

Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Києво-Могилянська академія»
Факультет природничих наук
Кафедра лабораторної діагностики біологічних систем

Магістерська робота

на тему: **«ВИЗНАЧЕННЯ РЕЦЕПТИВНОСТІ ЕНДОМЕТРІЮ ЗА
ДОПОМОГОЮ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ»**

Виконала: студентка 2-го року навчання
Галузь знань: 09 Біологія
Спеціальність: 091 Біологія
Освітньо-наукова програма: Лабораторна
діагностика біологічних систем
Яненко Марія Вячеславівна

Керівники:
Будаш Г. В.,
кандидат біологічних наук,
старший викладач НаУКМА
Кременська Ю. В.,
кандидат біологічних наук,
керівник Генетичного Лабораторного
Центру, ISIDA-IVF

Рецензент:
Бровко А. О.,
кандидат біологічних наук,
завідувач молекулярно-цитогенетичної
лабораторії Генетичного Лабораторного
Центру, ISIDA-IVF

Кваліфікаційну роботу захищено
з оцінкою _____

Секретар ЕК
Пахаренко М. В.
«____» червня 20__ року

Київ – 2020

ЗМІСТ

	Ст.
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	4
ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	8
1.1. Чинники сприйнятливості ендометрію.	8
1.2. Фізіологія лютеїнової фази.	10
1.3. Процес імплантації бластоцисти.	12
1.4. Огляд методів визначення рецептивності ендометрію.	15
1.4.1. Гістологічний метод.	15
1.4.2. Визначення рецептивності ендометрію за допомогою скануючої електронної мікроскопії.	17
1.4.3. Імуногістохімічне дослідження ендометрію.	18
1.4.4. Визначення рівня простагландинів PGE ₂ та PGF _{2α} .	18
1.4.5. Молекулярно-генетичний метод визначення рецептивності.	20
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	23
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	23
2.1. Об'єкт та предмет дослідження.	23
2.2. Використані реактиви.	
2.3. Використані матеріали.	23
2.4. Використане обладнання.	24
2.5. Використані методи.	25
2.5.1. Схема роботи.	26
2.5.2. Аспіраційна біопсія ендометрію.	27
2.5.3. Протокол реєстрації аспірату ендометрію.	27
2.5.4. Підготовка приміщення до виділення РНК.	28
2.5.5. Виділення РНК із тканин ендометрію.	28

2.5.6. Вимірювання концентрації РНК.	29
2.5.7. Постановка ПЛР у реальному часі.	29
2.5.8. Синтез комплементарної ДНК.	31
2.5.9. Аналіз отриманих результатів.	32
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	34
3.1. Визначення рівня експресії генів та аналіз відмінності цих показників у різні дні забору.	34
3.2. Оцінка динаміки експресії генів у різних пацієнтів.	40
3.3. Аналіз результативності методу визначення рецептивної фази.	44
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ	48
ВИСНОВКИ	53
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	54

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АЕ	– аспірат ендометрію.
БМ	– біоматеріал.
ДНК	– дезоксирибонуклеїнова кислота.
ДРТ	– допоміжні репродуктивні технології.
ЛГ	– лютеїнізуючий гормон.
мкл	– мікролітр.
нг	– нанограм.
НЛФ	– недостатність лютеїнової фази.
ПГД	– передімплантаційна діагностика.
ПЛР-RT	– полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі (<u>R</u>real <u>T</u>ime, RT).
РНК	– рибонуклеїнова кислота.
ФСГ	– фолікулостимулюючий гормон
с-ДНК	– комплементарна ДНК (<u>C</u>omplementary, c)
dNTP	– дезоксинуклеозидтрифосфати (<u>D</u>eoxyNucleosideTriPhosphate, dNTP).
RNase-free	– не містить рибонуклеаз (<u>R</u>iboNuclease free, RNase-free).

ВСТУП

Проблематика питання зачаття дитини стала головною причиною у створенні великої галузі допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ). За статистикою по допомогу звертається кожна п'ята пара і половині з них потрібна допомога спеціалістів із цієї галузі. На сьогоднішній день методи мають велику ступінь розвитку. Для пар, які планують батьківство стали доступними послуги замороження (вітрифікації) гамет та ембріонів, запліднення методом фертилізації *in vitro* і шляхом ін'єкції сперматозоїда у цитоплазму яйцеклітини (метод ICSI) [1]. За останні 30 років у батьків які скористалися методом «штучного запліднення», в цілому світі народилося більше трьох з половиною мільйонів дітей. Проте, незважаючи на розвиток у галузі допоміжних репродуктивних технологій, частка неуспішних програм залишається досить суттєвою (рис. 1.1.1) [3].

Також значно розвинувся і набув розголосу скринінг бластоцист за допомогою ПГД – передімплантаційної діагностики, методу генетичного дослідження ембріонів людини [2]. Було встановлено, що фактор чоловічого безпліддя також існує і складає майже половину випадків причин непліддя пар. До питань безплідності пар почали підходити комплексно.

Передімплантаційна генетична діагностика (ПГД) – метод діагностики, який дозволяє виявити бластоцисти із генетичними чи хромосомними патологіями [1]. Він допомагає збільшити ефективність екстракорпорального запліднення (ЕКЗ) за рахунок відсіювання бластоцист із виявленими специфічними патологіями [2]. Але навіть такий прогрес методів не гарантує повної успішності програм ДРТ.

Однією із причин невдалих протоколів ДРТ є зміщене «вікно імплантації». Перенесення ембріонів має відбутися, коли ендометрій рецептивний. Тож ефективність допоміжних програм залежить не тільки від бластоцист, а і від стану ендометрію. Адже саме тканина ендометрію має

прийняти ембріон і дати йому змогу розвиватися далі. Діалог між ембріоном та ендометрієм можливий лише у період відкритого «вікна імплантації». У цей момент ендометрій набуває сприйнятливих властивостей та може імплантувати бластоцисту [3]. Але в окремих випадках «вікно імплантації» може бути зміщене. І цей фактор може зіграти вирішальну роль після всіх маніпуляцій, проведених під час ДРТ.

За сучасними даними 2/3 циклів ДРТ не призводять до народження дитини [4]. А частка еуплоїдних ембріонів, що не імплантуються сягає 40 % [5, 6]. Показники успішності програм ДРТ надихнули дослідників на винайдення та удосконалення методів визначення «вікна імплантації» для покращення ефективності [7].

Метод дослідження рецептивності ендометрію зможе допомогти усунути фактор впливу нерецептивного ендометрію на ембріотрансфер. На сьогоднішній день створено багато методів, які дозволяють визначити фазу сприйнятливого ендометрію за допомогою морфології тканини ендометрію, досліджуючи його зміни протягом циклу. Є методи, які визначають молекулярні показники як, наприклад, концентрацію білків, факторів росту, цитокінів, тощо. Але вони дуже відрізняються ефективністю [8].

Дослідження експресії генів показали найбільший рівень достовірного визначення фази рецептивності ендометрію. На генетично-молекулярному рівні можна зафіксувати картину динаміки експресії генів, які є показовими для рецептивної фази. Дослідження експресії можна провести за допомогою секвенування всіх 238 генів із позитивною динамікою під час змін фаз ендометрію. Більш доступним способом є аналіз невеликих груп генів, який має більш специфічний підхід. Це пояснюється тим, що досліджуються найважливіші гени для визначення трьох фаз ендометрію: передрецептивної, рецептивної та пострецептивної фази.

Робота виконана на базі Генетичного Лабораторного Центру клініки ISIDA-IVF у молекулярно-генетичному відділі.

Метою роботи є дослідити та проаналізувати визначення рецептивності ендометрію за допомогою експресії генів.

Відповідно до мети були поставлені наступні завдання:

1. Визначити рівень експресії досліджуваних генів.
2. Проаналізувати відмінності показників, залежно від доби забору матеріалу.
3. Порівняти експресію генів зразків під час різних фаз ендометрію, які були у день забору матеріалу.
4. Проаналізувати результативність дослідження фаз ендометрію та успішність імплантації.

Об'єктом дипломної роботи була експресія генів у тканині ендометрію людини.

Предметом кваліфікаційної роботи були показники експресії генів, які змінювалися із розвитком ендометрію.

Методи, які були використані: виділення РНК із тканини ендометрію, вимірювання концентрації РНК флуорометром, молекулярно-генетичний метод полімеразно-ланцюгової реакції, метод синтезу комплементарної ДНК.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Відомі чинники сприйнятливості ендометрію до імплантації бластоцисти

У 1945 році Паола Вігано із групою вчених сформулювали наступний вислів: «Бластоциста може віртуально імплантуватися у будь-якому місці людського тіла, окрім нерцептивного ендометрію». Насправді є безліч механізмів, що регулюють процес імплантації, та ендометрій відіграє ключову роль формуючи так зване «вікно імплантації». Тканина ендометрію не є рецептивною допоки вона не пройде етап підготовки – це є унікальною властивістю цієї тканини. Під час «вікна імплантації» ендометрій є найбільш сприйнятливий до сигналів бластоцисти і може на них реагувати та відповідати [9]. За допомогою сигналів здійснюється діалог між матір'ю та ембріоном, який є запорукою успішної імплантації та вагітності [10]. Дослідження питання порушеного «вікна імплантації» стало дуже актуальним, адже воно визначається генетично і не може регулюватися медикаментозно. Тому, вчені ще із 50-их років активно почали досліджувати властивості сприйнятливого ендометрію та методи їх дослідження.

Структурні зміни ендометрію протягом менструального циклу забезпечуються гормоном із фолікулів – естрадіолом, та гормоном жовтого тіла – прогестероном [11]. Вплив цих гормонів призводить до проліферації, секреції та трансформації ендометрію. Під час цих трансформацій ендометрій потовщується і стає комфортним місцем для імплантації бластоцисти [10].

Перш за все для визначення рецептивної фази ендометрію до уваги береться товщина ендометрію. Її можна визначити за допомогою трансвагінального ультразвукового дослідження або біопсії. Дослідження

проводиться у перший день виявлення лютеїнізуючого гормону у крові пацієнток. Це пов'язано з тим, що у цей день починається вихід яйцеклітини у маткову трубу та ендометрій готується до імплантації. Результати дослідження показують, що ендометрій товщий за 12 мм у цей день збільшує шанси на успішну імплантацію в тричі [12]. Так само загальний об'єм ендометрію має сягати більше 2 мл для позитивного прогнозу адгезії та імплантації бластоцисти [13]. Цей показник можна виміряти за допомогою трансвагінального ультразвукового дослідження.

Вигляд ендометрію зафіксований ультразвуком може мати декілька характеристик: однорідний, двошаровий, тришаровий. Була визначена певна кореляція, що шаруватість ендометрію має зв'язок із успішною імплантацією [14].

Крім морфологічних факторів відзначають також молекулярні медіатори рецептивного ендометрію: фактори росту, молекули клітинної адгезії, цитокіни, простагландини, циклооксигенази, глікопротеїн MUC-1 та багато інших [15]. Також, до цього переліку входять хімічні атрактанти та ангіогенні сполуки, що секркуються натуральними кілерами. Ці фактори полегшують перебудову судин ендометрію та інвазію бластоцисти [16].

Статистика ефективності програм допоміжних репродуктивних технологій вказує на потребу розвитку методів визначення сприйнятливого ендометрію (рис. 1.1.1) для збільшення відсотку їх успішності.

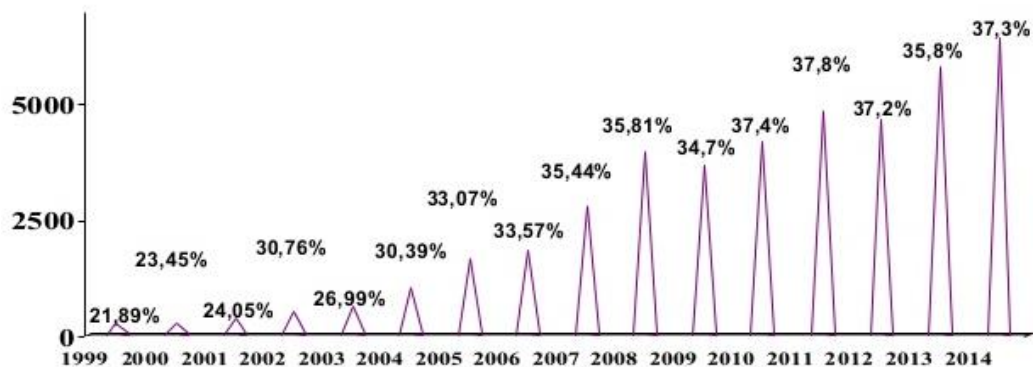


Рис. 1.1.1. Графік ефективності програм ДРТ в Україні [17].

Сукупність всіх перерахованих факторів може вказувати на рецептивність ендометрію. Адже процес імплантації ембріона – це дуже складний процес, який потребує рецептивного ендометрію, життєздатного ембріона та синхронізації між цими двома структурами. Вирішальну роль імплантації бластоцисти, як вважають, відіграє внутрішня оболонка матки людини [16]. Для достовірного визначення часу «вікна імплантації» і планування майбутньої вагітності потрібен комплексний підхід.

1.2. Процес імплантації бластоцисти

Імплантація ембріона є найбільш критичним етапом складного репродуктивного процесу. Для того, щоб цей процес став можливим матка проходить низку складних змін: ендометрій стає більший у товщину, васкуляризується, посилює свою секреторну активність за рахунок розростання залоз. Цей період називається переддецидуалізація і пік змін настає приблизно на сьомий день після овуляції [18]. Після всіх модифікацій настає короткий період часу, коли бластоциста може імплантуватися.

Формуються піноподії, які також беруть участь у імплантації ембріону. Ці структури мають вигляд випуклих апікальних випинань епітеліальних клітин ендометрію. Вони зменшують об'єм порожнини матки тим самим збільшують шанс на імплантацію бластоцисти [19]. Піноподії формуються на 19–21-у добу гестаційного циклу і в нормі зберігаються не більше двох діб. Вони також можуть свідчити про період відкритого «вікна імплантації» [20].

У момент, коли ембріон контактує із ендометрієм, починається наступний етап – адгезія. Для здійснення цього етапу бластоциста проходить процес хетчингу, або вилуплення. Хетчинг відбувається під дією літичних ферментів, які секретує внутрішня оболонка матки. А саме неактивний плазміноген, що знаходиться у порожнині матки, активується факторами бластоцисти і

перетворюється на плазмін. Зовнішня болонка бластоцисти *zona pellucida* частково лізується і саме цією стороною ембріон буде приєднуватися до внутрішньої оболонки матки. Це зумовлюється тим, що на тому місці забезпечується повний контакт трофобласту та епітеліальних клітин ендометрію [18].

Далі починають діяти молекули клітинної адгезії. Ці поверхневі ліганди (інтегрини, кадгерини, селектини та імуноглобуліни) забезпечують адгезію клітин. Більшість інтегринів можна виявити протягом всього циклу, але цилітрини характеризуються періодичною наявністю і виявляються в період «вікна імплантації» [21]. Також вони активно секретуються під час імплантації [22]. Найбільшу увагу зі всіх досліджених селектинів отримав L-селектин, який є важливим для процесу приєднання бластоцисти до ендометрію [23]. Кадгерини відповідають за кальцій-залежний зв'язок і для успішної імплантації потрібні E-кадгерини [24]. Також і процесі адгезії бере участь молекула міжклітинної адгезії 1 або CD54 [25]. Крім вище зазначених молекул адгезії у цьому процесі ще залучено інгібуючий фактор лейкемії, колонієстимулюючий фактор, цитокіни, тощо [9, 17]. На поверхні ендометрію містяться також муцини, а саме MUC-1. На відміну від інших молекул клітинної адгезії ці сполуки розщеплюються у місці інвазії під впливом факторів бластоцисти [27].

Наступним етапом імплантації є інвазія бластоцисти. Це відбувається за рахунок випинання та розростання клітин трофобласту у глибокий ендометрію [28]. Ці структури називаються синцитіотрофобластами і вони розмежовані трабекулами.

Синцитіотрофобласти поступово проходять через базальну мембрану децидуальних клітин, проростають у строму і продовжують рухатися у напрямку кровоносних судин. Вони вростають все глибше і розгалужуються на вторинні та третинні ворсини хоріону. Таким чином відбувається процес плацентзації [24].

У випадку настання вагітності настає етап децидуалізації [29]. Децидуальні клітини накопичують ліпіди та глікоген. Вони набувають характерної поліедричної форми. Саме бластоциста є тригером (стимулом), який сприяє переходу на цей етап, оскільки за відсутності бластоцисти у порожнині матки ці морфологічні зміни не спостерігаються [30]. Процес децидуалізації передбачає порушення цілісності ендометрію та інвазію у нього клітин трофобласту. Ендометрій починає змінюватися. Відбувається проліферація епітелію та васкуляризація ендометрію. Підвищується судинна проникність, відбувається ангиогенез. Утворюється зона із децидуальними клітинами, яка захищає судини матері від надмірної інвазії бластоцисти [31].

Імплантація ембріону є складним процесом і відіграє значну роль для настання вагітності. Він залежить від багатьох гормональних, імунних та генетичних чинників. Всі етапи мають чітку послідовність і в результаті забезпечують успішну імплантацію та вагітність у майбутньому

1.3. Фізіологія лютеїнової фази

Менструальний цикл поділяється на три фази: фолікулярна (період менструації), овуляторна та лютеїнова. Лютеїнова фаза бере початок із моменту утворення жовтого тіла – тимчасової секреторної залози яєчників, які продукують гормони, включаючи прогестерон та естроген [32]. Саме під впливом цих гормонів відбувається стимуляція ендометрію до проліферації і підготовки до настання вагітності [33].

Естроген контролює проліферацію стромальних клітин і залоз, а вплив прогестерону провокує секреторні зміни та підготовку до імплантації бластоцисти [34]. Закінчується ця фаза після настання вагітності або після деградації жовтого тіла [35].

Беручи до уваги природній менструальний цикл фолікулярна фаза закінчується дозріванням домінуючого фолікула під дією ФСГ – фолікулостимулюючого гормону. Це призводить до зростання рівня секреції естрогену гранулярними клітинами. Передня доля гіпофізу починає секретувати лютеїнізуючий гормон (ЛГ), який сприяє виходу ооцитів із фолікула, тобто овуляції і перетворенню фолікулів на секреторне жовте тіло (рис. 1.3.1). Після виходу фолікула у маткову трубу підвищується рівень естрадіолу, який пригнічує секрецію лютеїнізуючого гормону.

Жовте тіло функціонує приблизно два тижні з моменту утворення, якщо ембріон не імплантується. І деградація жовтого тіла запобігає настанню вагітності. У випадку настання вагітності секреторний фолікул може зберігатися і підтримуватися місяці. Секреція синцитіотрофобластом гормону хоріонічного гонадотропіну людини підтримує життєдіяльність жовтого тіла під час вагітності. Після виконання своїх функцій жовте тіло руйнується і відбувається лютеоліз [36].

На рис. 1.3.1 можна помітити, що під час лютеїзації фолікула базальна пластина гранулярних клітин руйнується і відбувається васкуляризація. У гранулярних клітинах збільшуються вакуолі. Ці вакуолі починають накопичувати речовину лютеїн, яка і надає їм типового жовтого забарвлення.



Рис. 1.3.1. Перетворення фолікула на жовте тіло та його деградація [36].

Процес дозрівання фолікула та перетворення його на секреторну одиницю відбувається під впливом лютеїнізуючого та фолікулостимулюючого гормону (ФСГ). Початок повноцінного функціонування жовтого тіла як секреторного інгібує секрецію ФСГ та ЛГ. На рис. 1.3.2 можна спостерігати графіки із піками збільшення рівня секреції цих гормонів та їх різке зниження після того, як відбулась овуляція.

Функціонування жовтого тіла впливає на підготовку матки до вагітності і підтримки її на перших термінах. Дослідження показали, що видалення жовтого тіла у період між сьомим та дев'ятим тижнями вагітності стало причиною викиднів у піддослідних. При цьому замісна терапія прогестероном у цих пацієнтів дала змогу підтримувати успішну вагітність і надалі. Спираючись на ці дані було доведено важливість наявності прогестерону для вагітності [35]. Адже у випадку не настання вагітності за тих чи інших причин падіння рівня прогестерону стимулює відторгнення ендометрію та початок менструації [32].

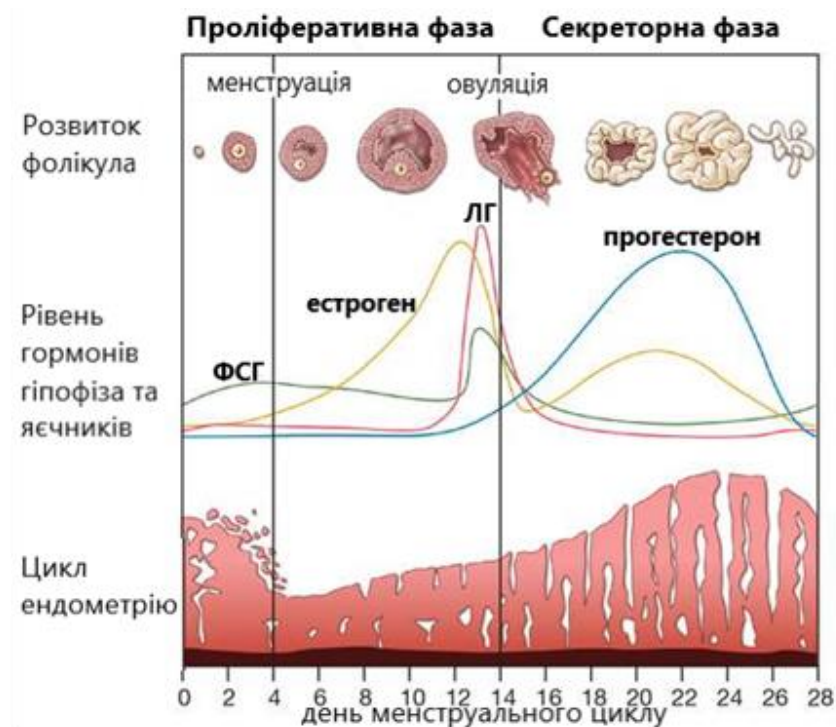


Рис. 1.3.2. Зображення перебігу менструального циклу людини [37].

Беручи до уваги показники рівня лютеїнізуючого гормону або прогестерону можна вирахувати день, коли ендометрій буде рецептивний. Переважно віко імплантації припадає на 19–20-ий день менструального циклу або 4–5-ий день секреції прогестерону, коли він досягає піку [34, 38]. На основі цих показників можна створювати протоколи біопсії ендометрію для виявлення «вікна імплантації».

1.4. Огляд методів визначення рецептивності ендометрію

Ендометрій стає сприйнятливим у середині лютеїнової фази (6–10-ий день секреції ЛГ). Ця тканина зазнає багатьох змін для того, щоб стати готовою до імплантації бластоцисти. Морфологічно зміни виглядають як утворення піноподів – утворів на апікальних кінцях клітин секреторного епітелію [39]. На молекулярному рівні зміни зачіпають рівень секреції білків клітинної адгезії, регуляторних та структурних білків. Спостерігається зміна секреції простагландинів, цитокінів, факторів росту, тощо [40]. Всі ці критерії можна дослідити за допомогою різних методів: гістологічний, електронна мікроскопія, імуногістохімічний, дослідження рівня простагландинів [41] та рівня експресії РНК у зразках ендометрію. Для точного встановлення «вікна імплантації» підходять не всі, адже вони дуже різні за своєю інформативністю.

1.4.1. Гістологічний метод. У 1947 р. вченими Нойєсом Р., Гертигом А. та Роком Дж. було встановлено критерії для вибору дати біопсії ендометрію [42]. Через два роки було встановлено зв'язок між неплідністю та зміною морфології у зразках біопсії ендометрію [43]. Було вирішено, що у разі невідповідності морфологічних ознак біоптату ендометрію до дня його забору встановлюється діагноз – недостатність лютеїнової фази (НЛФ). Для такого дослідження першою точкою для відліку був день початку менструації або день максимального рівня експресії ЛГ у плазмі крові (овуляції).

Початок лютеїнової фази класифікували за активним мітозом клітин епітелію. Для середини фази є характерним поява базального розміщення ядер епітелію та зубчата форма залоз. Але ці показники не зникають із перебігом фази, тому використовувати їх для встановлення терміну не достатньо. Переддецидуальні зміни ендометрію свідчать про пізню секреторну фазу. Проте відомо багато випадків, коли ці зміни починаються вже на початку секреторної фази і зберігаються. Наприклад, зафіксовано вакуоляризацію епітеліальних клітин раніше кінцевої лютеїнової фази (рис. 1.4.1) [44] .

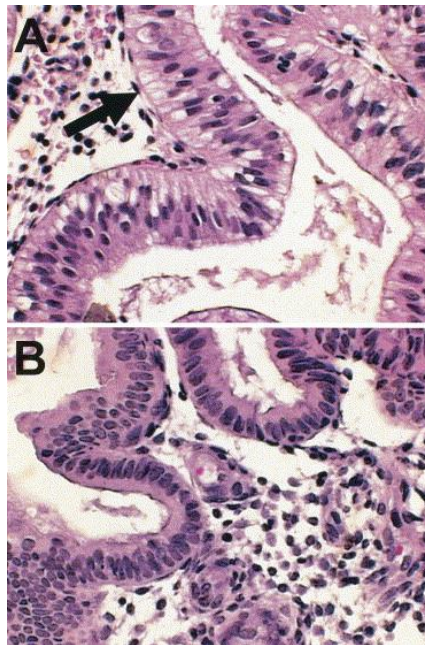


Рис. 1.4.1. Гістологічні препарати біоптату ендометрію, фарбування гематоксиліном-еозином (зроблена біопсія на восьмий день ЛГ): А. На зразку видно наявність неядерних вакуоль (вказані стрілкою); В. Неядерні вакуолі відсутні [44].

Гістологічний метод був одним із перших способів визначення рецептивності. Для сучасної діагностики цей метод не враховує багато інших механізмів впливу на ендометрій. До уваги не беруться порушення на молекулярному рівні: патологія стероїдних рецепторів (прогестерону), порушення структурних білків, факторів росту, цитокінів, простагландинів,

тощо [40, 45]. Такий метод не можна використовувати для дослідження та встановлення періоду вінка імплантації, так як він не є високоспецифічним [8].

1.4.2. Визначення рецептивності ендометрію за допомогою скануючої електронної мікроскопії. За допомогою електронної мікроскопії стало можливим детально дослідити динаміку морфологічної організації епітелію ендометрію протягом циклу [46]. Головним елементом дослідження стали піноподи – опуклі випинання цитоплазматичної мембрани діаметром 6 мкм на апікальному кінці клітин секреторного епітелію. Ці структури характерні для середини секреторної фази.

Наявність зрілих пінопод у досліджуваних зразках свідчить про фазу сприйнятливості ендометрію [8]. Загалом класифікують три стадії цих утворень: дозріваючі, зрілі та регресуючі (рис.1.4.2).

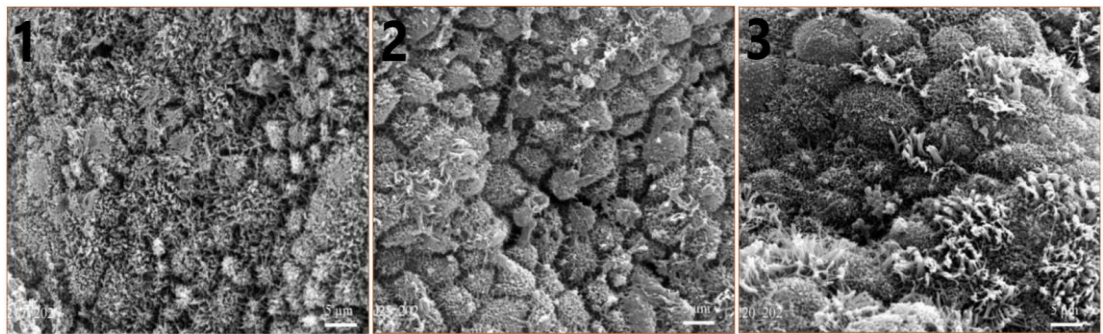


Рис. 1.4.2. Скануюча електронна мікрофотографія ендометрію людини: 1. Дозріваючі піноподи дрібних розмірів; 2. Зрілі піноподи; 3. Регресуючі піноподи [47].

У пінопод, що дозрівають, починає формуватися опукла форма, але мікроворсинки секреторних клітин ще помітні на їх поверхні. У зрілих піноподів ворсинки взагалі відсутні, їх поверхня гладка, а випинання цитоплазматичної мембрани досягає максимуму. Якщо випинання мембрани зменшується і з'являються складки та мікроворсинки, то це характерно для регресуючих піноподів [48].

У людському організмі достовірно не відома роль піноподів під час імплантації. Є думка, що гладка випукла форма забезпечує кращий контакт ембріона із епітелієм [49]. Крім того, *in vitro* було досліджено, що успішність імплантації корелює із кількістю та зрілістю піноподів на поверхні ендометрію [50].

Проте назвати піноподії головним чи достатнім критерієм для визначення «вікна імплантації» не можна. За даними одних досліджень [20, 39] було виявлено їх дозрівання у групи жінок в середині лютеїнової фази. Пік зрілості піноподів спостерігався дві доби під час відкритого «вікна імплантації». Та деякі досліді показали, що ці структури можуть з'являтися раніше та існувати довше. Наприклад, у іншому дослідженні було показано, що в 73 % біопсій ендометрію на 7–8-ий день лютеїнової фази і 56 % зразків 11–12-го дня виявили піноподи [36, 37]. Тобто у половини випадків вони появилися раніше середини секреторної фази та зберігалися протягом чотирьох днів. Поява піноподів не може бути достовірним показником для встановлення «вікна імплантації».

1.4.3. Імуногістохімічне дослідження ендометрію. Метод базується на дослідженні наявності інтегрину $\alpha\beta 3$. Цей білок є одним із найбільш вивчених, секреція якого пов'язана із рецептивною фазою [53]. Низька концентрація або відсутність інтегрину $\alpha\beta 3$ зустрічається при запальних станах ендометрію, порушенні процесу імплантації чи неплідності. У дослідях із мишами було виявлено наявність інтегрину на поверхні рецептивного ендометрію та трофоектодерми бластоцисти [54]. Зниження секреції призводило до порушення молекулярних процесів адгезії.

На основі властивостей білка було створено комерційні тести, які визначали концентрацію $\alpha\beta 3$. Але білків, що впливають на імплантацію значно більше (кадгерини, CD44, фактори росту, тощо). Тому метод імуногістохімічного визначення рівня секреції білку $\alpha\beta 3$ не набув великого значення для встановлення періоду «вікна імплантації» [8]. Крім того під час його застосування часто застосовували паралельно додаткові методи

визначення рецептивної фази (наприклад, молекулярно-генетичні). Показники концентрації одного інтегрину $\alpha\text{v}\beta 3$ не були достатньо інформативними.

1.4.4. Визначення рівня простагландинів PGE_2 та $\text{PGF}_{2\alpha}$. Взаємодію між бластоцистою та ендометрієм можна вважати прозапальним процесом. Адже прикріплення та інвазія ембріона в ендометрій передбачають вторгнення у кровоносні судини матері. Простагландини (ПГ) у свою чергу є вазоактивними речовинами, які відіграють роль під час овуляції, заплідненні та пізніх термінах вагітності (початок пологів). Також досліджено, що простагландини є одним із визначальних факторів успішної імплантації [41].

Простагландини належать до родини ейкозаноїдів та утворюються із мембранних фосфоліпідів за допомогою двох ферментів: цитозольної фосфоліпази A_2 та циклооксигенази [55]. Під дією цих ферментів утворюється проміжний продукт – простагландин H_2 . Він є субстратом для простагландин синтаз [56], за допомогою яких і утворюються потрібні активні молекули.

Для дослідження значення простагландинів на мишах здійснювали нокаут генів цитозольної фосфоліпази A_2 та циклооксигенази [55]. Це призводило до нестачі ПГ. Було отримано результати, що ця нестача спричиняла порушення у процесах овуляції, імплантації та зачаття. Однак екзогенне введення ПГ нормалізувало перебіг всіх процесів вагітності [57].

Рівень синтезу простагландинів PGE_2 та $\text{PGF}_{2\alpha}$ прослідковується однаково протягом всього менструального циклу, крім пізньої секреторної та проліферативної фази [58, 59]. На основі цього було запропоновано, що вони можуть стимулювати проліферацію залозистих клітин. Крім того PGE_2 відіграє роль у васкуляризації тканин ендометрію [60].

Аналіз рівня секреції простагландинів за день до переносу бластоцисти та декількох днів вагітності показав (п'ятий та третій день), що їх рівень значно збільшився [41]. Дослідження показали, що визначення концентрації ПГ за 24 години до переносу може бути маркером успішного приєднання бластоцисти.

Перевагою методу визначення рівня простагландинів є його мала інвазивність. Цей метод не потребує проведення біопсії ендометрію. Проте, він базується виключно на показниках рівня PGE_2 та $\text{PGF}_{2\alpha}$. Так як імплантація ембріону є складним багатоступінчастим процесом у якому беруть участь не тільки простагландини, то для точного визначення відкритого «вікна імплантації» варто використовувати більш розширені або додаткові дослідження.

1.4.5. Молекулярно-генетичний метод визначення рецептивності.

Всі зміни, що відбуваються із ендометрієм для набуття сприйнятливості (формування піноподів, секреція інтегринів, факторів росту, проліферація клітин, тощо) можна пояснити зміною транскрипційної активності генів. Гени, залучені до всіх цих змін, ретельно вивчалися (рис 1.4.3) [61].

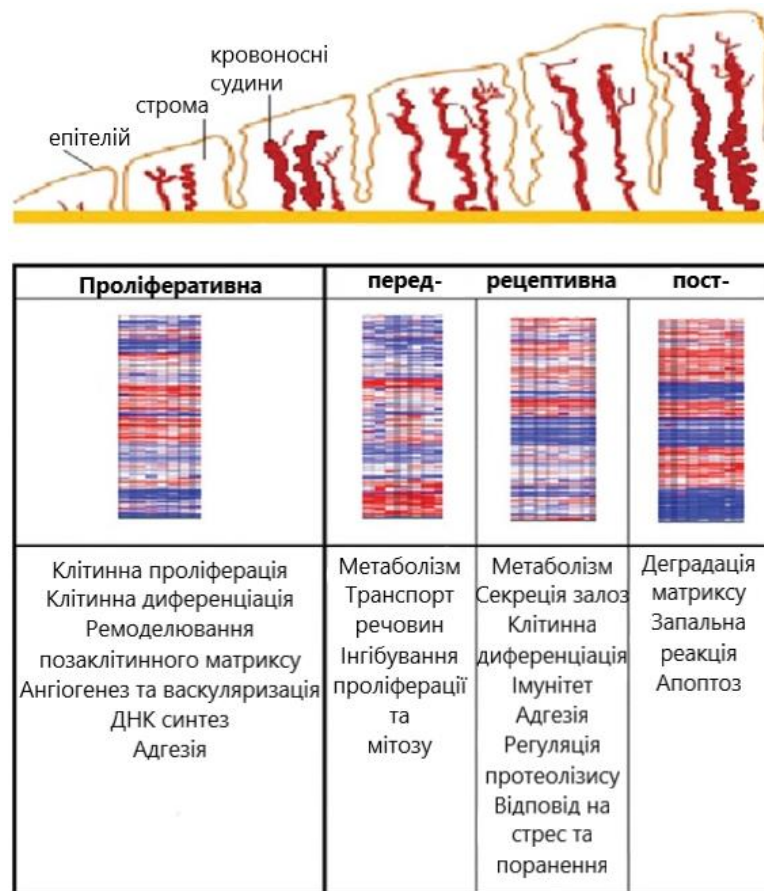


Рис. 1.4.3. Динаміка експресії генів у ендометрію людини. Перебіг біологічних функцій на різних фазах [34].

Профілювання транскрипції генів стало одним із найбільш показових та важливих методів, що досліджують молекулярні та біологічні процеси у тканині ендометрію під впливом гормонів протягом менструального циклу [16, 62]. За допомогою визначення рівня експресії груп РНК можна створювати ці профілі.

Передрецептивну або ранню секреторну фазу можна описати на молекулярному рівні як метаболічно активну. У цей період тканина готується до можливої імплантації. Фаза характерна низькою концентрацією факторів росту та, відповідно, пригніченням клітинного поділу [63]. Можна спостерігати наявність різних метаболітів клітин: жирні кислоти, ейкозаноїди, ліпіди, тощо [64]. За цими ознаками можна визначити нерцептивний ендометрій.

Для рецептивної фази характерним є включення великої кількості генів. До секреторної та метаболічної активності додається ще імунна. Це пов'язано із прозапальною природою процесу імплантації.

Під час пізньої секреторної фази ендометрій вже вважається пострецептивним. Для цієї фази характерна активність генів, що відповідають за наступні процеси: згортання крові, метаболізм простагландинів, синтез стероїдів, гуморальна та клітинна імунна відповідь (рис. 1.4.3) [65].

Метод визначення рівня експресії генів може комбінуватися і з вищезгаданими способами дослідження відкритого «вікна імплантації» та фаз ендометрію. Імуногістохімічне фарбування зразків ендометрію доповнювали визначенням кількості та розповсюдження РНК, що відповідає за фактор інгібітор лейкемії (LIF), кальцитоцину, інтегрину $\alpha\upsilon\beta 3$ [15, 66]. Наприклад, за допомогою дослідження було виявлено, що РНК білку LIF присутня протягом 18–28-ої доби менструального циклу. А пік експресії LIF припадає на двадцятий день. Проте для достовірного дослідження періоду рецептивності ендометрію потрібно опрацьовувати більше, ніж один ген.

Важливим кроком у еволюції методу стало створення тесту ERA (Endometrium Receptivity Assay; аналіз сприйнятливості ендометрію) [62]. Цей аналіз передбачає дослідження 238 генів, які мають показову динаміку експресії протягом перебігу фаз ендометрію: передрецептивної, рецептивної та пострецептивної. Виконується дослідження генів за допомогою технологій секвенування нового покоління. Результати такого аналізу показують рівень експресії генів на момент біопсії. Якщо отримані дані відповідають рецептивній фазі, то пацієнткам рекомендується проводити переніс ембріона у той же день наступного циклу, яким датувалась біопсія.

Функціонально активні клітини, які важливі для імплантації, складають меншу частину клітин зразка. Тому коливання рівня експресії не всіх 238 генів є важливим для визначення «вікна імплантації». Отже, результати повного секвенування не завжди співпадають із результатами дослідження невеликих груп генів. Щоб виявити потрібну групу генів проводили дослідження на сьомий день лютеїнової фази трьох груп жінок: із природнім циклом, із контрольованим циклом та жінки із внутрішньоматковою спіраллю. Для цих груп було виявлено коливання рівня експресії 1399 генів (природній цикл) [67], 342 (стимульований цикл) [68], 52 (жінки зі спіраллю). Із цих генів було вираховано 25 спільних генів [69].

Метод визначення рівня експресії генів дає можливість дослідити взаємодію великої кількості молекулярних механізмів, а не лише одного фактору. І чим більше значимих генів буде входити у аналіз, тим точнішими будуть результати. Опрацювавши отримані дані дослідження можна визначати фазу ендометрію та надавати рекомендації планування переносу ембріона.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкт та предмет дослідження

Об'єктом дослідження була експресія генів у тканині ендометрію людини. Ендометрій є внутрішнім епітеліальним шаром матки ссавців. Саме цей шар відіграє головну роль у взаємодії бластоцисти із маткою [70]. Ця тканина знаходиться у постійній динаміці зміни фаз і залучає велику кількість генів. Клітини ендометрію здатні експресувати близько 70 % генів, що кодують білки [71]. Тож експресія генів тканини є головним досліджуваним об'єктом для встановлення відкритого «вікна імплантації».

Предметом дослідження були показники експресії генів інтересу, які змінювалися із перебігом фаз ендометрію (передрецептивної, пострецептивної та рецептивної фази, яка забезпечує успішну імплантацію ембріону).

2.2. Використані реактиви

- RNAlater буфер для стабілізації РНК (Thermo Fisher, США).
- β -меркаптоетанол (Sigma-Aldrich, США).
- Розчин спирту 70 % (Житомирська ФФ ООО, Україна).
- DNA-Exitus Plus розчин для прибирання нуклеїнових кислот з поверхонь (PanReas AppliChem, Іспанія).
- Реакційні суміші TaqMan 20x для аналізу експресії генів інтересу (Applied Biosystems, США).

- Набір для виділення РНК «PureLink® RNA Mini Kit» (Thermo Fisher, США):
 1. Wash Buffer I;
 2. Wash Buffer II;
 3. RNase-Free вода.
- Набір для визначення концентрації РНК «Qubit® RNA BR Assay Kit» (Thermo Fisher, США):
 1. Qubit® RNA BR реагент;
 2. Qubit® RNA BR буфер;
 3. Qubit® RNA BR стандарт 1;
 4. Qubit® RNA BR стандарт 2.
- Набір для постановки ПЛР-RT «SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit» (Thermo Fisher, США):
 1. SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq Mix;
 2. 2x реакційна суміш (містить 0,4 мМ dNTP та 6 мМ MgSO₄);
 3. ROX референсний барвник (25 мкМ);
- Набір для синтезу комплементарної ДНК «Thermo ScientificRevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit» (Thermo Fisher, США):
 1. праймер Oligo (dT)₁₈;
 2. 5x реакційний буфер;
 3. Інгібітор рибонуклеаз RiboLock;
 4. 10 мМ суміш dNTP;
 5. Реверсивна транскриптаза;
 6. RiboLock інгібітор рибонуктеаз.

2.3. Використані матеріали

- Неткані серветки.

- Пробірки 0,5 мл стерильні (CAPP, Німеччина).
- Пробірки 1,5 мл стерильні (CAPP, Німеччина).
- Пробірки «Qubit® assay tubes» 0,5 мл (Thermo Fisher, США).
- Пробірки 15 мл (CAPP, Німеччина).
- RNase-free колонки для вилілення РНК 1,5 мл (Thermo Fisher, США).
- Змінні контейнери для колонок (Thermo Fisher, США).
- Стріпи з пробірками, 0,2 мл (Thermo Fisher, США).
- Плашки 96-луночні (Thermo Fisher, США).
- Одноразові рукавички.
- Змінні носи́ки для автоматичної піпетки з фільтром 100-1250 мл, 20-200 мл, 2-20 мл, 0,1-10 мл (Vertex® Pipette, США).
- Змінні носи́ки для автоматичної піпетки без фільтра 100-1250 мл, 20-200 мл (Vertex® Pipette, США).
- Штативи для пробірок.
- Холодильні штативи для мікропробірок.

2.4. Використане обладнання

- Центрифуга 5424 (Eppendorf, Німеччина).
- Автоматичні піпетки об'ємом 100-1000 мл, 20-200 мл, 2-20 мл, 0,1-10 мл (Eppendorf, Німеччина).
- Центрифуга-змішувач FV-2400 (Biosan, Латвія).
- Центрифуга-мішалка для мікропробірок MSC-300 (Biosan, Латвія).
- Ампліфікатор (Applied Biosystems, США).
- Флюорометр Qubit 4 (Thermo Fisher, США).
- Термостат Bio TDB-100 (Biosan, Латвія).
- Холодильник LCexv 4010 (Liebherr, Німеччина)

- Морозильна камера LCexv 4010 (Liebherr, Німеччина).

2.5. Використані методи

2.5.1. Схема експерименту. Головною метою дослідження є встановлення рецептивної фази ендометрію. Аспіраційна біопсія ендометрію проводиться тричі у конкретні дні менструального циклу жінки. Дні біопсії призначаються лікарем, залежно від того який тип циклу у пацієнта: природній чи регульований (стимульований) цикл. Після забору БМ ми проводили маніпуляції, що зображені на рис. 2.5.1, для визначення часу відкритого «вікна імплантації».



Рис. 2.5.1. Послідовність методів дослідження

Отримані результати по 2–3-ох пробах аналізують та присвоюють відповідні фази: передрецептивна, рецептивна та пострецептивна. Залежно від того, на який день циклу припадає рецептивна фаза, видаються рекомендації для майбутнього планування вагітності.

Після проведеного дослідження зразок біопсії зберігаємо рік у архіві за температури -20°C у морозильній камері. Буфер, у якому знаходиться тканина, стабілізує РНК. Це дозволяє за потреби повторно виділити і проаналізувати зразок, або використати його як контрольний у майбутньому.

Для того, щоб із виділенням зразком можна було працювати через певний час, ми застосовували метод синтезу комплементарної ДНК. Це потрібно для кращого збереження нуклеїнових кислот, так як РНК дуже нестабільна і швидко деградує. Архівація зразків у вигляді ДНК значно вигідніша для більш тривалого зберігання.

2.5.2. Аспіраційна біопсія ендометрію. Зразок аспірату ендометрію (АЕ) відбирали у маніпуляційній кімнаті за допомогою пайпеля – пластикової трубки із поршнем для проведення біопсій. Процедура здійснюється під контролем УЗД апарату. Отриманий аспірат ендометрію поміщали у підготовлену пробірку 0,5 мл із вмістом стабілізуючого буферу RNeasy Lysis Buffer. Пробірку із направленням на дослідження поміщали у холодильний контейнер та передавали до молекулярно-генетичної лабораторії.

2.5.3. Протокол реєстрації аспірату ендометрію. Перед тим як брати БМ до роботи, перевіряли його на відповідність (колір зразку, його кількість, маркування). Якщо матеріал не відповідає вимогам, отримані із нього результати не вважатимуться достовірними. За неправильного зберігання чи маркування зразок не є придатним для дослідження. Ми оглядали контейнер на цілісність, чи є прикріплене направлення на дослідження. Дивилися чи поміщений АЕ у відповідну пробірку із стабілізуючим буферним розчином RNeasy Lysis Buffer.

У таблицю реєстрації аспірату ендометрію вносили дані пацієнта та час проведення біопсії. Потім дублювали дані у журнал реєстрації біологічного матеріалу. Робили копію направлення та прикріплювали її до пробірки зі зразком. Зареєстрований матеріал клали у морозильну камеру (-20°C) для збереження до виділення РНК.

2.5.4. Підготовка приміщення до виділення РНК. Потрібно було обробити всі робочі поверхні та обладнання 70 % спиртом. Після того все протирали спеціальним розчином DNA-Exitus Plus для усунення можливих залишків нуклеїнових кислот на поверхнях використовуючи неткані серветки. Коли всі робочі поверхні були протерті, ми включати кварцову лампу на 20 хв для стерилізації. Як тільки приміщення було оброблено можна було приступати до виділення РНК.

2.5.5. Виділення РНК із тканин ендометрію. Спершу ми готували витратні матеріали – підписували колонки та пробірки для виділення (день проведення біопсії, кодовий номер пацієнта, дату виділення РНК). Пробірки із АЕ переносили із морозильної камери у холодильник для розморожування на 20 хв за температури 4°C. В окремій пробірці готували лізуючий буфер. Змішували одновідсотковий спиртовий розчин β -меркаптоетанолу. У пробірки вмістом 1,5 мл вносили 0,6 мл лізуючого буферу та 10-30 нг АЕ. Інтенсивно піпетували буфер із тканиною до повного розчинення частинок автоматичною піпеткою. Додавали 70 % спирт рівної кількості (0,6 мл) та ретельно перемішували центрифугою-мішалкою. Вносили автоматичною піпеткою у колонки по 620 мкл суміші, центрифугували протягом 15 с на швидкості 12000 об./хв та повторювали цей крок ще раз. Фільтрат виливали зі змінного контейнера у контейнер для утилізації відходів та поміщали колонку у нього назад. У колонку додавали 700 мкл Wash buffer I та центрифугували 15 с за швидкості 12000 об./хв. Фільтрат викидали у контейнер для утилізації разом зі змінним контейнером та ставили новий. Вносили 500 мкл Wash buffer II і ставили центрифугуватися на 15 с за швидкості 12000 об./хв. Виливали над осадову рідину та ставили колонку у той самий контейнер. Аналогічно повторювали відмивку із Wash buffer II. Після повторного промивання центрифугували 1 хв при 12000 об./хв із порожнім контейнером для підсушування мембрани колонки. У підсушену колонку обережно вносили 100 мкл RNase-free води так щоб краплина потрапила на мембрану. Інкубували із водою 1 хв за кімнатної температури. Колонку переносили у

стерильну пробірку (1,5 мл) для елюції РНК замість змінного контейнера. Центрифугували колонки 2 хв за швидкості 12000 об./хв [72]. Отриманий елюент поміщали і морозильну камеру за температури -20°C на зберігання, так як РНК швидко деградує і має бути використаною протягом двох годин.

2.5.6. Вимірювання концентрації РНК. Завчасно діставали буфер Qubit RNA BR та Qubit RNA BR стандарт 1 і стандарт 2 із холодильної камери, щоб вони були кімнатної температури. Всі реагенти, разом з виділеною попередньо РНК, перемішували та осаджували за допомогою центрифуги-мішалки. Готували потрібну кількість пробірок (Qubit assay tubes, 0,5 мл), підписували їх. Для приготування реакційної суміші ми змішували реагент Qubit RNA BR та буфер Qubit RNA BR. До кожних 199 мкл буферу додавали 1 мкл реагенту. Реакційну суміш інтенсивно перемішували та осаджували. У пробірки для Qubit RNA BR стандартів вносили по 190 мкл реакційної суміші, а у пробірки для РНК проб – по 195 мкл. Стандарти додавали у окремі пробірки по 10 мкл. Розчин з РНК вносили по 5 мкл у окремі пробірки [73]. Після внесення елюент РНК прибирали до морозильної камери, щоб уникнути її деградації. Всі пробірки із отриманою сумішшю ретельно перемішували та осаджували. Залишали інкубуватися на 1–2 хвилини, щоб всі реагенти активувалися. Концентрацію РНК вимірювали за допомогою флуорометра Qubit 4, для оцінки значень використовували програму Broad-Range. Починали з розчину зі стандартом 1, потім зі стандартом 2. Якщо їх показники задовільні, тоді вимірювали концентрацію РНК у пробах.

2.5.7. Постановка ПЛР у реальному часі. Набір для постановки ПЛР-RT «SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit» попередньо діставали із морозильної камери та ставили у холодильник (4°C) для розморожування на 5 хв.

Із розмороженими реагентами працювали за допомогою холодильних штативів. Для проведення полімеразно-ланцюгової реакції ми спочатку готували реакційні суміші згідно до даних у таблиці 2.5.1.

Табл. 2.5.1. Розрахунок реакційної суміші.

Назва компоненту	Вміст у 50 мкл реакційної суміші
SuperScript™ III RT/Platinum™ Taq Mix	1 мкл
2х реакційна суміш	25 мкл
Референсний барвник ROX (25 мМ)	1 мкл
Реакційна суміш TaqMan 20х	2 мкл
РНК, 50 нг/мкл	Вираховується з концентрації
RNase-Free вода	Доводимо до 50 мкл

Реакційну суміш готували на холодильних штативах, щоб інгібувати взаємодію реагентів (праймерів, полімерази, dNTP). Готову суміш без РНК вносили у лунки плашки по 29 мкл. Потім додавали виділену РНК у такий кількості, щоб кінцева концентрація у розчині її становила 50 нг/мкл. У лунки із контролю вносили воду для балансу об'ємів. Для кожного гену використовували один контроль. Осаджували суміш на дно лунок центрифугою-мішалкою для мікропробірок та ставили у ампліфікатор.

За допомогою комп'ютерної програми «QuantStudio 3D AnalysisSuite Cloud» задавали протокол ампліфікації (табл. 2.4.2) [74].

Табл. 2.5.2. Протокол ампліфікації.

Температура	Час
1 цикл	
50°C	15 хв
95°C	2 хв
40 циклів:	
95°C	15 с
60°C	30 с

Після завершення ПЛР експортували отримані результати для наступного аналізу даних.

2.5.8. Синтез комплементарної ДНК. На холодильних штативах у пробірках ми змішували реакційну суміш (табл. 2.5.3). Залежно від концентрації виділеної РНК вираховували потрібну нам кількість, так щоб у отримані реакційній суміші її концентрація була 50 нг/мкл.

Таблиця 2.5.3. Компоненти реакційної суміші.

Назва компоненту	Кількість
Зразок РНК	50 нг/мкл
праймер Oligo (dT) ₁₈	1 мкл
RNase-Free вода	Доводимо до 12 мкл

Обережно перемішували вміст пробірок та інкубували 5 хв за температури 65°C у термостаті. Потім охолоджували на холодильному штативі 3 хв, перемішували центрифугою-мішалкою та знову ставили у штатив. У пробірки додавали наступні компоненти вказані у табл. 2.5.4.

Таблиця 2.5.4. Компоненти реакційної суміші.

Назва компоненту	Об'єм
5x реакційний буфер	4 мкл
Інгібітор рибонуклеаз RiboLock	1 мкл
10 mM суміш dNTP	2 мкл
Реверсивна транскриптаза	1 мкл
Загальний об'єм із компонентами з табл. 2.5.3 разом: 20 мкл.	

Обережно перемішували отриману суміш. Інкубували у термостаті 60 хв за температури 42°C. Для зупинення реакції синтезу с-ДНК суміш нагрівали

до 70°C протягом 5 хв у термостаті. Пробірки зберігали за -20°C у морозильній камері до одного тижня, потім утилізували [75].

2.5.9. Аналіз отриманих результатів. Інтерпретація результатів ПЛР у реальному часі базується на показнику C_t – пороговий цикл (cycle threshold). Цей показник визначає цикл, на якому флуоресценція зразку перевищила поріг фонові флуоресценції (рис. 2.5.2).

Для більшої показовості динаміки рівня експресії досліджуваних генів вираховували різницю між експресією генів – ΔC_t , які мають сталу експресію у клітинах (гени гомеобоксу), та генами інтересу. Крім того, ген гомеобоксу був у якості контролю, так як його показник C_t має бути однаковий за рівних концентраціях у реакційній суміші для ПЛР.

Ми вираховували показник ΔC_t для аналізу експресії генів інтересу відносно гену гомеобоксу. Із даних ΔC_t ми робили таблиці та діаграми для оцінки інформативності експресії гену для визначення конкретної фази.

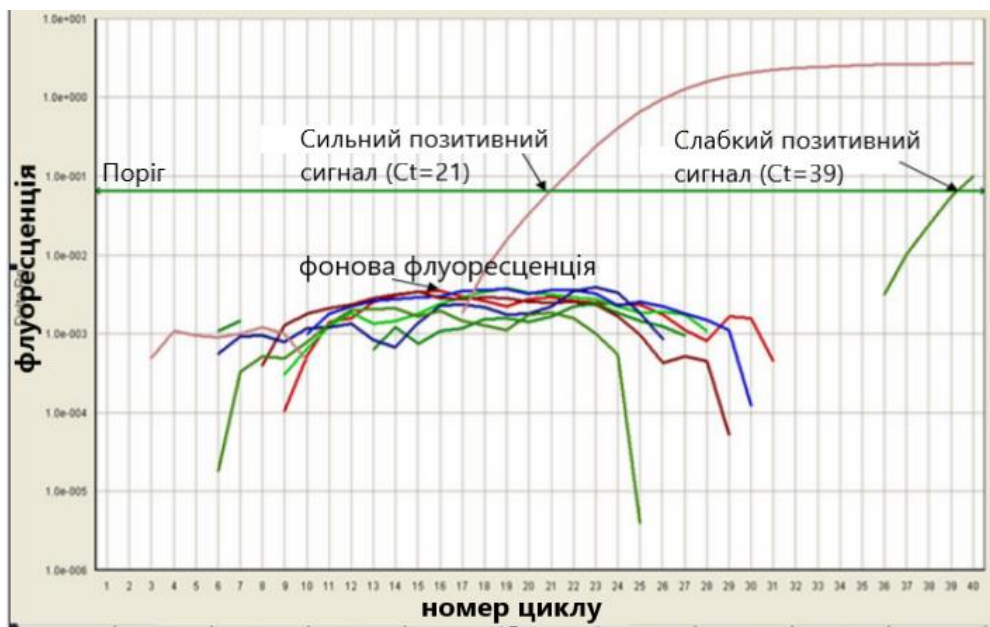


Рис. 2.5.2. Схематичне зображення результату ампліфікації.

На схемах результатів ампліфікації ми аналізували концентрацію та чистоту зразків. Чим раніше лінія перетинає поріг фонові флуоресценції, тим більша його концентрація. Для більш детального аналізу результатів ми

завантажували дані з програми ампліфікатора «QuantStudio 3D AnalysisSuite Cloud» у комп'ютерну програму «Excel». У цих таблицях було вказано точне число C_t для кожного зразку.

Для статистичної обробки отриманих результатів було обрано функцію вирахування стандартного відхилення у програмі «Excel». Стандартне відхилення є показником розкиду значень від середнього показника. Функція зображає діапазон відхилення, у межі яких має попадати значення. Тобто ми аналізували чи входять показники кожного гена на діаграмах у діапазон стандартного відхилення.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Визначення рівня експресії генів та аналіз відмінності цих показників у різні дні забору

Для аналізу результатів були обрані пацієнти ER-52, ER-62, ER-69, ER-81, ER-82. Ці пацієнти мають контрольований штучний цикл. Аспіраційна біопсія ендометрію у них проводилася перший раз на четвертий день виявлення прогестерону у крові (П+4), другий раз – на шостий день виявлення прогестерону (П+6), третій раз – на восьмий день виявлення прогестерону (П+8). Вони всі мають три різні дні забору біоматеріалу, які вважаються стандартними для проведення дослідження фаз рецептивності. У цих пацієнтів не спостерігалось зміщення «вікна імплантації». Передрецептивна фаза припадала на П+4, рецептивна – на П+6, пострецептивна – на П+8. Такі показники входять у межі норми.

Для створення діаграми (рис. 3.1.1) було вираховано показник ΔSt , який показує різницю експресії генів між геном гомеобоксу та генами інтересу.

На діаграмі (рис. 3.1.1) можна спостерігати, що майже всі гени пацієнта ER-52 мають нищий рівень експресії, ніж гена гомеобоксу (служує точкою відліку). Адже чим більший показник порогового циклу, тим пізніше цей зразок його перетнув. Тільки ген 5 під час пострецептивної фази має трошки вищий показник, практично однаковий.

Аналізуючи динаміку експресії генів, можна виділити декілька найбільш показових генів: ген 1, ген 2, ген 4, ген 7, ген 8. Показники різних фаз ендометрію мають великі перепади експресії цих генів, на відміну від гена 3, гена 6 та гена 9, зміна рівня експресії у яких невелика.

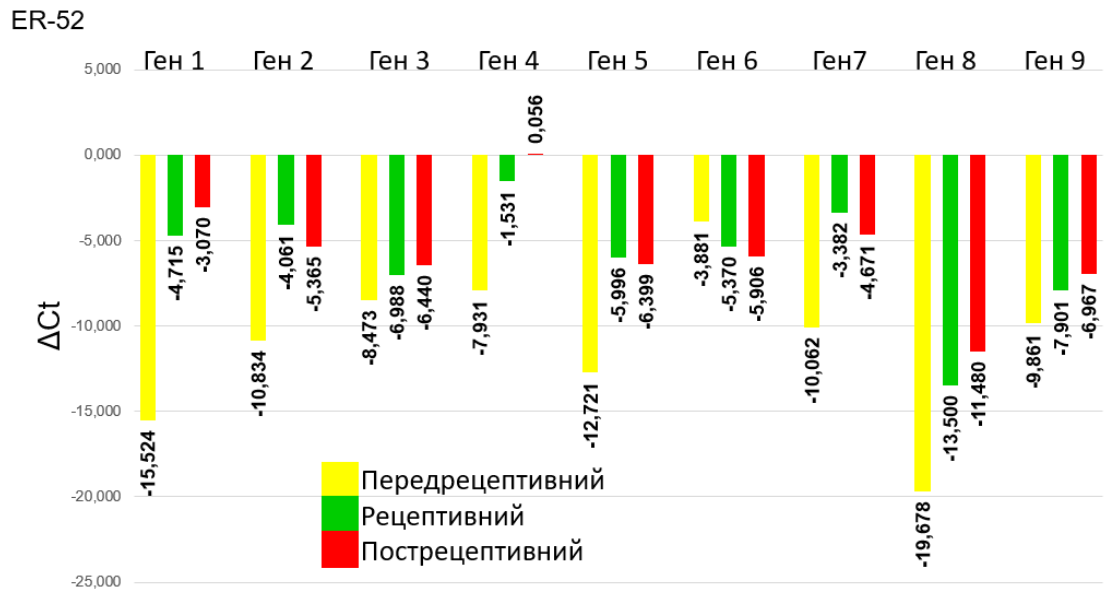


Рис. 3.1.1. Діаграма інтенсивності експресії генів інтересу відносно гену гомеобоксу під час трьох фаз ендометрію. Пацієнт ER-52.

Ген 5 у цієї пацієнтки має відмінний показник експресії лише під час передрецептивної фази. Фазу рецептивності і пострецептивності цей ген характеризує однаковим показником. Тому для уточнення цих двох фаз бажано використовувати додаткові показники інших генів, у яких рівень експресії під час цих фаз відрізняється. Наприклад, ген 4 та ген 2.

У наступного пацієнта ER-62 схожі показники перепаду експресії генів (рис.3.1.2), якщо порівнювати із попереднім пацієнтом ER-52.

Рівень експресії гену 5 має більшу значимість для встановлення пострецептивної фази, ніж останніх двох. А ген 8 та ген 1 – навпаки. У цих генах показники під час рецептивної та пострецептивної фази практично однакові.

Найбільш показову динаміку мають такі гени: ген 2, ген 4, ген 5, ген 9. Ген 7 та ген 3 мають незначні коливання рівня експресії на різних фазах. Ген 6 має добре помітну динаміку, якщо порівнювати між собою дві крайні фази: передрецептивну та пострецептивну.

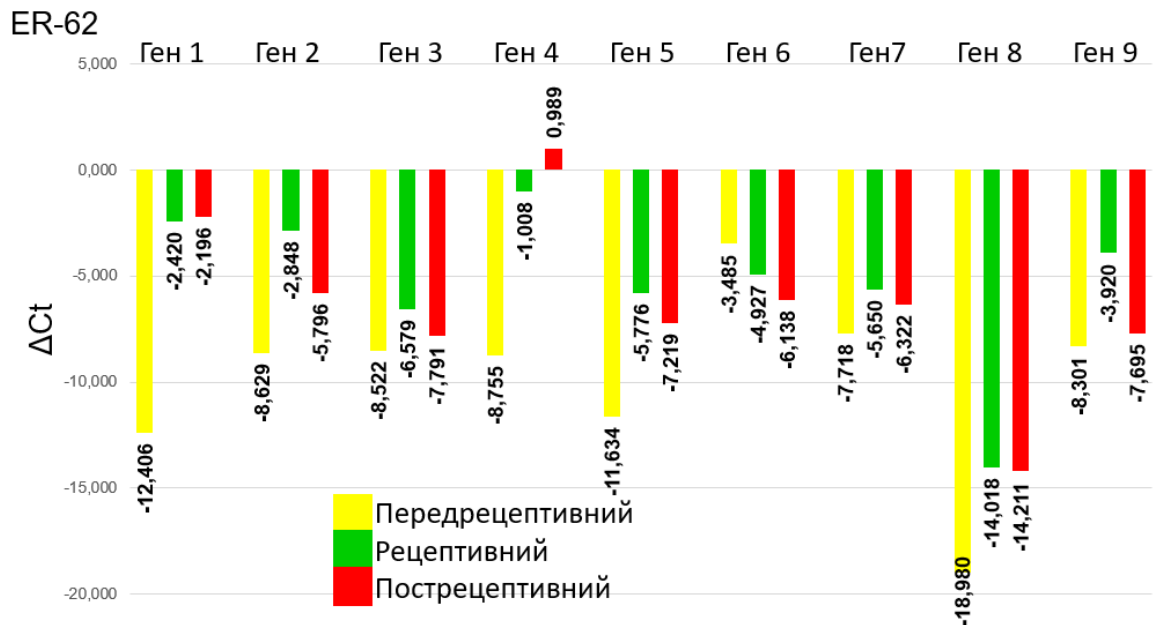


Рис. 3.1.2. Діаграма інтенсивності експресії генів інтересу відносно гену гомеобоксу під час трьох фаз ендометрію. Пацієнт ER-62.

У пацієнта ER-69 було відмічено наступні гени, як найбільш показові: ген 1, ген 2, ген 4. На діаграмі (рис.3.1.3) можна помітити, що ген 3 має більше помітну зміну рівня експресії у порівнянні із попередніми пацієнтами (ER-62 та ER-52).

Також варто звернути увагу на те, що загальна тенденція показників ΔC_t у пацієнтів зберігається. Розміщення більшості показників схоже на діаграмах попередніх пацієнтів.

Помітно, що у попередньо згадуваних пацієнтів, ген 1, ген 4 та ген 8 мають тенденцію до збільшення рівня експресії протягом досліджуваних фаз. Хоча, ген 8 у пацієнта ER-62 зупиняє ріст рівня експресії на рецептивній фазі. Ген 2, ген 5 та ген 7 характеризується збільшенням експресії під час рецептивної фази, а на пострецептивній фазі його рівень експресії знову зменшується.

Показовими генами можна назвати ген 1, ген 2, ген 4. Показники експресії гену 5, гену 6 та гену 8 інформативні більше для встановлення передрецептивної фази. Показники цих генів під час рецептивної та

пострецептивної фаз не мають таку показову відмінність, тому варто брати до уваги інші гени, які мають більш інформативні показники на цих фазах.

Ген 9 та ген 7 не є інформативними для диференціації фаз рецептивності у випадку цього пацієнта, так як їх показники із перебігом фаз не дуже помітно змінюються.

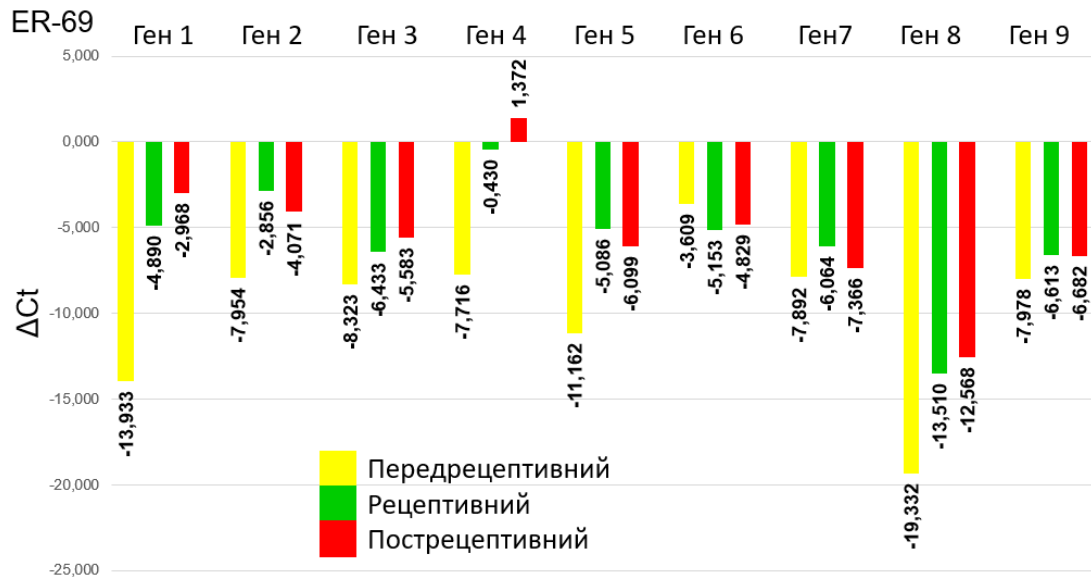


Рис. 3.1.3. Діаграма інтенсивності експресії генів інтересу відносно гену гомеобоксу під час трьох фаз ендометрію. Пацієнт ER-69.

Дослідження рівня експресії ER-81 (рис.3.1.4) показало, що найбільш інформативними генами можна вважати наступні: ген 1, ген 2, ген 4, ген 9. Ген 8 та ген 5 мають схожу динаміку як і у ER-69. Вони гарно характеризують перепад між передрецептивною та рецептивною фазою, але показового перепаду між рецептивною та пострецептивною не мають. Ген 3 має однаковий рівень на перших двох фазах, а на останній його рівень помітно менший. Ген 7 навпаки має однаковий рівень на останніх двох фазах, а передрецептивна характеризується набагато нижчим рівнем експресії.

Зміна рівня експресії гену 1 у пацієнта ER-69 має зовсім інший характер. Під час пострецептивної фази його експресія зменшується. Результати попередніх пацієнтів показували ріст експресії протягом всіх фаз.

Ген 2, Ген 5 та ген 7 зберігає показовий ріст експресії під час фази рецетивності та зменшення під час фази пострецетивного ендометрію. Можна зауважити, що ген 7 під час останніх двох фаз має невелику відмінність рівня експресії.

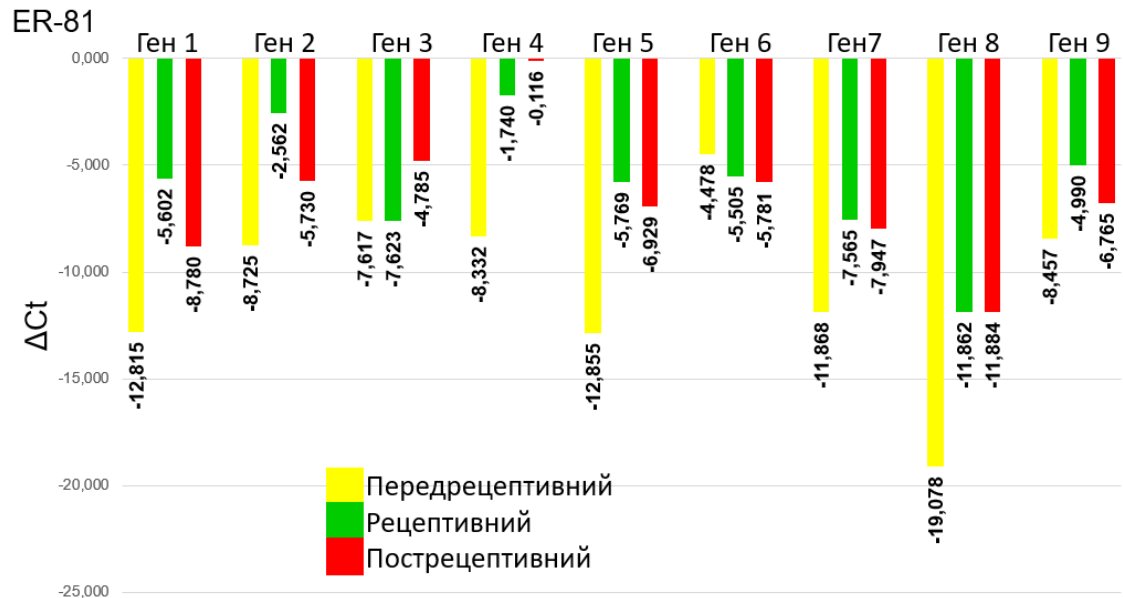


Рис. 3.1.4. Діаграма інтенсивності експресії генів інтересу відносно гену гомеобоксу під час трьох фаз ендометрію. Пацієнт ER-81.

Аналізуючи результати наступного пацієнта ER-82ми помітили, що показову динаміку мають ген 2, ген 4, ген 7 та ген 9. Ген 1 та ген 8 не мають великої зміни рівня експресії на рецетивній та пострецетивній фазі (рис. 3.1.5). Але їх показники достатньо інформативні для визначення передрецетивної фази.

Ген 3 у цього пацієнта не показав достатні коливання рівня експресії під час перебігу фаз рецетивності. Тобто цей ген неінформативний для диференціації досліджуваних фаз ендометрію. Ген 5 має не велику різницю експресії під час рецетивної та пострецетивної фази, але передрецетивну характеризує набагато нищим рівнем експресії. Ген 6 показує непогану градацію свого рівня експресії, особлива, якщо порівнювати дві крайні фази.

Повторно спостерігався ріст рівня експресії протягом досліджуваних фаз у гені 1 та гені 4. Ген 8, у цьому випадку, не показав таку динаміку. Збільшення рівня експресії під час рецептивної фази та її зменшення під час пострецептивної знову реєструвалося у гені 2, гені 5 та гені 7.

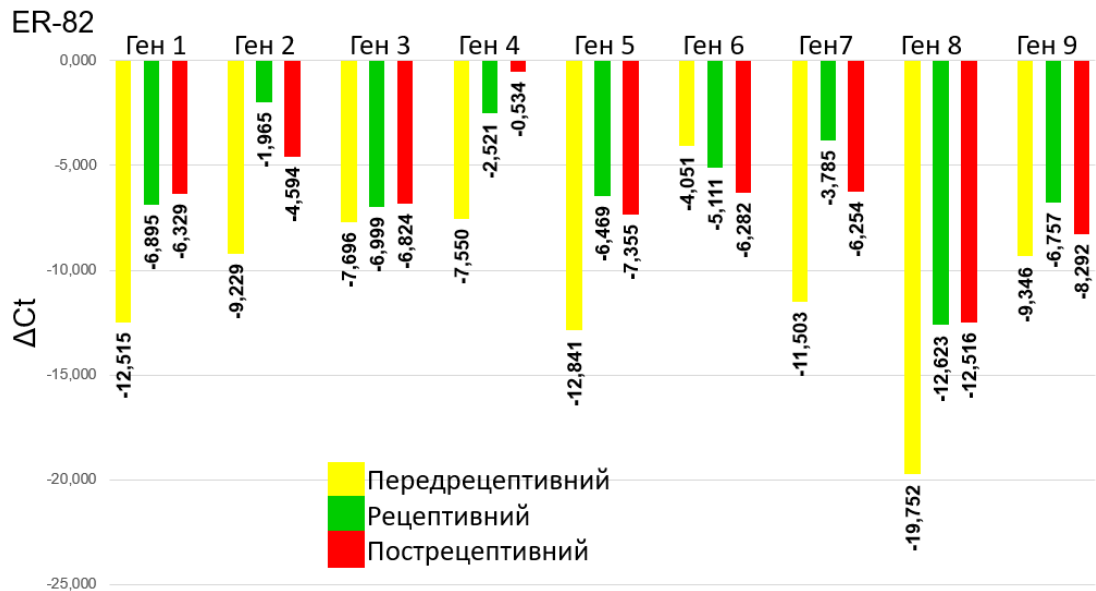


Рис. 3.1.5. Діаграма інтенсивності експресії генів інтересу відносно гену гомеобоксу під час трьох фаз ендометрію. Пацієнт ER-82.

Ген 2 та ген 4 у всіх пацієнтів показав найкращі результати. У них дуже помітні перепади рівня експресії під час трьох фаз. Ці гени мають однакову динаміку. Ген 2 під час передрецептивної фази має низький рівень експресії, на рецептивній рівень підвищується, а під час пострецептивної рівень експресії знову починає падати. Ген 4 характеризується значним підвищенням рівня експресії протягом всіх трьох фаз.

Ген 7 у більшості випадків мав достатньо показові результати рівня експресії для визначення фаз рецептивності. У двох пацієнтів ген 9 показав гарну картину динаміки, на якій спостерігається інформативне коливання рівня експресії.

Ген 6 та ген 3 здебільшого у пацієнтів не мав значних змін рівня експресії протягом трьох фаз ендометрію. І деякі гени, наприклад, ген 8 та ген 5, мали перепад рівня експресії лише на одній фазі.

3.2 Оцінка динаміки експресії генів у різних пацієнтів

Для того, щоб ген був максимально інформативний він повинен мати повторювані показники рівня експресії у різних пацієнтів. На діаграмах, що знаходяться нижче, позначене стандартне відхилення, в яке наші показники мають входити. Діапазон відхилення було обрано 1,5 пункти, так як на показник порогової флуоресценції (Ct) може також впливати концентрація РНК у реакційній суміші для ПЛР. Забезпечити абсолютно однакову концентрацію досить складно, враховуючи ще той факт, що РНК не володіє достатньою стабільністю.

Показник Ct показує на якому циклі ампліфікації флуоресцентне світіння зразку стало інтенсивнішим за фонову флуоресценцію. Тобто чим більший цей показник, тим менший вміст досліджуваної РНК у зразку.

На діаграмі, що зображена на рис. 3.2.1 можна бачити показники рівня експресії генів на передрецептивній фазі всіх п'яти пацієнтів.

Ген 10, якого не було на попередніх діаграмах – це ген гомеобоксу. Цей ген має постійну експресію на однаковому рівні у всіх клітинах і може слугувати контролем для концентрації зразків РНК у реакційній суміші. На всіх результатах ПЛР у реальному часі можна спостерігати, що його показник порогової флуоресценції знаходиться приблизно на двадцятому циклі із сорока. Переважна частина відповідних генів інших пацієнтів потребувала більшу кількість циклів для перетину порогової флуоресценції. Тобто більший показник Ct.

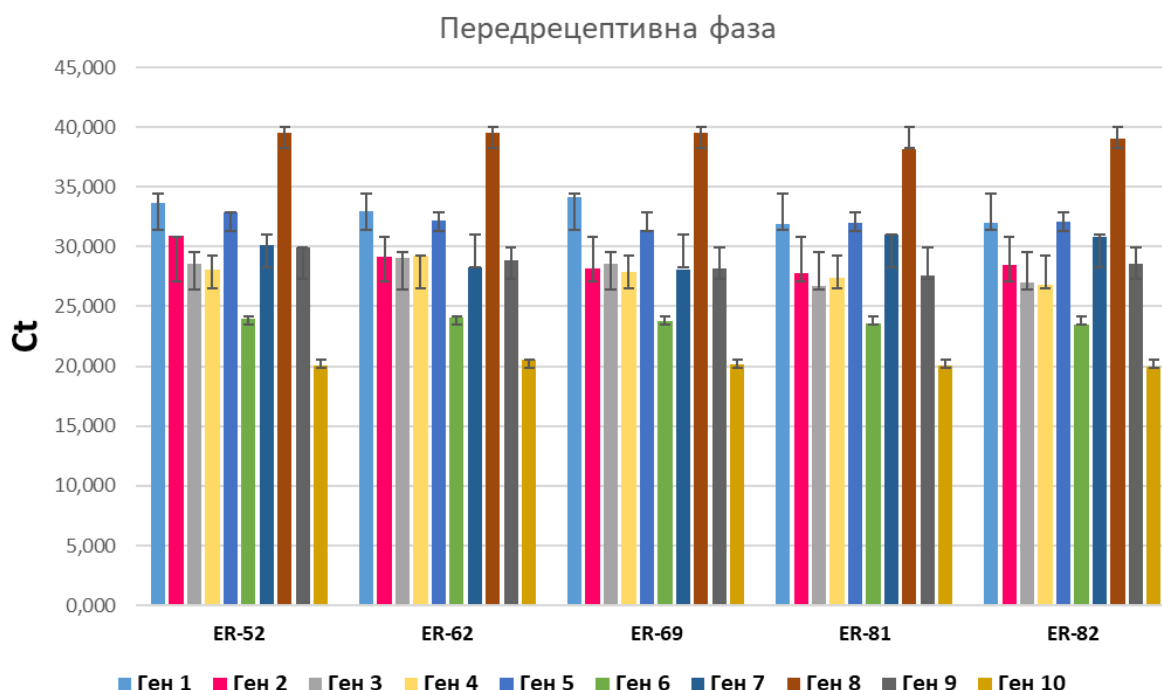


Рис. 3.2.1. Порівняння діапазонів розкиду рівня експресії генів у п'яти пацієнтів під час передрецептивної фази.

Показники пацієнта ER-81 знаходяться помітно нижче, ніж у решти пацієнтів. Всі гени цього пацієнта знаходяться на нижній границі стандартного відхилення. Враховуючи це, можна зробити припущення, що концентрація РНК у реакційній суміші для ПЛР була трошки вищою від концентрації РНК інших пацієнтів. Тому її зразки перейшли показник порогової флуоресценції раніше за інші.

Діаграма на рис. 3.2.1 ілюструє, що майже всі показники рівня експресії знаходяться у межах, які вказують діапазон відхилення. Виключенням є ген 7 у пацієнтів ER-62 та ER-69. У них показник C_t знаходиться на нижній межі відхилення, або не досягає її взагалі (ER-69).

На діаграмі, яка показує рівень експресії генів під час рецептивної фази можна спостерігати аналогічну ситуацію високих показників рівня експресії генів у пацієнта ER-81, включаючи ген гомеобоксу (рис. 3.2.2).

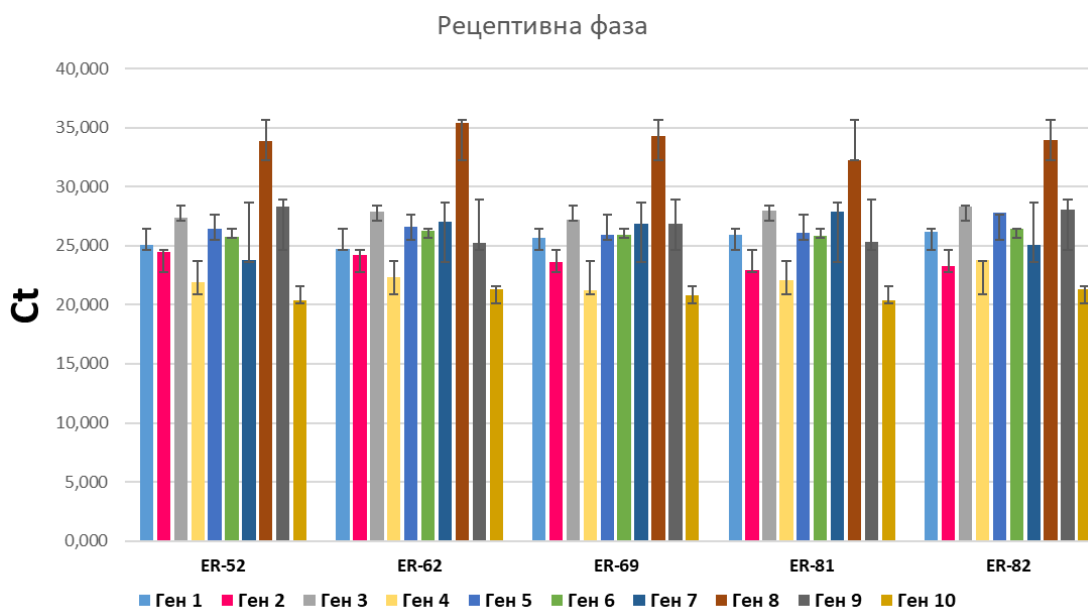


Рис. 3.2.2. Порівняння діапазонів розкиду рівня експресії генів у п'яти пацієнтів під час рецептивної фази.

Картина, що повторюється може підтвердити припущення про вміст більшої концентрації РНК цього пацієнта у реакційній суміші.

На рис. 3.2.2 можна бачити, що всі гени входять у діапазон стандартного відхилення. Тобто вони мають рівень експресії генів у одному діапазоні. Ми можемо бачити, що діаграми всіх генів кожного пацієнта мають подібну картину і візуально вони схожі один з одним.

На діаграмі, що зображена на рис. 3.2.3 знаходиться порівняння розкиду показників рівня експресії під час пострецептивної фази.

Аналогічно до попередніх двох діаграм можна спостерігати дуже подібні картини рівня експресії генів у різних пацієнтів. Гени пацієнта ER-81 повторно показують вищі показники. Виключенням є лише ген 1, який сягає верхньої границі стандартного відхилення. Решта показників знаходиться на нижній границі, або під нею.

Показники порогової флуоресценції у пацієнтів ER-52, ER-62, ER-69 та ER-82 знаходяться у межах діапазону стандартного відхилення і показують схожі картини розподілу рівня експресії всіх генів (рис. 3.2.3).

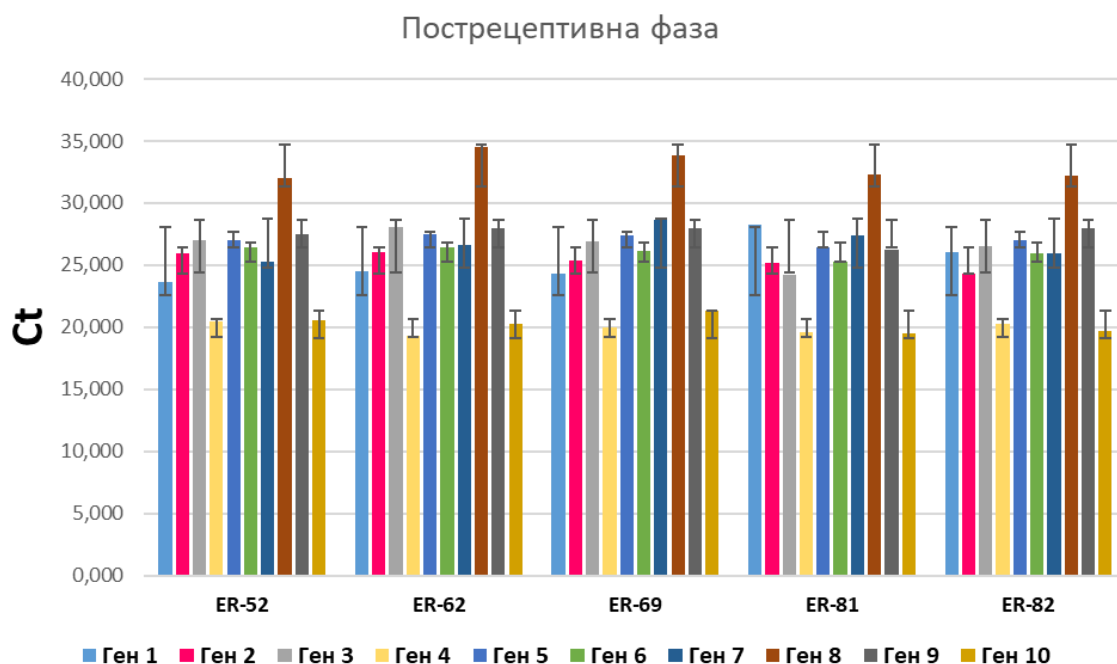


Рис. 3.2.3. Порівняння діапазонів розкиду рівня експресії генів у п'яти пацієнтів під час пострецептивної фази.

Загалом на всіх діаграмах помітно, що картина експресії різних генів у досліджуваних пацієнтів схожа. Це важливо для того, щоб гени можна було вважати показовими для визначення передрецептивної, рецептивної та пострецептивної фази ендометрію. Можна вважати, що картина дослідження характеризується повторюваністю результатів.

Практично всі показники рівня експресії генів знаходяться у межах стандартного відхилення, за винятком деяких випадків. Виключенням є ген 7 у пацієнтів ER-62 та ER-69 під час передоцептивної фази (рис.3.2.1). Також рівень експресії генів пацієнта ER-81 знаходиться на нижній границі стандартного відхилення, але при цьому має схожий характер динаміки показників рівня експресії всіх генів.

Спостерігається повторюваність результатів рівня експресії генів пацієнтів ER-52, ER-62, ER-69, ER-81, ER-82. Тобто гени у більшості випадків однаково коливаються під час перебігу фаз рецептивності ендометрію і їх стандартне відхилення у більшості випадків входить у межу допустимого.

Досліджувані гени можна використовувати для молекулярно-генетичного методу визначення сприйнятливої ендометрію.

3.3. Аналіз результативності методу визначення рецептивної фази

Головною метою дослідження трьох фаз рецептивності є визначення конкретно рецептивної фази ендометрію. Цей показник важливий для створення майбутніх протоколів для програм допоміжних репродуктивних технологій.

Зразки біопсії датуються днем наявності у крові гормону. Це може бути відлік з моменту виявлення лютеїнізуючого гормону, якщо у пацієнта всі зразки забираються під час природнього менструального циклу. Якщо відлік робиться за наявністю прогестерону, то пацієнт приймає гормональну терапію, яка регулює його цикл і дозрівання фолікулів. Тобто таким пацієнти створюють умови регулюючого штучного циклу.

На основі розробленої схеми визначення фази рецептивності проведено було дослідження 53 пацієнтів. У цих жінок було визначено день, на який припадало «вікно імплантації» (рис. 3.3.1). Для забору біоматеріалу було обрано як стандартні точки (П+4, П+6, П+8, ЛГ+5, ЛГ+7), так і нестандартні (П+5, П+7, ЛГ+8, ЛГ+6). Це пов'язано із тим, що деякі пацієнти вже мали випадки неуспішних переносів ембріонів. Крім того, наявність нестандартних точок може говорити про проведення додаткового забору аспірату ендометрію. Ця маніпуляція проводиться у випадку, коли два із трьох зразків відповідають одній фазі рецептивності. Наприклад, коли виявлено тільки передрецептивну та пострецептивну.

Діаграма на рис. 3.3.1 показує відсоток жінок, у яких «вікно імплантації» припадає на певний день виявлення гормону в крові (прогестерону чи ЛГ). Можна помітити на діаграмі, що достатній відсоток пацієнтів має зміщене

«вікно імплантації». Це пацієнти, у яких рецептивний ендометрій був виявлений на ЛГ+8, ЛГ+5, П+4 та П+8 (16 %). Зміщення спричинене генетичними факторами і не може коригуватись медикаментозно. Тому, у таких випадках єдиним рішенням є встановлення рецептивної фази ендометрію за допомогою молекулярно-генетичних методів.

Найбільший відсоток у обох категоріях припадає на норму. Великий відсоток спостерігається у жінок зі штучним циклом (43 %). Рецептивний ендометрій у них найчастіше визначався на шостий та п'ятий день виявлення прогестерону у крові.

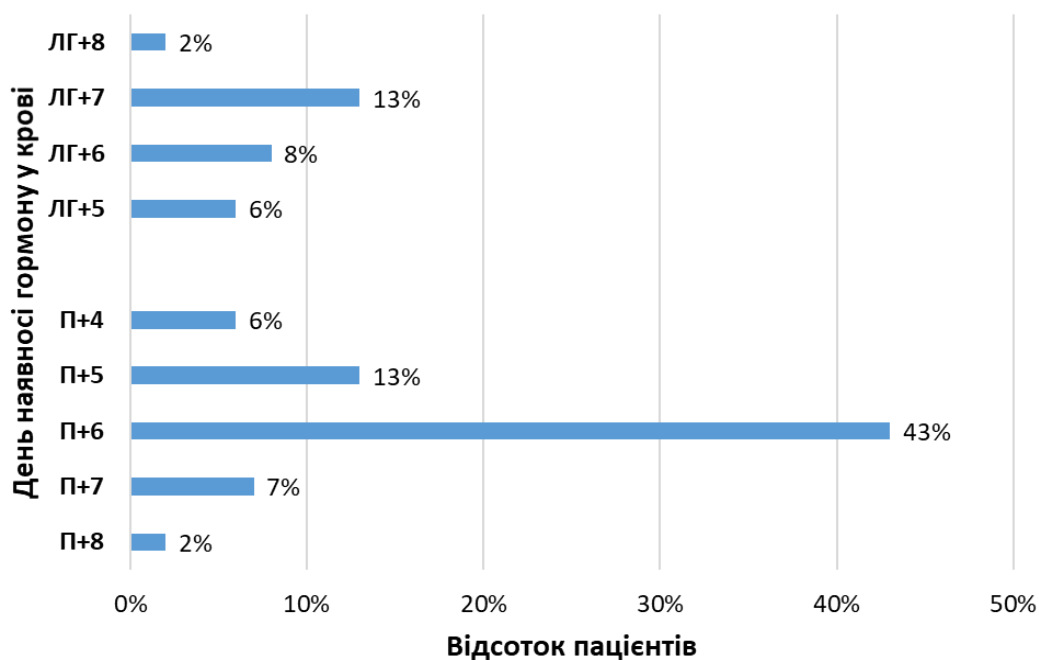


Рис. 3.3.1. Оцінка відсоткового співвідношення дня «вікна імплантації». ЛГ – лютеїнізуючий гормон; П – прогестерон; цифра вказує на день виявлення гормону у крові пацієнта.

У пацієнтів із природнім циклом найчастіше фаза сприйнятливого ендометрію припадала на сьомий та шостий день наявності лютеїнізуючого гормону. Хоча забір аспірату ендометрію на шостий день ЛГ не вважається стандартним днем для дослідження.

Основаючиись на отриманих результатах встановлення рецептивної фази ендометрію створили протоколи для програм ДРТ на наступний цикл. Жінкам проводили перенесення бластоцисти на встановлений день природнього чи штучного циклу. Всього було проведено 29 ембріотрансферів.

Успішність ембріотрансферу після проведення дослідження «вікна імплантації» становить 45 % (рис. 3.3.2). Негативних переносів ембріонів – 52 %. Також у 3 % встановлено біохімічну вагітність, що свідчить про виявлення високої концентрації хоріонічного гонадотропіну людини у крові. Цей аналіз проводиться через 2 тижні після проведення ембріотрансферу.

Варто ще звернути увагу на те, що є частина пацієнтів, які не робили передімплантаційну діагностику бластоцист. Достовірно встановити причину негативного результату не можна. У випадках, коли ПГД бластоцист не проводиться, не можна стверджувати, що вони без хромосомних чи генетичних патологій.

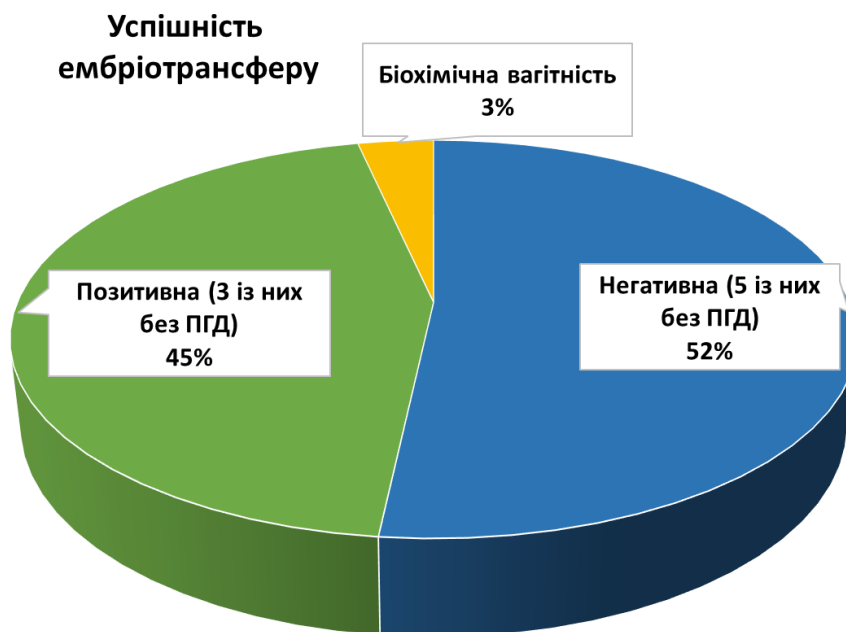


Рис. 3.3.2. Відсоткове співвідношення ефективності ембріотрансферу на встановлений день рецептивності ендометрію. ПГД – передімплантаційна діагностика.

Позитивний показник у 45 % можна вважати достатньо високим. Якщо порівнювати із використанням методу «ERA», то цей показник вищий на 20 %. Показник успішних переносів ембріонів після визначення «вікна імплантації» методом «ERA» становить лише 25 % [34].

Отримана статистика переносу ембріонів у визначені дні відкритого «вікна імплантації» показує достатню ефективність визначення дня рецептивного ендометрію за допомогою методу визначення рівня експресії конкретних груп генів. Цей метод аналізу є більш доступним та ефективнішим.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

На сьогоднішній день методи визначення сприйнятливого ендометрію набули актуальності та активно розвиваються. Важливим моментом побудови історії ДРТ стала можливість екстракорпорального запліднення (ЕКЗ) [1]. Здійснюється ЕКЗ методом запліднення *in vitro* та ін'єкцією сперматозоїда у цитоплазму яйцеклітини (ICSI). У 80-их роках завдяки методу ЕКЗ відсоток успішності програм ДРТ сягав 13 – 17 % [2]. Другим важливим моментом стало застосування передімплантаційної діагностики. Почали проводити скринінг бластоцист на наявність хромосомних та генетичних порушень.

Сьогодні у світі живе більше трьох з половиною мільйонів людей, які появились на світ завдяки методу екстракорпорального запліднення. Розвиток галузі допоміжних репродуктивних технологій є дуже важливим у сучасному світі.

Не зважаючи на успішний та швидкий розвиток методів ДРТ, успішність цих програм не стовідсоткова. За умов наявності сперматозоїдів та яйцеклітин із гарними показниками і створення з них ембріону гарної якості немає гарантії, що ембріон імплантується. За даними сучасних досліджень більше половини програм ДРТ не закінчуються народженням дитини і вісім із десяти ембріонів не імплантується [2]. Дослідження із ембріонами, яким робили передімплантаційну діагностику показали успішність імплантації лише у 60 % [4]. Ці показники надихнули вчених дослідити проблему зміщеного «вікна імплантації». Зміщення детермінується генетично і на нього не можна ніяк вплинути медикаментозно, щоб нормалізувати перебіг рецептивної фази. Тому єдиним варіантом для таких пацієнтів стало знайти метод, яким можна його визначити персоналізовано.

Гістологічний метод визначення фази сприйнятливого ендометрію, заснований на морфологічних характеристиках, застосовується із 50-их років. Але цей метод не володіє достатньою ефективністю визначення «вікна

імплантації». Новим кроком стала ера дослідження молекулярних маркерів рецептивного ендометрію (білків адгезії, факторів росту, простагландинів, тощо) [42, 53]. На жаль, показника концентрації тільки одного білку виявилось недостатньо для дослідження. Тож самим перспективним та прогресивним методом стало молекулярно-генетичне дослідження рівня експресії генів. Цей метод дозволяє дослідити всі процеси перетворення ендометрію на генетичному рівні.

Для удосконалення методу молекулярно-генетичного дослідження фази рецептивності ендометрію почали створювати невеликі комбінації різних генів. Ці комбінації можуть складатися із декількох десятків генів і поєднувати у собі найбільш показові гени [62, 69]. Вони мають демонструвати перепади рівня експресії на різних фазах ендометрію: передрецептивній, рецептивній та пострецептивній фазі. Також ці панелі мають аналізувати гени гомеобоксу (хоча б один-два), які характеризуються постійним рівнем експресії на всіх фазах ендометрію людини.

Для нашого дослідження було обрано десять генів, один із яких (ген 10) був геном гомеобоксу. Після аналізу результатів, було обрано п'ять пацієнтів: ER-52, ER-62, ER-69, ER-81, ER-82. Вони всі мали три зразка біопсії, зібрані на четвертий, шостий та восьмий дні введення прогестерону. Це були пацієнти із штучним циклом. За результатами їх точки відповідали всім трьом досліджуваним фазам ендометрію.

Перш за все ми провели порівняння рівня експресії генів відносно гену гомеобоксу (ген 10). У цьому випадку ген 10 слугує точкою відліку, нулем на діаграмах. Ми вираховували показник ΔSt для аналізу експресії генів інтересу. Цей показник є різницею St гену гомеобоксу та St досліджуваних генів.

У всіх пацієнтів можна відмітити показову зміну рівня експресії гену 1, гену 2, гену 4 та гену 5. У більшій частині досліджуваних пацієнтів спостерігається інформативні рівні експресії гену 7, гену 8 та гену 9 для диференціації фаз ендометрію за їх показниками. Ген 6 та ген 3 можна

відмітити як неінформативні або слабо інформативні гени, показники рівня експресії яких не сильно відрізняються із перебігом фаз.

Додатково було проаналізовано, що деякі гени не мають інформативних показників експресії на рецептивній та пострецептивній фазі. Ці гени мали показовий зсув тільки під час передрецептивної фази. До цих генів можна віднести ген 8 та у пацієнта ER-69 ген 9.

Характер коливання рівня експресії також повторюється у досліджуваних пацієнтів у більшості випадків. Ген 1, ген 4 та ген 8 має тенденцію до збільшення рівня експресії протягом перебігу трьох фаз ендометрію. Ген 4 навіть перевищував у деяких випадках рівень експресії гену гомеобоксу. У більшості пацієнтів також спостерігався ріст експресії гену 3, але не значний у порівнянні з попередніми.

Також було проаналізовано, що експресія гену 2, гену 5, гену 7 та гену 9 збільшується від передрецептивної фази до рецептивної. А під при переході із рецептивної на пострецептивну їх експресія зменшується.

Тенденцію до зменшення рівня експресії можна було спостерігати тільки на показниках гену 6. Але коливання експресії його гену незначні для ефективного використання цих показників у встановленні рецептивної фази ендометрію цим методом.

Загалом можна припустити, що показники рівня експресії більшості генів можна вважати інформативними та такими, що повторюються і різних пацієнтів. Це є важливим моментом для використання цих генів у методі визначення «вікна імплантації».

Наступним кроком ми дослідили загальну картину рівня експресії десяти генів у всіх пацієнтів. Для цього ми проаналізували рівні експресії генів, які відповідали трьом фазам ендометрію.

До всіх показників кожної діаграми було застосовано формулу, яка вираховувала показник стандартного відхилення. Цей показник вказує на ступінь відхилення досліджуваних значень від усередненого показника. Кожен ген окремо має свій власний діапазон стандартного відхилення, який

застосований до кожного пацієнта. Діапазоном відхилення було обрано значення у півтора пункти.

Відразу було помічено, що всі показники рівня експресії у пацієнта ER-81 мають високі показники і знаходяться на нижній межі стандартного відхилення, або під нею. Вони досить рано перетнули межу порогової флуоресценції, по відношенню до показників інших пацієнтів. Це може свідчити про вміст більшої концентрації зразку РНК цього пацієнта у реакційній суміші.

Було проаналізовано, що загальна картина динаміки експресії генів у всіх пацієнтів повторюється. Це факт додатково підтверджує, що гени у більшості випадків однаково коливаються під час перебігу фаз рецептивності ендометрію. І їх можна використовувати для молекулярно-генетичного методу.

За даними наших результатів було встановлено дату «вікна імплантації» у 53 пацієнтів. Для дослідження жінок обиралися стандартні та нестандартні дні забору біоматеріалу. Однією із причин була наявність пацієнтів із проведеним неуспішним ембріотрансфером у прогнозований день «вікна імплантації». Також наявність нестандартних днів забору була пов'язана із тим, що проводилися додаткові біопсії у випадку, коли із трьох зразків ні один не відповідав рецептивній фазі.

У 43 % жінок із штучним циклом рецептивна фаза була на шостий день введення прогестерону. також великий показник 13 % припав на п'ятий день штучного циклу. У жінок із природнім циклом 13 % датовано сьомим днем наявності лютеїнізуючого гормону і 8 % припало на 6 день. Загалом до норми увійшло лише 77 % пацієнтів. У 33 % жінок спостерігався незначний зсув вінка імплантації на 1–2 дні до чи після прогнозованого дня.

Пацієнтам із визначеним днем рецептивного ендометрію створювалися протоколи ДРТ на наступний цикл із урахуванням визначеного для рецептивності. Успішність імплантації у цих пацієнтів після ембріотрансферу складала 45 % та 3 % – біохімічна вагітність. Не успішних переносів ембріонів

було 52 % відповідно. Проте, деякі пацієнти із цих 52 % не проводили своїм ембріонам передімплантаційну діагностику. Тому є ризик того, що ембріон не імплантувався через присутні у ньому генетичні чи хромосомні патології.

Продовження розвитку молекулярно-генетичного методу дасть змогу повністю усунути проблему зміщеного «вікна імплантації». Це дозволить мінімізувати відсоток неуспішних програм допоміжних репродуктивних технологій та успішність імплантації здорових ембріонів зросте.

ВИСНОВКИ

1. Було визначено рівень експресії досліджуваних генів на трьох точках рецептивності ендометрію та обрано п'ять пацієнтів, точки яких відповідали кожній фазі.
2. Ген 1, ген 2, ген 4, ген 8 та ген 9 показали інформативну динаміку зміни рівня експресії протягом трьох фаз ендометрію. Ген 6 та ген 3 показали найменшу інформативність.
3. У всіх пацієнтів спостерігається повторюваність результатів рівня експресії досліджуваних генів.
4. Перенесення ембріонів на встановлений день рецептивності показує 45 % успішних вагітностей, свідчить про ефективність методу визначення фази сприйнятливої ендометрію.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

- [1] Alon I, Guimón J, Urbanos-Garrido R. What to expect from assisted reproductive technologies? Experts' forecasts for the next two decades. *Technol Forecast Soc Change* 2019; 148: 119722.
- [2] Sullivan-Pyke C, Dokras A. Preimplantation Genetic Screening and Preimplantation Genetic Diagnosis. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America* 2018; 45: 113–125.
- [3] Enciso M, Jpcjspam-Osmjahjaan. Development of a new comprehensive and reliable endometrial receptivity map (ER Map/ER Grade) based on RT-qPCR gene expression analysis. *Hum Reprod* 2018; 33: 220–228.
- [4] Kovalevsky G, Patrizio P. High rates of embryo wastage with use of assisted reproductive technology: A look at the trends between 1995 and 2001 in the United States. *Fertil Steril* 2005; 84: 325–330.
- [5] Hashimoto T, Koizumi M, Doshida M, et al. Efficacy of the endometrial receptivity array for repeated implantation failure in Japan: A retrospective, two-centers study. *Reprod Med Biol* 2017; 16: 290–296.
- [6] Delphine H, Sakmsttrbhjdv and SH. Gene expression profile of human endometrial receptivity: comparison between natural and stimulated cycles for the same patients. *Hum Reprod* 2009; 24: 1445.
- [7] Cohen J, Alikani M, Bisignano A. Past performance of assisted reproduction technologies as a model to predict future progress: A proposed addendum to Moore's law. *Reprod Biomed Online* 2012; 25: 585–590.
- [8] Kibanov M V., Makhmudova GM, Gokhberg YA. In search for an ideal marker of endometrial receptivity: from histology to comprehensive molecular genetics-based approaches. *Alm Clin Med* 2019; 47: 12–25.
- [9] Makker A, Singh MM. Endometrial receptivity: Clinical assessment in relation to fertility, infertility, and antifertility. *Med Res Rev* 2006; 26: 699–746.
- [10] Heger A, Sator M, Pietrowski D. Endometrial receptivity and its predictive

- value for IVF/ICSI-outcome. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 2012; 72: 710–715.
- [11] Rogenhofer N, Bohlmann MK, Thaler CJ, et al. Habituelle abortneigung: Evidenzbasierte diagnostik und therapie. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 2010; 70: 544–552.
- [12] Kehila M, Kebaili S, Bougmiza I, et al. [Endometrial thickness in in vitro fertilization. A study of 414 cases]. *Tunis Med* 2010; 88: 928–932.
- [13] Kovachev E, Ganchev Z, Cherneva S, et al. Measurement of endometrial volume and endometrial thickness for assessment of endometrial receptivity in assisted reproductive techniques. *Akush Ginekol (Sofia)* 2005; 44 Suppl 2: 27–33.
- [14] Bassil S. Changes in endometrial thickness, width, length and pattern in predicting pregnancy outcome during ovarian stimulation in in vitro fertilization. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2001; 18: 258–263.
- [15] Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update*; 12: 731–46.
- [16] Teh WT, McBain J, Rogers P. What is the contribution of embryo-endometrial asynchrony to implantation failure? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 2016; 33: 1419–1430.
- [17] Думанська В. П.. Внесок новітніх репродуктивних технологій у народжуваність в Україні. *Demogr Soc Econ* 2018; 2: 82–93.
- [18] Sharma A, Kumar P. Understanding implantation window, a crucial phenomenon. *Journal of Human Reproductive Sciences* 2012; 5: 2–6.
- [19] Usadi RS, Murray MJ, Bagnell RC, et al. Temporal and morphologic characteristics of pinopod expression across the secretory phase of the endometrial cycle in normally cycling women with proven fertility. *Fertil Steril* 2003; 79: 970–974.
- [20] Aghajanova L, Stavreus-Evers A, Nikas Y, et al. Coexpression of pinopodes and leukemia inhibitory factor, as well as its receptor, in human endometrium. *Fertil Steril* 2003; 79 Suppl 1: 808–14.
- [21] Bowen JA, Hunt JS. The role of integrins in reproduction. *Proceedings of the*

- Society for Experimental Biology and Medicine* 2000; 223: 331–343.
- [22] Wang J, Armant DR. Integrin-Mediated Adhesion and Signaling during Blastocyst Implantation. *Cells Tissues Organs* 2002; 172: 190–201.
 - [23] Smalley DM, Ley K. L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. *Journal of cellular and molecular medicine* 2005; 9: 255–266.
 - [24] Ochoa-Bernal MA, Fazleabas AT. Physiologic events of embryo implantation and decidualization in human and non-human primates. *International Journal of Molecular Sciences*; 21. Epub ahead of print 1 March 2020. DOI: 10.3390/ijms21061973.
 - [25] Defrere S, Van Langendonck A, Moulin P, et al. Human Endometrial Epithelial Cells (EEC) Constitutively Express More Intercellular Adhesion Molecule (ICAM)-1 than Endometrial Stromal Cells (ESC) in Culture. *Am J Reprod Immunol* 2005; 54: 5–12.
 - [26] Heikkinen J, Möttönen M, Alanen A, et al. Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua. *Clin Exp Immunol* 2004; 136: 373–378.
 - [27] Meseguer M, Aplin JD, Caballero-Campo P, et al. Human Endometrial Mucin MUC1 Is Up-Regulated by Progesterone and Down-Regulated In Vitro by the Human Blastocyst1. *Biol Reprod* 2001; 64: 590–601.
 - [28] Fitzgerald JS, Poehlmann TG, Schleussner E, et al. Trophoblast invasion: the role of intracellular cytokine signalling via signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). *Hum Reprod Update*; 14: 335–44.
 - [29] Ashary N, Tiwari A, Modi D. Embryo Implantation: War in times of love. *Endocrinology* 2018; 159: 1188–1198.
 - [30] Blois SM, Klapp BF, Barrientos G. Decidualization and angiogenesis in early pregnancy: Unravelling the functions of DC and NK cells. *J Reprod Immunol* 2011; 88: 86–92.
 - [31] Plaisier M. Decidualisation and angiogenesis. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology* 2011; 25: 259–271.

- [32] Crawford NM, Pritchard DA, Herring AH, et al. Prospective evaluation of luteal phase length and natural fertility. *Fertil Steril* 2017; 107: 749–755.
- [33] Van der Linden M, Buckingham K, Farquhar C, et al. Luteal phase support for assisted reproduction cycles. *Cochrane Database of Systematic Reviews*; 2015. Epub ahead of print 7 July 2015. DOI: 10.1002/14651858.CD009154.pub3.
- [34] Mahajan N. Endometrial receptivity array: Clinical application. *Journal of Human Reproductive Sciences* 2015; 8: 121–129.
- [35] Mesen TB, Young SL. Progesterone and the Luteal Phase: A Requisite to Reproduction. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America* 2015; 42: 135–151.
- [36] Bagnjuk K, Mayerhofer A. Human luteinized granulosa cells—a cellular model for the human corpus luteum. *Frontiers in Endocrinology*; 10. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.3389/fendo.2019.00452.
- [37] Aitken RJ, Baker MA, Doncel GF, et al. As the world grows: Contraception in the 21st century. *Journal of Clinical Investigation* 2008; 118: 1330–1343.
- [38] Lessey BA. Assessment of endometrial receptivity. *Fertility and Sterility* 2011; 96: 522–529.
- [39] Nikas G, Makrigiannakis A, Hovatta O, et al. Surface Morphology of the Human Endometrium: Basic and Clinical Aspects. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 900: 316–324.
- [40] Fox C, Morin S, Jeong JW, et al. Local and systemic factors and implantation: What is the evidence? *Fertility and Sterility* 2016; 105: 873–884.
- [41] Vilella F, Ramirez L, Berlanga O, et al. PGE2 and PGF2 α concentrations in human endometrial fluid as biomarkers for embryonic implantation. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: 4123–4132.
- [42] Noyes RW, Hertig AT, Rock J. Dating the Endometrial Biopsy. *Fertil Steril* 1950; 1: 3–25.
- [43] Jones Ges. Some newer aspects of the management of infertility. *J Am Med Assoc* 1949; 141: 1123–1129.
- [44] Murray MJ, Meyer WR, Zaino RJ, et al. A critical analysis of the accuracy,

- reproducibility, and clinical utility of histologic endometrial dating in fertile women. *Fertil Steril* 2004; 81: 1333–1343.
- [45] Aplin JD, Ruane PT. Embryo-epithelium interactions during implantation at a glance. *J Cell Sci* 2017; 130: 15–22.
- [46] Develioglu OH, Nikas G, Hsiu JG, et al. Detection of endometrial pinopodes by light microscopy. *Fertil Steril* 2000; 74: 767–770.
- [47] Quinn CE, Casper RF. Pinopodes: a questionable role in endometrial receptivity. *Hum Reprod Update*; 15: 229–36.
- [48] Nikas G. Endometrial receptivity: Changes in cell-surface morphology. *Seminars in Reproductive Medicine* 2000; 18: 229–235.
- [49] Adams SM, Gayer N, Terry V, et al. Manipulation of the follicular phase: Uterodomes and pregnancy - Is there a correlation? *BMC Pregnancy Childbirth* 2001; 1: 2.
- [50] Nikas G, Makrigiannakis A. Endometrial pinopodes and uterine receptivity. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. New York Academy of Sciences, 2003, pp. 120–123.
- [51] Montserrat Creus Joffrcbfecjavjb. $\alpha\beta3$ integrin expression and pinopod formation in normal and out-of-phase endometria of fertile and infertile women. *Hum Reprod* 2002; 17: 2279–2286.
- [52] Acosta AA, Elberger L, Borghi M, et al. Endometrial dating and determination of the window of implantation in healthy fertile women. *Fertil Steril* 2000; 73: 788–798.
- [53] Thomas K, Thomson A, Wood S, et al. Endometrial integrin expression in women undergoing in vitro fertilization and the association with subsequent treatment outcome. *Fertil Steril* 2003; 80: 502–507.
- [54] Illera MJ, Cullinan E, Gui Y, et al. Blockade of the $\alpha\beta3$ Integrin Adversely Affects Implantation in the Mouse¹. *Biol Reprod* 2000; 62: 1285–1290.
- [55] Song H, Lim H, Paria BC, et al. Cytosolic phospholipase A2 α is crucial [correction of A2 α deficiency is crucial] for ‘on-time’ embryo implantation that directs subsequent development. *Development* 2002; 129:

2879–89.

- [56] Forsberg L, Leeb L, Thorén S, et al. Human glutathione dependent prostaglandin E synthase: Gene structure and regulation. *FEBS Lett* 2000; 471: 78–82.
- [57] Ye X, Hama K, Contos JJA, et al. LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing. *Nature* 2005; 435: 104–108.
- [58] Milne SA, Jabbour HN. Prostaglandin (PG) F₂ α receptor expression and signaling in human endometrium: Role of PGF₂ α in epithelial cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 1825–1832.
- [59] Battersby S, Critchley HOD, de Brum-Fernandes AJ, et al. Temporal expression and signalling of prostacyclin receptor in the human endometrium across the menstrual cycle. *Reproduction* 2004; 127: 79–86.
- [60] Milne SA, Perchick GB, Boddy SC, et al. Expression, localization, and signaling of PGE₂ and EP₂/EP₄ receptors in human nonpregnant endometrium across the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4453–4459.
- [61] Borthwick JM, Charnock-Jones DS, Tom BD, et al. Determination of the transcript profile of human endometrium. *Molecular Human Reproduction* 2003; 9: 19–33.
- [62] Díaz-Gimeno P, Horcajadas JA, Martínez-Conejero JA, et al. A genomic diagnostic tool for human endometrial receptivity based on the transcriptomic signature. *Fertil Steril*; 95. Epub ahead of print 2011. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2010.04.063.
- [63] Talbi S, Hamilton AE, Vo KC, et al. Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women. *Endocrinology* 2006; 147: 1097–1121.
- [64] Díaz-Gimeno P, Ruíz-Alonso M, Blesa D, et al. Transcriptomics of the human endometrium. *Int J Dev Biol* 2014; 58: 127–137.
- [65] Critchley HOD, Kelly RW, Brenner RM, et al. The endocrinology of menstruation - A role for the immune system. *Clinical Endocrinology* 2001;

- 55: 701–710.
- [66] Apparao KBC, Murray MJ, Fritz MA, et al. Osteopontin and Its Receptor $\alpha\beta$ 3 Integrin Are Coexpressed in the Human Endometrium during the Menstrual Cycle But Regulated Differentially . *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4991–5000.
 - [67] Riesewijk A, Martín J, van Os R, et al. Gene expression profiling of human endometrial receptivity on days LH+2 versus LH+7 by microarray technology. *Mol Hum Reprod* 2003; 9: 253–264.
 - [68] Horcujadas JA, Riesewijk A, Polman J, et al. Effect of controlled ovarian hyperstimulation in IVF on endometrial gene expression profiles. *Mol Hum Reprod* 2004; 11: 195–205.
 - [69] Horcujadas JA1 PASC. Wide genomic analysis of human endometrial receptivity: new times, new opportunities. *Hum Reprod Update* 2007; 13: 77–86.
 - [70] Wang H, Zhang S, Lin H, et al. Physiological and molecular determinants of embryo implantation. *Molecular Aspects of Medicine* 2013; 34: 939–980.
 - [71] Zieba A, Sjöstedt E, Olovsson M, et al. The Human Endometrium-Specific Proteome Defined by Transcriptomics and Antibody-Based Profiling. *Omi A J Integr Biol* 2015; 19: 659–668.
 - [72] Thermo Fisher Scientific. *PureLink® RNA Mini Kit*. 2012.
 - [73] Fisher Scientific T. *User Guide: Qubit RNA BR Assay Kits*.
 - [74] ThermoFisher Scientific. *SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit*, www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions.html. (3 May 2016, accessed 5 March 2020).
 - [75] Thermo Fisher Scientific. *Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit #K1622 100 rxns*, www.thermoscientific.com/onebio (2013, accessed 5 March 2020).