышеуказанные факты подтверждают данные, полученные в работе коллектива авторов во главе с Telenti A. [127, 148].

По наследству передаются эпигенетические модификации, которые не могут быть вызваны изменениями в последовательности ДНК. На заболевания влияют факторы окружающей среды и генетическая изменчивость.

В полученных нами данных после проведённого анализа было установлено, что средний возраст реализации репродуктивной функции у исследованных пациенток составляет 31-40 лет.

Общеизвестно, что к нарушениям механизмов иммунной защиты и изменению концентрации провоспалительных цитокинов могут привести инфекционно-воспалительные изменения в организме. О вышесказанном также сообщает Chaouat G. с коллегами, а именно, что у большинства бесплодных женщин с рецидивирующей неудачей имплантации после успешного экстракорпорального оплодотворения выработка LIF статистически намного ниже нормы [51]. В проведённом нами исследовании учитывались воспалительные заболевания в полости матки в анамнезе у женщин, страдающих бесплодием. Бактериальные и вирусные инфекции влияют на репродуктивное здоровье женщин, что впоследствии часто является причиной формирования трубного фактора бесплодия, внематочной трубной беременности или преждевременных

родов [43, 3, 13, 16].

Рассматривая женское бесплодие, можно сделать вывод о том, что к появлению доброкачественных заболеваний матки и придатков приводит влияние многих факторов. Мы предполагаем, что на молекулярно-генетическом уровне это отразится на изменениях в сигнальных путях, снижая возможность успешной имплантации эмбриона. В добавление коллектив авторов во главе с Коган Е.А. сообщали о наличие корреляции между пролиферативными процессами в эндо- и миометрии, а также возможную тесную взаимосвязь между развитием гиперпластических процессов эндо- и миометрия [11]. Но необходимо продолжать накапливать опыт в определении изменений в сигнальных путях на молекулярно-генетическом уровне при формировании доброкачественных заболеваний матки. Стоит отметить, что имеются данные об изменении в сигнальных путях, которые затем влияют на пролиферацию и дифференцировку клеток эндометрия. Нарушение этих функций может вызвать развитие нескольких патологий эндометрия - от полипов до онкологических изменений [54, 85, 130]. Поэтому можно предположить, что формирование доброкачественной патологии в полости матки у женщин репродуктивного возраста, изменяя передачу сигнала на уровне однонуклеотидных полиморфизмов, позднее может привести к нарушению реализации репродуктивной функции. Однако этот вопрос требует дальнейшего изучения ввиду распространённости патологии эндометрия у женщин репродуктивного возраста.

Несмотря на широкое применение вспомогательных репродуктивных технологий, остаётся острой ещё одна проблема – рецидивирующие неудачи имплантации, которая обусловлена главным образом нарушением восприимчивости эндометрия, поэтому существует потребность в поиске наиболее достоверного маркёра для оценки восприимчивости эндометрия, особенно во время переноса эмбрионов. Как сообщает Bellver J. и коллеги, увеличение ИМТ на одну единицу снижает вероятность беременности на 0,84 в случаях экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) [126]. При этом за время проводимого нами исследования были установлены случаи наступившей беременности у

обследованных пациенток - у четырёх женщин, что соответствует 2,8% от общего количества. Необходимо подчеркнуть, что беременность во всех случаях наступила самопроизвольно после проведённого хирургического лечения по поводу маточного фактора бесплодия. У трёх из них было установлено бесплодие: двое с первичным, одна – с вторичным типом нарушения репродуктивной функции. Также беременность наступила у одной пациентки без бесплодия [20].

Методы диагностики, используемые в ежедневной практике, позволяют в большинстве случаев выявить причину бесплодия, определить дальнейшую тактику ведения пациенток, а в некоторых случаях восстановить репродуктивную функцию. Наиболее широкое применение в диагностике внутриматочной патологии отведено транвагинальному ультразвуковому исследованию. Многие исследователи уже доказали высокую специфичность и чувствительность метода (0,24-0,94), что обосновывает использование ультразвукового исследования в качестве скринингового мониторинга у женщин с нарушением репродуктивной функции [7, 84, 143].

Применение гистероскопии значительно расширило возможности диагностики патологических состояний эндометрия. Метод обладает высокой чувствительностью 0,84-0,97 и специфичностью 0,88-0,93 при диагностике внутриматочной патологии [9, 61].

На настоящий момент даже после полного клинико-лабораторного и инструментального обследования пары основной фактор нарушения фертильности остается не известен. Для определения причин генетических нарушений бесплодия необходимо использовать методы диагностики, обладающие ещё большей информативностью. Дополнительные методы оценки морфологической структуры и функции эндометрия могли бы существенно упростить задачу в прогнозировании успешной имплантации эмбриона. При этом считается, что будущие исследования в области женской репродукции должны быть направлены на изучение репродуктивных генетических мутаций и нейроэндокринных заболеваний [63].

Широко распространены молекулярно-генетические методы исследования, а именно — секвенирование индивидуальных геномов или полногеномный анализ

однонуклеотидных полиморфизмов генов, которые позволяют определить генетическое разнообразие вариантов генов, связанных с риском развития бесплодия. Полученная впоследствии информация повысит эффективность лечебно-диагностических мероприятий от фундаментальных научных исследований к практической медицине. Перспективным методом диагностики также стало использование общегеномного секвенирования, что позволило выявить многофакторную генетическую предрасположенность к нарушениям, влияющих на результаты программ экстракорпорального оплодотворения и репродуктивный потенциал [95]. Молекулярно-генетические методы позволяют выявить изменения в геноме, которые впоследствии привели к нарушению репродуктивной функции. Секвенирование по Сэнгеру — метод, который позволяет выявить последовательность нуклеотидов в ДНК. Данный метод обладает высокой чувствительностью и специфичностью [12, 31].

Раннее эмбриональное развитие контролируется как генетическими, так и эпигенетическими механизмами. Эпигенетические механизмы основываются не на последовательности ДНК, в то время как генетический механизм основан на последовательности и однонуклеотидных полиморфизмах. Эпигенетические механизмы, а также влияние вышеуказанных факторов риска развития женского бесплодия устанавливают наследуемые изменения, которые играют важную роль в регуляции экспрессии генов [110].

Основываясь на данных мировой литературы, нами был рассмотрен сигнальный путь TP53, включающий фактор, ингибирующий лейкемию. В поддержании восприимчивого состояния эндометрия человека участвует передача сигналов через сигнальный путь TP53, точечная мутация в котором может привести к нарушению восприимчивости эндометрия, а впоследствии стать причиной женского бесплодия. С целью определения более полной картины изменений в сигнальном пути TP53 в проведённом исследовании были определены однонуклеотидные полиморфизмы при различных патологиях полости матки, которые впоследствии формируют маточный фактор бесплодия. Были получены данные, подтверждающие изменения уровня экспрессии генов сигнального пути

TP53 у пациенток с бесплодием и доброкачественными заболеваниями эндометрия. В зависимости от наличия или отсутствия беременности в анамнезе были определены наиболее информативные полиморфизмы, тогда как корреляции с наличием доброкачественных заболеваний матки выявлено не было.

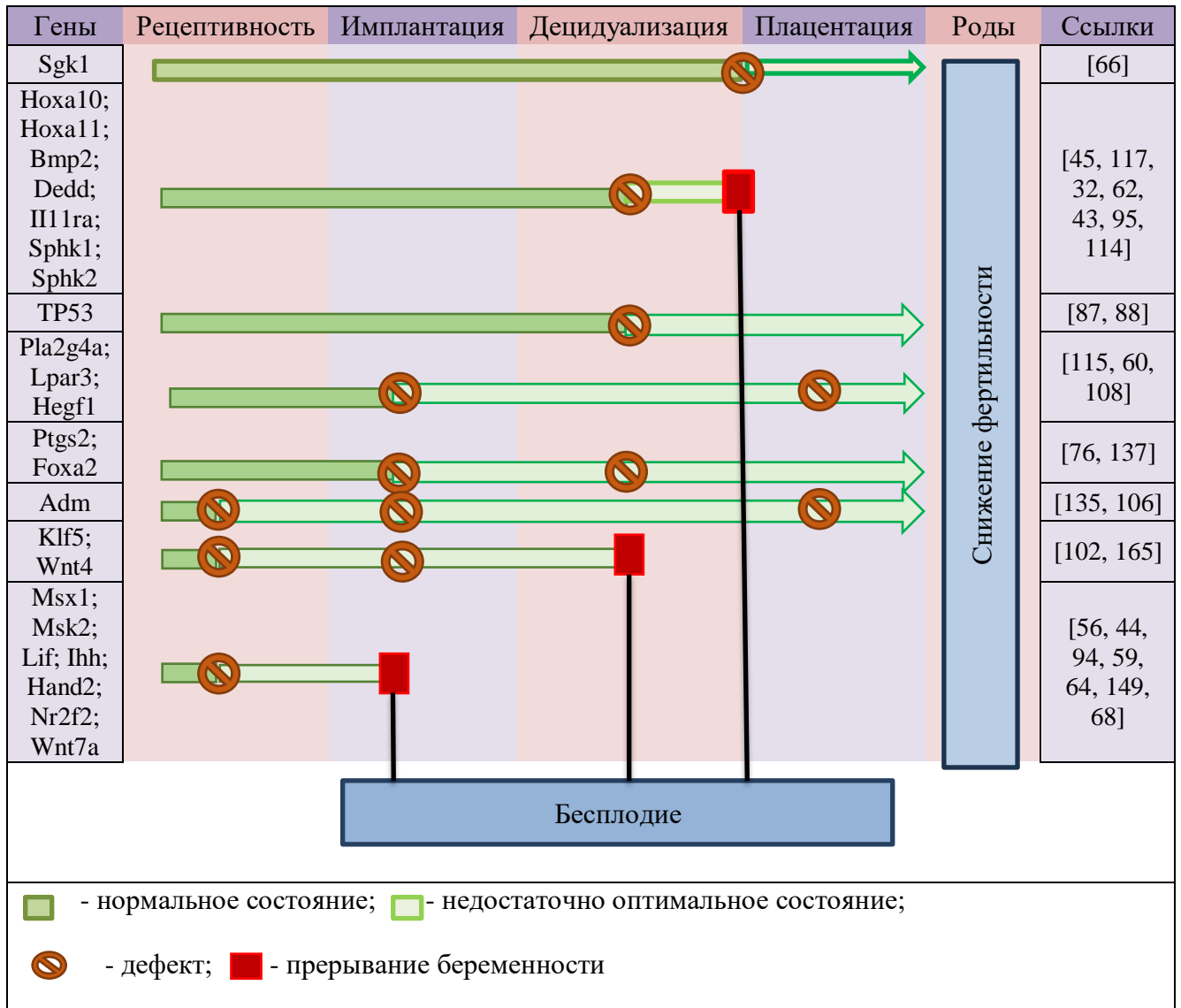


Рисунок 7 — Нарушения у мышей, возникающие при наличии мутации на определённом этапе развития беременности [50]

На рисунке 6 представлены нарушения на каждом этапе молекулярно-генетического уровня при развитии беременности, поэтому важным является накопление опыта в поиске наиболее информативных маркёров прогрессирования гестации. Так, например, аберрации, возникающие в сигнальном пути TP53, могут привести к нарушению формирования нормальной беременности и впоследствии к её прерыванию [87, 88].

Но можно предположить, что мутации, возникающие в сигнальном пути TP53 могут быть обратимыми, так как на сегодняшний момент предпринимаются попытки коррекции нарушения репродуктивной функции у женщин за счёт инъекций рекомбинантного LIF человека (r-hLIF), вводимого во время лютеиновой фазы в циклах ЭКО [133]. Несмотря на то, что исследование P.R. Brinsden и соавторов не выявило доказательств эффективности введения рекомбинантного LIF для повышения частоты имплантации и дальнейшего прогрессирования беременности у женщин, у которых ранее были множественные неудачные имплантации после применения вспомогательных репродуктивных технологий, тем не менее необходимо продолжить накапливать опыт в физиологии имплантации у человека.

На сегодняшний день установлено, что некоторые однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) белков p53, MDM2, MdmX и путь p53 связаны с риском нарушения репродуктивной функции у женщин [154].

Как представитель семейства провоспалительных цитокинов, LIF может оказывать парадоксально противоположные эффекты на разные типы клеток, включая стимуляцию или ингибирование пролиферации, дифференцировки и сохранение каждой клетки. LIF опосредует множественные процессы имплантации эмбриона, начиная от роста и развития бластоцисты, подготовки матки к имплантации, децидуализации, воспалительных реакций в матке в отношении имплантируемых эмбрионов, взаимодействия эмбриона с эндометрием и инвазии трофобласта [133]. Доказано, что LIF необходим для децидуализации эндометрия, при этом он оказывает опосредованное действие в сигнальном пути, регулирующем целостность клеточных контактов, пролиферацию и дифференцировку клеток стромы [71, 77, 112]. Проведённый анализ литературы показал, что LIF участвует во всех этапах процесса имплантации: повышение рецептивности эндометрия, межклеточное взаимодействие между яйцеклеткой и тканью эндометрия, децидуальная реакция стромы, инвазия трофобласта, рост и его развитие бластоцисты. Именно поэтому важно провести поиск наиболее показательного биоматериала для проведения молекулярно-генетических методов исследования.

На сегодняшний день в современной научной литературе имеется разнообразный опыт исследования полиморфизмов генов в крови, цервикальной слизи, смывов из полости матки и эндометрии. Так, например, имеются данные, что у женщин с бесплодием и повторными неудачными попытками ЭКО в анамнезе снижена концентрация LIF и LIF-R в цервикальной слизи (ЦС), а также их экспрессия в эндометрии [22]. Но в проведённом нами исследовании важным было определение концентрации LIF у женщин с нарушением репродуктивной функции в эндометрии как непосредственного участника в процессе имплантации.

Несмотря на данные, полученные Чуйкиным И.А. в работе, посвящённой изучению сигнальных путей, влияющих на пролиферативную активность эмбриональных стволовых клеток мыши, где он показал, что внутренняя клеточная масса не нуждается в факторе LIF [126], по сообщениям ряда авторов экспрессия LIF отмечалась только у женщин с необъяснимыми причинами бесплодия, а экспрессия LIF-R была снижена во всех подгруппах бесплодных женщин [107].

В проведённом нами исследовании также получены подтверждения данной модели. Таким образом, сформированы многочисленные данные, которые подтверждают, что аномальная экспрессия LIF в эндометрии может лежать в основе некоторых форм женского бесплодия.

Известно, что повышенная активность гена MDM2 приведёт к обратной зависимости в процессе трансляции белка p53, что впоследствии станет причиной нарушения имплантации даже после использования вспомогательных репродуктивных технологий или риском формирования бесплодия. Доказано, что взаимодействие LIF с протеином p53 участвует как в супрессии онкологических процессов, так и в нарушениях женской репродуктивной функции, при этом ген MDM2 регулирует работу белка p53. Доказано, что ось Mdm2-p53-SF1 в клетках гранулезной оболочки кумулюса яичников влияет на качество яйцеклеток [116]. Уже определён потенциально новый механизм, с помощью которого снижается адгезия эпителиальных клеток эндометрия посредством подавления MDM2. Эти данные свидетельствуют о том, что MDM2 способствует адгезии эндометрия к бластоцисте, имплантации и бесплодию у женщин [124].

Установлено, что MDM4 ингибируют активность p53, но не разрушает его, а связывает его активатор транскрипции. Поэтому даже изменение одного аллеля гена MDM4 будет связано с увеличением концентрации белка MDM4, а значит, снижением белка p53. Такие генетические перестройки в гене приведут к безуспешной попытке процесса имплантации, что подтверждает Palomares A.R. [78]. Также в вышеназванном исследовании получены данные о том, что MDM4 (rs1563828) связан с разной частотой продолжительности беременности и различными случаями выкидышей, соответственно. При этом была подчеркнута связь между полиморфизмами генов, связанных с функцией P53, и их влиянием на репродуктивные результаты ЭКО.

Результаты нашего исследования, как и данные работ Симбирцева А.С. [23], Пальцева М.А. [15], Zhaohui Feng. [74], свидетельствуют о связи однонуклеотидного полиморфизма T/G гена MDM2 с первичным бесплодием и полиморфизма T/T — с вторичным, вариант гена MDM4 показывает связь полиморфизма G/G с первичным бесплодием, а полиморфизма A/A — с вторичным. Также в ходе проведённого нами анализа регрессионной модели было определено, что при выявлении мутантного нуклеотидного полиморфизма MDM4 rs1563828 (A/G) NG47 первичное бесплодие маловероятно.

На сегодняшний день установлено значение семейства генов p53 в репродуктивных процессах. Каждый член семейства действует через различные механизмы: p53 участвует в сохранении стабильности генома и регуляции имплантации бластоцисты; p63 является регулятором качества и степени созревания яйцеклеток; а p73 отвечает за мейотическое веретено деления. Доказано, что полиморфизмы в генах семейства p53 были связаны с женским бесплодием. Один полиморфизм в генах MDM2, основного регулятора семейства p53, также был связан с женским бесплодием. Белок p53, регуляцию работы которого осуществляет одноимённый ген TP53, обеспечивает регуляцию транскрипции гена LIF, изменяя уровень апоптоза в клетках трофобласта. Поэтому даже единичная мутация в гене TP53 приведёт к усилению апоптоза, в результате чего изменится толщина внутренней слизистой оболочки тела матки. В своём

исследовании Vagnini L.D. et al. пришли к выводу, что наличие генотипов TP53-T/T, TP73-G/G, MMP9-Gln/Gln и MTHFR-A/A увеличивает вероятность развития сниженного овариального резерва у женщин. Таким образом, эти полиморфизмы могут быть полезны в качестве генетических маркеров низкого овариального резерва у бесплодных пациенток [57].

Исходя из вышесказанного, можно сделать вывод о том, что определение однонуклеотидных полиморфизмов генов сигнальных путей, участвующих в реализации репродуктивной функции, может представлять колоссальный научный и практический интерес.

Целью нашего исследования явилось повышение эффективности диагностики причин нарушения имплантационной функции эндометрия на основании выявления полиморфизма генов сигнального пути TP53. В последующем следует определить вероятность фенотипического проявления инфертильности при выявлении соответствующих нуклеотидных полиморфизмов, а также степени фенотипического проявления аллеля [22].

В основе проводимой нами работы был анализ типа нарушения репродуктивной функции, данные клинико-лабораторных и инструментальных методов обследования, включая гистологическое и молекулярно-генетические исследования биоматериала ткани эндометрия, а также хирургического лечения.

В рамках проводимого исследования были обследованы 142 пациентки в возрасте от 22 до 48 лет, включающее женщин как с нарушением репродуктивной функции, так и без него перед оперативным лечением. В первую группу было включено 66 женщин с первичным бесплодием, во вторую – 40 женщин с вторичным бесплодием. Преобладающей жалобой у женщин, у которых на момент обращения были выявлены признаки внутриматочной патологии (группа I n=66 и группа II n=40), стало отсутствие наступления беременности при регулярной половой жизни без использования контрацептивных средств. Группа контроля была представлена 36 пациентками, не предъявляющих жалобы на нарушения репродуктивной функции. Необходимо отметить, что часть этих пациенток имела беременности в прошлом, у части пациенток беременностей не было и вопрос

деторождения для них был неактуальным на момент обращения.

Во всех трёх группах отмечалось наибольшее количество пациенток в возрасте 31- 40 лет: более половины в I группе (54,5%), во II группе – 15 (75%), в III группе – 12 (66,7%). В возрастной группе 21-30 лет преобладали пациентки с первичным бесплодием, в группе 41-40 лет показатели распределились поровну между первичным (3; 9%) и вторичным бесплодием (3;15%). Возрастной фактор обследуемых пациенток соответствует современной тенденции преодоления нарушения репродуктивной функции у женщин старшего репродуктивного возраста. Данный факт также подтверждает работа Сыркашевой А.Г., Ильиной Е.О., Долгушиной Н.В. [26], в которой авторы подчёркивают влияние старшего репродуктивного возраста на качество яйцеклеток.

У каждой пациентки были оценены факторы риска, уточнены соматические заболевания и гинекологические заболевания. Особое внимание было отведено особенностям менструальной и репродуктивной функции, наличию их нарушений, а также выраженности сопутствующих патологий.

После формирования анамнеза жизни и заболевания, а также после завершения объективного осмотра всем пациенткам проводилось полное клинико-лабораторное обследование. С целью уточнения причины бесплодия всем пациенткам было рекомендовано ультразвуковое исследование матки и придатков в раннюю фолликулярную фазу цикла. Для визуализации состояния внутренних репродуктивных органов проводилось трансвагинальное ультразвуковое исследование.

В I группе сочетание бесплодия и полипа эндометрия было представлено в большинстве случаев (56%). Бесплодие и гиперплазия эндометрия были отмечены в 26% случаев. Внутриматочные синехии и первичное бесплодие определялись у 9% из общего количества пациенток I группы. Сочетание бесплодия с хроническим эндометритом были выявлены у 3% женщин. Сложная мультифакторная патология, представленная сочетанием бесплодия, полипа эндометрия и гиперплазии эндометрия и бесплодия с внутриматочными синехиями и хроническим эндометритом, определялись в 3% случаев соответственно.

Во II группе пациенток преобладало сочетание вторичного бесплодия и полипа эндометрия (в 42% наблюдений) и внутриматочные синехии (37% случаев). При этом в группе обследованных были пациентки с гиперпластическим процессом эндометрия, миомой матки и хроническим эндометритом. Сочетание внутриматочных синехий и хронического эндометрита наблюдалось в 11% случаев. Идентичные показатели были отмечены при сочетании полипа эндометрия и гиперплазии эндометрия и в случае изолированного гиперпластического процесса эндометрия – по 5% соответственно.

Учитывая отсутствие основной жалобы по поводу infertility в группе III, у большинства обследованных отсутствовали жалобы по поводу бесплодия, однако в ходе проведения клинической диагностики были выявлены гиперпластические процессы эндометрия у 14 пациенток, что составило 78%, и полип эндометрия у 10 пациенток (56%).

В настоящее время «золотым стандартом» диагностики и лечения внутриматочной патологии является гистероскопия [10, 67], которая широко используется в ежедневной рутинной практике врача акушера-гинеколога.

В зависимости от выявленной патологии пациенткам проводилось оперативное лечение в объёме: гистероскопия, раздельное диагностическое выскабливание; гистероскопия, лазерная полипэктомия; гистероскопия, деструкция внутриматочных синехий. Пациенткам с внутриматочными синехиями, после их деструкции, производилась биопсия эндометрия для гистологического исследования.

Даже учитывая постоянно обновляющуюся информацию об изменениях в сигнальных путях, участвующих в имплантации бластоцисты, необходимо отметить, что крайне важно найти наиболее информативный биоматериал для исследования. Поэтому после завершения оперативного лечения у каждой пациентки в нашем исследовании ткань эндометрия была направлена не только на гистологическое, но и молекулярно-генетическое исследования.

Таким образом, в проведённом нами исследовании молекулярно-генетическое исследование включало несколько этапов:

- выделение геномной ДНК;
- генотипирование ДНК;
- секвенирование.

При изучении полиморфизмов генов у всех 142 обследованных пациенток был обнаружен LIF rs41281637 (G/A), что частично подтверждает данные научной литературы об участии LIF в процессах нарушения женской репродуктивной функции. Однако, принимая во внимание его наличие и у женщин без нарушения репродуктивной функции, из дальнейшего анализа вышеуказанный ген был исключён.

LIF rs9292271 может быть определён как ген, ассоциированный с вторичным бесплодием, так и ген, снижающий риск первичного бесплодия, что более вероятно. TP 53 был определён чаще у женщин с первичным бесплодием, а MDM2 наибольшую частоту встречаемости показал в группе женщин с вторичным бесплодием. Полученные данные по определению MDM4 в биоматериале ткани эндометрия также свидетельствуют о том, что MDM4 более информативен при первичном бесплодии. Точно сказать не представляется возможным, ввиду имеющегося ограничения в проводимом нами исследовании в виде малой выборки пациенток. Однако этот вопрос требует дальнейшего изучения.

Кроме того, были определены однонуклеотидные полиморфизмы генов сигнального пути TP53 при доброкачественных заболеваниях, которые впоследствии могли стать причиной маточного фактора бесплодия. Наибольшая экспрессия была определена в гетерозиготных вариантах генов MDM2 rs2279744 (T/G) и TP53 rs1042522 (G/C) у пациенток I группы с полипом эндометрия. При выделении однонуклеотидных полиморфизмов у пациенток с гиперплазией эндометрия была выявлена наибольшая частота гетерозиготных аллелей в группе пациенток с первичным бесплодием (MDM2 rs2279744 (T/G) и TP53 rs1042522 (G/C)), а также преобладал гомозиготный вариант гена MDM4 rs1563828 (A/G) также у пациенток с первичным бесплодием. У пациенток с вторичным бесплодием и внутриматочными синехиями была увеличена экспрессия минорных аллелей LIF rs9292271 (T/T), MDM4 rs1563828 (A/A), TP53 rs1042522 (G/G). Исследование

генотипов при хроническом эндометрите в группе пациенток с вторичным бесплодием продемонстрировало наибольшую экспрессию LIF rs9292271 (T/T), MDM2 rs2279744 (T/G), в то время как в группе пациенток с первичным бесплодием и контрольной группе отмечались низкие показатели экспрессии генов или их отсутствие.

После анализа полученных нами результатов можно предположить, что наличие какой-либо патологии эндометрия может привести к изменениям в экспрессии однонуклеотидных полиморфизмов генов в сигнальных путях, участвующих в имплантации. Даже единичное изменение экспрессии пары оснований в последовательности ДНК может стать причиной отсутствия наступления беременности или регулярных неудач имплантации. Однако в нашем исследовании не было выявлено статистически достоверных различий в экспрессии генов сигнального пути TP53 в эндометрии у пациенток с различной внутриматочной патологией. Учитывая, что на сегодняшний день очень мало данных в научной литературе по поводу изменений экспрессии однонуклеотидных полиморфизмов генов в сигнальных путях, участвующих в репродуктивных процессах в ткани эндометрия, то следует продолжать накапливать научный опыт по данному вопросу. При этом важно отметить, что до сих пор ведутся исследования с целью поиска наиболее информативного материала у пациенток с бесплодием для определения генетических маркёров. Будущее, принимая во внимание значительную роль сигнальных систем, участвующих в процессах наступления беременности, выглядит многообещающим для разработки наиболее информативных генетических маркёров в качестве диагностических и прогностических при регулярных нарушениях имплантации, невынашивание беременности или бесплодия.

Необходимо отметить, что за время проводимого нами исследования у четырёх обследованных женщин (2,8%) были установлены случаи наступившей беременности из всего количества женщин. Нужно подчеркнуть, что беременность во всех случаях наступила самопроизвольно после проведённого хирургического лечения по поводу маточного фактора бесплодия. Средний возраст у пациенток с

наступившей беременностью составил  $33 \pm 2$  года. У трёх из них было установлено бесплодие: двое с первичным, одна – с вторичным типом нарушения репродуктивной функции. Также беременность наступила у одной пациентки из контрольной группы [20]. Структура маточного фактора бесплодия распределилась поровну между гиперплазией эндометрия ( $n=2$ ) и полипом эндометрия ( $n=2$ ). Можно предположить, что у этих пациенток причиной ненаступления беременности являлась внутриматочная патология, устранение которой хирургическим путем оказалось достаточным для восстановления репродуктивной функции.

Безусловно, имплантация эмбриона является одним из ключевых событий в наступлении беременности, поскольку качество участвующих в имплантации клеток, а также чётко определённая, последовательная передача сигнала на генетическом уровне определяют исход наступления и развития беременности. Уже есть накопленные данные в научной литературе, которые свидетельствуют о том, что есть большое количество факторов, включая факторы транскрипции, компоненты сигнальной трансдукции и липиды, необходимых для имплантации эмбриона [34]. При этом, как сообщает А. Fazleabas совместно с Z. Strakova, в течение периода восприимчивости сигналы от эмбриона могут резко изменять морфологические и функциональные характеристики эндометрия [73].

Все больше данных также демонстрируют важную роль эпигенетических факторов в этом критическом событии. Именно поэтому после проведённого нами анализа полученных данных нельзя исключить, что наступление беременности у пациенток с нарушением репродуктивной функции в анамнезе стало результатом изменения экспрессии нуклеотидных полиморфизмов в генах сигнального пути TP53. Нами не была произведена оценка изменения ИМТ – как эпигенетического фактора – в ходе проводимого исследования на момент наступления беременности. Однако проведённое оперативное лечение у пациенток с маточным фактором бесплодия позволяет предположить, что после него у части пациенток произошли изменения в молекулярно-генетических механизмах в ткани эндометрия, которые впоследствии привели к успешной имплантации. Эти результаты также

необходимо подтверждать и уточнять в последующих научных исследованиях на больших количествах участниц, учитывая перспективу поиска генетических маркёров бесплодия и успешную имплантацию у тех же пациенток впоследствии.

Проанализировав полученные в результате нашего исследования данные, целесообразно предположить, что определение полиморфизмов генов сигнального пути TP53 в образцах эндометрия может свидетельствовать о потенциальном риске развития первичного или вторичного бесплодия у женщин с внутриматочной патологией. Доказывая это предположение, стоит отметить работу Yan Fang совместно с коллегами, которые установили, что генотипы HDM2 SNP309 G/G и p53 кодон 72 Pro/Pro могут индуцировать высокие уровни HDM2, а впоследствии могут стать причиной замершей беременности [152].

Несомненно, полная картина генетических причин женского бесплодия основывается как на определении большего количества мутаций при различных типах бесплодия, так и на объединении с уже известной информацией о мутациях в сигнальных путях, участвующих в реализации репродуктивной функции. Но важно отметить, что исследование панелей ДНК-полиморфизмов в сигнальных путях, участвующих в процессах оплодотворения, позволит определить предрасположенность к таким многофакторным заболеваниям как бесплодие, а также дополнить уже имеющиеся алгоритмы лабораторной диагностики и поиска причин, лежащих в основе заболевания.

Учитывая, что молекулярные механизмы, лежащие в основе женской инфертильности, вызванного патогенными мутациями, в большинстве современных исследований в значительной степени неясны, важно использовать постоянно обновляющиеся данные в области молекулярно-генетических механизмов бесплодия и наступления беременности для определения перспективных и приоритетных направлений в будущих исследованиях в области генетических причин бесплодия, а также применять знания о мутациях для прогнозирования риска, диагностики и потенциального лечения женского бесплодия.

## ВЫВОДЫ

1. Для прогнозирования успешной имплантации у пациенток как с первичным, так и с вторичным бесплодием важное клиническое значение имеет определение в эндометрии молекулярно-генетических маркёров полиморфизмов генов сигнального пути TP53.
2. У женщин с первичным и вторичным бесплодием увеличение возраста представляет собой статистически значимый прогностический фактор риска (для первичного бесплодия  $OR = -0,27$ ,  $P < 0,001$ ; для вторичного бесплодия  $OR = 0,22$ ,  $P < 0,001$ ), а у пациенток с вторичным бесплодием суплементарным фактором риска является повышение индекса массы тела ( $OR = 0,94$ ,  $P < 0,001$ ).
3. У пациенток с бесплодием и у женщин без нарушения репродуктивной функции не выявлено различий в определении LIF (вариант rs41281637) в эндометрии. Во всех 142 наблюдениях в образцах эндометрия выявлен минорный аллель G/G LIF rs41281637.
4. При первичном бесплодии в сочетании с доброкачественными заболеваниями эндометрия наиболее значимым является определение генетических полиморфизмов LIF (вариант rs9292271), MDM4 и TP53 сигнального пути TP53. У пациенток с первичным бесплодием выявлена статистически достоверная связь гена LIF rs9292271 ( $OR = -0,67$ ,  $P < 0,001$ ) и гена MDM4 rs1563828 ( $OR = -0,46$ ,  $P < 0,001$ ), а также TP53 rs1042522 ( $OR = 0$ ,  $P = 0,001$ ).
5. При вторичном бесплодии у пациенток с доброкачественными заболеваниями эндометрия выявлена статистически достоверная связь однонуклеотидных полиморфизмов гена MDM2 rs2279744 (T/G): ( $OR = -0,09$ ,  $P = 0,05$ ) и TP53 rs1042522 ( $OR = -0,24$ ,  $P = 0,05$ ).
6. У женщин с различными доброкачественными заболеваниями эндометрия и нарушением репродуктивной функции отсутствуют различия в нуклеотидных полиморфизмах генов сигнального пути TP53.
7. Разработанный на основании клинико-анамнестических, инструментальных, морфологических и молекулярно-генетических методов исследования алгоритм

повышает эффективность диагностики маточного фактора бесплодия и способствует прогнозированию состояния эндометрия для успешной имплантации.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Введение в клиническую практику дополнительных молекулярно-генетических маркеров в эндометрии у женщин с нарушениями женской репродуктивной функции позволит усовершенствовать методы обследования пациенток с бесплодием и сопутствующей доброкачественной внутриматочной патологией.
2. Выявление нуклеотидных полиморфизмов генов сигнального пути TP53 может быть рекомендовано как эффективный метод диагностики причин женского бесплодия, в том числе и перед использованием вспомогательных репродуктивных технологий, и определение молекулярно-генетических маркеров полиморфизма генов сигнального пути TP53 может способствовать значительному повышению качества диагностики имплантационного состояния эндометрия.
3. В программах вспомогательных репродуктивных технологий дополнительное определение нуклеотидных полиморфизмов генов способствует лучшему прогнозированию реализации репродуктивного потенциала.
4. Определение молекулярно-генетических маркеров инфертильности до проявления клинических признаков нарушений имплантации поможет выделить группу пациенток с повышенной вероятностью возникновения нарушений репродуктивной функции, а также выбрать персонифицированную тактику ведения.
5. Сочетание гистологического и генетического метода исследования образцов тканей эндометрия позволит выявить женщин из групп риска женского бесплодия или невынашивания беременности. Дополнительное выявление генов сигнального пути TP53 может стать прогностическим маркером наступления беременности у пациенток с нарушением репродуктивной функции.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

**ВИЧ** — вирус иммунодефицита человека

**ВМИ** – внутриматочная инсеминация

**ВПГ** — вирус простого герпеса

**ВРТ** — вспомогательные репродуктивные технологии

**ВС** — внутриматочные синехии

**ГЭ** — гиперплазия эндометрия

**ИАПГ**— ингибитор активатора плазминогена

**ИГХ** — иммуногистохимическое исследование

**ИКСИ** - интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида

**ИЛ-6** – интерлейкин – 6

**ИМТ** – индекс массы тела

**ЛГ** — лютеинизирующий гормон

**мтДНК** — митохондриальная ДНК

**ПЭ** — полип эндометрия

**СПКЯ** — синдром поликистозных яичников

**ФНО-а** — фактор некроза опухоли-альфа

**ФСГ** — фолликулостимулирующий гормон

**ХЭ** — хронический эндометрит

**ЦС** — цервикальная слизь

**ЭКО** – экстракорпоральное оплодотворение

**IGFBP-1** — инсулиноподобный фактор роста-1

**IL -6** – интерлейкин – 6

**НОХА10** — белок, кодируемый у человека геном НОХА10

**LIF** – фактор, ингибирующий лейкемию

**LPAR3** - рецептор лизофосфатидной кислоты 3

**MDM2** – гомолог двойной минуты 2 у мыши

**MDM4** – гомолог двойной минуты 4 у мыши

**POLG** — гамма-субъединица ДНК-полимеразы

**SF1** - стероидогенный фактор 1 сиротского ядерного рецептора

**Sis3** — специфический ингибитор Smad3

**TGF- $\beta$ 1** — трансформирующий фактор роста-бета

**TP53** – опухолевый белок P53

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Боярский, К. Ю. Факторы, определяющие овариальный резерв. / К. Ю. Боярский, С. Н. Гайдуков, А. С. Чинчаладзе // *Акушерство и женское бесплодие.* – 2009. – № 2. – С. 65-69.
2. Возможности преодоления неудач имплантации при бесплодии маточного генеза, обусловленных хроническим эндометритом / К. В. Краснопольская, Л. М., Михалева, М. Р. Оразов [и др.] // *Гинекология.* – 2022. – № 24(5). – С. 400–407.
3. Генетические особенности пациенток с бесплодием неясного генеза / Л. С. Логутова, К. В. Краснопольская, Е. Ю. Воскобоева [и др.] // *Российский вестник акушера-гинеколога.* – 2023. – № 23(5). – С. 19–24.
4. Диаэм. Секвенирование нуклеиновых кислот. – Режим доступа: <https://kazan.dia-m.ru/page/sekvenirovanie-nukleinovyx-kislot/>
5. Значение определения полиморфизма генов сигнального пути TP53 у пациенток с бесплодием и доброкачественными процессами в эндометрии / А. О. Путило, Т. А. Джибладзе, Н. В. Позднякова [и др.] // *Российский вестник акушера-гинеколога.* – 2023. – Т. 23, № 1. – С. 11-16.
6. Значение оценки нуклеотидных полиморфизмов генов сигнального пути TP53 в диагностике маточного фактора бесплодия / А. О. Путило, Т. А. Джибладзе, Н. В. Позднякова, Н. Ю. Григорцевич [и др.] // *Архив акушерства и гинекологии им. В. Ф. Снегирева.* – 2022. – Т. 9, № 1. – С. 41- 48.
7. Кибанов, М. В. Поиск идеального маркера для оценки рецептивности эндометрия: от гистологии до современных молекулярно-генетических подходов / М. В. Кибанов // *Альманах клинической медицины.* – 2019. – № 1(47). – С. 12-25.
8. Комплексное лечение маточной формы бесплодия при синдроме Ашермана / Т. А. Джибладзе, В. М. Зуев, А. И. Ищенко [и др.] // *Российский вестник акушера-гинеколога.* – 2022. – № 3. – С. 165-169.
9. Максимова, Т. А. Преимущества офисной гистероскопии при обследовании и лечении женщин с бесплодием: специальность 14.01.01 «Акушерство и

гинекология»: диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Максимова Тамара Анатольевна; ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова. – Москва, 2019г. – С. 67

10. Миниинвазивные вмешательства в диагностике и лечении внутриматочной патологии у женщин с бесплодием / Т. А. Максимова, А. Л. Черкасова, Т. А. Джибладзе [и др.] // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2018. – Т. 17, № 1. – С. 27-32.

11. Морфофункциональное состояние эндометрия у больных миомой матки репродуктивного возраста / Е. А. Коган, С. И. Аскольская, П. Н. Бурькина [и др.] // Акушерство и Гинекология. – 2013. – № 8. – С. 46-5.

12. Необходимость усиления мер по диагностике и лечению хеликобактерной инфекции в России. Меморандум / Л. Б. Лазебник, Д. С. Бордин, Н. Н. Дехнич [и др.] // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2021. – № 3 (187). – С. 83-96.

13. Оразов, М.Р. Хронический эндометрит на современном этапе: в фокусе внимания преодоление неудач имплантации / М. Р. Оразов, В. Е. Радзинский, Е. Д. Долгов // Клинический разбор в общей медицине. – 2024. – № 5 (3). – С. 18–26.

14. Ответ яичников в программах вспомогательных репродуктивных технологий при трубном бесплодии / И. А. Петров, О. А. Тихоновская, М. С. Петрова [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2017. – № 1. – С. 33-39.

15. Пальцев, М. А. Молекулярные механизмы заболеваний репродуктивной системы (лекционные очерки) / М. А. Пальцев, Э. К. Айламазян, И. М. Кветной. – Санкт-Петербург: Эко-Вектор, 2017. – 256 с.

16. Патогенез неудач имплантации при бесплодии, обусловленном аденомиозом / В. Е. Радзинский, М. Р. Оразов, Л. М. Михалева [и др.] // Акушерство и гинекология: новости, мнения, обучение. Акушерство и гинекология: новости, мнения, обучение. – 2024. – № 12 (S). – С. 69-74.

17. Путило, А.О. Новое в нарушении женской репродуктивной функции неясного генеза (обзор литературы) / А.О. Путило, Т.А. Джибладзе, Н.Ю.

- Григорцевич // Архив акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирева. – 2020. – № 7 (2). – С. 84-88.
18. Радзинский, В.Е. Бесплодие и эндометриоз. Версии и контраверсии. / В. Е. Радзинский, М. Р. Оразов. – М.: Редакция журнала Status Praesens, 2019. – 208 с.
19. Рецептивность эндометрия и экспрессия факторов апоптоза и пролиферации в эндометрии женщин с гиперплазией и бесплодием / А.А. Гришкина, Г.Н. Чистякова [и др.] // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. –2019. –№ 4. (72). – С. 37-39.
20. Роль определения генетических полиморфизмов генов сигнального пути TP53 у пациенток с маточной формой бесплодия/ А.О. Путило, Т.А. Джибладзе, Н.В. Позднякова, Н.Ю. Григорцевич, Е.А. Свидинская. – Текст: непосредственный // XVII Международный конгресс по репродуктивной медицине: материалы научно-практической конференции / «МЕДИ Экспо»; под редакцией Г.Т. Сухих, Л.В. Адамян. — Москва, 17-20 января 2023г. – С. 127-128.
21. Савина, А.А. Потери потенциальных рождений в г. Москве за счет женского и мужского бесплодия / А. А. Савина, Е. В. Землянова, С. И. Фейгинова // Здоровье мегаполиса. – 2022. – Т. 3, № 3. – С. 39-45.
22. Сеидова, Л.А. Исследование маркеров рецептивности эндометрия в цервикальной слизи как неинвазивный метод оценки имплантационного потенциала / Л. А. Сеидова, С. Г. Перминова, Т. Т. А. Демура // Акушерство и гинекология. – 2015. – № 5. – С. 74-79.
23. Симбирцев, А.С. Цитокины в патогенезе и лечении заболеваний человека / А. С. Симбирцев. – СПб.: Фолиант, 2018. – 512 с.
24. Сравнительная оценка эффективности различных вариантов естественного цикла и овариальной стимуляции при проведении программы ЭКО/ИКСИ у пациенток с бесплодием / К.Ю. Боярский, С.Н. Гайдуков, Е.И. Кахиани [и др.] // Проблемы репродукции. – 2019. – Т. 25. – № 1. – С. 41-48.
25. Суханов, А.А. Эпидемиология женского бесплодия и опыт восстановления репродуктивной функции у пациенток с хроническим эндометритом в Тюменском регионе / А. А Суханов, Г. Б. Дикке, И. И. Кукарская // Проблемы репродукции. –

2023. – № 29(3). – С. 98–107.

26. Сыркашева, А.Г. Бесплодие у женщин старшего репродуктивного возраста: причины, тактика ведения, перспективы использования преимплантационного генетического скрининга (обзор литературы) / А. Г. Сыркашева, Е. О. Ильина, Н. В. Долгушина // Гинекология. – 2016. – № 18 (3). – С. 40–43.
27. Тонкий эндометрий и бесплодие / К. В. Краснопольская, М. Р. Оразов, И. Ю. Ершова, А. А. Федоров – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2022. – 208 с.
28. Чуйкин, И.А. Сигнальные пути, определяющие пролиферативную активность эмбриональных стволовых клеток мыши / И. А. Чуйкин, М. С. Лянгузова, В. А. Поспелов // Цитология. – 2007. – № 49 (5). – С. 370–384.
29. Эффективность программ криопереноса эмбрионов в полость матки у женщин с избыточной массой тела и ожирением / Е. Е. Краевая, Н. П. Макарова, Е. А. Калинина [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2024. – № 8. – С. 114-120
30. A comparison of transcriptomic profiles in endometrium during window of implantation between women with unexplained recurrent implantation failure and recurrent miscarriage / J. Huang, H. Qin, Y. Yang [et al.] // Reproduction. – 2017. – № 153(6). – P. 749–758.
31. A Prospective Chinese Study on Molecular Testing for H. pylori Clarithromycin and Quinolone Resistance / C. Zhang, M. Cao, T. Lv [et al.] // European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. – 2021. – № 40(8). – P. 1599-1608.
32. Abnormal uterine stromal and glandular function associated with maternal reproductive defects in Hoxa-11 null mice / R. L. Gendron, H. Paradis, H. M. Hsieh-Li [et al.] // Biol. Reprod. – 1997. – № 56. – P. 1097–1105.
33. Activation of Uterine Smad3 Pathway Is Crucial for Embryo Implantation / J. Li, X.Y. Dong, P. W. Yang [et al.] // Curr Med Sci. – 2019. – № 39(6). – P. 997-1002.
34. Adiguzel, D. FoxO1 is a cell-specific core transcription factor for endometrial remodeling and homeostasis during menstrual cycle and early pregnancy / D. Adiguzel, C. Celik-Ozenci // Hum Reprod Update. – 2021. – № 27(3). – P. 570-583.
35. Aghajanova, L. Leukemia inhibitory factor and human embryo implantation / L. Aghajanova // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2004. – № 1034. – P.

176–183.

36. Aghajanova, L. Uterine receptivity to human embryonic implantation: histology, biomarkers, and transcriptomics. *Semin / L. Aghajanova, A. E. Hamilton, L. C. Giudice // Cell Dev. Biol.* – 2008. – № 19(2). – P. 204-211.
37. Aghajanova, L. Update on the role of leukemia inhibitory factor in assisted reproduction / L. Aghajanova // *Current opinion in obstetrics & gynecology.* – 2010. – № 22(3). – P. 213–219.
38. Amoako, AA. Epigenetic Influences During the Periconception Period and Assisted Reproduction / A. A. Amoako, T. M. Nafee, B. Ola // *Adv Exp Med Biol.* – 2017. – № 1014. – P. 15-39.
39. Association between estrogen receptor 1 (ESR1) and leukemia inhibitory factor (LIF) polymorphisms can help in the prediction of recurrent implantation failure / L. D. Vagnini, A. Renzi, B. Petersen [et al.] // *Fertility and Sterility.* – 2019. – Vol. 111, № 3. – P. 527-534.
40. Author Correction: Human sex reversal is caused by duplication or deletion of core enhancers upstream of SOX9 / B. Croft, T. Ohnesorg, J. Hewitt [et al.] // *Nat Commun.* – 2019. – № 10. – P. 3351.
41. Bala, R. Environment, Lifestyle, and Female Infertility / R. Bala, V. Sing, S. Rajender // *Reprod Sci.* – 2021. – № 28(3). – P. 617-638.
42. Bashiri, A. Recurrent Implantation Failure-update overview on etiology, diagnosis, treatment and future directions / A. Bashiri, K. I. Halper, R. Orvieto // *Reprod Biol Endocrinol.* – 2018. – № 16(1). – P. 121.
43. Bilinski, P. Maternal IL-11R $\alpha$  function is required for normal decidua and fetoplacental development in mice / P. Bilinski, D. Roopenian, A. Gossler // *Genes Dev.* – 1998. – № 12. – P. 2234–2243.
44. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukemia inhibitory factor / C. L., Stewart, P. Kaspar, L. J. Brunet [et al.] // *Nature* – 1992. – № 359(6390). – P. 76-79.
45. Bmp2 is critical for the murine uterine decidual response / K. Y Lee, J. W. Jeong, J. Wang [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* – 2007. – № 27(15). – P. 5468–5478.

46. Broekmans, F. J. Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences / F. J. Broekmans, M.R. Soules, B.C. Fauser // *Endocr Rev.* – 2009. – № 30(5). – P. 465-493.
47. Broughton, D. E. Obesity and female infertility: potential mediators of obesity's impact / D. E. Broughton, K.H. Moley // *Fertil Steril.* – 2017. – № 107(4). – P. 840-847.
48. Butler, M.G. Clinically relevant known and candidate genes for obesity and their overlap with human infertility and reproduction / M.G. Butler, A. McGuire, A. M. Manzardo // *J Assist Reprod Genet.* – 2015. – № 32(4). – P. 495-508.
49. Cabry, R. Management of infertility in women over / R. Cabry, P. Merviel, A. Hazout // *Maturitas.* – 2014. – № 78(1). – P. 17-21.
50. Cha, J. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy / J. Cha, X.Sun, S. K. Dey // *Nature Medicine.* – 2012. – № 18(12). – P. 1754-1767.
51. Chaouat, G. Immuno-endocrine interactions in early pregnancy / G. Chaouat, E.Menu, G. Delage G // *Hum Reprod.* – 1995. – № 10(2). – P. 55-59.
52. Chassot, A.A. R-spondin1, WNT4, and the CTNNB1 signaling pathway: strict control over ovarian differentiation / A.A. Chassot, I. Gillot, M. C. Chaboissier // *Reproduction.* – 2014. – № 148. – P. R97–R110.
53. Chyra-Jach, D. The Associations between Infertility and Antioxidants, Proinflammatory Cytokines, and Chemokines / D. Chyra-Jach, Z. Kaletka, M. Dobrakowski // *Oxid Med Cell Longev.* – 2018. – № 2018. – P. 8354747.
54. Cobellis, L. The pattern of expression of Notch protein members in normal and pathological endometrium / L. Cobellis, F. Caprio, E. Trabucco // *J Anat.* – 2008. – № 213(4). – P. 464-472.
55. Collins, S. C. Precision reproductive medicine: multigene panel testing for infertility risk assessment / S. C. Collins // *J Assist Reprod Genet.* – 2017. – № 34(8). – P. 967-973.
56. Conditional deletion of MSX homeobox genes in the uterus inhibits blastocyst implantation by altering uterine receptivity / T. Daikoku, J. Cha, X. Sun [et al.] // *Dev. Cell* – 2011. – № 21(6). – P. 1014-1025.
57. Correlation of TP53 (rs1625895), TP73 (rs3765730), MMP9 (rs17576), and MTHFR(rs868014) polymorphisms with low ovarian reserve / L. D. Vagnini, A. Renzi,

- C. G. Petersen [et al.] // *Eur Obstet Gynecol Reprod Biol.* – 2022. – № 269. – P.132-137.
58. Crawford, N. M. Age-related infertility / N. M. Crawford, A. Z. Steiner // *Obstet Gynecol Clin North Am.* – 2015. – № 42(1). – P.15-25.
59. COUP-TFII mediates progesterone regulation of uterine implantation by controlling ER activity / I., Kurihara, D. K. Lee, F. G. Petit [et al.] // *PLoS Genet.* – 2007. – № 3(6). – P. e102.
60. Cytosolic phospholipase A2 $\alpha$  is crucial [correction of A2 $\alpha$  deficiency is crucial] for ‘on-time’ embryo implantation that directs subsequent development / H. Song, H. Lim, B. C. Paria [et al.] // *Development.* 2002. – № 129. – P. 2879–2889.
61. Daniilidis, A. Indications of diagnostic hysteroscopy, a brief review of the literature /A. Daniilidis, A. Pantelis, K. Dinas // *Gynecol Surg.* – 2012. – № 9. – P. 23-32.
62. Death effector domain-containing protein (DEDD) is required for uterine decidualization during early pregnancy in mice / M. Mori, M. Kitazume, R. Ose [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2011. – № 121(1). – P. 318-327.
63. Decade in Female Reproduction: An Endocrine View of the Past and Into the Future / D. Macut, D. V. Milutinović, A. Rašić-Marković [et al.] // *Hormones (Athens).* – 2018.– № 17 (4). – P. 497-505.
64. Deletion of the orphan nuclear receptor COUP-TFII in uterus leads to placental deficiency / F. G. Petit, S. P. Jamin, I. Kurihara [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – № 104(15). – P. 6293-6298.
65. Demain, L. A. Genetics of mitochondrial dysfunction and infertility / L. A. Demain, G. S. Conway, W. G. Newman // *Clin Genet.* – 2017. – № 91(2). – P.199-207.
66. Deregulation of the serum- and glucocorticoid-inducible kinase / M. S., Salker, M. Christian, J. H. Steel // *SGK1 in the endometrium causes reproductive failure. Nat. Med.* – 2011. – № 17. – P. 1509–1513.
67. Diagnostic hysteroscopy in abnormal uterine bleeding: a systematic review and meta-analysis / H. van Dongen, C. D. de Kroon, C. E. Jacobi [et al.] // *BJOG.* . – 2007. – № 114(6). – P.664-675.

68. Dunlap, K.A. et al. Postnatal deletion of Wnt7a inhibits uterine gland morphogenesis and compromises adult fertility in mice / K. A. Dunlap, J. Filant, K. Hayashi [et al.] // *Biol. Reprod.* – 2011. – № 85(2). – P. 386-396.
69. Elosaily, H. Role of miRNA manipulation on methylation states of breast cancer stemcell-related gene: Methylation status and miRNAs on BCSCs / H. Elosaily // *Azhar International Journal of Pharmaceutical and Medical Sciences.* – 2021. – Vol. 1, №. 2. – P. 13-22.
70. Endometrial receptivity: a revisit to functional genomics studies on human endometrium and creation of HGEx-ERdb / S.R. Bhagwat, D.S. Chandrashekar, R. Kakar R [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – № 8(3). – P. e58419.
71. Endometrial expression of LIF and its receptor and peritoneal fluid levels of IL-1 $\alpha$  and IL-6 in women with endometriosis are associated with the probability of pregnancy / C. Moberg, V. Bourlev, N. Ilyasova [et al.] // *Arch Gynecol Obstet.* – 2015. – № 292(2). – P. 429-437.
72. Farquhar, C. M. Female subfertility / C. M. Farquhar, S. Bhattacharya, S. Repping // *Nat Rev Dis Primers.* – 2019. – № 5(1). – P. 7.
73. Fazleabas, A. T. Endometrial function: cell specific changes in the uterine environment / A. T. Fazleabas, Z. Strakova // *Mol Cell Endocrinol.* – 2002. – № 186(2). – P. 143-147.
74. Feng, Z. Tumor suppressor p53 meets microRNAs / Z. Feng, C. Zhang, R. Wu // *J Mol Cell Biol.* – 2011. – № 3(1). – P. 44-50.
75. Flores, D. Mechanical and signaling mechanisms that guide pre-implantation embryomovement / D. Flores, M. Madhavan, S. Wright // *Development.* – 2020. – № 147(24). –P. dev193490.
76. Foxa2 is essential for mouse endometrial gland development and fertility / J. W. Jeong, I. Kwak, K. Y. Lee [et al.] // *Biol. Reprod.* – 2010. – № 83(3). – P. 396-403.
77. Fukui, Y. Uterine receptivity is reflected by LIF expression in the cervix / Y. Fukui // *Reproductive Sciences.* – 2022. – P. 1-6.
78. Genetic variants in the p53 pathway influence implantation and pregnancy maintenance in IVF treatments using donor oocytes / A. R. Palomares, A. A. Castillo-

Domínguez, M. Ruiz-Galdón [et al.] // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. – 2021. – Vol. 38. – P. 3267-3275.

79. GeneCaRNA. MK280073-425. – Режим доступа: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MK280073-425>

80. GeneCaRNA. TRSpCGA4-1. – Режим доступа: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TRS-CGA4-1>

81. GeneCaRNA. LOC105378842. – Режим доступа: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LOC105378842>

82. GeneCaRNA. TRP—CGG1-3. – Режим доступа: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TRP-CGG1-3>

83. Global epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* in infertile populations: systematic review, metaanalysis and metaregression / H. Chemaitelly, A. Majed, F. Abu-Hijleh [et al.] // *Sex Transm Infect*. – 2021. – № 97(2). – P. 157 – 169.

84. Gumus, I.I. Diagnostic value of hysteroscopy and hysterosonography in endometrial abnormalities in asymptomatic postmenopausal women / I.I. Gumus, E. A. Keskin, E. Kiliç // *Arch Gynecol Obstet*. – 2008. – № 278(3). – P. 241-244.

85. Guo, M. Metformin alleviates endometrial hyperplasia through the UCA1/miR-144/TGF- $\beta$ 1/AKT signaling pathway / M. Guo, J. J. Zhou, W. Huang // *Int J Mol Med*. – 2020. – № 45(2). – P. 623-633.

86. Hazlina, N. H. N. Worldwide prevalence, risk factors and psychological impact of infertility among women: a systematic review and meta-analysis / N. H. N. Hazlina // *BMJ open*. – 2022. – Vol. 12, № 3. – P. e057132.

87. Heightened uterine mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling provokes preterm birth in mice / Y. Hirota, J. Cha, M. Yoshie [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2011. – № 108. – P. 18073–18078.

88. Hirota, Y. Uterine-specific p53 deficiency confers premature uterine senescence and promotes preterm birth in mice / Y. Hirota // *J. Clin. Invest*. – 2010. – № 120. – P. 803– 815.

89. Histomorphological patterns of endometrium in infertility / S. S. Nandedkar, E. Patidar, D. B. Gada [et al.] // *The Journal of Obstetrics and Gynecology of India*. – 2015.

– Vol. 65. – P. 328-334.

90. Hulten, M. Errors in chromosome segregation during oogenesis and early embryogenesis / M. Hulten, E. Smith, J. Delhanty // *Reproductive Endocrinology and Infertility: Integrating Modern Clinical and Laboratory Practice*. – 2010. – P. 1602–1675.
91. Hunter, T. Signaling--2000 and beyond / T. Hunter // *Cell*. – 2000. – № 100(1). – P. 113–127.
92. Hur, C. Uterine Factor Infertility: A Clinical Review / C. Hur, J. Rehmer, R. Flyckt // *Clinical Obstetrics and Gynecology*. – 2019. – № 62(2). – P. 257-270.
93. Importance of complete phenotyping in prenatal whole exome sequencing / M. Aarabi, O. Sniezek, H. Jiang [et al.] // *Human genetics*. – 2018. – № 137. – P. 175-181.
94. Indian hedgehog is a major mediator of progesterone signaling in the mouse uterus / K. Lee, J. Jeong, I. Kwak [et al.] // *Nat. Genet.* – 2006. – № 38(10). – P. 1204-1209.
95. Infertility in female mice lacking the receptor for interleukin 11 is due to a defective uterine response to implantation / L. Robb, R. Li, L. Hartley [et al.] // *Nat. Med.* – 1998. – № 4(3). – P. 303-308.
96. Infertility prevalence and the methods of estimation from 1990 to 2021: a systematic review and meta-analysis / C. M. Cox, M. E. Thoma, N. Tchangalova [et al.] // *Hum Reprod Open*. – 2022. – № 4. – P. hoac051.
97. Identifying dysregulated pathways in cancers from pathway interaction networks / K. Q. Liu, Z. P. Liu, J. K. Hao [et al.] // *BMC Bioinformatics*. – 2012. – № 13. – P. 126.
98. Jiang, R. Walking on multiple disease-gene networks to prioritize candidate genes / R. Jiang // *J Mol Cell Biol.* – 2015. – № 7(3). – P. 214–230.
99. Johnson, N. P. Ovarian reserve tests for predicting fertility outcomes for assisted reproductive technology: the International Systematic Collaboration of Ovarian Reserve Evaluation protocol for a systematic review of ovarian reserve test accuracy / N. P. Johnson, E. M. Bagrie, A. Coomarasamy // *BJOG*. – 2006. – № 113(12). – P. 1472-1480.
100. Kang, H. J. P53 and reproduction / H.J. Kang, Z. Rosenwaks // *Fertil Steril*. – 2018. – № 109(1). – P. 39-43.
101. Khademi, F. Induced Oxidative Stress in Human Primary Endometrial Cells / F. Khademi, H. Totonchi, N. Mohammadi // *Int J Toxicol*. – 2019. – № 38(3). – P. 202-208.

102. Kruppel-like factor 5 (KLF5) is critical for conferring uterine receptivity to implantation / X. Sun, L. Zhang, H. Xie [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2012. – № 109(4). – P. 1145-1150.
103. Leukaemia inhibitory factor gene mutations in infertile women / R. Giess, J. Tanasescu, T. Steck [et al.] // *Molecular human reproduction*. – 1999. – № 5(6). – P. 581–586.
104. Leukaemia inhibitory factor (LIF) gene mutations in women diagnosed with unexplained infertility and endometriosis have a negative impact on the IVF outcome. A pilot study / Z. Novotný, J. Krízan, R. Síma // *Folia Biol (Praha)*. – 2009. – Vol. 55, № 3. – P. 92-97.
105. Leukaemia inhibitory factor (LIF) gene mutations in women with unexplained infertility and recurrent failure of implantation after IVF and embryo transfer / T. Steck, R. Giess, M. W. Suetterlin [et al.] // *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. – 2004. – Vol. 112, № 1. – P. 69–73.
106. Li, M. Haploinsufficiency for adrenomedullin reduces pinopodes and diminishes uterine receptivity in mice / M. Li, Y. Wu, K. M. Caron // *Biol. Reprod*. – 2008. – № 79. – P. 1169–1175.
107. LIF endometrial expression is impaired in women with unexplained infertility while LIF-R expression in all infertility sub-groups / C. Margioulas-Siarkou, Y. Prapas, S. Petousis [et al.] // *Cytokine*. – 2017. – Vol. 96. – P. 166-172.
108. LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing / X. Ye, K. Hama, J. J. Contos [et al.] // *Nature* – 2005. – № 435(7038). – P. 104-108.
109. Lu, J. A novel and compact review on the role of oxidative stress in female reproduction / J. Lu, Z. Wang, J. Cao // *Reprod Biol Endocrinol*. – 2018. – № 16. – P. 80.
110. Lucifero, D. Potential significance of genomic imprinting defects for reproduction and assisted reproductive technology / D. Lucifero, J. R. Chaillet, J. M. Trasler // *Hum Reprod Update*. – 2004. – № 10(1). – P. 3-18.
111. Mallepaly, R. Genetic basis of male and female infertility / R. Mallepaly // *Genetics of Human Infertility*. Karger Publishers. – 2017. – Vol. 21. – P. 1-16.

112. Marquardt, R. M. Progesterone and estrogen signaling in the endometrium: what goes wrong in endometriosis? / R. M. Marquardt // *International journal of molecular sciences*. – 2019. – Vol. 20, № 15. – P. 3822.
113. Marshburn, P. B. Counseling and diagnostic evaluation for the infertile couple / P. B. Marshburn // *Obstet Gynecol Clin North Am*. – 2015. – № 42(1). – P. 1-14.
114. Maternal disturbance in activated sphingolipid metabolism causes pregnancy loss in mice / K. Mizugishi, C. Li, A. Olivera [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2007. – № 117(10). – P. 2993-3006.
115. Maternal heparin-binding-EGF deficiency limits pregnancy success in mice / H. Xie, H. Wang, S. Tranguch [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2007. – № 104(46). – P. 18315-18320.
116. Mdm2-p53-SF1 pathway in ovarian granulosa cells directs ovulation and fertilization by conditioning oocyte quality / H. Haraguchi, Y. Hirota, T. Saito-Fujita [et al.] // *FASEBJ*. – 2019. – № 33(2). – P. 2610-2620.
117. Mechanisms of reduced fertility in Hoxa-10 mutant mice: uterine homeostasis and loss of maternal Hoxa-10 expression / G. V. Benson, H. Lim, B. C. Paria [et al.] // *Development*. – 1996. – № 122. – P. 2687–2696.
118. Meggiolaro, A. The role of Pap test screening against cervical cancer: a systematic review and meta-analysis / A. Meggiolaro // *Clin Ter*. – 2016. – Vol. 167, № 4. – P. 124-139.
119. Meiosis interrupted: the genetics of female infertility via meiotic failure / L. Biswas, K. Tyc, El. Yakoubi [et al.] // *Reproduction*. – 2021. – № 161(2). – P. R13-R35.
120. Midluteal Progesterone: A Marker of Treatment Outcomes in Couples With Unexplained Infertility / K. R. Hansen, E. Eisenberg, V. Baker [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab*. – 2018. – № 103(7). – P. 2743-2751.
121. Mikolajczyk, M. The impact of leukemia inhibitory factor in uterine flushing on the reproductive potential of infertile women—a prospective study / M. Mikolajczyk, P. Wirstlein, J. Skrzypczak // *American Journal of Reproductive Immunology*. – 2007. – Vol. 58, № 1. – P. 65-74.
122. Mitochondria-targeted therapeutics, MitoQ and BGP-15, reverse aging-associated

- meiotic spindle defects in mouse and human oocytes / U. Al-Zubaidi, D. Adhikari, O. Cinar // *Hum Reprod.* – 2021. – № 36. – P. 771–84.
123. Molecular tools for the genomic assessment of oocyte's reproductive competence / L. Picchetta, S. Caroselli, M. Figliuzzi [et al.] // *J Assist Reprod Genet.* – 2022. – № 39(4). – P. 47-860.
124. Mouse double minute homologue 2 (MDM2) downregulation by miR-661 impairs human endometrial epithelial cell adhesive capacity / A. Winship, A. Ton, M. Van Sinderen [et al.] // *Reprod Fertil Dev.* – 2018. – № 30(3). – P. 477-486.
125. Nikas, G. Endometrial pinopodes: some more understanding on human implantation? / G. Nikas, L. Aghajanova // *Reprod Biomed Online.* – 2002. – № 4(3). – P. 18–23.
126. Obesity and assisted reproductive technology outcomes / J. Bellver, C. Busso, A. Pellicer [et al.] // *Reprod Biomed Online.* – 2006. – № 12(5). – P. 562-568.
127. Pisarska, M. D. Genetics and epigenetics of infertility and treatments on outcomes / M. D. Pisarska // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* – 2019. – Vol. 104, № 6. – P. 1871-1886.
128. Ochoa-Bernal, M. A. Physiologic events of embryo implantation and decidualization in human and non-human primates / M. A. Ochoa-Bernal, A. T. Fazleabas // *International journal of molecular sciences.* – 2020. – Vol. 21, № 6. – P. 1973.
129. Ounap, K. Three patients with 9p deletions including DMRT1 and DMRT2: a Red-Horse, K, Zhou Y, two XX females with normal pubertal development / K. Ounap // *American Journal of Medical Genetics Part A.* – 2004. – Vol. 130, № 4. – P. 415-423.
130. Overactive mTOR signaling leads to endometrial hyperplasia in aged women and mice / P. Bajwa, S. Nielsen, J. M. Lombard [et al.] // *Oncotarget.* – 2017. – № 8(5). – P. 7265-7275.
131. Rarani, F. Z. Endometrial pinopode biomarkers: Molecules and microRNAs / F. Z. Rarani, F. Borhani, B. Rashidi // *J Cell Physiol.* – 2018. – № 233(12). – P. 9145-9158.
132. Red-Horse, K. Trophoblast differentiation during embryo implantation and

formation of the maternal-fetal interface / K. Red-Horse, Y. Zhou, O. Genbacev // *J Clin Invest.* – 2004. – № 114(6). – P. 744-754.

133. Recombinant human leukemia inhibitory factor does not improve implantation and pregnancy outcomes after assisted reproductive techniques in women with recurrent unexplained implantation failure / R. P. Brinsden, V. Alam, B. Moustier [et al.] // *Fertility and Sterility.* – 2009. – № 91(4). – P. 1445-1447.

134. Recurrent pregnancy loss is associated with a pro-senescent decidual response during the peri-implantation window / E. S. Lucas, P. Vrljicak, J. Muter [et al.] // *Commun Biol.* – 2020. – № 3(1). – P. 37.

135. Reduced maternal expression of adrenomedullin disrupts fertility, placentation, and fetal growth in mice / M. Li, D. Yee, T. R Magnuson [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2006. – № 116(10). – P. 2653-2662.

136. Reproductive outcome of patients undergoing in vitro fertilisation treatment and diagnosed with bacterial vaginosis or abnormal vaginal microbiota: a systematic PRISMA review and metaanalysis / T. Haahr, J. Zacho, M. Bräuner [et al.] // *BJOG.* – 2019. – № 126(2). – P. 200 – 207.

137. Rescue of female infertility from the loss of cyclooxygenase-2 by compensatory up-regulation of cyclooxygenase-1 is a function of genetic makeup / H. Wang, W. G. Ma, L. Tejada [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2004. – № 279(11). – P. 10649-10658.

138. Rubio, C. Embryo aneuploidy screening for unexplained recurrent miscarriage: a minireview / C. Rubio, T. Pehlivan, L. Rodrigo // *Am J Reprod Immunol.* – 2005. – № 53(4). – P. 159-165.

139. Single-nucleotide polymorphisms in the p53 pathway regulate fertility in humans / H.J. Kang, Z. Feng, Y. Sun [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2009. – № 106(24). – P.9761-9766.

140. Smith, R. J. Capture of endothelial cells under flow using immobilized vascular endothelial growth factor / R.J. Smith, M. T. Koobatian, A. Shahini // *Biomaterials.* – 2015. – № 51. – P. 303–312.

141. Smith, S. K. The role of leukemia inhibitory factor and interleukin-6 in human reproduction / S. K. Smith, D. S. Charnock-Jones, A. M. Sharkey // *Hum Reprod.* – 1998.

– № 3. – P. 237-246.

142. Snider, A P. Obesity induces ovarian inflammation and reduces oocyte quality / A.P, Snider, J. R. Wood // *Reproduction*. – 2019. – № 158(3). – P. R79-R90.

143. Soares, S. R. Diagnostic accuracy of sonohysterography, transvaginal sonography, and hysterosalpingography in patients with uterine cavity diseases. / S. R, Soares // *FertilSteril*. – 2000. – № 73(2). – P. 406-411.

144. STRING Database : functional protein association networks. – Режим доступа: <https://string-db.org/cgi/network.pl?taskId=UOEovP5PurYX&allnodes=1>

145. Suman, P. LIF-STAT signaling and trophoblast biology / P. Suman, S. S. Malhotra, S. K. Gupta // *JAKSTAT*. – 2013. – № 2(4). – P. e25155.

146. Takahashi, A. Irreversibility of cellular senescence: dual roles of p16INK4a/Rb-pathway in cell cycle control / A. Takahashi, N. Ohtani, E. Hara // *Cell Div*. – 2007. – № 2. – P. 10.

147. Talmor, A. Female obesity and infertility / A. Talmor, B. Dunphy // *Best Pract ResClin Obstet Gynaecol*. – 2015. – № 29(4). – P. 498-506.

148. Telenti, A. Deep sequencing of 10,000 human genomes / A. Telenti, L. C. Pierce, W.H. Biggs // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2016. – № 113. – P. 11901–11906.

149. The antiproliferative action of progesterone in uterine epithelium is mediated by Hand2 / Q. Li, A. Kannan, F. J. De Mayo [et al.] // *Science*. – 2011. – № 331(6019). – P. 912-916.

150. The association between vaginal microbiota and female infertility: a systematic review and meta-analysis / X. Hong, J. Ma, J. Yin [et al.] // *Arch Gynecol Obstet*. – 2020. – № 302(3). – P. 569 -578.

151. The low expression of leukemia inhibitory factor in endometrium: possible relevant to unexplained infertility with multiple implantation failures / M. Wu, Y. Yin, M. Zhao [et al.] // *Cytokine*. – 2013. – № 62(2). – P. 334–339.

152. The p53-HDM2 gene-gene polymorphism interaction is associated with the development of missed abortion / Y. Fang, B. Kong, Q. Yang [et al.] // *Hum Reprod*. – 2011. – № 26(5). – P. 1252-1258.

153. The MDM2-p53 pathway revisited / S. Nag, J. Qin, K. S. Srivenugopal [et al.]

// Journal of biomedical research. – 2013. – Vol. 27, № 4. – P. 254.

154. The new function of p53 family and its pathway related proteins in female reproduction / H. Zhu, A. Li, J. Yu [et al.] // Yi Chuan= Hereditas. – 2012. – Vol. 34, № 8. – P. 943-949.

155. The Role of Oxidative Stress and Natural Antioxidants in Ovarian Aging / L. Yang, Y. Chen, Y. Liu [et al.] // Front Pharmacol. – 2020. – № 11. – P. 617843.

156. Tsevat, D. G. Sexually transmitted diseases and infertility / D. G. Tsevat, H. C. Wiesenfeld // Am J Obstet Gynecol. – 2017. – Vol. 216, № 1. – P. 1-9.

157. Uncovering signal transduction networks from high-throughput data by integer linear programming / X. M. Zhao, R. S. Wang, L. Chen [et al.] // Nucleic acids research. – 2008. – Vol. 36, № 9. – P. e48-e48.

158. Uterine Epithelial LIF Receptors Contribute to Implantation Chamber Formation in Blastocyst Attachment / Y. Fukui, Y. Hirota, T. Saito-Fujita [et al.] // Endocrinology. – 2021. – № 162(11). – P. bqab169.

159. Uterine Factor Infertility, a Systematic Review / C. Sallée, F. Margueritte, P. Marquet [et al.] // Journal of Clinical Medicine. – 2022. – № 11(16). – P. 4907.

160. Vander Borgh, M. Fertility and infertility: Definition and epidemiology / M. Vander Borgh, C. Wyns // Clinical biochemistry. – 2018. – № 62. – P. 2-10.

161. Wang, K. CASCADE\_SCAN: mining signal transduction network from high-throughput data based on steepest descent method / K. Wang, F. Hu, K. Xu // BMC Bioinformatics. – 2011. – № 12. – P. 164.

162. Wang, Y. C. H. Reconfiguring phosphorylation signaling by genetic polymorphisms affects cancer susceptibility / Y. C. H. Wang, Z. Pan, J. Ren // J Mol Cell Biol. – 2015. – № 7(3). – P. 187–202.

163. Warburton, D. Biological aging and the etiology of aneuploidy / D. Warburton // Cytogenet Genome Res. – 2005. – № 111(3-4). – P. 266-272.

164. Weiss, R.V. Female infertility of endocrine origin / R.V. Weiss, R. Clapauch // ArqBras Endocrinol Metabol. – 2014. – № 58(2). – P. 144-152.

165. WNT4 is a key regulator of normal postnatal uterine development and progesterone signaling during embryo implantation and decidualization in the mouse / H. L. Franco, D. Dai, K. Y. Lee [et al.] // *FASEB J.* – 2011. – № 25(4). – P. 1176.
166. Yatsenko, S. A. Genetics of human female infertility / S. A. Yatsenko, A. Rajkovic // *Biology of reproduction.* – 2019. – Vol. 101, № 3. – P. 549-566.
167. Yong, W. Role of Obesity in Female Reproduction / W. Yong, J. Wang, Y. Leng // *Int J Med Sci.* – 2023. – Vol. 20, № 3. – P. 366-375.
168. Yücel, B. Decline in ovarian reserve may be an undiagnosed reason for unexplained infertility: a cohort study / B. Yücel, S. Kelekci, E. Demirel // *Arch Med Sci.* – 2018. – Vol. 14, № 3. – P. 527-531.
169. Zhang, W. Diagnosing phenotypes of single-sample individuals by edge biomarkers / W. Zhang, T. Zeng, X. Liu // *J Mol Cell Biol.* – 2015. – Vol. 7, № 3. – P. 231–41.
170. Zhao, X. M. HISP: a hybrid intelligent approach for identifying directed signaling pathways / X. M. Zhao, S. Li // *J Mol Cell Biol.* – 2017. – Vol. 9, № 6. – P. 453–462.
171. ZNRF3 functions in mammalian sex determination by inhibiting canonical WNT signaling / A. Harris, P. Siggers, S. Corrochano [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2018. – № 115. – P. 5474–5479.