

© Коллектив авторов, 2021

Я.А. ГОХБЕРГ, А.В. ТИМОФЕЕВА, Е.А. КАЛИНИНА

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ РЕЦЕПТИВНОСТИ ЭНДОМЕТРИЯ В ПРОГРАММАХ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

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

Несмотря на рост эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), частота успешных имплантаций эмбриона остается на низком уровне. Отсутствие имплантации может быть связано с нарушением рецептивности эндометрия в период «имплантационного окна». Для определения рецептивности эндометрия разработаны и используются различные методы диагностики: гистологический анализ, электронная микроскопия, иммуногистохимическое исследование, молекулярно-генетический анализ, однако многие из них зависят от сопутствующих факторов и имеют невысокую функциональную значимость в решении данной проблемы. В настоящее время продолжается поиск идеального маркера, позволяющего определить наилучший момент для переноса эмбриона в полость матки в цикле экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). Применение омиксных технологий в исследовании культуральной среды эмбриона позволило прогнозировать не только качество, но и имплантационный потенциал самого эмбриона, а также оптимизировать выбор эмбрионов для переноса в полость матки. Однако для повышения результативности программ ВРТ целесообразным является не только изучение эмбрионального профиля, но и оценка рецептивности эндометрия.

Заключение: *В связи с этим на основании проведенного анализа литературных источников было показано, что изучение профиля малых некодирующих РНК (мнкРНК) в образцах эндометрия является перспективным и актуальным анализом, который позволит персонафицировать подход в рамках проведения программ ВРТ.*

Ключевые слова: *вспомогательные репродуктивные технологии, беременность, имплантация эмбрионов, культуральная среда эмбрионов, рецептивность эндометрия, бесплодие, малые некодирующие РНК, микроРНК, пивиРНК, омиксные технологии, miRNA, piRNA, тест ERA.*

Вклад авторов: Гохберг Я.А. — сбор и анализ литературных данных, обработка исходного материала и написание статьи; Тимофеева А.В., Калинина Е.А. — редактирование рукописи статьи и утверждение публикации.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии возможных конфликтов интересов.

Финансирование: Работа проведена без привлечения дополнительного финансирования со стороны третьих лиц.

Для цитирования: Гохберг Я.А., Тимофеева А.В., Калинина Е.А.
Молекулярные маркеры рецептивности эндометрия в программах
вспомогательных репродуктивных технологий.
Акушерство и гинекология. 2021; 11: 56-62
<https://dx.doi.org/10.18565/aig.2021.11.56-62>

©A group of authors, 2021

YA.A. GOKHBERG, A.V. TIMOFEEVA, E.A. KALININA

MOLECULAR MARKERS FOR ENDOMETRIAL RECEPTIVITY IN ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY PROGRAMS

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

Despite the increasing effectiveness of assisted reproductive technology (ART) programs, the frequency of successful embryo implantations remains low. The lack of implantation may be associated with impaired endometrial receptivity during the implantation window. To determine the receptivity of the endometrium, various diagnostic methods, such as histological analysis, electron microscopy, immunohistochemical examination, and molecular genetic analysis, have been developed and used; however, many of them depend on contributing factors and are of low functional significance in solving this problem. The search for an ideal marker is now ongoing to determine the best moment for embryo transfer into the uterine cavity for an in vitro fertilization (IVF) cycle. The use of omix technologies to study the embryo culture medium could predict not only the quality, but also implantation potential of the embryo itself, as well as optimize the selection of embryos for transfer to the uterine cavity. However, to enhance the effectiveness of ART programs, it is advisable not only to study the embryonic profile, but also to assess endometrial receptivity.

Conclusion: *In this connection, analyzing the literature sources has shown that the study of the small non-coding RNA (sncRNA) in the endometrial samples is a promising and relevant analysis that will be able to personalize the approach to implementing ART programs.*

Keywords: *assisted reproductive technologies, pregnancy, embryo implantation, embryo culture medium, endometrial receptivity, infertility, small non-coding RNA (sncRNA), miRNA, piRNA, omic technologies, ERA test.*

Authors' contributions: Gokhberg Ya.A. – literature data collection and analysis; processing of the source material and writing the article; Timofeeva A.V., Kalinina E.A. – editing the manuscript of the article and approval of the publication.

Conflicts of interest: The authors declare that there are no possible conflicts of interest.

Funding: The investigation has been conducted without additional funding from the third parties.

For citation: Gokhberg Ya.A., Timofeeva A.V., Kalinina E.A. Molecular markers for endometrial receptivity in assisted reproductive technology programs. Akusherstvo i Ginekologiya/Obstetrics and Gynecology. 2021; 11: 56-62 (in Russian) <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2021.11.56-62>

Бесплодие у супружеской пары остается одной из важных медицинских и социальных проблем. На долю женского бесплодия в Российской Федерации приходится около 50%, мужского – 20–30%, сочетание женского и мужского фактора бесплодия встречается в 20% [1]. Несмотря на оптимизацию протоколов программ вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), их эффективность за последние годы значительно не меняется и остается на уровне 30–40% [2]. Поэтому актуальной является разработка новых методических подходов как для понимания причин бесплодия, так и для диагностических и прогностических целей.

Как известно, успех в программах ВРТ зависит от трех факторов: качества гамет, определяемого состоянием репродуктивной системы обоих партнеров, качества эмбриона, функциональной зрелости (рецептивности) эндометрия [3]. Эндометрий максимально восприимчив к имплантации эмбриона на стадии бластоцисты в период «имплантационного окна». Совокупность структурно-функциональных характеристик слизистой тела матки, обеспечивающих оптимальные условия для имплантации бластоцисты, определяют как рецептивность эндометрия. Имплантация зависит от сложной системы регуляции межмолекулярных и межклеточных взаимодействий, обеспечивающих «диалог» между эмбрионом и рецептивным эндометрием, а также дальнейшего проникновения эмбриона в децидуальный слой матки с последующей дифференцировкой клеток эмбрио- и трофобласта [4].

Одной из основных причин нарушения механизмов имплантации является смещение «имплантационного окна». У большинства женщин «имплантационное окно» охватывает 6–10-й день после пика лютеинизирующего гормона (ЛГ) в секреторную фазу менструального цикла. Однако в некоторых случаях «имплантационное окно» смещается в силу индивидуальных особенностей или под влиянием гормональной стимуляции [5]. При различных патологиях эндометрия наблюдается дисрегуляция его секреторной трансформации, происходит спад активности маточных желез, в частности, секрета эндометрия, что является причиной снижения рецептивности и, как следствие, нарушения взаимодействия эмбриона с материнским организмом в доимплантационный период [6].

Общеизвестными методами оценки рецептивности эндометрия являются: гистологический анализ [7], электронная микроскопия [8], иммуногистохимическое исследование [9], определение уровня простагландинов с помощью масс-спектрометрии [10], молекулярно-генетический анализ [11].

Данные методы являются крайне зависимыми от сопутствующих факторов, а молекулярные механизмы имплантации остаются в значительной степени неясными. Это дало стимул для дальнейших исследований и поиска нового маркера рецептивности эндометрия.

В настоящее время активно изучается роль омиксных высокопроизводительных технологий [12–16], в частности, малых некодирующих РНК (мнкРНК), среди которых наибольший интерес представляют микроРНК (miRNAs) и пивиРНК (piwiRNAs). МикроРНК представляют собой одноцепочечные молекулы РНК длиной от 22 до 24 нуклеотидов. Основная их функция заключается в регуляции экспрессии генов на посттранскрипционном уровне путем образования комплементарных/полукомплементарных структур с 3'-нетранслируемой областью (3'UTR) целевой матричной РНК (мРНК) в составе РНК-индуцированного комплекса сайленсинга (RISC), что приводит к эндонуклеазному расщеплению мРНК и/или блокированию синтеза белка при взаимодействии с факторами инициации трансляции [17, 18].

По данным анализа базы miRBase v22 (<http://mirbase.org/>) у людей идентифицировано 2654 микроРНК, которые играют важную роль во многих биологических процессах. Практически все клетки в организме способны секретировать микроРНК, и уровень их концентрации в биологической среде является отражением как физиологических, так и патологических состояний [19].

Менее изученными представителями класса мнкРНК с точки зрения выполняемой в клетке функции и участия в патологических процессах являются пивиРНК. ПивиРНК представляют собой одноцепочечные молекулы РНК длиной 24–31 нуклеотид, которые специфически связываются с белками piwi подсемейства Argonaute и выполняют в клетке две основные функции: поддержание стабильности генома путем ингибирования экспрес-

сии мобильных участков генома (транспозонов) и регуляция экспрессии кодирующих белок генов за счет РНК-интерференции подобно механизму действия микроРНК [20, 21].

В последние годы активно изучаются преимущества мнкРНК в качестве диагностических и прогностических биомаркеров исходов программ ВРТ в исследованиях имплантационного потенциала эмбриона и оценки рецептивности эндометрия [22–25].

Жизнеспособность эмбриона является одним из ключевых факторов, определяющих имплантацию. Оценка качества эмбрионов, согласно морфокинетическим критериям, включает в себя деление клеток, скорость развития эмбриона, форму бластомеров и степень их фрагментации. Секретируемые в среду культивирования мнкРНК в процессе имплантации эмбрионов могут быть использованы в качестве неинвазивных маркеров качества эмбрионов [26]. Так, Rosenbluth E. et al. [27] провели количественную оценку микроРНК в культуральной среде методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени и обнаружили специфичные для эмбриона miR-191 и miR-372. В случае анеуплоидии эмбрионов плохого качества уровень miR-191 в среде культивирования был резко повышен и ассоциирован с отрицательными исходами в программах ВРТ. Также была обнаружена корреляция уровня miR-372 с отрицательным исходом программы ВРТ, но связь с хромосомным набором и качеством эмбриона не была установлена. В свою очередь, Cuman S. et al. [28] показали, что уровень экспрессии микроРНК может быть связан как с имплантационным потенциалом самого эмбриона, так и с рецептивностью. Уровень miR-661 был повышен у эмбрионов с отсутствием имплантационного потенциала по сравнению с бластоцистами, способными к имплантации. Результаты исследования показали наличие транспорта miR-661 в комплексе с белком Argonaute 1 из среды культивирования бластоцисты внутрь клеток первичной культуры эндометрия. Повышенный уровень секреции miR-661 негативным образом влияет на адгезию клеток трофобласта к эпителию эндометрия, что приводит к нарушению имплантации эмбриона.

Возможность использования анализа уровня экспрессии микроРНК для оценки имплантационного потенциала эмбриона в среде культивирования была продемонстрирована Borges E. et al. [29]. По результатам тестирования семи микроРНК статистически значимые различия групп с отрицательным и положительным результатами ВРТ были выявлены по уровню экспрессии miR-142-3p ($p < 0,001$). Авторы исследования приходят к выводу о том, что miR-142-3p может быть использована в качестве маркера имплантационного потенциала бластоцисты.

Несмотря на многочисленные исследования зарубежных коллег, роль пивнРНК в культуральной среде эмбрионов не была изучена. Исходя из этого в 2020 г. Timofeeva A. et al. [30] впервые опубликовали крупное исследование о роли ключевых молекул микроРНК и пивнРНК, которые участвуют в процессе формировании здорового эмбриона и его

имплантационного потенциала. Было произведено глубокое секвенирование мнкРНК в образцах культуральной среды эмбрионов с последующей количественной ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени. Доказано, что уровни секреции таких микроРНК и пивнРНК, как hsa_piR_011291, hsa_piR_019122, hsa_piR_001311, hsa_piR_015026, hsa_piR_015462, hsa_piR_016735, hsa_piR_019675, hsa_piR_020381, hsa_piR_020485, hsa_piR_004880, hsa_piR_000807, hsa-let-7b-5p и hsa-let-7i-5p, являются отражением качества эмбрионов на стадии морулы. Дисбаланс регуляции уровня экспрессии данных молекул на стадии морулы приводит к образованию бластоцисты низкого качества или даже к остановке ее развития либо деградации. Повышение уровня экспрессии мнкРНК эмбрионом до определенных значений на стадии морулы является отражением качества материнско-зиготического перехода, который необходим для эмбриогенеза и наступления беременности.

Однако на успешное наступление беременности влияют не только качество и имплантационный потенциал самого эмбриона, но и рецептивность эндометрия [31]. В работе Viella F. et al. [32] оценивали роль экспрессии микроРНК в клетках эндометрия как посттранскрипционного регулятора имплантации эмбрионов. Для того чтобы определить рецептивность эндометрия и подходящий день для переноса эмбрионов, авторы сравнивали экспрессию микроРНК в разные фазы цикла. Полученные образцы были разделены на следующие группы: ранняя пролиферативная (РП; 6–8-й дни; $n=4$), поздняя пролиферативная (ПП; 9–14-й дни; $n=4$), ранняя секреторная (РС; 15–18-й дни; $n=4$), «имплантационное окно» (19–23-й дни; $n=4$) и поздняя секреторная (ПС; 24–28-й дни; $n=4$). Методом микроматричного анализа были идентифицированы микроРНК в маточном аспирате. Выявлена их дифференциальная экспрессия между фазами менструального цикла. Выявленные изменения уровня экспрессии микроРНК в маточном аспирате обнаружены как в секреторную фазу, так и в пролиферативную фазу менструального цикла относительно окна имплантации. Стоит отметить, что в пролиферативную фазу уровень экспрессии микроРНК был значительно снижен, а в секреторную фазу — повышен. Также наибольшие изменения в экспрессии были выявлены у hsa-miR-30d из семейства miR-30d в «имплантационное окно». Авторы продемонстрировали, что идентифицированная hsa-miR-30d в клетках эндометрия может быть рассмотрена в качестве одного из маркеров рецептивности эндометрия. Более того, при добавлении в культуральную среду miR-30d эмбрионы на этапе до имплантации экспрессируют молекулы адгезии, такие как интегрин бета 3 (ITGB3), интегрин альфа 7 (ITGA7) и кадгерин 5 (CDH5).

Ferlita A. et al. [33] аналогичным образом показали, что экспрессия miR-30d и miR-30b значительно повышена в рецептивном эндометрии (ЛГ+7), а уровень miR-494 снижен по сравнению с пререцептивным эндометрием (ЛГ+2).

В последние годы широко обсуждалась роль некоторых белков в процессе имплантации эмбрионов.

Так, например, апикальная поверхность эндометрия покрыта гликокаликсом, который содержит гликопротеиды. Наиболее значимым из семейства адгезивных молекул гликопротеидов является муцин1 (Muc1). Ранее считалось, что экспрессия Muc1 повышается в период «имплантационного окна», что благоприятно влияет на рецептивность эндометрия. Однако, по данным Inyawilert W. et al. [34], выработка Muc1 значительно снизилась во время окна имплантации и могла быть связана с негативной регуляцией miR-199a, let-7a и let-7b. Liang J. et al. [35] в своей работе описали влияние miR-192-5p на экспрессию Muc1 клетками эндометрия. Выяснилось, что высокая экспрессия данных молекул предотвращает адгезию трофобласта в эндометрий и наступление беременности в целом. Исходя из этого авторы отметили, что анализ уровня микроРНК и его локальное влияние на Muc1 могут стать ключевыми факторами в диагностике и лечении бесплодия.

Считается, что связывающий протеин-1 инсулиноподобный фактор роста (IGFBP-1) продуцируется децидуальными стромальными клетками и стимулирует клеточную миграцию и адгезию в момент максимальной рецептивности эндометрия. Чрезмерное увеличение экспрессии miR-145 снижает уровень IGFBP-1 в эндометрии, тем самым ингибируя инвазию трофобласта [36]. Tochigi H. et al. [37] продемонстрировали, что экспрессия miR-542-3p снижает секрецию таких белков, как IGFBP1, WNT4 (Wnt Family Member 4) и PRL (Prolactin gene), которые играют непосредственную роль в процессе децидуализации стромы эндометрия. Аналогичные исследования проводились учеными разных стран, которые описывали негативное влияние молекулы miR-542-3p на рецептивность эндометрия [38, 39].

Немаловажную роль в процессах пролиферации клеток эндометрия и инвазии бластоцисты играют такие факторы, как интерлейкин (IL)-1 β , сосудистый эндотелиальный ростовой фактор (VEGF), эпидермальный ростовой фактор (EGF), фактор роста фибробластов (FGF1), фактор ингибирования лейкемии (LIF) и т.д. Наиболее значимым фактором регуляции ангиогенеза и наиболее экспрессируемым в эндометрии человека является VEGF. Низкие уровни VEGF снижают маточный кровоток, что может приводить к развитию «тонкого» эндометрия, не способного к nidации эмбриона [40]. В одном из исследований было показано, что miR-184 увеличивает уровень экспрессии VEGF с помощью активации сигнальных путей RAS/RAF/MEK/ERK, что благоприятно сказывается на регуляции процесса васкуляризации ткани эндометрия и имплантации [41]. Также было отмечено, что miR-26a выполняют сложные и разнообразные функции путем воздействия на PTEN и косвенно регулируя сигнальный путь PI3K/AKT в клетках эндометрия, а также контролируют экспрессию остеопонтина (OPN), циклооксигеназы-2 (COX-2), пролактина (PRL) и VEGF в клетках эндометрия [42].

Стоит отметить, что среди активно изучаемых маркеров эндометриальной рецептивности LIF является одним из ключевых. LIF продуцируется эндометрием в течение всего менструального цикла, однако его уровень значительно выше в секреторную фазу

цикла. Как известно, LIF запускает активацию сигнального пути STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3), который оказывает влияние на морфофункциональное состояние эндометрия и повышает его рецептивность. В свою очередь, бластоциста имеет на своей поверхности специфические LIF-рецепторы: LIF-R и gp130, что свидетельствует о возможном механизме взаимодействия эмбриона и эндометрия [43]. По результатам исследования Dong X. et al. [44], экспрессия miR-223-3p была выше у небеременных мышей по сравнению с беременными (1,09 \pm 0,20 против 0,41 \pm 0,11, $p < 0,01$). Напротив, экспрессия LIF была ниже у небеременных мышей по сравнению с беременными мышами (1,04 \pm 0,34 против 6,03 \pm 0,42, $p < 0,001$). Чтобы подтвердить, влияет ли miR-223-3p на образование пиноподий, ассоциированных с увеличением экспрессии LIF, была изучена апикальная поверхность эндометрия методом электронной микроскопии. Было показано, что экспрессия miR-223-3p влияет на имплантацию эмбрионов путем подавления экспрессии LIF и пиноподий в эндометрии у беременных мышей. Увеличение miR-223-3p во время окна имплантации может уменьшить шанс наступления беременности и привести к бесплодию. Поэтому miR-223-3p может служить потенциальным маркером рецептивности эндометрия.

Кроме того, рецептивность эндометрия определяется активностью половых гормонов, которые могут связываться с рецепторами ткани эндометрия и изменять их морфофункциональные свойства в период «имплантационного окна». В связи с этим изучается роль половых гормонов, влияющих на уровень экспрессии микроРНК в эндометрии. К примеру, прогестерон индуцирует экспрессию miR-125b в клетках эндометрия. В то же время повышенная экспрессия miR-125b уменьшает активность матриксной металлопротеиназы 26 (MMP26), которая участвует в деградации внеклеточного матрикса, тем самым снижая частоту имплантации. Также прогестерон регулирует экспрессию факторов транскрипции генов *HOXA10* (Homeobox A10), *HOXA11* (Homeobox A11), которые значимо снижены среди женщин с жалобами на бесплодие, привычное невынашивание беременности и эндометриоз [45]. В работе Salmasi S. et al. [46] было показано, что стимуляция яичников и введение экзогенного прогестерона увеличивают плотность CD31-положительных клеток (эндотелиальных клеток) за счет активации белка VEGF, который, в свою очередь, является мощным ангиогенным белком, принимает участие в процессах неоваскуляризации, а при ингибировании его функции может привести к бесплодию.

Akbar R. et al. [47] изучили роль семейства miR-183, а именно miR-183-5p, miR-182-5p и miR-96-5p в имплантации эмбрионов. Продemonстрировано участие miR-183-5p в эстрогензависимой активации эндометриальных клеток, а ее ингибирование значительно снижало частоту имплантации эмбрионов и увеличивало экспрессию CTNNA2 (Catenin Alpha 2). Авторы пришли к выводу, что miR-183-5p и CTNNA2 могут быть потенциальными биомаркерами восприимчивости эндометрия и использованы в качестве диагностических и прогностических методов для успешной имплантации эмбрионов.

Сравнительный анализ уровней экспрессии miR-135b и HOXA10 был проведен в исследовании Riyanti A. et al. [48] методом ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени. Экспрессия miR-135b в ткани эндометрия у бесплодных пар оказалась выше в 1,81 раза по сравнению с контрольной группой ($p < 0,01$), тогда как экспрессия HOXA10 была значительно ниже контрольных значений ($p = 0,047$). Была обнаружена существенная отрицательная корреляция между уровнями экспрессии miR-135b и HOXA10 ($p = 0,021$; $r = -0,607$).

Таким образом, на основании полученных данных целесообразным является изучение мнкРНК в образцах эндометрия и их транскрипционный профиль для определения рецептивности эндометрия.

Посредством детального молекулярного анализа был разработан тест ERA (Endometrial Receptivity Analysis) по оценке уровня экспрессии 238 генов, статистически значимо отличающий рецептивный эндометрий от пре- и пострецептивного эндометрия [49]. На данный момент он является единственным эффективным и внедренным тестом в клиническую практику. Для большинства пациентов тест ERA проводится в цикле заместительной гормональной терапии при помощи пайпель-биопсии на 5-й день после введения прогестерона (П+5), а также в естественном цикле спустя 7 дней с момента пика ЛГ (ЛГ+7). Результат теста показывает состояние эндометрия в день проведения биопсии и дает возможность принять решение об индивидуальном переносе эмбрионов рЕТ (personalized embryo transfer) [50]. Hashimoto T. et al. [51] также доказали эффективность рЕТ у женщин с повторными неудачными попытками переноса эмбрионов. Проведение теста ERA способствовало повышению частоты наступления клинической беременности у женщин с неправильно установленным окном имплантации в предыдущих попытках ЭКО, которая оказалась сравнимо больше при стандартном переносе эмбрионов (50% против 35% соответственно).

В крупном ретроспективном исследовании Patel J. et al. [52] были отобраны 248 пациенток для сравнительного анализа рецептивного и нерепцептивного эндометрия. С помощью теста ERA рецептивный эндометрий был выявлен у 82,3% (204/248) пациенток, в то время как нерепцептивный эндометрий — у 17,7% (44/248). Авторы считают, что рЕТ с помощью теста ERA поможет определить «имплантационное окно» и улучшить исходы наступления беременности в циклах ВРТ.

Несмотря на большое количество исследований в области поиска потенциальных маркеров рецептивности эндометрия, однозначно идеального фактора, отражающего фертильность, на данный момент не верифицировано. Более того, существующие методы оценки рецептивности эндометрия основаны на инвазивных методах, таких как пайпель-биопсия. В связи с этим целесообразным и актуальным является дальнейший поиск оптимальной панели для неинвазивной диагностики состояния эндометрия и наиболее подходящего дня для переноса эмбрионов. Поэтому Li T. et al. [53] впервые выделили мнкРНК из внеклеточных везикул путем аспирации маточной жидкости у пациенток в естественном цикле и в цикле гормональной

терапии. Были идентифицированы 11 микроРНК и 1 пивиРНК, которые могут положительно влиять на рецептивность эндометрия и имплантацию эмбрионов. Целью исследования Grasso A. et al. [54] было изучить и сравнить экспрессию микроРНК эндометрия в секреторную фазу менструального цикла в естественном цикле и цикле заместительной гормональной терапии. Аспирация 10–50 мкл секрета эндометрия проводилась у 40 женщин в естественном цикле ЛГ+0 ($n=9$), ЛГ+3 ($n=9$), ЛГ+5 ($n=7$) и ЛГ+7 ($n=2$) и в циклах заместительной гормональной терапии: П+0 ($n=9$), П+1 ($n=8$), П+3 ($n=8$) и П+5 ($n=6$). С помощью количественной ПЦР в реальном времени определяли экспрессию микроРНК в анализируемых группах. Найдены различия в уровне экспрессии hsa-miR-3656, hsa-miR-4516, hsa-miR-3648, hsa-miR-3960, и hsa-miR-5100 при сравнении ЛГ+0 и П+0; hsa-miR-3960 и hsa-miR-3648 при сравнении ЛГ+5 и П+3. Существенной разницы между естественным циклом и циклом с заместительной гормональной терапией по уровню экспрессии анализируемых микроРНК выявлено не было. При этом рецептивная фаза характеризовалась экспрессией hsa-miR-30d-5p и hsa-miR-30b-3p. В случае снижения уровня экспрессии hsa-miR-30d-5p не происходит адгезии blastocysts к эндометрию и дальнейшей ее инвазии. Авторы пришли к выводу, что снижение уровня экспрессии miR-30b-3p в секрете эндометрия является прогностическим фактором отсутствия имплантации. Секреторная фаза менструального цикла в естественных циклах и в циклах заместительной гормональной терапии не отличается по профилю экспрессии микроРНК.

Заключение

Выявленные многогранные аспекты влияния мнкРНК на межклеточные взаимодействия, возможно, являются важными локальными регуляторными факторами имплантации. Проведенный анализ литературных данных продемонстрировал, что, помимо циклических изменений в морфологии эндометрия, существует очень сложная взаимосвязь между мнкРНК и их многочисленными генами-мишенями, кодирующими белки-маркеры рецептивности эндометрия и имплантационного потенциала эмбрионов.

Литература/References

1. Корсак В.С., Смирнова А.А., Шурыгина О.В. Регистр ВРТ Российской ассоциации репродукции человека. Отчет за 2017 год. Проблемы репродукции. 2019; 25(6): 9-21. [Korsak V.S., Smirnova A.A., Shurygina O.V. Register of ART of the Russian Association of Human Reproduction. Report for 2017. Problems of reproduction. 2019; 25(6): 9-21. (in Russian)]. <https://doi.org/10.17116/repro2019250619>.
2. Gleicher N., Kushnir V.A., Barad D.H. Worldwide decline of IVF birth rates and its probable causes. Hum. Reprod. Open. 2019; 2019(3): hoz017. <https://dx.doi.org/10.1093/hropen/hoz017>.
3. Wang L., Lv S., Mao W., Pei M., Yang X. Assessment of endometrial receptivity during implantation window in women with unexplained infertility. Gynecol. Endocrinol. 2020; 36(10): 917-21. <https://dx.doi.org/10.1080/09513590.2020.1727433>.
4. Massimiani M., Lacconi V., La Civita F., Ticconi C., Rago R., Campagnolo L. Molecular signaling regulating endometrium-blastocyst crosstalk. Int. J. Mol. Sci. 2019; 21(1): 23. <https://dx.doi.org/10.3390/ijms21010023>.

5. Lessey B.A., Young S.L. What exactly is endometrial receptivity? *Fertil. Steril.* 2019; 111(4): 611-7. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.02.009>.
6. Kelleher A.M., DeMayo F.J., Spencer T.E. Uterine glands: developmental biology and functional roles in pregnancy. *Endocr. Rev.* 2019; 40(5): 1424-45. <https://dx.doi.org/10.1210/er.2018-00281>.
7. Gnainsky Y., Granot I., Aldo P., Barash A., Or Y., Mor G. et al. Biopsy-induced inflammatory conditions improve endometrial receptivity: the mechanism of action. *Reproduction.* 2015; 149(1): 75-85. <https://dx.doi.org/10.1530/REP-14-0395>.
8. Melkozherova O.A., Bashmakova N.V., Malgina G.B., Bragina E.E., Michelson A.A., Chistyakova G.N. Ultrastructural markers of tissue endometrial receptivity in patients with recurrent implantation failure. *Gynecol. Endocrinol.* 2019; 35(Suppl. 1): 45-8. <https://dx.doi.org/10.1080/09513590.2019.1653562>.
9. Гохберг Я.А., Макарова Н.П., Бабаян А.А., Калинина Е.А. Роль различных факторов воздействия на эндометрий в повышении эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий. *Акушерство и гинекология.* 2021; 1: 28-34. [Gokhberg Ya.A., Makarova N.P., Babayan A.A., Kalinina E.A. The role of various factors affecting the endometrium in enhancing the effectiveness of assisted reproductive technology programs. *Akusherstvo i Ginekologiya/Obstetrics and Gynecology.* 2021; 1: 28-34 (in Russian)]. <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2021.1.28-34>.
10. Keleş I.D., Ülgen E., Erkan M.B., Çelik S.E., Aydın Y., Önem A.N. et al. Comparison of endometrial prostanoid profiles in three infertile subgroups: the missing part of receptivity? *Fertil. Steril.* 2020; 113(3): 670-8.e1. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.10.017>.
11. Кубанов М.В., Махмудова Г.М., Гохберг Я.А. Поиск идеального маркера для оценки рецептивности эндометрия: от гистологии до современных молекулярно-генетических подходов. *Альманах клинической медицины.* 2019; 47(1): 12-25. [Kibanov M.V., Makhmudova G.M., Gokhberg Ya.A. In search for an ideal marker of endometrial receptivity: from histology to comprehensive molecular genetics-based approaches. *Almanac of Clinical Medicine.* 2019; 47(1): 12-25. (in Russian)]. <https://doi.org/10.18786/2072-0505-2019-47-005>.
12. Timofeeva A.V., Chagovets V.V., Drapkina Y.S., Makarova N.P., Kalinina E.A., Sukhikh G.T. Cell-free, embryo-specific snRNA as a molecular biological bridge between patient fertility and IVF efficiency. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20(12): 2912. <https://dx.doi.org/10.3390/ijms20122912>.
13. Zmuidinaite R., Sharara F.I., Iles R.K. Current advancements in noninvasive profiling of the embryo culture media secretome. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22(5): 2513. <https://dx.doi.org/10.3390/ijms22052513>.
14. Capra E., Lange-Consiglio A. The biological function of extracellular vesicles during fertilization, early embryo-maternal crosstalk and their involvement in reproduction: review and overview. *Biomolecules.* 2020; 10(11): 1510. <https://dx.doi.org/10.3390/biom10111510>.
15. Haraszti R.A., Didoti M.C., Sapp E., Leszyk J., Shaffer S.A., Rockwell H.E. et al. High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources. *J. Extracell. Vesicles.* 2016; 5: 32570. <https://dx.doi.org/10.3402/jev.v5.32570>.
16. Haouzi D., Entezami F., Torre A., Innocenti C., Antoine Y., Mauries C. et al. Customized frozen embryo transfer after identification of the receptivity window with a transcriptomic approach improves the implantation and live birth rates in patients with repeated implantation failure. *Reprod. Sci.* 2021; 28(1): 69-78. <https://dx.doi.org/10.1007/s43032-020-00252-0>.
17. Salas-Huetos A., James E.R., Aston K.I., Carrell D.T., Jenkins T.G., Yeste M. The role of miRNAs in male human reproduction: a systematic review. *Andrology.* 2020; 8(1): 7-26. <https://dx.doi.org/10.1111/andr.12714>.
18. Treiber T., Treiber N., Meister G. Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2019; 20(1): 5-20. <https://dx.doi.org/10.1038/s41580-018-0059-1>.
19. Ha M., Kim V.N. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014; 15(8): 509-24. <https://dx.doi.org/10.1038/nrm3838>.
20. Iwasaki Y.W., Siomi M.C., Siomi H. PIWI-interacting RNA: its biogenesis and functions. *Annu. Rev. Biochem.* 2015; 84: 405-33. <https://dx.doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034258>.
21. Hirakata S., Siomi M.C. PiRNA biogenesis in the germline: from transcription of piRNA genomic sources to piRNA maturation. *Biochim. Biophys. Acta.* 2016; 1859(1): 82-92. <https://dx.doi.org/10.1016/j.bbarm.2015.09.002>.
22. Guo X., Li T.C., Chen X. The endometrial proteomic profile around the time of embryo implantation. *Biol. Reprod.* 2021; 104(1): 11-26. <https://dx.doi.org/10.1093/biolre/iaaa150>.
23. Hua R., Wang Y., Lian W., Li W., Xi Y., Xue S. et al. Small RNA-seq analysis of extracellular vesicles from porcine uterine flushing fluids during peri-implantation. *Gene.* 2021; 766: 145117. <https://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2020.145117>.
24. Homer H., Rice G.E., Salomon C. Review: embryo- and endometrium-derived exosomes and their potential role in assisted reproductive treatments-liquid biopsies for endometrial receptivity. *Placenta.* 2017; 54: 89-94. <https://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2016.12.011>.
25. Shi C., Shen H., Fan L.J., Guan J., Zheng X.B., Chen X. et al. Endometrial microRNA signature during the window of implantation changed in patients with repeated implantation failure. *Chin. Med. J. (Engl.)* 2017; 130(5): 566-73. <https://dx.doi.org/10.4103/0366-6999.200550>.
26. Franasiak J.M., Forman E.J., Hong K.H., Werner M.D., Upham K.M., Treff N.R. et al. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophectoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. *Fertil. Steril.* 2014; 101(3): 656-63.e1. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.11.004>.
27. Rosenbluth E.M., Shelton D.N., Wells L.M., Sparks A.E., Van Voorhis B.J. Human embryos secrete microRNAs into culture media – a potential biomarker for implantation. *Fertil. Steril.* 2014; 101(5): 1493-500. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.01.058>.
28. Cuman C., Van Sinderen M., Gantier M.P., Rainczuk K., Sorby K., Rombauts L. et al. Human blastocyst secreted microRNA regulate endometrial epithelial cell adhesion. *EBioMedicine.* 2015; 2(10): 1528-35. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.09.003>.
29. Borges E. Jr., Setti A.S., Braga D.P., Geraldo M.V., Figueira R.C., Iaconelli A. Jr. MiR-142-3p as a biomarker of blastocyst implantation failure – a pilot study. *JBRA Assist. Reprod.* 2016; 20(4): 200-5. <https://dx.doi.org/10.5935/1518-0557.20160039>.
30. Timofeeva A., Drapkina Y., Fedorov I., Chagovets V., Makarova N., Shamina M. et al. Small noncoding RNA signatures for determining the developmental potential of an embryo at the morula stage. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(24): 9399. <https://dx.doi.org/10.3390/ijms21249399>.
31. Драпкина Ю.С., Тимофеева А.В., Чаговец В.В., Кононихин А.С., Франкевич В.Е., Калинина Е.А. Применение омиксных технологий в решении проблем репродуктивной медицины. *Акушерство и гинекология.* 2018; 9: 24-32. [Drapkina Yu.S., Timofeeva A.V., Chagovets V.V., Kononikhin A.S., Frankevich V.E., Kalinina E.A. Application of omix technologies in solving problems of reproductive medicine. *Akusherstvo i Ginekologiya/Obstetrics and Gynecology.* 2018; 9: 24-32. (in Russian)]. <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2018.9.24-32>.
32. Vilella F., Moreno-Moya J.M., Balaguer N., Grasso A., Herrero M., Martínez S. et al. Hsa-miR-30d, secreted by the human endometrium, is taken up by the pre-implantation embryo and might modify its transcriptome. *Development.* 2015; 142(18): 3210-21. <https://dx.doi.org/10.1242/dev.124289>.
33. Ferlita A., Battaglia R., Andronico F., Caruso S., Cianci A., Purrello M. et al. Non-coding RNAs in endometrial physiopathology. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19(7): 2120. <https://dx.doi.org/10.3390/ijms19072120>.
34. Inyavilert W., Fu T.Y., Lin C.T., Tang P.C. MicroRNA-199a mediates mucin 1 expression in mouse uterus during implantation. *Reprod. Fertil. Dev.* 2014; 26(5): 653-64. <https://dx.doi.org/10.1071/RD12097>.
35. Liang J., Cao D., Zhang X., Liu L., Tan Q., Shi S. et al. MiR-192-5p suppresses uterine receptivity formation through impeding epithelial transformation during embryo implantation. *Theriogenology.* 2020; 157: 360-71. <https://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.08.009>.

36. Kang Y.J., Lees M., Matthews L.C., Kimber S.J., Forbes K., Aplin J.D. MiR-145 suppresses embryo-epithelial juxtacrine communication at implantation by modulating maternal IGF1R. *J. Cell Sci.* 2015; 128(4): 804-14. <https://dx.doi.org/10.1242/jcs.164004>.
37. Tochigi H., Kajihara T., Mizuno Y., Mizuno Y., Tamaru S., Kamei Y. et al. Loss of miR-542-3p enhances IGFBP-1 expression in decidualizing human endometrial stromal cells. *Sci. Rep.* 2017; 7: 40001. <https://dx.doi.org/10.1038/srep40001>.
38. Sultana S., Kajihara T., Mizuno Y., Sato T., Oguro T., Kimura M. et al. Overexpression of microRNA-542-3p attenuates the differentiating capacity of endometrial stromal cells. *Reprod. Med. Biol.* 2017; 16(2): 170-8. <https://dx.doi.org/10.1002/rmb2.12028>.
39. Kimura M., Kajihara T., Mizuno Y., Sato T., Ishihara O. Loss of high-mobility group N5 contributes to the promotion of human endometrial stromal cell decidualization. *Reprod. Med. Biol.* 2018; 17(4): 493-9. <https://dx.doi.org/10.1002/rmb2.12226>.
40. Wang Y., Qin C., Witorsa F. Clarifying configurations of reaction rate constant for first-order and Monod-type kinetics: a comparative manner and a pursuit of parametric definition. *Waste Manag.* 2018; 77: 22-9. <https://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2018.04.040>.
41. Cui J., Liu X., Yang L., Che S., Guo H., Han J. et al. MiR-184 combined with STC2 promotes endometrial epithelial cell apoptosis in dairy goats via RAS/RAF/MEK/ERK pathway. *Genes (Basel)*. 2020; 11(9): 1052. <https://dx.doi.org/10.3390/genes11091052>.
42. Zhang L., Liu X., Liu J., Ma X., Zhou Z., Song Y. et al. MiR-26a promoted endometrial epithelium cells (EECs) proliferation and induced stromal cells (ESCs) apoptosis via the PTEN-PI3K/AKT pathway in dairy goats. *J. Cell. Physiol.* 2018; 233(6): 4688-4706. <https://dx.doi.org/10.1002/jcp.26252>.
43. Коган Е.А., Калинин Е.А., Колотовкина А.В., Файзуллина Н.М., Адамьян 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. Morphological and molecular substrate of impaired endometrial receptivity in infertile patients with external genital endometriosis. *Akusherstvo i Ginekologiya/Obstetrics and Gynecology*. 2014; 8: 47-52. (in Russian)].
44. Dong X., Sui C., Huang K., Wang L., Hu D., Xiong T. et al. MicroRNA-223-3p suppresses leukemia inhibitory factor expression and pinopodes formation during embryo implantation in mice. *Am. J. Transl. Res.* 2016; 8(2): 1155-63.
45. Chen C., Zhao Y., Yu Y., Li R., Qiao J. MiR-125b regulates endometrial receptivity by targeting MMP26 in women undergoing IVF-ET with elevated progesterone on HCG priming day. *Sci. Rep.* 2016; 6: 25302. <https://dx.doi.org/10.1038/srep25302>.
46. Salmasi S., Sharifi M., Rashidi B. Evaluating the effect of ovarian stimulation and exogenous progesterone on CD31-positive cell density, VEGF protein, and miR-17-5p expression of endometrium immediately before implantation. *Biomed. Pharmacother.* 2021; 133: 110922. <https://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110922>.
47. Akbar R., Ullah K., Rahman T.U., Cheng Y., Pang H.Y., Jin L.Y. et al. MiR-183-5p regulates uterine receptivity and enhances embryo implantation. *J. Mol. Endocrinol.* 2020; 64(1): 43-52. <https://dx.doi.org/10.1530/JME-19-0184>.
48. Riyanti A., Febri R.R., Zakirah S.C., Harzif A.K., Rajuddin R., Muharam R. et al. Suppressing HOXA-10 gene expression by microRNA 135b during the window of implantation in infertile women. *J. Reprod. Infertil.* 2020; 21(3): 217-21.
49. Tan J., Kan A., Hitkari J., Taylor B., Tallon N., Warraich G. et al. The role of the endometrial receptivity array (ERA) in patients who have failed euploid embryo transfers. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2018; 35(4): 683-92. <https://dx.doi.org/10.1007/s10815-017-1112-2>.
50. Eisman L.E., Pisarska M.D., Wertheimer S., Chan J.L., Akopians A.L., Surrey M.W. et al. Clinical utility of the endometrial receptivity analysis in women with prior failed transfers. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2021; 38(3): 645-50. <https://dx.doi.org/10.1007/s10815-020-02041-9>.
51. Hashimoto T., Koizumi M., Doshida M., Toya M., Sagara E., Oka N. et al. Efficacy of the endometrial receptivity array for repeated implantation failure in Japan: a retrospective, two-centers study. *Reprod. Med. Biol.* 2017; 16(3): 290-6. <https://dx.doi.org/10.1002/rmb2.12041>.
52. Patel J.A., Patel A.J., Banker J.M., Shah S.I., Banker M.R. Personalized embryo transfer helps in improving In vitro fertilization/ICSI outcomes in patients with recurrent implantation failure. *J. Hum. Reprod. Sci.* 2019; 12(1): 59-66. https://dx.doi.org/10.4103/jhrs.JHRS_74_18.
53. Li T., Greenblatt E.M., Shin M.E., Brown T.J., Chan C. Cargo small non-coding RNAs of extracellular vesicles isolated from uterine fluid associate with endometrial receptivity and implantation success. *Fertil. Steril.* 2021; 115(5): 1327-36. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.10.046>.
54. Grasso A., Navarro R., Balaguer N., Moreno I., Alama P., Jimenez J. et al. Endometrial liquid biopsy provides a miRNA roadmap of the secretory phase of the human endometrium. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2020; 105(3): dgz146. <https://dx.doi.org/10.1210/clinem/dgz146>.

Поступила 28.06.2021

Принята в печать 12.07.2021

Received 28.06.2021

Accepted 12.07.2021

Сведения об авторах:

Гохберг Яэль Александровна, аспирант отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. профессора Б.В. Леонова, Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова МЗ РФ, dr.yaelgokhberg@gmail.com, 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

Тимофеева Анжелика Владимировна, к.б.н., заведующая лабораторией прикладной транскриптомики отдела системной биологии в репродукции, Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова МЗ РФ, avtimofeeva28@gmail.com, 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

Калинина Елена Анатольевна, д.м.н., профессор, заведующая отделением вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. профессора Б.В. Леонова, Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова МЗ РФ, e_kalinina@oparina4.ru, 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

Authors' information:

Yael A. Gokhberg, postgraduate student at the B.V. Leonov Department of Assisted Technologies for the Treatment of Infertility, V.I. Kulakov NMRC for OG&P, Ministry of Health of Russia, dr.yaelgokhberg@gmail.com, 4 Oparin str., 117997, Moscow, Russia.

Angelika V. Timofeeva, M.D., Ph.D., Head of Laboratory of applied transcriptomics, V.I. Kulakov NMRC OG&P, Ministry of Health of the Russian Federation, avtimofeeva28@gmail.com, 4 Oparin str., 117997, Moscow, Russia.

Elena A. Kalinina, Dr. Med. Sci., Professor, Head of the B.V. Leonov Department of Assisted Technologies for the Treatment of Infertility, V.I. Kulakov NMRC for OG&P, Ministry of Health of the Russian Federation, e_kalinina@oparina4.ru, 4 Oparin str., 117997, Moscow, Russia.