

Мелкозерова О.А., Башмакова Н.В., Третьякова Т.Б., Цывьян П.Б.

Молекулярно-генетические и эпигенетические механизмы нарушения рецептивности эндометрия у пациенток с репродуктивными неудачами, рожденных с низким весом

ФГБУ «Уральский НИИ Охраны материнства и младенчества» Министерства здравоохранения России, г. Екатеринбург

Melkozerova O.A., Bashmakova N.V., Tretyakova T.B., Tsyvian P.B.

The molecular, genetic and epigenetic mechanisms of endometrial receptivity violation in patients with reproductive failures, were born with low weight

Резюме

Цель - изучить молекулярно-генетические и внутриутробные эпигенетические механизмы нарушения рецептивности эндометрия у пациенток с репродуктивными неудачами. Материал и методы исследования. Обследовано 96 девочек подростков, страдающих нарушением становления менструальной функции по типу аномальных маточных кровотечений (АМК ПП) и 210 женщин репродуктивного возраста, страдающих маточной формой бесплодия или невынашивания беременности, обусловленными «тонким» эндометрием. Все пациентки родились в доношенном сроке. Внутри основных когорт пациентки были стратифицированы в зависимости от массы тела при рождении. Анализированы клинико-anamnestические данные и молекулярно-генетические исследования полиморфных вариантов генов рецепторов половых стероидов, генов регуляции эндотелиальной функции, ангиогенеза и тромбофилии методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции в «режиме реального времени» со снятием кривых плавления продуктов амплификации с использованием комплекта реагентов и протоколов фирмы ООО «Тест Ген» (Россия). Результаты исследования. Риск репродуктивных неудач, обусловленных нарушением рецептивности эндометрия, ассоциирован с носительством полиморфного аллеля А гена VEGF2578C>A: для пациенток с бесплодием (OR=2,73 (1,36-5,45); p=0,01) и невынашиванием беременности (OR=4,61 (2,19-9,71); p=0,01) и с носительством полиморфного аллеля 675 4G гена PAI-1 675 5G>4G: для пациенток с бесплодием (OR=8,45 (3,96-18,21); p=0,001) и невынашиванием беременности (OR=9,98 (4,61-21,74); p=0,001). Носительство полиморфизма pVull-CC гена ESR1 397T>C ассоциировано с повышенным риском нарушения становления менструальной функции, проявляющегося аномальными маточными кровотечениями пубертатного периода (OR=4,58 (0,97-21,68) p=0,04), и риском развития в репродуктивном возрасте невынашивания беременности, обусловленного «тонким» эндометрием (OR=6,79 (1,94-23,75); p=0,01). У женщин, рожденных с низким весом, определяется достоверно более высокая частота генотипов, содержащих полиморфный аллель 786C гена эндотелиальной NO-синтазы NOS3 786 T>C: для женщин с бесплодием OR=6,173 (1,83-20,83); p=0,001; для женщин с невынашиванием беременности OR=4,902 (1,69-14,08); p=0,002; для девочек OR=2,56 (1,01-6,50); p=0,04. Заключение. Генетическая сеть, содержащая описанные вариативные аллели, координирует патологический характер регуляции эндометриальной функции, что может приводить к формированию «тонкого» нерецептивного эндометрия в ответ на его травматическое повреждение.

Ключевые слова: рецептивность эндометрия, «тонкий» эндометрий, генетическая регуляция, эпигенетическая регуляция, низкий вес при рождении

Summary

The aim is to study genetic and intrauterine epigenetic mechanisms of endometrial receptivity disorders in patients with reproductive failures. Material and methods. 96 girls of adolescents with disturbed menstrual function as anomalous uterine bleeding (AUB PP) and 210 women of reproductive age, suffering from uterine infertility or miscarriage, due to "thin" endometrium were examined. All the patients were born on the deadline. Within the main cohorts, the patients were stratified according to

their birth weight. Clinical anamnestic data and molecular genetic studies of polymorphic variants of sex steroids receptor genes, endothelial function regulation genes, angiogenesis and thrombophilia were analyzed using the 'real-time' allele-specific polymerase chain reaction with melting curves of the amplification products using a set of reagents and protocols of the company Test Gen LTD (Russia). Results. The risk of reproductive failures due to impaired receptivity of the endometrium is associated with the carrier of the polymorphic allele A of the VEGF2578C gene: A: for patients with infertility (OR = 2.73 (1.36-5.45), p = 0.01) and miscarriage OR = 4.61 (2.19-9.71), p = 0.01) and bearing the polymorphic allele 675 4G of the PAI-1 gene 675 5G> 4G: for patients with infertility (OR = 8.45 (3, 96-18,21), p = 0,001) and miscarriage (OR = 9.98 (4.61-21.74), p = 0.001). The carrier of polymorphism pVull-CC of the gene ESR1 397T> C is associated with an increased risk of disruption of the development of the menstrual function, manifested by abnormal uterine bleeding of the pubertal period (OR = 4.58 (0.97-21.68) p = 0.04), and the risk of developing in the reproductive age of miscarriage, caused by a "thin" endometrium (OR = 6.79 (1.94-23.75), p = 0.01). In women born with low weight, a significantly higher frequency of genotypes containing polymorphic allele 786C of the gene for endothelial NO-synthase NOS3 786 T> C was determined: for women with infertility OR = 6.173 (1.83-20.83); p = 0.001; for women with miscarriage OR = 4.902 (1.69-14.08); p = 0.002; for girls OR = 2.56 (1.01-6.50); p = 0.04. Conclusion. The genetic network containing the described variable alleles coordinates the pathological nature of the regulation of the endometrial function, which can lead to the formation of a "thin" non-receptive endometrium in response to traumatic injury. **Key words:** endometrial receptivity, "thin" endometrium, genetic regulation, epigenetic regulation, low birth weight

Введение

В настоящее время в мировой науке остаются малоизученными вопросы влияния внутриутробных эпигенетических факторов на реализацию рецептивности эндометрия в репродуктивном возрасте. По данным Глобального Исследования ВОЗ ежегодно в мире рождается около 20 миллионов детей с низкой массой тела (<2500 г), из которых около 10,2 миллионов младенцев рождаются с низкой массой тела в доношенном сроке (LBW – low birth weight) [1,2]. Это составляет 27% от всех родившихся живыми. Последние систематические обзоры подтверждают, что метаболические эффекты, связанные с низким весом при рождении проявляются в очень молодом возрасте и сохраняются в течение жизни.

Доказано развитие у людей, рожденных с низкой массой тела, метаболического синдрома, ожирения, артериальной гипертензии, сахарного диабета 2 типа и эндотелиальной дисфункции [3-5]. Существуют единичные эпигенетические механизмы формирования данной патологии, предопределяемые внутриутробно программируемым гиперметилированием промотерных областей ряда генов и модификацией гистонов [6, 7], которые во взрослом возрасте способны оказывать влияние на функционально-регенераторные возможности различных тканей человека, в том числе процессы пролиферации, сосудистого стромального ремоделирования, рекрутинга иммунокомпетентных клеток, неоангиогенеза и регенерации в эндометрии. Подобных работ в мировой литературе немного и требуются дальнейшие исследования, подтверждающие эти положения.

Цель исследования – изучить некоторые молекулярно-генетические и внутриутробные эпигенетические механизмы нарушения рецептивности эндометрия у пациенток с репродуктивными неудачами.

Материалы и методы

Обследовано 96 девочек подростков, страдающих нарушением становления менструальной функции по типу аномальных маточных кровотечений (АМК ПП)

и 210 женщин репродуктивного возраста, страдающих маточной формой бесплодия или невынашивания беременности, обусловленными «тонким» эндометрием. Все пациентки родились в доношенном сроке. Среди девочек-подростков первую основную группу составили 32 девочки пубертатного возраста, рожденных в доношенном сроке с низким весом при рождении (Low birth weight – LBW: менее 10 перцентили по росто-весовым показателям), страдающие с менархе АМК ПП. Вторую основную группу составили 37 девочек пубертатного возраста, рожденных в доношенном сроке с нормальной массой тела при рождении (Normal birth weight –NBW: более 10 перцентили по росто-весовым показателям), страдающих с менархе аномальными маточными кровотечениями пубертатного периода. Контрольную группу составили 27 девочек пубертатного возраста, рожденных в доношенном сроке с нормальной массой тела с правильным ритмом менструации с менархе, гармоничным физическим и половым развитием.

В число 210 женщин репродуктивного возраста были включены 92 женщины с маточной формой бесплодия, и 90 женщин с невынашиванием беременности, обусловленными «тонким» эндометрием. Для изучения роли внутриутробного программирования в формировании нарушений рецептивности эндометрия пациентки репродуктивного возраста были стратифицированы по массе тела при рождении и разделены на 4 группы: 126 женщин с бесплодием, рожденные с LBW, 66 женщин с бесплодием, рожденные с NBW, 35 женщин с невынашиванием, рожденные с LBW, 55 женщин с невынашиванием беременности, рожденные с NBW.

Контрольную группу составили 28 здоровых фертильных женщин, не имеющих в анамнезе случаев невынашивания беременности, имеющих в анамнезе срочные роды через естественные родовые пути без отклонения от физиологического течения беременности и родового акта, закончившиеся рождением здоровых детей.

Критерии включения в исследование для девочек-подростков: возраст 12-15 лет, отсутствие опыта сек-

суальных контактов, наличие маточных кровотечений пубертатного периода для пациенток основных групп исследования, гестационный возраст на момент рождения 37 недель и более.

Критерии включения в исследование для женщин: репродуктивный возраст (18 - 40 лет); маточный фактор бесплодия и невынашивания беременности, обусловленные гипоплазией эндометрия; толщина эндометрия не более 7 мм в день ЛГ+7 (период предполагаемого «имплантационного окна»), нормокоагуляция.

Критерии исключения из исследования для девочек-подростков: наличие заболевания крови с нарушением гемостаза, других тяжелых экстрагенитальных заболеваний, органической патологии половых органов (аденомиоз, врожденные пороки развития, опухоли и опухолевидные образования половых органов), специфических воспалительных заболеваний и травм половых органов, кровянистых выделений из половых путей неясного генеза в момент обращения, прием лекарственных препаратов, влияющих на свертывающую систему крови.

Критерии исключения: возраст менее 18 и более 40 лет; онкологические заболевания, соматическая патология, при которой вынашивание беременности противопоказано; бесплодие и невынашивание беременности, не ассоциированное с гипоплазией эндометрия.

Аналізу подвергнуты данные анамнеза и клинического осмотра.

Анамнестические данные получены в результате личного собеседования с пациентками, дополнительные сведения получены из обменных карт беременных и амбулаторных карт и карт наблюдения ребенка (форма 112).

Особое внимание уделяли оценке массы тела и роста пациенток при рождении. В соответствии с положениями Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации последнего пересмотра, у всех пациенток и/или их законных представителей до момента включения в исследование было получено информированное согласие на участие в исследовании и использование биологического материала. Обследование детей проводилось с согласия девочек-подростков и их родителей, в присутствии родителей.

Материалом для молекулярно-генетического исследования послужили образцы ДНК женщин, выделенные с использованием коммерческих комплектов реагентов «Цитолизин» ТУ 9398-108-01897593-10 и протоколов для выделения ДНК фирмы ООО «ИнтерЛабСервис», Россия.

Для оценки количества выделенной геномной ДНК использовали набор реагентов «КВМ», предназначенных для контроля взятия материала для метода ПЦР (НПО «ДНК-Технология», Россия). В исследование брали не менее 1,0 нг геномной ДНК на реакцию.

Исследовали следующие полиморфные варианты генов: гены рецепторов половых стероидов: ESR1 351A>G (rs9340799, xbal), ESR1 397T>C (rs2234693, PvuII), PGR 660 A>G (rs1042838); гены регуляции эндотелиальной функции: NOS3 786T>C (rs2070744), NOS3 894G>T

(rs1799983); гены регуляции ангиогенеза: VEGF-A 936 C>T (rs 3025039), VEGF-A -634 G>C (rs 2010963); гены тромбофилии: PAI-1 675 4G/5G (rs 1799889), ITGA3 1565 T/C (rs5918), ITGA2 807 C/T (rs1126643).

Образцы ДНК выделяли из свежей цельной крови, взятой в количестве 2 мл в одноразовую пробирку с 0,1 мл 6%-ного ЭДТА, используя комплект для выделения ДНК лейкоцитов цельной крови «Цитолизин» (Россия ТУ 9398-108-01897593-10). Затем проводили аллель-специфичную полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в «режиме реального времени» со снятием кривых плавления продуктов амплификации с использованием комплекта реагентов и протоколов фирмы ООО «ТестГен» (Россия).

Детекция и интерпретация результатов исследования осуществлялась программным обеспечением прибора ДТ-96 производства НПО «ДНК-Технология».

Статистическую обработку результатов исследований проводили с использованием пакетов прикладных программ «StatSoft Statistica 6.0» (StatSoft, США), SPSS Statistics версия 22.0 (IBM Microsoft, США). В случае подчинения распределения признака закону нормального распределения данные представляли в виде средней величины (M) и стандартной ошибки средней (m). Проверку статистических гипотез об отсутствии межгрупповых различий количественных признаков в независимых группах осуществляли с использованием процедуры однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). При отклонении распределения признака от закона нормального распределения, данные представляли в виде медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей (25-го и 75-го процентилей, P25-P75). Для показателей, характеризующих качественные признаки, указывали абсолютное значение и относительную величину в процентах, проверку статистических гипотез осуществляли с использованием критерия хи-квадрат (χ^2). Критический уровень значимости различий (p), при котором нулевая гипотеза об отсутствии различий отвергалась и принималась альтернативная, устанавливали равным 0,025 (критерий Краскала-Уоллиса) и $p < 0,05$ (критерий Вилкоксона).

Распределение генотипов проверяли на соответствие равновесию Харди-Вайнберга с помощью критерия χ^2 , а также при сравнении с параболой DeFinetti. Различия по частоте аллелей и генотипов между группами оценили критерием χ^2 Пирсона. Для оценки ассоциации генотипов и аллелей с презклампсией рассчитаны отношения шансов (odds ratio, OR) с 95 % доверительным интервалом (confidence interval, CI).

Результаты и обсуждение

Правильное формирование функционально полноценного эндометрия, начинается еще на этапе внутриутробного развития. В антенатальный период формирование репродуктивной системы происходит под действием как генетических, так и эпигенетических факторов [8,9]. Течение беременности и родов у матери оказывает определяющее влияние на становление репродуктивного здоровья девочки [8, 10]. Известно, что нарушение ментральной функции чаще формируются у девочек, рож-

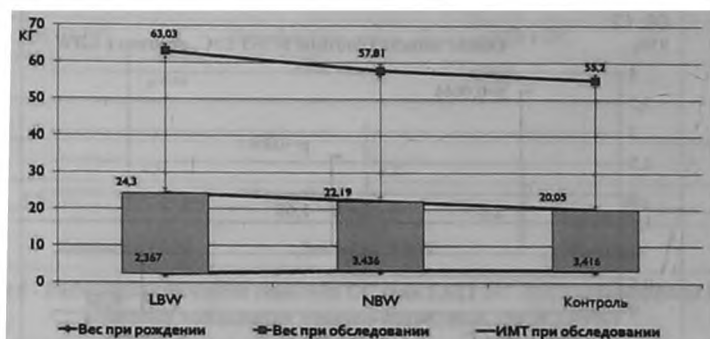


Рисунок 1 – Возрастная динамика антропометрических данных девочек-подростков групп наблюдения (n=96; Me)

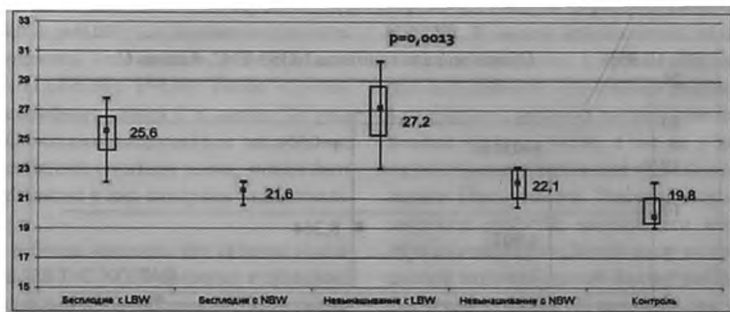


Рисунок 2 – Индекс массы тела женщин репродуктивного возраста в группах наблюдения в зависимости от массы тела при рождении

денных от матерей, беременность которых протекала на фоне привычного невынашивания, преэклампсии и хронической фетоплацентарной недостаточности с исходом в синдром задержки внутриутробного развития плода [9,10]. Доказано развитие у людей, рожденных с низкой массой тела, метаболического синдрома и ожирения, артериальной гипертензии и эндотелиальной [3, 4, 5].

В нашем исследовании девочки, рожденные с синдромом задержки роста плода, к моменту пубертатного возраста имели достоверно более высокий индекс массы тела, граничащий с нормой, и при этом наименьший рост по сравнению с девочками, рожденными с нормальной массой тела (рисунок 1).

Данный факт может быть объяснен теорией David Backer о внутриутробном программировании некоторых заболеваний у людей, рожденных с низкой массой тела, и в первую очередь ожирения [5,11,12].

Механизмы, участвующие в метаболическом программировании, только начинают исследоваться. По некоторым данным задержка внутриутробного роста плода приводит к широкому распространению изменений метилрования ДНК, осуществляя таким образом эпигенетические влияния на реализацию геномного ответа [13].

Следует отметить, что описанные выше антропометрические особенности сохраняются на протяжении жизни. Так по нашим данным, в репродуктивном возрасте женщины, рожденные с задержкой внутриутробного

роста, отличались от своих сверстниц, рожденных с нормальным весом, более высокими показателями индекса массы тела при средних значениях роста (рисунок 2).

Каждая пятая пациентка с бесплодием (19,23%) и каждая третья пациентка с привычным невынашиванием беременности (34,29%), будучи рожденной с низкой массой, имела в репродуктивном возрасте лишний вес.

По данным нашей работы, наследственность пациенток, рожденных с низким весом наиболее часто была отягощена сахарным диабетом - у 31,3 % женщин основной группы с LBW, у 28,3% - девочек основной группы с LBW, в контроле - 3,7%; и артериальной гипертензией - у 64,9% девочек основной группы с LBW и у 56,3 % женщин в основной группе с LBW соответственно, против 20,2% в контроле. Это согласуется с описанным в литературе более высоким риском развития артериальной гипертензии, инсульта, сахарного диабета у людей с низким для гестационного возраста весом при рождении [5,6].

Следует особо отметить более высокую частоту формирования вторичной аменореи и синдрома Ашермана именно у пациенток, рожденных с низким весом. Так, по нашим данным практически четверть пациенток (23,08%), страдающих органической патологией матки, сопровождающей развитие «тонкого» эндометрия, родились с низким весом для своего гестационного срока. Субстратом органического поражения матки у них явился синдром Ашермана в 76,92%, пороки развития матки (7,69%), субмукозная миома матки (15,39%). У 80,76%

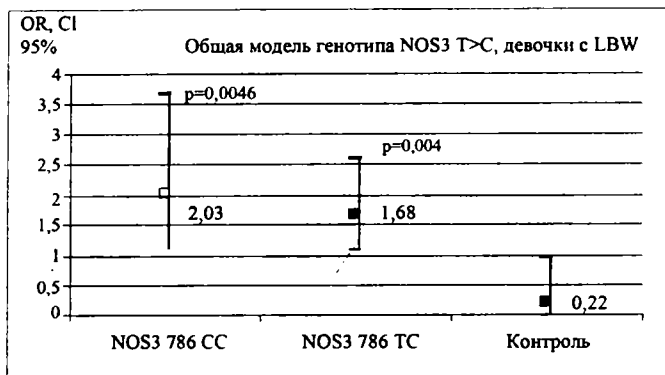


Рисунок 3 – Распределение частот генотипов, содержащих полиморфный аллель С в гене NOS3 786 T>C, у девочек-подростков, рожденных с LBW, OR (CI95%)

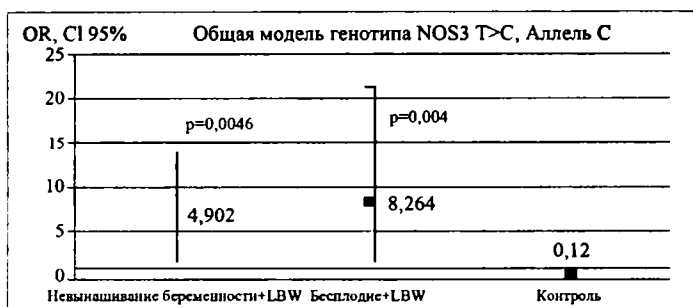


Рисунок 4 – Распределение частот носительства генотипов, содержащих полиморфный аллель С, в гене NOS3 786 T>C, у женщин основных групп наблюдения, рожденных с LBW, OR (CI95%)

данных пациенток был диагностирован хронический эндометрит.

В пубертатном периоде у девочек, рожденных с СЗРП, наиболее распространенными соматическими заболеваниями являлись частые респираторные инфекции (46,2%), нарушение жирового обмена (22,4%), сердечно-сосудистые заболевания (56,25%) и патология ЖКТ (81,3%).

Аналогичным образом выглядит структура соматической патологии и у женщин репродуктивного возраста, рожденных с низкой массой тела. Частые респираторно-вирусные заболевания (42,31%), болезни свертывающей системы крови (15,38%), ожирение (19,3%) и сердечно-сосудистые заболевания (34,61%). На наш взгляд, в основе столь высокой частоты распространения метаболического синдрома, артериальной гипертензии и патологией системы гемостаза среди женщин, рожденных с низким весом, лежит внутриутробно программируемый синдром эндотелиальной дисфункции.

Доказана роль генетического полиморфизма эндотелиальной NO-синтазы (NOS3) в развитии преэклампсии и плацентарной недостаточности [14, 15, 16]. Поэтому логично предположить, что женщины, рожденные с синдромом задержки роста плода от матерей, чья беременность протекала на фоне синдрома эндотелиальной дисфункции с исходом в преэклампсию и фетоплацентарную недостаточность, унаследовали определенный

полиморфизм генов, регулирующих функцию эндотелиальной системы.

Фенотипически эндотелиальная дисфункция у них реализуется в развитии метаболического синдрома, артериальной гипертензии, нарушении свертывающей системы крови, а также в нарушении менструальной функции, связанном с изменением баланса тканевых эндотелиальных факторов, регуляторов сосудистого тонуса, ангиогенеза и локального гемостаза в эндометрии [17].

Нами проведено исследование полиморфизма генов 786 T>C, 894G>T у девочек, рожденных с задержкой внутриутробного роста, имеющих нарушение становления менструальной функции по типу аномальных маточных кровотечений, а также у взрослых женщин, рожденных с задержкой внутриутробного роста и страдающих бесплодием и невынашиванием беременности, обусловленных «тонким» эндометрием.

Анализ распределения частот аллелей генов NOS3 показал абсолютно идентичную картину: частота полиморфизма гена NOS3 786T>C была достоверно выше и у девочек, и у женщин групп наблюдения, рожденных с синдромом задержки внутриутробного роста плода (рисунок 3 и 4). OR, CI 95% Общая модель генотипа NOS3 T>C, девочки с LBW

По нашим данным, у женщин, рожденных с низким весом, определяется достоверно более высокая частота генотипов, содержащих полиморфный ал-

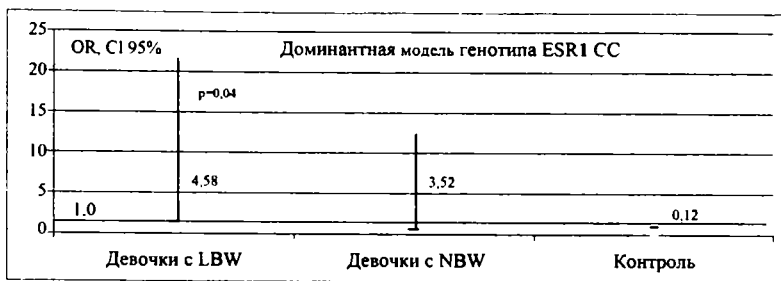


Рисунок 5 - Распределение частот генотипа CC гена ESRI 397 T>C (полиморфизм P-vull) в группах наблюдения девочек-подростков, OR (CL95%)

ль -786C гена эндотелиальной NO-синтазы NOS3 786 T>C: для женщин с бесплодием OR=8,264 (1,83-20,83); p=0,001; для женщин с невынашиванием беременности OR=4,902 (1,69-14,08); p=0,002; для девочек-подростков, страдающих нарушением становления менструальной функции OR=2,56 (1,01-6,50); p=0,04. Таким образом, носительство полиморфного аллеля C в локусе 786 гена эндотелиальной NO-синтазы, наблюдаемое нами у лиц женского пола, рожденных с низким весом, может быть связано с риском развития у них синдрома эндотелиальной дисфункции.

В последних работах показано, что наличие аллеля C в промоторе гена 786 T>C NOS3 приводит к снижению активности эндотелиальной NO-синтазы (NOS3) и уменьшает ее экспрессию в тканях, в результате чего снижается синтез и высвобождение оксида азота, что и определяет синдром эндотелиальной дисфункции [18]. Сообщается, что носители аллеля C гена 786 T>C NOS3 имеют более низкие уровни нитритов в крови, у них снижена реакция компенсаторной активации кровотока в плечевой артерии на введение ацетилхолина и эстрогенов [19]. Мета-анализ из 20 исследований, включающий 11236 пациенток, продемонстрировал связь полиморфного аллеля C в гене 786 T>C NOS3 с наличием повышенного тонуса коронарных артерий, склонностью к коронарному спазму и извращенной реакцией на введение ацетилхолина, что может служить основой развития ИБС и острого коронарного синдрома (OR 1.32, CI 95% 1.07-1.28, p=0.001) [20].

В нашем исследовании у девочек, страдающих маточными кровотечениями пубертатного периода и у взрослых женщин, страдающих привычным с невынашиванием беременности на фоне «тонкого» эндометрия чаще определялся генотип ESRI PvuII-CC в гене эстрогеновых рецепторов альфа (рисунок 5).

В работах, посвященных изучению влияния полиморфизма PvuII ESRI на дисфункцию эндотелия при сердечно-сосудистых заболеваниях, подчеркивается, что генотип ESRI PvuII-CC несет повышенный риск формирования эндотелиальной дисфункции и клинически чаще проявляется увеличением систолического артериального давления, толщины интимы и частоты ИБС у женщин [21, 22]. В работах других авторов подчеркивается, что генотип ESRI PvuII-CC значительно уменьшает NO-зависимое увеличение скорости кровотока и биодоступность NO [23].

Ряд исследователей полагают, что синдром эндотелиальной дисфункции вызывает снижение кровотока в строме эндометрия и формирование тканевой гипоксии [17, 22]. В нашем исследовании показано достоверное снижение кровотока в субэндометриальной области, сопровождающееся повышением индексов резистентности в спиральных артериях матки у девочек с АМК ПП, рожденных с низким весом, а так же у женщин с «тонким» эндометрием, страдающих бесплодием или невынашиванием беременности. Тканевая гипоксия в этом случае запускает развитие аномального ангиогенеза, за счет образования клеток, интенсивно экспрессирующих сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF). Loswood C.J. и соавт., 2011 [17] показали, что тканевая гипоксия, связанная с ингибированием активности кровотока в эндометрии и гиперпродукцией активных форм кислорода при синдроме эндотелиальной дисфункции, увеличивает синтез ангиогенных факторов роста, таких как VEGF-A в HESC и ангиопоэтина -2 (Ang-2) в эндотелиальных клетках эндометрия, в то время как синтез ангиопоэтина -1 в HESC клетках уменьшается [17]. В результате возрастает хрупкость сосудистой стенки. У юных девушек-подростков это может повлечь за собой развитие аномальных маточных кровотечений. В репродуктивном возрасте дисрегуляция ангиогенеза и лимфоангиогенеза в эндометрии может являться важным патогенетическим механизмом нарушения регенерации эндометрия в ответ на травму. Изначально стратегия формирования проангиогенного статуса является, по-видимому, одним из компенсаторных механизмов сохранения оптимальной тканевой перфузии в эндометрии при нарушении условий ее существования. Однако, в дальнейшем любое неблагоприятное воздействие на эндометрий в период репродуктивного возраста у данной категории женщин (носительниц определенных полиморфных аллелей генов NOS, ESRI, VEGFA) может обладать потенциально опасным высоким риском развития «тонкого» рефрактерного эндометрия на фоне его регенераторно-пластической недостаточности.

По нашим данным, носительство полиморфизма PvuII-CC гена ESRI 397T>C ассоциировано не только с повышенным риском нарушения становления менструальной функции, проявляющегося аномальными маточными кровотечениями пубертатного периода (OR=4,58 (0,97-21,68) p=0,04), но и риском развития в репродуктивном возрасте невынашивания беременности, обуслов-

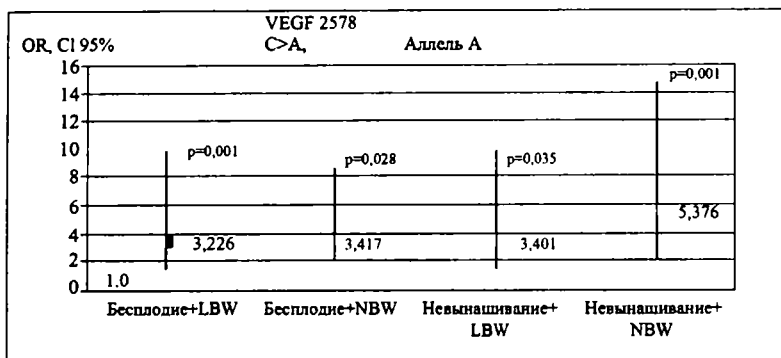


Рисунок 6 – Распределение частот носительства аллеля -2578A в локусе rs699947 гена VEGF 2578 C>A в группах наблюдения, OR (CL95%)

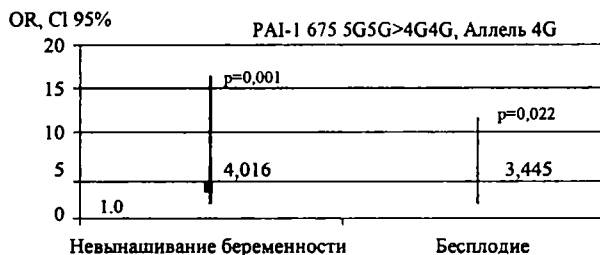


Рисунок 7 - Распределение частот носительства аллеля - 4G в локусе гена PAI-1 675 5G5G>4G4G в группах наблюдения, OR (CL95%)

ленного «тонким» эндометрием (OR=6,79 (1,94-23,75); p=0,01).

С другой стороны, аномалия ангиогенеза в эндометрии неизбежно приведет к изменению ритма экспрессии стероидных рецепторов и продукции факторов роста в эндометрии в связи с изменением транскрипционного профиля генов в ответ на эпигенетическое влияние фактора тканевой гипоксии [24].

В подтверждение роли аномального ангиогенеза в формировании «тонкого» рефрактерного эндометрия у пациенток с репродуктивными неудачами следует отметить значительное превышение частот носительства аллеля -2578A в локусе rs699947 гена VEGF 2578 C>A по данным проведенного исследования как в когорте женщин с бесплодием (OR=2,73 (1,36-5,45); p=0,01), так и среди пациенток с привычным невынашиванием беременности (OR=4,61 (2,19-9,71); p=0,01) (рисунок 6).

Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) индуцирует образование новых сосудов путем стимулирования, деления и миграции эндотелиальных клеток близлежащих сосудов [25]. VEGF специфически связывается с двумя трансмембранными тирозин-киназными рецепторами (VEGFR) на эндотелиальных клетках для трансдукции внутриклеточного сигнала, необходимого для ангиогенеза [25]. По данным ряда авторов носительство генотипа CC/CA гена VEGF 2578 C>A ассоциировано с повышением синтеза VEGF-A в плазме крови и риском метастазирования ряда эпителиальных раков; в противоположность этому вариантный аллель -2578A связан со снижением транскрипции AP-протеида и синтеза VEGF-A в тканях [26, 27].

Снижением продукции VEGF-A может объясняться низкая активность ангиогенеза в тканях, в том числе эндометрия, у носительниц генотипа AA/AC гена VEGF 2578 C>A [28].

Другим существенным звеном в генетической сети, сопряженной с регуляцией эндотелиальной функции, являются гены, кодирующие синтез факторов фибринолиза эндотелием сосудов (PAI-1 5G/4G). В частности, ген SERPINE1, принадлежащий семейству серпинов, кодирует эндотелиальный ингибитор активатора плазминогена – 1 (ИАП-1). По данным литературы, у гомозигот по аллелю 4G (генотип 4G/4G) гена SERPINE1 повышение концентрации белка ИАП-1 в плазме крови приводит к увеличению риска невынашивания беременности и формирования ретроплацентарных гематом [22, 29]. С другой стороны, присутствие аллеля 5G связано с меньшим торможением активатора плазминогена и, как следствие, с повышением активации маточных металлопротеиназ, играющих важную роль в процессах стромального секроторного ремоделирования и инвазии цитотрофобласта [30]. Носительство полиморфного аллеля 4G может способствовать неполноценному стромальному ремоделированию эндометрия (за счет низкой активности MMP), недостаточной инвазии цитотрофобласта в спиральные артерии и формированию микроангиотромбозов, связанных с угнетением фибринолиза. Данные механизмы могут лежать в основе патогенеза неразвивающейся беременности и ранних спонтанных аборттов.

По данным нашего исследования (рисунок 7), генотипы женщин, страдающих бесплодием и невына-

шиванием беременности, обусловленными «тонким» эндометрием, достоверно чаще содержали полиморфный аллель - 675 4G гена SERPINE1 в сравнении с фертильными здоровыми пациентками: для пациенток с бесплодием (OR=8,45 (3,96-18,21); $p=0,001$) и невынашиванием беременности (OR=9,98 (4,61-21,74); $p=0,001$).

Заключение

Резюмируя полученные результаты молекулярно-генетических исследований, стоит еще раз отметить, многофакторность природы заболеваний, приводящих к формированию «тонкого» рефрактерного эндометрия. И это вполне объяснимо с точки молекулярной генетики. Генная сеть, контролирующая определенный фенотипический признак организма, обычно включает от нескольких десятков до сотен генов. Долгие годы исследования генетического полиморфизма были сосредоточены на поиске «универсального маркера заболевания». Однако, попытки дискриминировать группы по одному маркеру обычно безрезультатны.

Мировые научные исследования в настоящее время сфокусированы на создании и клиническом применении генетической сети транскриптома профильных генов рецептивности эндометрия – endometrial receptivity array (ERA) [31]. Межгенные ассоциации генов половой стероидной рецепции, ангиогенеза, эндотелиальной функции, тромбофилии и целого ряда других групп генов формируют сеть, в пределах которой осуществляются молекулярно-генетические механизмы регуляции роста, дифференцировки и морфогенеза клеток эндометрия. В нашем исследовании показано, что внутриутробное влияние гипоксии, как эпигенетического фактора, активирует экспрессию генов эндотелиальной NOS3. Это приводит у девушек и женщин, рожденных с синдромом задержки внутриутробного роста, к формированию внутриутробно

программируемой эндотелиальной дисфункции, которая реализуется дисбалансом регуляции локального ангиогенеза, синтеза тканевых факторов роста, вазоконстрикции и фибринолиза в эндометрии. У носителей полиморфизма Rvull гена эстрогеновых рецепторов ситуация усугубляется снижением активности белков эстрогеновых рецепторов ESR1, что дополнительно снижает ангиогенный и пролиферативный потенциал ткани эндометрия. Генетическая сеть, содержащая описанные вариативные аллели, координирует патологический характер регуляции эндометриальной функции, что приводит к развитию болезни в ответ на действие триггерного фактора, которым наиболее часто является травма эндометрия. Поскольку, согласно эволюционной биологии именно накопление мутаций в различных частях генной сети и формирует болезнь [32].■

Мелкозёрова Оксана Александровна, кандидат медицинских наук, руководитель отдела сохранения репродуктивной функции, ФГБУ «Уральский НИИ ОММ» Минздрава России, г. Екатеринбург. Башмакова Надежда Васильевна, профессор, д.м.н., заслуженный врач Российской Федерации, Главный акушер-гинеколог Уральского Федерального округа, директор ФГБУ «Уральский НИИ ОММ» Минздрава России, г. Екатеринбург. Третьякова Татьяна Борисовна, врач генетик, к.м.н., руководитель лаборатории генетики ФГБУ «Уральский НИИ ОММ» Минздрава России, г. Екатеринбург. Цывлян Павел Борисович – д.м.н., профессор, и.о. ведущего научного сотрудника отдела сохранения репродуктивной функции ФГБУ «Уральский НИИ ОММ» Минздрава России, г. Екатеринбург. Автор, ответственный за переписку - Мелкозёрова Оксана Александровна, 620146 г. Екатеринбург, ул. Репина, 1, e-mail: abolmed1@mail.ru, Рабочий телефон (343)-371-24-27

Литература:

1. Black, R.E. Global Prevalence of Small for Gestational Age / R.E.Black // Births. Nestle Nutr. Inst. Workshop. Ser.- 2015.- Vol. 81.- P. 1-7.
2. Lee, A.C. National and regional estimates of term and preterm babies born small for gestational age in 138 low-income and middle-income countries in 2010 / A.C. Lee, J. Katz, H. Blencowe // Lancet Glob Health.- 2013.- Vol.1.-P 26–36.
3. Barker, D.J. The origins of the developmental origins theory / D.J.Baeker // J.Intern. Med.- 2007.- Vol. 261.- P.412–417.
4. Chernausek, S.D. Update: Consequences of Abnormal Fetal Growth / S.D.Chernausek // J. Clin. Endocrinol. Metab. -2012.- Vol.97.- P. 689–695.
5. Eriksson, J.G. Patterns of growth among children who later develop type 2 diabetes or its risk / J.O.Eriksson, C.Osmond, T.Kajantie // Diabetologia.-2006.- Vol. 49.- P.2853–2858.
6. Christian, L.R.Mechanisms affecting neuroendocrine and epigenetic regulation of body weight and onset of puberty: potential implications in the child born small for gestational age (SGA) / L.R.Christian, S.Sheela // Rev. Endocr Metab. Disord. – 2012. – Vol.13. – P 129–140.
7. Kawai, T. Increased epigenetic alterations at the promoters of transcriptional regulators following inadequate maternal gestational weight gain / T.Kawai, T.Yamada, K.Abe, K.Okamura, Hi.Kamura, R.Akaishi // Sci Rep. – 2015. – Vol. 5. – P. 142-224.
8. Баранов, А.А. Здоровье и развитие подростков России / А.А.Баранов, В.Р.Кучма, Л.С.Намазова-Баранова. – М.: НЦЗД РАМН, 2010. – 102 с.
9. Гуркин, Ю.А. Детская и подростковая гинекология / Ю.А. Гуркин. – СПб.: Медицинское информационное агентство, 2009. – 698с.
10. Данькова, И.В. Особенности течения пубертата у девочек-подростков, родившихся с проявлениями задержки внутриутробного развития / И.В.Данькова,

- Н.В.Башмакова, Г.Н.Чистякова // *Репродуктивное здоровье детей и подростков.* -2013.- № 1.- С. 44-52.
11. Barker, D.J. *Intrauterine programming of adult disease / D.J.Barker // Mol. Med. Today.* -1995.-Vol. 1, № 9. - P.418-423.
 12. Nasr, H.B. *Functional G894T (rs1799983) polymorphism and intron-4 VNTR variant of nitric oxide synthase(NOS3) gene are susceptibility biomarkers of obesity among Tunisians/ H.B.Nasr, S.Dimassi, R.M'hadhbi // Obes. Res. Clin. Pract.* - 2015. - Vol.5. – P.1871-1903.
 13. Lango, A.H. *Hundreds of variants clustered in genomic loci and biological pathways affect human height / A.H. Lango, K. Estrada, G. Lettre // Nature.*-2010.- Vol. 467.- P.832–838.
 14. Ali, S.M. *Genetic, Immune, and Vasoactive Factors in the Vascular Dysfunction Associated with Hypertension in Pregnancy/S.M.Ali, R.A.Khalil // Expert. Opin. Ther Targets.* - 2015.- Vol.19.- P. 1495–1515.
 15. Haram, K. *Genetic Aspects of Preeclampsia and the HELLP Syndrome / K.Haram, J.H.Mortensen, B.Nagy // J. Pregnancy.* -2014.- Vol. 9.- P.107-151.
 16. Leonardo, D.P. *Association of Nitric Oxide Synthase and Matrix Metalloprotease Single Nucleotide Polymorphisms with Preeclampsia and Its Complications / D.P.Leonardo, D.M.Albuquerque, C.Lanaro // PLoS One.*-2015.- Vol.10.- P.66 - 93.
 17. Lockwood, C.J. *Decidualized Human Endometrial Stromal Cells Mediate Hemostasis, Angiogenesis, and Abnormal Uterine Bleeding /C.J. Lockwood, Y.Nemerson, S.Guller //Reprod Sci.* Feb .-2009.- Vol.16.- P. 162–170.
 18. Asif, A.R. *Polymorphism of the nos-3 Gene and the Endothelial Cell Response to Fluid Shear Stress - A Proteome Analysis / A.R.Asif, M.Oellerich, V.W.Armstrong //Journal of Proteome Research.*- 2009.- Vol.8.- P. 3161–3168.
 19. Monti, L.D. *Pharmacogenetic influence of NOS3 gene variant on endothelial and glucose metabolism responses to L-arginine supplementation: Post hoc analysis of the L-arginine trial /L.D.Monti, E.Galluccio, B.Fontana //Metabolism.*- 2015.- Vol.64, №11.- P.1582-1591.
 20. Sung, J.H.*Association between NOS3 polymorphisms and risk of coronary artery disease in a Korean population: a meta-analysis./J.H.Sung, B.E.Lee, J.O.Kim // Genet. Mol. Res.*- 2015.- Vol.9, № 4.- P.16508-16520.
 21. Ozsoy, A.Z. *The Evaluation of IL6 and ESR1 Gene Polymorphisms in Primary Dysmenorrhea/ A.Z.Ozsoy, N.H.Karakus, S.G.Yigit //Immunol Invest.*- 2016.- Vol.45.- P.75-86.
 22. Shen, C. *Association between the polymorphism of estrogen receptor α and coronary artery disease in a Chinese population / C.Shen J.Chen S.Fan //European Journal of Internal Medicine.*- 2012.- Vol. 23.- P.175–178.
 23. Clapauch, R. *Endothelial function and insulin resistance in early postmenopausal women with cardiovascular risk factors: importance of ESR1 and NOS3 polymorphisms / R.Clapauch, A.F.Mourão,A.S.Mecenas // PLoS One.* -2014.- Vol. 9.- P.34-44.
 24. Гамбалева, Н.А. *Оценка экспрессии мРНК генов цитокинов в эндометрии при хроническом эндометрите / Н.А.Гамбалева, О.В.Бурменская, Т.А.Демур, Л.А.Марченко // Акушерство и гинекология.* - 2013. – № 11. – С.35-40.
 25. Ferrara, N. *The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis / N.Ferrara, H.P.Gerber // Acta Haematol.* – 2001. – Vol. 106. – P. 148-156.
 26. Shahbazi, M *Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection / M.Shahbazi, A.A.Fryer, V.Pravica // J. Am. Soc. Nephron.* – 2002. – Vol. 13. – P. 260-264.
 27. Prakash, N. *Impact of Vascular Endothelial Growth Factor Single Nucleotide Polymorphism Association on Acute Renal Allograft Rejection /S.Prakash, S.Agrawal, S.Kumar // Nephron.* – 2015. – Vol. 129. – P. 91–96.
 28. Liu, F *Association of VEGFA polymorphisms with susceptibility and clinical outcome of hepatocellular carcinoma in a Chinese Han population / F.Liu, L.Luo, Y.Weii // Oncotarget.*- 2017.- Vol.8, №10.- P.16488-16497.
 29. Кирющенко, П.А. *Значение полиморфизма гена ингибитора активатора плазминогена I типа (SERPINE1: 5G>4G) при отслойках хориона и плаценты на ранних сроках беременности / П.А.Кирющенко, З.С.Ходжаева, Н.К.Тетраушвили, А.Е.Донников // Акушерство и гинекология.* – 2012. – № 5. – С. 34 – 37.
 30. Li, Z.L. *Regulation of bcl-2 transcription by estrogen receptor-alpha and C-Jun in human endometrium / Z.L.Li, K.Ueki, K.Kumagai // Med. Mol. Morphol.*-2014.- Vol. 47, № 1.- P 43-53.
 31. Garrido-Gómez, T. *Profiling the gene signature of endometrial receptivity: clinical results / T.Garrido-Gómez, M.Ruiz-Alonso, D.Blesa // Fertil. Steril.*- 2013.- Vol. 99.- P.1078-1085.
 32. Колчанов, Н.А. *Генные сети / Н.А.Колчанов, Е.В.Игнатьева,О.А.Подколотная // Вавиловский журнал генетики и селекции.* – 2013. –№ 4/2. – С. 833-850.