

© Коллектив авторов, 2020

Е.А. КНЯЗЕВА, М.В. КУЗНЕЦОВА, Е.С. ШУБИНА,
А.Ю. ГОЛЬЦОВ, А.Е. ДОННИКОВ, Е.А. КАЛИНИНА

ОСОБЕННОСТИ МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОВ *HOXA10* И *HOXA11* У ПАЦИЕНТОК С ТРУБНО-ПЕРИТОНЕАЛЬНЫМ ФАКТОРОМ БЕСПЛОДИЯ И НЕУДАЧНЫМИ ПОПЫТКАМИ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ В АНАМНЕЗЕ

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии
имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия

Цель. Оценить метилирование промоторов генов *HOXA10* и *HOXA11* у пациенток с трубно-перитонеальным фактором бесплодия и неудачными попытками ЭКО в анамнезе.

Материалы и методы. У 47 пациенток перед программой ЭКО проводилась пайпель-биопсия эндометрия с оценкой метилирования промоторов генов *HOXA10* и *HOXA11*. В зависимости от исхода следующей после проведения пайпель-биопсии программы ЭКО пациентки были разделены на 2 группы: группа 1 – пациентки, у которых беременность наступила; группа 2 – пациентки, у которых беременность не наступила.

Результаты. В ходе исследования было проанализировано метилирование 23 CpG-островков промоторного участка гена *HOXA10* и 15 CpG-островков гена *HOXA11*. В исследуемых группах не выявлено статистически значимого различия метилирования ни для одного из CpG-островков *HOXA10* и *HOXA11*.

Заключение. Полученные результаты позволяют предположить, что метилирование генов *HOXA10* и *HOXA11* является довольно консервативным параметром и, по-видимому, не вносит вклада в определение исходов программ ЭКО у пациенток исследуемой группы.

Ключевые слова: ЭКО, бесплодие, рецептивность эндометрия, окно имплантации, метилирование ДНК, *HOX*-гены, *HOXA10*, *HOXA11*.

Вклад авторов: Князева Е.А.: сбор материала, ведение пациентов, обработка клиничко-анамнестических данных; Кузнецова М.В.: молекулярно-биологические методы – бисульфитное конвертирование ДНК, ПЦР; Шубина Е.С.: биоинформатическая обработка данных; Гольцов А.Ю.: NGS-секвенирование; Донников А.Е.: разработка дизайна, биоинформатическая обработка данных; Калинина Е.А.: разработка дизайна, координация работы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Финансирование работы в рамках государственного задания.

Для цитирования: Князева Е.А., Кузнецова М.В., Шубина Е.С., Гольцов А.Ю., Донников А.Е., Калинина Е.А. Особенности метилирования генов *HOXA10* и *HOXA11* у пациенток с трубно-перитонеальным фактором бесплодия и неудачными попытками экстракорпорального оплодотворения в анамнезе. Акушерство и гинекология. 2020; 4: 140-147. <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2020.4.140-147>

© A group of authors, 2020

Е.А. KNYAZEVA, M.V. KUZNETSOVA, E.S. SHUBINA,
A.YU. GOLTISOV, A.E. DONNIKOV, E.A. KALININA

CHARACTERISTICS OF METHYLATION OF *HOXA10* AND *HOXA11* GENES IN PATIENTS WITH TUBAL AND PERITONEAL FACTOR INFERTILITY AND PREVIOUS UNSUCCESSFUL IVF ATTEMPTS

Academician V.I. Kulakov National Medical Research Centre for Obstetrics, Gynecology and Perinatology,
Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

Objective. To assess methylation of *HOXA10* and *HOXA11* gene promoters in patients with tubal and peritoneal factor infertility and previous unsuccessful in vitro fertilization (IVF) attempts.

Materials and methods. Before starting the IVF program 47 patients were performed pipelle endometrial biopsy with the assessment of methylation of *HOXA10* and *HOXA11* gene promoters. According to the outcomes of the IVF program following the pipelle biopsy, the patients were divided into two groups: group 1 included the women who achieved pregnancy, group 2 included the patients without pregnancy.

Results. During the study period, the analysis of methylation of 23 CpG islands located in the promoter regions of the HOXA10 gene was performed. In the study groups statistically significant difference in methylation was not revealed in any of CpG islands of HOXA10 and HOXA11.

Conclusion. The obtained results suggest that methylation of the HOXA10 and HOXA11 genes is rather a conservative parameter and it does not appear to influence the outcome of the IVF program in the women of the study group.

Keywords: *in vitro* fertilization, infertility, endometrial receptivity, implantation window, DNA methylation, HOX genes, HOXA10, HOXA11.

Author contributions. Knyazeva E.A.: material collection, management of patients, processing of clinical and anamnestic data; Kuznetsova M.V.: molecular biological methods, bisulphate sequencing of DNA, PCR; Shubina E.S.: bioinformatic processing of data; Goltsov A.Yu.: next generation sequencing; Donnikov A.E.: concept and design of the investigation, bioinformatic processing of data; Kalinina E.A.: concept and design of the investigation, coordination of work.

Conflict of interests. The authors declare that there are no conflicts of interest.

Financing. The research was carried out within the framework of the State Program.

For citation: Knyazeva E.A., Kuznetsova M.V., Shubina E.S., Goltsov A.Yu., Donnikov A.E., Kalinina E.A. Characteristics of methylation of HOXA10 and HOXA11 genes in patients with tubal and peritoneal factor infertility and previous unsuccessful ivf attempts. Akusherstvo i Ginekologiya/ Obstetrics and gynecology. 2020; 4: 140–147. (In Russian). <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2020.4.140-147>

По данным Всемирной организации здравоохранения, женское бесплодие в общей структуре бесплодия составляет от 8 до 29% и не имеет тенденции к снижению во всем мире [1]. При стабильной частоте традиционных вариантов бесплодия – эндокринный, трубно-перитонеальный, мужской фактор – существенно возросла роль его сочетанных форм [2]. По данным ASRM (American Society for Reproductive Medicine), по крайней мере 25% бесплодных пар имеют более одной причины бесплодия, причем проблемы могут быть у каждого из супругов, и у одного из супругов одновременно может быть несколько проблем [3]. Выявить причину бесплодия может быть достаточно трудно, поскольку встречаются различные комбинации факторов бесплодия, а также существует вероятность, что за диагностированной патологией скрывается еще и неустановленная причина [4]. Кроме того, в ряде случаев после полного клинико-лабораторного обследования причина бесплодия остается невыявленной, и пара считается здоровой. В таком случае говорят о бесплодии неясного генеза, или идиопатическом бесплодии, доля которого в структуре бесплодия может составлять 10–30% [5]. По данным ASRM, причину бесплодия не удается выявить у 10% бесплодных пар. В случае бесплодия неясного генеза нет единого алгоритма дальнейшего диагностического поиска проблемы, что объясняет совершенно различную тактику ведения: от выжидательной тактики (контролируемая индукция овуляции, внутриматочная инсеминация) до сложных протоколов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) [6, 7]. Таким образом, бесплодие неясного генеза является серьезной проблемой современной репродуктологии.

Отдельно необходимо отметить, что ряд супружеских пар с уже установленной причиной бесплодия, требующей применения методов ВРТ, не достигают наступления желанной беременности даже после повторных попыток ЭКО. Проблема повторных неудач имплантации, к которым относят

не менее 3 неудачных циклов ЭКО с переносом 1 или 2 морфологически нормальных эмбрионов в каждом цикле, очень актуальна в настоящее время, поскольку, несмотря на совершенствование диагностических методов и ВРТ, остается до сих пор нерешенной [8, 9]. Причины неудачных попыток ЭКО с переносом эмбрионов могут быть отнесены либо к неспособности эмбрионов к имплантации в эндометрий (эмбриональный фактор), либо к снижению рецептивности эндометрия (маточный фактор) [10, 11, 12, 13]. Под рецептивностью эндометрия в литературе понимают способность эндометрия принять внедряющуюся бластоцисту. Известно, что перенос эмбриона без генетических аномалий после проведения преимплантационного генетического скрининга во многих случаях не заканчивается наступлением беременности, что может свидетельствовать о маточном факторе бесплодия в связи с нарушением рецептивности эндометрия [12].

Имплантация эмбриона является сложным многостадийным процессом. Эмбрион может имплантироваться только в подготовленный эндометрий, что возможно только в определенный период менструального цикла, называемый «окном имплантации» (6–8 день после пика ЛГ и овуляции). Успешность имплантации эмбриона во многом зависит как от качества самого эмбриона, так и от морфофункционального состояния эндометрия. Морфологические изменения эндометрия наравне с экспрессией определенных факторов (гормонов, цитокинов, молекул адгезии, факторов роста и др.) в эндометрии в этот период являются определяющими для формирования полноценного «окна имплантации» и последующей успешной имплантации бластоцисты. Данные факторы были названы «маркерами эндометриальной рецептивности», к которым относятся различные инструментальные и лабораторные показатели, изменения которых могут повлиять на клинические исходы ЭКО, оцениваемые по частоте наступления беременности [13, 14].

Было выявлено, что в рецептивности эндометрия важную роль могут играть рецепторы эстрогенов и прогестерона. Также выявлен специфический ультраструктурный маркер «окна имплантации» — выросты на поверхности эндометрия (пиноподии), возникающие в середине лютеиновой фазы. Существует ряд доказательств, что начальные процессы прикрепления (адгезии) бластоцисты к эндометрию происходят именно на поверхности пиноподий [15]. Однако в литературе многократно описаны случаи нормальной ультраструктуры поверхности эпителиальных клеток у пациенток с неудачными попытками ЭКО, поэтому образование пиноподий не может быть единственным маркером, характеризующим рецептивность эндометрия [13]. Другими маркерами имплантации являются белки клеточной адгезии, включая интегрины и селектины, способствующие прикреплению эмбриона к эндометрию [16]. Однако, несмотря на то, что в литературе имеются данные об успешном применении определения интегринов в качестве маркеров «окна имплантации», не все исследователи согласны с необходимостью их определения в клинической практике [15]. Многие специалисты считают целесообразным определение в биоптатах эндометрия уровней экспрессии лейкемия-ингибирующего фактора, сосудисто-эндотелиального фактора роста, трансформирующего фактора роста $\beta 1$ и других маркеров в качестве возможных предиктивных критериев адекватной рецептивности эндометрия [13]. Таким образом, на настоящий момент не существует единственного и оптимального маркера рецептивности эндометрия, в связи с чем продолжается поиск новых информативных маркеров «окна имплантации», что могло бы позволить прогнозировать наступление беременности в программах ВРТ.

Согласно данным литературы, к числу ключевых регуляторов процессов, ответственных за рецептивность эндометрия, относятся гены *HOXA10* и *HOXA11* [17, 18]. Также было показано, что гиперметилирование промоторов данных генов может быть связано с развитием внематочной беременности [19]. Известно, что оба гена экспрессируются как в ядрах эпителия желез эндометрия, так и в строме эндометрия в различных участках матки. Экспрессия этих генов значительно возрастает в период «окна имплантации» [20]. Обнаружено, что продукт гена *HOXA10* играет важную роль в регуляции эмбрионального развития, а также контролирует циклическую трансформацию эндометрия в течение менструального цикла [21]. В исследовании Yang Y. et al. показано, что у женщин с повторными неудачами имплантации была значительно снижена экспрессия *HOXA10* гена [22, 23]. Блокирование гена *HOXA10* ведет к резкому уменьшению количества пиноподий [16]. Кроме того, в процессе трансформации эндометрия в середине цикла в клетках эндометрия значительно увеличивается экспрессия генов *HOXA10* и *HOXA11* [24]. Известно, что снижение уровня продукта того или иного гена может быть вызвано как генетическими причинами (полиморфизмом гена или мутацией), так и эпигенетической регуляцией. В частности, метилирова-

ние промоторных участков гена может приводить как к снижению экспрессии гена, так и к полной его инактивации («эпигенетическое молчание»). Du H. и Taylor H.S. был проведен обзор работ, в которых было показано, что метилирование промоторов генов *HOXA10* и *HOXA11* приводит к уменьшению их экспрессии и снижению рецептивности эндометрия [18]. Таким образом, существует достаточно оснований полагать, что гены *HOXA10* и *HOXA11* играют немаловажную роль в формировании «окна имплантации» и в определении рецептивности эндометрия.

Целью данной работы было исследование статуса метилирования промоторных участков генов *HOXA10* и *HOXA11* в биоптатах эндометрия у женщин с трубно-перитонеальным фактором бесплодия и неудачными попытками ЭКО в анамнезе.

Материалы и методы

Группу исследования составили 47 пациенток, планирующих реализацию репродуктивной функции в программе ЭКО, обратившихся в отделение вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. проф. Б.В. Леонова НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова для проведения программы ЭКО. Все пациентки соответствовали критериям включения (возраст от 18 до 40 лет, трубно-перитонеальный фактор бесплодия без выраженной патозооспермии партнера, 2 и более неудачных попыток ЭКО в анамнезе, нормальный овариальный резерв, отсутствие оперативных вмешательств на яичниках, информированное согласие на участие в исследовании). Всем пациенткам в рамках подготовки к программе ЭКО проводилось клиничко-лабораторное обследование в соответствии с Приказом МЗ от 30.09.2012г №107н «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению». Также у каждой пациентки в рамках обследования производилась аспирационная биопсия эндометрия (инструментом Pipelle) в период «окна имплантации» (7–9 день после овуляции, диагностированной при помощи ультразвукового исследования и мочевого теста на овуляцию Clear Blue [Unipath Ltd, Великобритания]). Полученные образцы эндометрия были трижды промыты буфером PBS (натрий-фосфатный буфер), затем заморожены и помещены на хранение при температуре -80°C в Биобанк ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова».

Выделение ДНК. Полученные образцы эндометрия измельчали хирургическим скальпелем и гомогенизировали. Выделение ДНК проводилось набором DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, USA).

Бисульфитная конверсия. 1 мкг геномной ДНК каждого образца подвергали бисульфитной конверсии (это позволяет химически модифицировать неметилированные остатки цитозина до урацила, что при дальнейшей полимеразной цепной реакции (ПЦР) приводит к подстановке в эту позицию тимина, тогда как метилированные остатки цитозина остаются немодифицированными) с использованием набора EZ DNA Methylation-Gold Kit (ZymoResearch, USA).

ПЦР-амплификация. ДНК-амплификация проводилась при общем объеме реакции 25 мкл, содержащем смесь объемом 1 мкл прямых и обратных праймеров (10 мкмоль) и 2 мкл ДНК после бисульфитного конвертирования. Было использовано 2 праймера из работы Wu et al. [25], которые подобраны к CpG-богатому фрагменту в промоторе HOXA10 на 5'-конце выше экзона I (F I регион).

Прямой:

5'-TGGGGTAGTTTTTATAGTTTTTG-3'.

Обратный:

5'-AACCCSTTСТААСТААСАТТТСТТ-3' (биотинилированный).

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

Секвенирование: амплифицированные фрагменты были секвенированы с использованием полупроводникового секвенирования на приборе Ion S5 (Thermo Fisher Scientific). Подготовка библиотек для секвенирования и секвенирование проводили согласно инструкции производителя.

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

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

Всем пациенткам проводилась программа ЭКО по стандартному протоколу с препаратами антагониста гонадотропин-рилизинг-гормона. Стимуляция функции яичников проводилась с применением рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона. Триггер овуляции вводился при наличии лидирующих фолликулов диаметром 17 мм и более. В качестве триггера овуляции использовался препарат хорионического гонадотропина. Перенос 1 бластоцисты хорошего качества (по классификации D. Gardner и W.B. Schoolcraft) осуществляли на 5-е сутки после проведения трансвагинальной пункции яичников. Патология эндометрия исключена. При подъеме уровня хорионического гонадотропина в сыворотке крови через 14 дней после переноса эмбриона в полость матки регистрировали биохимическую беременность, а при визуализации плодного яйца в полости матки через 21 день после переноса эмбриона – клиническую беременность.

Статистическая обработка данных выполнялась на индивидуальном компьютере с помощью пакета статистических программ Statistica 12 (США) и SPSS Statistics 23 (США).

Для качественных данных определяли доли и риски (%). Для сравнения категориальных данных в двух группах, а также для оценки значимых различий между ними использовали непараметрические методы (точный критерий Фишера). Для количественных данных результаты указывались как медиана, 25–75 процентиля. Для сравнения количественных данных в двух группах также применяли методы непараметрической статистики (тест Манна–Уитни). Различия между величинами считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

Исследование было одобрено комиссией по этике ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России.

Результаты и обсуждение

В зависимости от исхода следующей после проведения пайпель-биопсии программы ЭКО пациентки были разделены на 2 группы: группа 1 – пациентки, у которых беременность наступила; группа 2 – пациентки, у которых беременность не наступила. На основании критерия Колмогорова–Смирнова выявлено, что возраст и антропометрические данные пациенток в исследуемых группах подчинялись закону нормального распределения ($p > 0,05$), однако, учитывая небольшой объем выборки для каждой из групп, мы применяли здесь и далее непараметрические методы расчета. Тест Манна–Уитни не выявил статистически значимых различий по возрасту, росту, массе тела и, как следствие, по индексу массы тела между исследуемыми группами (таблица).

Также не было выявлено статистически значимых различий между группами при оценке менструальной функции (возраст менархе, длительность менструального цикла, продолжительность менструального кровотечения) и половой функции (возраст начала половой жизни) (таблица).

В структуре экстрагенитальных заболеваний статистически значимых различий между исследуемыми группами обнаружено не было. Гинекологическая заболеваемость и акушерский анамнез пациенток также не различались в обеих группах, как видно из таблицы. Следует отметить, что в обеих группах пациенток в анамнезе не было образований яичников, и, как следствие, резекция яичников не проводилась. Также ни у одной пациентки, включенной в исследование, не встречался синдром поликистозных яичников. При проведении сравнительной оценки гормонального статуса пациенток статистически значимых различий выявлено не было.

Нами было сделано предположение, что у исследуемых пациенток с положительным и отрицательным исходом программ ВРТ различается метилирование промоторов HOXA10 и HOXA11 генов, что может влиять на экспрессию данных генов и, как следствие, на рецептивность эндометрия. Промотор гена включает в себя несколько участков последовательности ДНК, в которых рядом находятся цитозинный и гуаниновый остатки – CpG-островки.

Известно, что ферменты, осуществляющие метилирование ДНК (ДНК-метилтрансферазы), могут присоединять метильную группу на цитозин только в области CpG-островков. С метилированием CpG-островков в промоторе гена в конечном итоге связано снижение экспрессии этого гена и подавление его функции.

Метилирование ДНК можно выявить с помощью химической реакции бисульфитной конверсии. В одноцепочечной ДНК бисульфит воздействует на остатки цитозина, что приводит в итоге к их превращению в урацил. Однако в случае присутствия метильной группы на остатке цитозина такая конверсия произойти не может. Зная последовательность нуклеотидов в нормальном геноме человека и последовательность ДНК после проведения бисульфитной конверсии, можно определить, какие CpG-островки были метилированы, а какие – нет. Для определения последовательности после конверсии может быть использован ряд методов,

например, метилспецифическая ПЦР, секвенирование по Сэнгеру, секвенирование нового поколения (NGS). Последний вариант позволяет точно и быстро определить в смеси последовательность всех присутствующих последовательностей ДНК.

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

Результаты сравнения профилей метилирования промоторов генов *HOXA10* и *HOXA11* представлены на рисунках 1 и 2 соответственно.

Таблица. Клинико-анамнестические характеристики исследуемых групп

Параметр	Группа 1 (беременные)	Группа 2 (небеременные)	P-уровень значимости
Возраст и антропометрические характеристики			
Возраст, лет**	33,0 (31,0–36,0)	34,0 (31,5–38,0)	0,349
Рост, см**	168,0 (164,0–170,0)	167,0 (162,0–170,0)	0,614
Масса тела, кг**	65,0 (54,0–71,0)	60,0 (52,0–68,0)	0,384
Индекс массы тела, кг/м ² **	23,0 (19,5–25,8)	21,6 (19,8–24,8)	0,462
Менструальная и половая функция			
Возраст менархе, лет**	13,0 (13,0–14,0)	13,0 (12,0–14,0)	0,112
Длительность менструации, дней**	5,0 (4,0–5,0)	5,0 (4,0–5,5)	0,971
Длина цикла, дней**	28,0 (28,0–30,0)	28,0 (28,0–28,5)	0,650
Возраст начала половой жизни, лет**	18,0 (18,0–19,0)	18,0 (17,0–18,5)	0,132
Гинекологический и акушерский анамнез			
Инфекции, передающиеся половым путем в анамнезе*	52,6% (10)	53,6% (15)	> 0,05
Наружный генитальный эндометриоз I–II степени*	15,8% (3)	14,3% (4)	> 0,05
Миома матки*	15,8% (3)	17,9% (5)	> 0,05
Патология эндометрия (гиперплазия эндометрия, полипы эндометрия)*	31,6% (6)	39,2% (11)	> 0,05
Эрозия шейки матки*	21,1% (4)	10,7% (3)	> 0,05
Число внутриматочных вмешательств**	1 (0–2)	1 (1–2)	0,150
Тип бесплодия*:			
первичное	57,9% (11)	42,9% (12)	> 0,05
вторичное	42,1% (8)	57,1% (16)	
Длительность бесплодия, лет**	5,0 (5,0–7,0)	6,5 (3,5–9,5)	0,743
Число беременностей в анамнезе**	0 (0–2)	1 (0–2)	0,457
Число беременностей после ЭКО**	0 (0–0)	0 (0–0)	0,190
Число искусственных прерываний беременности**	0 (0–0)	0 (0–1)	0,062
Число самопроизвольных прерываний беременности**	0 (0–0)	0 (0–0)	0,687
Число родов**	0 (0–0)	0 (0–0)	0,383

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

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

Всего в ходе исследования было проанализировано метилирование 23 CpG-островков промоторного участка гена *HOXA10* и 15 CpG-островков гена *HOXA11*. В результате не было выявлено достоверного различия метилирования ни для одного из CpG-островков обоих генов. Это позволяет предположить, что в исследованной популяции у паци-

енток с повторными неудачными попытками ЭКО в анамнезе метилирование генов *HOXA10* и *HOXA11* является довольно консервативным параметром и, по-видимому, не вносит вклада в определение исходов программ ЭКО.

Хотя существует множество исследований, в которых проводится анализ связи метилирования про-

Рис. 1. График сравнения профилей метилирования CpG-островков в промоторе гена *HOXA10* в группах 1 и 2 (для наглядности профили метилирования у разных групп сдвинуты по горизонтали)

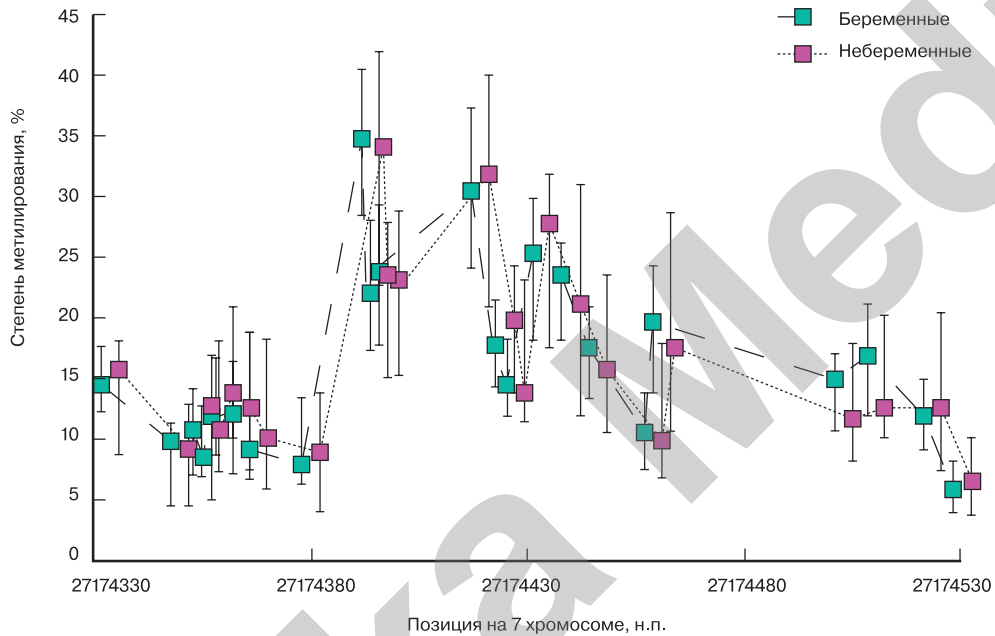
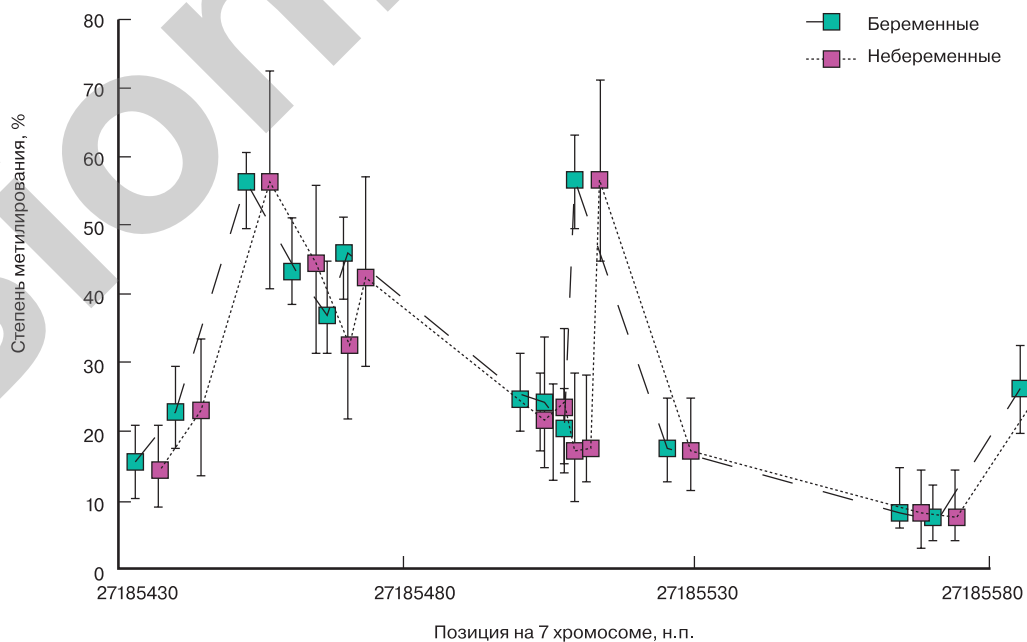


Рис. 2. График сравнения профилей метилирования CpG-островков в промоторе гена *HOXA11* в группах 1 и 2 (для наглядности профили метилирования у разных групп сдвинуты по горизонтали)



моторов генов *HOXA10* и *HOXA11* с различными факторами бесплодия, у женщин с трубно-перитонеальным бесплодием ранее роль метилирования генов *HOXA10* и *HOXA11* в составе многофакторных моделей не анализировалась. В проспективное наблюдательное исследование Margioulas-Siarkou C. et al. было включено 65 пациенток с бесплодием различного генеза, у 13 из них был трубно-перитонеальный фактор, а у 15 – бесплодие неясного генеза. В группу контроля вошли 25 здоровых пациенток. В ходе исследования было выявлено, что у пациенток с бесплодием неясного генеза в эндометрии экспрессия *HOXA11* статистически ниже, а у пациенток с трубно-перитонеальным фактором бесплодия значимого отличия экспрессии данных генов не обнаруживалось. При этом метилирование генов в данном исследовании не анализировалось [27].

В другом исследовании с наблюдательным когортным дизайном с участием 18 здоровых женщин, 12 женщин с привычными неудачами имплантации и 20 женщин с привычным невынашиванием беременности было выявлено, что в эндометрии здоровых женщин экспрессия белка *HOXA10* значимо выше, чем у остальных групп пациенток, что, вероятно, указывает на роль *HOXA10* в неудачных исходах программ ВРТ. Однако анализа метилирования генов в данном исследовании также не проводилось [22].

Заключение

Таким образом, ранее у пациенток с трубно-перитонеальным бесплодием и неудачными попытками ЭКО в анамнезе статус метилирования промоторных участков генов *HOXA10* и *HOXA11* не рассматривался, хотя роль данных генов в неудачных исходах предполагалась. В исследованной нами популяции роль метилирования промоторов генов *HOXA10* и *HOXA11* для прогноза исходов программ ВРТ не подтвердилась, поскольку профиль метилирования промоторов данных генов является довольно консервативным.

Литература/References

1. Доклад о репродуктивном здоровье. Всемирная организация здравоохранения, Европейское региональное бюро 2011 год. [Doklad o reproduktivnom zdorov'e. Vsemirnaya organizatsiya zdravookhraneniya, Evropeiskoe regional'noe byuro 2011. (in Russian).]
2. Краснополянская К.В., Назаренко Т.А. Клинические аспекты лечения бесплодия в браке. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2013. [Krasnopol'skaya K.V., Nazarenko T.A. Klinicheskie aspekty lecheniya besplodiya v brake. Moscow: GEOTAR-Media; 2013. (in Russian).]
3. European Society of Human Reproduction and Embryology. ART fact sheet. [Электронный ресурс]. Available at: https://www.eshre.eu/-/media/sitecore-files/Guidelines/ART-fact-sheet_vFebr18_VG.pdf Accessed 02.10.2019.
4. Корсак В. Сегодня существуют технологии, позволяющие вылечить бесплодие. Эффективная фармакотерапия. 2012; 18: 4-6. [Korsak V. Segodnya sushchestvuyut tekhnologii, pozvolyayushchie vylechit' besplodie. Effektivnaya farmakoterapiya. 2012; (18): 4-6. (in Russian).]
5. Leanza V, Coco L., Grasso F, Leanza G., Zarbo G., Palumbo M. Unexplained infertility and ovulatory induction with menopausal gonadotropins. Minerva Ginecol. 2014; 66(3): 303-7.
6. McLachlan R.I. Approach to the patient with oligozoospermia. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2013; 98(3): 873-80. <https://dx.doi.org/10.1210/jc.2012-3650>.
7. van den Boogaard N.M., Bendsdorp A.J., Oude Rengerink K., Barnhart K., Bhattacharya S., Custers I.M. et al. Prognostic profiles and the effectiveness of assisted conception: secondary analyses of individual patient data. Hum. Reprod. Update. 2014; 20(1): 141-51. <https://dx.doi.org/10.1093/humupd/dmt035>.
8. Guo F, Zhou M.J., Zhang A.J. Advances in the treatment of recurrent implantation failure. Reprod. Dev. Med. 2017; 1(2): 123-6. <https://dx.doi.org/10.4103/2096-2924.216860>.
9. Moura-Ramos M., Gameiro S., Canavarro M.C., Soares I. Assessing infertility stress: re-examining the factor structure of the fertility problem inventory. Hum. Reprod. 2012; 27(2): 496-505. <https://dx.doi.org/10.1093/humrep/der388>.
10. Das M., Holzner H.E. Recurrent implantation failure: gamete and embryo factors. Fertil. Steril. 2012; 97(5): 1021-7. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.02.029>.
11. Корсак В.С., Смирнова А.А., Шурьгина О.В. Регистр центров ВРТ России. Отчет за 2013г. Проблемы репродукции. 2015; 21(6): 17-24. [Korsak V.S., Smirnova A.A., Shurygina O.V. Russian ART register, 2013. Russian Journal of Human Reproduction/Problemy reproduktivnoi. 2015; 21(6): 17-24. (in Russian).]
12. Herington J.L., Guo Y., Reese J., Paria B.C. Gene profiling the window of implantation: Microarray analyses from human and rodent models. J. Reprod. Health Med. 2016; 2(Suppl. 2): S19-25. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jrh.2016.11.006>.
13. Краснополянская К.В., Назаренко Т.А., Ершова И.Ю. Современные подходы к оценке рецептивности эндометрия (обзор литературы). Проблемы репродукции. 2016; 22(5): 61-9. [Krasnopol'skaya K.V., Nazarenko T.A., Ershova I.Yu. Modern approaches to endometrial receptivity assessment (a review). Russian Journal of Human Reproduction/Problemy reproduktivnoi. 2016; 22(5): 61-9. (in Russian).] <https://dx.doi.org/10.17116/repro201622561-69>.
14. Ginsburg E.S., Racowsky C., eds. In vitro fertilization: A comprehensive guide. New York: Springer; 2012.
15. Боярский К.Ю., Гайдуков С.Н., Пальченко Н.А. Современный взгляд на проблему рецептивности и тонкого эндометрия в программах ВРТ (обзор литературы). Проблемы репродукции. 2013; 19(4): 51-60. [Boyarskii K.Yu., Gaidukov S.N., Pal'chenko N.A. Modern look on endometrial receptivity and thin endometrium in art cycles (a review). Russian Journal of Human Reproduction/Problemy reproduktivnoi. 2013; 19(4): 51-60. (in Russian).]
16. Коган Е.А., Калинина Е.А., Колотовкина А.В., Файзуллина Н.М., Адамян Л.В. Морфологический и молекулярный субстрат нарушения рецептивности эндометрия у бесплодных пациенток с наружно-генитальным эндометриозом. Акушерство и гинекология. 2014; 8: 47-52. [Kogan E.A., Kalinina E.A., Kolotovkina A.V., Faizullina N.M., Adamyan L.V. The morphological and molecular substrate of impaired endometrial receptivity in infertile patients with external genital endometriosis who enter an assisted reproductive technology program. Obstetrics and Gynecology/Akusherstvo i ginekologiya. 2014; (8): 47-52. (in Russian).]
17. Князева Е.А., Алиева К.У., Калинина Е.А. Яичниковая беременность после программы экстракорпорального оплодотворения у пациентки со сниженной рецептивностью эндометрия. Акушерство и гинекология. 2018; 8: 180-5. [Knyazeva E.A., Alieva K.U., Kalinina E.A. Ovarian pregnancy after an IVF program in a patient with reduced endometrial receptivity. Obstetrics and Gynecology/Akusherstvo i ginekologiya. 2018; (8): 180-5. (in Russian).] <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2018.8.180-184>.
18. Князева Е.А., Калинина Е.А., Быстрицкий А.А., Алиева К.У., Байрамова Г.Р. Роль HOX-генов при заболеваниях репродуктивной системы женщины, ассоциированных с бесплодием. Акушерство и гинекология. 2017; 11: 16-22. [Knyazeva E.A., Kalinina E.A., Bystritsky A.A., Alieva K.U., Bairamova G.R. Role of HOX genes associated with infertility in female reproductive system diseases. Obstetrics and Gynecology/Akusherstvo i ginekologiya. 2017; (11): 16-22. (in Russian).] <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2017.11.16-22>.

19. Ping L.I., Xia C.A.I. Effect of HOXA10 gene expression on embryonic implantation in patients with endometriosis. *J. Int. Reprod. Health Fam. Plan.* 2013; 32(6): 506-8.
20. Taniguchi Y. Hox transcription factors: modulators of cell-cell and cell-extracellular matrix adhesion. *Biomed. Res. Int.* 2014; 2014: 591374. <https://dx.doi.org/10.1155/2014/591374>.
21. Simon A., Laufer N. Repeated implantation failure: clinical approach. *Fertil. Steril.* 2012; 97(5): 1039-43. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.03.010>.
22. Yang Y., Chen X., Saravelos S.H., Liu Y., Huang J., Zhang J., Li T.C. HOXA-10 and E-cadherin expression in the endometrium of women with recurrent implantation failure and recurrent miscarriage. *Fertil. Steril.* 2017; 107(1): 136-43. e2. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.09.016>.
23. Bourdic A., Ahmad S.F., Lachhab A., Akoum A. Regulation of inflammatory and angiogenesis mediators in a functional model of decidualized endometrial stromal cells. *Reprod. Biomed. Online.* 2016; 32(1): 85-95. <https://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.09.011>.
24. Du H., Taylor H.S. The role of Hox genes in female reproductive tract development, adult function, and fertility. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2016; 6(1): a023002. <https://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a023002>.
25. Wu Y., Halverson G., Basir Z., Strawn E., Yan P., Guo S.W. Aberrant methylation at HOXA10 may be responsible for its aberrant expression in the endometrium of patients with endometriosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2005; 193(2): 371-80. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2005.01.034>.
26. Сухих Г.Т., Осипьянц А.И., Мальцева Л.И., Смолина Г.Р., Полозников А.А., Муйжнек Е.Л., Киселев В.И. Аномальное гиперметилирование генов HOXA10 и HOXA11 при бесплодии, ассоциированном с хроническим эндометритом. *Акушерство и гинекология.* 2015; 12: 69-74. [Sukhikh G.T., Osipyants A.I., Maltseva L.I., Smolina G.R., Poloznikov A.A., Muizhnek E.L., Kiselev V.I. Abnormal hypermethylation of HOXA10 and HOXA11 genes in chronic endometritis-related infertility. *Obstetrics and Gynecology Akusherstvo i ginekologiya.* 2015; (12): 69-74. (in Russian).]
27. Margioulas-Starkou C., Petousis S., Miliats S., Ravanos K., Kalogiannidis I., Mavromatidis G. et al. Endometrial expression of Leukemia Inhibitory Factor (LIF), LIF-receptor and HOXA11 but not HOXA-10 is significantly impaired in women with unexplained infertility during implantation window. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2016; 206: e165-6. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ejogrb.2016.07.410>.

Поступила 03.10.2019

Принята в печать 29.11.2019

Received 03.10.2019

Accepted 29.11.2019

Сведения об авторах:

Князева Екатерина Андреевна, аспирант отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. Б.В. Леонова ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России. Тел.: +7 (495) 438-25-01. E-mail: dr.knyazeva.ea@gmail.com. ORCID: 0000-0002-1472-2018. Адрес: 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

Кузнецова Мария Владимировна, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических методов ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России. Тел.: +7 (495) 438-13-41. E-mail: mkarja@mail.ru. ORCID: 0000-0003-3790-0427. Адрес: 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

Шубина Екатерина Сергеевна, к.б.н., заведующий лабораторией анализа геномных данных ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России. Тел.: +7 (926) 721-87-17. E-mail: e_shubina@oparina4.ru. Адрес: 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

Гольцов Андрей Юрьевич, старший научный сотрудник лаборатории молекулярно-генетических методов ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России. Тел.: +7 (495) 438-13-41. E-mail: andrey.goltsov@gmail.com. ORCID: 0000-0002-4004-4214. Адрес: 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

Донников Андрей Евгеньевич, к.м.н., заведующий лабораторией молекулярно-генетических методов, врач клинической лабораторной диагностики, ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России. Тел.: +7 (495) 438-49-51. E-mail: a_donnikov@oparina4.ru. ORCID: 0000-0003-3504-2406. Адрес: 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

Калинина Елена Анатольевна, д.м.н., доцент, руководитель отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. Б.В. Леонова ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России. Тел.: +7 (495) 438-13-41. E-mail: e_kalinina@oparina4.ru. ORCID: 0000-0002-8922-2878. Адрес: 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

About the authors:

Ekaterina A. Knyazeva, Post-graduate student of B.V. Leonov Department of Auxiliary Technologies in Infertility Treatment, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov. Tel.: +7 (495)438-25-01. E-mail: dr.knyazeva.ea@gmail.com. ORCID: 0000-0002-1472-2018. 4 Oparina str., Moscow, 117997, Russian Federation.

Maria V. Kuznetsova, PhD, Researcher of the laboratory of molecular genetics methods, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov. Tel.: +7(495)438-22-92. E-mail: mkarja@mail.ru. ORCID: 0000-0003-3790-0427

Ekaterina S. Shubina, PhD, head of the Department of Laboratory genomic data, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov. Tel.: +7(926)721-87-17 E-mail: e_shubina@oparina4.ru. 4 Oparina str., Moscow, 117997, Russian Federation.

Andrey Yu. Goltsov, Researcher of the laboratory of molecular genetics methods, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov. Tel.: +7(495)438-22-92. E-mail: andrey.goltsov@gmail.com. ORCID: 0000-0002-4004-4214. 4 Oparina str., Moscow, 117997, Russian Federation.

Andrey E. Donnikov, PhD, Head of the Department of Laboratory and Genetic Methods, National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov. Tel.: +7(495)438-77-00. E-mail: a_donnikov@oparina4.ru. ORCID: 0000-0003-3504-2406. 4 Oparina str., Moscow, 117997, Russian Federation.

Elena A. Kalinina, MD, Associate Professor, Chief of B.V. Leonov Department of Auxiliary Technologies in Infertility Treatment named after professor B.V. Leonov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov. Tel.: +7(495)438-13-41. E-mail: e_kalinina@oparina4.ru. ORCID: 0000-0002-8922-2878. 4 Oparina str., Moscow, 117997, Russian Federation.