

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *AREG* В КЛЕТКАХ КУМУЛЮСА ЧЕЛОВЕКА КАК МАРКЕР ПРОГНОЗИРОВАНИЯ КАЧЕСТВА ООЦИТОВ

Башенджиева Е. О.¹, Барашкова Е. А.², Татищева Ю. А.²,
Калугина А. С.^{2,3}, Енукашвили Н. И.¹

Контактная информация:
Енукашвили Натэлла Иосифовна,
ФГБУН «Институт цитологии» РАН,
Тихорецкий пр., 4, Санкт-Петербург,
Россия, 194064.
E-mail: n.enukashvily@incras.ru

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Институт цитологии» Российской академии наук, Санкт-Петербург,
Россия

² Общество с ограниченной ответственностью «Клиника
репродукции «Скайферт», Санкт-Петербург, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский
государственный медицинский университет имени академика
И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Статья поступила в редакцию 18.08.2024
и принята к печати 29.08.2024.

Резюме

Актуальность. Вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) являются перспективными методами лечения бесплодия. Персонализированный подход позволяет повысить их эффективность. Одним из таких подходов является разработка методов оценки качества эмбриона для переноса. Качество эмбриона, во многом определяющее успешность процедуры переноса, в значительной мере зависит от качества гамет, участвовавших в оплодотворении. Поэтому разработка неинвазивных методов оценки качества ооцитов востребована для развития персонализированных ВРТ. Молекулярно-биологическая характеристика клеток кумулюса может быть использована для оценки качества ооцитов и прогнозирования успешности имплантации перенесенного эмбриона. **Цель исследования:** оценка уровня экспрессии потенциальных генов — маркеров качества ооцита (*AREG*, *STAR*, *PTGS2*, *HAS2* и *SCD5*) в кумулюсных клетках здоровых доноров и пациенток с первичным и вторичным типами бесплодия. **Материалы и методы.** В исследовании участвовало 9 здоровых доноров и 19 доноров из числа лиц, проходящих лечение бесплодия с применением методов ВРТ. Из клеток кумулюса, полученных при подготовке ооцитов к оплодотворению, выделяли РНК и синтезировали кДНК, которую использовали в качестве матрицы для ПЦР в режиме реального времени с праймерами к указанным выше генам интереса. **Результаты.** Обнаружены достоверные различия в уровне экспрессии гена *AREG* между клетками кумулюса ооцитов с успешным (процедура закончилась родами) и неудачным исходами ЭКО. Для генов *STAR*, *HAS2*, *PTGS2* и *SCD5* различия не выявлены. **Заключение.** Метод определения уровня экспрессии генов-маркеров с помощью ПЦР в режиме реального времени является перспективным для оценки качества ооцитов. Ген *AREG* является одним из возможных генов-маркеров.

Ключевые слова: амфирегулин, ооцит-кумуляный комплекс, созревание ооцита, экстракорпоральное оплодотворение.

Для цитирования: Башенджиева Е.О., Барашкова Е.А., Татищева Ю.А. и др. Экспрессия гена *AREG* в клетках кумулюса человека как маркер прогнозирования качества ооцитов. Трансляционная медицина. 2024; 11(5): 407-418. DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-5-407-418. EDN: CTADWW

AREG EXPRESSION IN CUMULUS CELLS AS A PROGNOSTIC MARKER OF OOCYTE QUALITY

Ekaterina O. Bashendjieva¹, Ekaterina A. Barashkova²,
Julia A. Tatishcheva², Alla S. Kalugina^{2,3}, Natella I. Erukashvily¹

¹ Institute of Cytology of the Russian Academy of Science, Saint Petersburg, Russia

² Skyfert Assisted Reproductive Technologies Clinic, Saint Petersburg, Russia

³ Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Natella I. Erukashvily,
Institute of Cytology of the Russian Academy
of Science,
Tikhoretsky ave., 4, Saint Petersburg, Russia,
194064.

E-mail: n.erukashvily@incras.ru

Received 18 August 2024; accepted
29 August 2024.

Abstract

Background. Assisted reproductive technologies (ART) represent the most promising and successful methods of infertility treatment. A personalized approach may enhance its efficacy. One such approach is the development of reliable methods for assessing the quality and selection of embryos for transfer. The quality of the embryo is largely contingent upon the quality of the gametes involved in fertilization; thus, the development of non-invasive methods to assess oocyte quality represents a crucial step in the advancement of personalized ART. It is proposed that molecular and biological characterization of cumulus cells can be utilized to assess oocyte quality and predict the success of implantation of transferred embryos. **The aim of the study** was to evaluate the expression levels of potential oocyte quality marker genes (*AREG*, *STAR*, *PTGS2*, *HAS2* and *SCD5*) in cumulus cells from healthy donors and patients with primary and secondary infertility. **Materials and Methods.** Nine donors and 19 patients were enrolled in the study. RNA was isolated from cumulus cells obtained during oocyte preparation for fertilization, and cDNA was synthesized. The cDNA was used as a matrix for real-time PCR with primers for the above-mentioned genes of interest. **Results.** Significant difference in *AREG* gene expression was observed between patients with successful (i.e. ended with birth) outcome and with IVF failure. No difference was found for the *STAR*, *HAS2*, *PTGS2* and *SCD5* genes. **Conclusion.** The method of assessing the expression level of marker genes in cumulus cells by real-time PCR shows considerable promise for the assessment of oocyte quality. The *AREG* gene is a potential candidate for use as a marker of oocyte quality.

Key words: amphiregulin, in vitro fertilization, oocyte-cumulus complex, oocyte maturation.

For citation: Bashendjieva EO, Barashkova EA, Tatishcheva JA, et al. *AREG expression in cumulus cells as a prognostic marker of oocyte quality. Translational Medicine. 2024; 11(5): 407-418. (In Rus.) DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-5-407-418. EDN: CTADW*

Список сокращений: ОКК — ооцит-кумулюсный комплекс, ПЦР — полимеразная цепная реакция, *AREG* — амфирегулин, *GREM1* — gremlin 1 (грелин 1), *HAS2* — hyaluronan synthase 2 (гиалуронансинтаза 2), *PTGS2* — Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (простагландин-эндопероксидсинтаза 2), *SCD1,5* — Stearoyl-CoA desaturase-1,5 (стеарилКоА десатураза-1,5), *YWHAZ* — 14-3-3 protein zeta/delta (белок 14-3-3 дзета/дельта).

Бесплодие представляет собой состояние, характеризующееся нарушением репродуктивной функции у мужчин или женщин и проявляющееся в невозможности достижения беременности при регулярной половой жизни без применения методов контрацепции в течение 12 месяцев [1]. Оно является результатом различных физиологических и патологических факторов. По последним данным Всемирной организации здравоохране-

ния, проблема бесплодия затрагивает около 17,5 % взрослого населения, то есть примерно каждый шестой человек в мире не может реализовать свою репродуктивную функцию [2].

Вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) являются самыми эффективными методами лечения бесплодия, к которым относятся экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО), микроинъекция сперматозоида в яйцеклетку (ИКСИ) и др. Сегодня в мире родилось более 15 млн детей в результате применения этих программ. Основная задача преодоления бесплодия методами ВРТ — наступление беременности и рождение одного здорового ребенка. С целью оптимизации эффективности программ ВРТ требуются различные персонифицированные подходы. Одним из ключевых аспектов является отбор эмбриона лучшего качества для переноса в матку, то есть эмбриона с высоким потенциалом имплантации и дальнейшего развития. В клинической практике с целью снижения риска возникновения многоплодной беременности рекомендуется проводить селективный перенос только одного эмбриона согласно клиническим рекомендациям Министерства здравоохранения Российской Федерации [3] и приказу Минздрава России № 803н от 31.07.2020. Такое ограничение способствует контролю над процедурой ЭКО, уменьшая вероятность многоплодной беременности и связанных с ней осложнений как для матери, так и для развивающегося плода. Чем выше качество эмбриона, тем выше вероятность наступления беременности и рождения здорового ребенка. При выборе эмбриона для переноса используют как морфологические критерии (классификация бластоцист по Гарднеру) [4], так и дополнительные методы оценки (морфокинетика, преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии) [5, 6]. Оценка качества ооцита, из которого получен эмбрион, представляется дополнительным высокоинформативным инструментом для выбора эмбриона с максимальным потенциалом к имплантации.

Известно, что качество эмбрионов во многом определяется качеством гамет, использованных для оплодотворения: ооцитов и сперматозоидов [6]. Поэтому возможность оценки ооцита, использованного для получения эмбриона, может стать дополнительным инструментом выбора для селективного переноса. Морфологическая оценка ооцитов проводится с целью определения их пригодности к использованию в программах ЭКО/криоконсервации и включает в себя: определение степени мейотической зрелости, а также выявление и фиксацию в протоколе морфологических

дисморфизмов различных структур ооцита, которые значимо влияют на клинические исходы (согласно методическим рекомендациям Российской Ассоциации репродукции человека (РАРЧ) от 15 ноября 2021 г.) [7].

Благодаря развитию технологий и научным исследованиям постоянно появляются новые подходы и методы, позволяющие более надежно определить качество ооцитов и повысить шансы на успешное проведение ВРТ и повысить частоту живорождений.

Для оценки качества ооцитов используют инвазивные и неинвазивные методы исследования. При неинвазивных методах сам ооцит не затрагивается, а оценка качества происходит либо на основе его морфологии, либо на основе анализа клеток и жидкостей, окружающих ооцит и имеющих непосредственное влияние на его рост и развитие [6]. К инвазивным методам можно также отнести оценку плоидности ооцита на основе анализа полярного тельца, поскольку биопсия полярного тельца проводится через разрез *zona pellucida* [8]. Поскольку ооциты представляют большую ценность, предпочтение отдается разработке именно неинвазивных методов, которые позволяют оценить их качество с минимальным нарушением условий культивирования, оплодотворения и развития эмбриона. К неинвазивным методам исследования относятся: транскриптомный анализ кумулюсных/гранулезных клеток, протеомный, транскриптомный и метаболомный анализ фолликулярной жидкости [6, 9].

В процессе роста ооцит получает необходимые ему вещества от окружающих его соматических клеток [10, 11]. Во время фолликуло- и оогенеза между клетками ооцит-кумуляного комплекса (ОКК) формируются тесные взаимодействия посредством щелевых контактов, благодаря чему происходит перенос питательных веществ и сигнальных молекул между ооцитом и кумулюсом, что обеспечивает взаимовлияние при созревании ооцита [12]. При естественном оплодотворении происходит взаимодействие кумулюсных клеток с рецепторами гиалуроновой кислоты, расположенными на головке сперматозоидов, что приводит к их разрушению и обеспечению доступа сперматозоида к блестящей оболочке ооцита.

Избыточные кумулюсные клетки, окружающие ооцит, часто удаляют непосредственно при получении ОКК, оставляя несколько слоев клеток вокруг ооцита для удобства дальнейших манипуляций. В настоящее время появляется все больше исследований, в которых кумулюсные клетки используются в роли дополнительного неинвазив-

ного источника маркеров качества яйцеклеток, поскольку есть возможность контролировать, от какого ооцита данные кумулюсные клетки были получены, а предлагаемые методы позволяют получить данные достаточно быстро. Все это в совокупности делает их удобным материалом для исследований, предположительно позволяющих быстро оценивать качество ооцита и полученного из него эмбриона.

Поскольку клетки кумулюса способствуют успешному эмбриональному развитию посредством тщательно настроенной и специфичной по времени программы экспрессии соответствующих генов [12–14], анализ характера их экспрессии и связанных с ними молекулярных функций может являться мощным инструментом для получения информации о процессах, связанных с компетентностью ооцита.

Последние научные исследования показывают, что уровни транскриптов определенных генов в клетках кумулюса и гранулезы связаны с созреванием ооцитов, жизнеспособностью эмбриона, беременностью и ее исходом [11, 13, 15–17].

Хорионический гонадотропин (ХГЧ) и лютеинизирующий гормон (ЛГ) индуцируют быструю кратковременную экспрессию факторов, подобных эпидермальному фактору роста (*EGF*) — амфирегулина (*AREG*) и эпирегулина (*EREG*) — в пристеночных гранулезных и кумулюсных клетках. *AREG* и *EREG* индуцируют экспрессию простагландинсинтазы-2 (*PTGS2*, также называемой *COX2*) и *HAS2*, которые необходимы для синтеза и стабилизации внеклеточного матрикса кумулюсных клеток, экспансии кумулюса и последующей овуляции. Продукты этих генов были оценены как потенциальные биомаркеры в исследованиях с использованием qPCR для анализа транскриптома кумулюсных и гранулезных клеток [15, 17].

Исследован уровень экспрессии *HAS2*, *PTGS2*, и *GREM1* в 108 ооцитах и клетках кумулюса человека в зависимости от зрелости гамет, оплодотворения и качества эмбрионов. Экспрессия *PTGS2* и *HAS2* была в 6 раз выше, а у *GREM1* — в 15 раз выше в кумулюсных клетках, окружающих ооциты, из которых в дальнейшем развились эмбрионы высокого качества, по сравнению с кумулюсными клетками ооцитов, которые привели к образованию эмбрионов низкого качества [17]. В другом исследовании [13] авторы провели анализ транскрипции генов, активность которых повышается в кумулюсных клетках в ответ на предовуляторный всплеск ЛГ, который предшествует экспансии кумулюса: стероидогенный острый регуляторный

белок (*STAR*), *PTGS2*, *AREG*, две стеарил-коэнзим А-десатуразы (*SCD1* и *SCD5*). Уровни экспрессии всех исследованных генов повышались после возобновления мейоза. Таким образом, созревание ядра было связано с повышенной экспрессией *STAR*, *PTGS2*, *AREG*, *SCD1* и *SCD5* кумулюсными клетками. Основываясь на данных литературы, процитированных выше, гены *AREG*, *STAR*, *PTGS2*, *HAS2* и *SCD5* были нами отобраны для исследования.

Целью данной работы являлась оценка уровня экспрессии потенциальных генов — маркеров качества ооцита (*AREG*, *STAR*, *PTGS2*, *HAS2* и *SCD5*) в кумулюсных клетках здоровых доноров и пациенток с первичным и вторичным типами бесплодия. В ходе исследования показано, что экспрессия гена *AREG*, но не *STAR*, *SCD5*, *PTGS2* и *HAS2* в клетках кумулюса варьирует у пациенток с различным исходом процедуры ЭКО. Полученные данные позволяют рассматривать *AREG* в качестве одного из кандидатов для создания панели маркеров прогнозирования качества ооцита.

Материалы и методы

Этические принципы

Все образцы клеток кумулюса получены от здоровых доноров и пациентов с первичным и вторичным бесплодием, проходящих лечение с использованием методов ВРТ. Забор образцов осуществляли в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (Хельсинкская декларация: этические принципы медицинских исследований с участием человека, включая поправки, внесенные на 64-м заседании ВМА в Форталезе, Бразилия, октябрь 2013 г.) (WMA declaration of Helsinki — ethical principles for medical research involving human subjects, 1964). От каждого пациента, участвующего в исследовании, получено письменное информированное согласие. Также получено разрешение этического комитета (№ 11 от 22.12.2016) клиники ВРТ, в которой производили забор материала.

Пациенты

В исследовании в качестве материала использовались кумулюсные клетки, полученные из ОКК здоровых женщин, участвующих в программе донорства ооцитов, и пациенток, обращающихся в клинику за услугами ВРТ. Всего было включено 19 пациенток. В качестве доноров ($n = 9$), согласно Приказу Минздрава России № 803н от 31.07.2020, отбирали женщин в возрасте от 18 до 35 лет, подходящих по показателям здоровья. Возраст пациенток с различными формами бесплодия на мо-

мент исследования варьировал от 27 до 42 лет. В исследование включали только женщин с нормальным для своей возрастной группы уровнем антимюллерова гормона (АМГ). В дальнейшем их разделяли на две группы по типу бесплодия: первично бесплодные (женщина ни разу в жизни не была беременна, уровень АМГ $6,86 \pm 4,3$) и вторично бесплодные (ранее у женщины наступали беременности, но на данный момент забеременеть не может, уровень АМГ $3,7 \pm 3,2$). Значительный разброс в группах по уровню АМГ связан с возрастом пациенток.

Получение клеток кумулюса

У доноров и пациенток проводили контролируемую овариальную стимуляцию (КОС) с использованием стандартных схем и применением стартовых и курсовых доз гонадотропинов. Длительность КОС в среднем составила $8,6 \pm 1,9$ дня. В нашем исследовании стимуляцию овуляции осуществляли с помощью протоколов с антагонистами гонадотропин-рилизинг-гормонов (ант-ГнРГ). Для стимуляции фолликулогенеза начинали введение рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона (р-ФСГ — фоллитропин альфа (Гонал-Ф, Merck Serono, Швейцария) или фоллитропин бета (Пурегон®, Нидерланды)) с 2–4 дня менструального цикла. Стартовая доза составила в среднем $198,6 \pm 55$, 3 МЕ. Введение ант-ГнРГ (цетрореликс, «МедСинтез», Россия) в ежедневной дозе 0,25 мг подкожно начинали при достижении лидирующим фолликулом диаметра 13–14 мм и продолжали до введения триггера овуляции. Суммарная доза препаратов р-ФСГ составила в среднем 2034 ± 580 МЕ. Для контроля за ростом фолликулов и состоянием эндометрия использовали УЗ-мониторинг. При достижении фолликулами диаметра 17–18 мм назначали триггер овуляции — рекомбинантный хорионический гонадотропин — ХГ (хориогонадотропин альфа, Овитрель®, Merck Serono, Швейцария) в дозе 250 мкг/0,5 мл. Через 36 часов после введения овуляторной дозы р-ХГ проводили трансвагинальную пункцию под УЗ-контролем и аспирацию содержимого всех фолликулов более 13 мм. Антральные и преантральные фолликулы пунктировали иглой под контролем УЗИ. Фолликулярную жидкость собирали в пробирки, передавали эмбриологу, который просматривал ее, находил и отбирал из них ооцит-кумулюсные комплексы. Часть кумулюсных клеток отделяли с помощью препаровальных игл, полученные клетки помещали в культуральную среду Flushig Medium (Origio, США) и передавали для научных исследований. Сразу в день забора клет-

ки кумулюса транспортировались в питательной среде из клиники в лабораторию при температуре 37 °С для дальнейших манипуляций.

Выделение РНК

Выделение РНК из клеток кумулюса проводили с помощью набора RNA Solo (Evrogen, Россия) согласно протоколу производителя. Далее выполняли количественный анализ для определения концентрации РНК в выделенной пробе с помощью спектрофотометра NanoDrop 3300 (Thermo Fisher Scientific Inc., США). По полученным данным рассчитывали необходимое количество РНК для последующей реакции ревертирования. Полученную РНК хранили при -80 °С.

Получение кДНК

Для получения кДНК проводили реакцию обратной транскрипции с помощью набора MMLV RT kit (Evrogen, Россия). К РНК матрице добавляли олиго(dT)₁₆-праймеры и инкубировали в течение 2 мин. при 70 °С для расплавления вторичных структур. Затем добавляли буфер и ревертазу MMLV и инкубировали в течение 60 мин. при 42 °С. Реакцию останавливали нагреванием до 70 °С в течение 10 мин. Полученную одонитевую кДНК затем использовали в ПЦР в реальном времени.

Олигонуклеотиды

В работе использованы следующие пары праймеров для определения кДНК: *STAR*, *AREG*, *SCD5* [13], *PTGS2*, *HAS2* (собственный дизайн):

1. *STAR*

F: 5'-GAGCAGAAGGGTGTTCATCAGG-3'

R: 5'-TAGAGGGGACTTCCAGCCAACG-3'

Размер амплификата: 147 п. н. (пар нуклеотидов)

2. *AREG*

F: 5'-TGGACCTCAATGACACCTACTCTG-3'

R: 5'-GGGCTTAACCTGTTCAACTCTG-3'

Размер амплификата: 251 п. н.

3. *SCD5*

F: 5'-TGACCTGCTTGCTGATCCTGTG-3'

R: 5'-TGAGTGAGATGGTATAGCGGAGAATAG-3'

Размер амплификата: 167 п. н.

4. *PTGS2*

F: 5'-GAAAAGCTGCTCAACAACCGGAA-3'

R: 5'-GTGCACTGTGTTTGGAGTGG-3'

Размер амплификата: 211 п. н.

5. *HAS2*

F: 5'-GTTGGGGGAGATGTCCCAGATTT-3'

G: 5'-TGCACTGAACACACCCAAAA-3'

Размер амплификата: 151 п. н.

Экспрессию генов нормализовали к двум референсным генам:

6. *GAPdH* [18]

F: 5'-AGGTCGGAGTCAACGGATTT-3'

R: 5'-TTCCCGTTCTCAGCCTTGAC-3'

7. *B2M* [19]

F: 5'-CCACTGAAAAAGATGAGTATGCCT-3'

R: 5'-CCAATCCAAATGCGGCATCTTCA-3'

При отладке методики оценивали возможность использования генов *YWHAZ* и *ACTB* в качестве референсных:

8. *YWHAZ* [20]

F: 5'-GGTCTGGCCCTTAACCTCTCTGTGTTCTA-3'

R: 5'-GCGTGCTGTCTTTGTATGATTCTTCACTT-3'

9. *ACTB* [21]

F: 5'-CGTGACATTAAGGAGAAGCTGTGC-3'

R: 5'-CTCAGGAGGAGCAATGATCTTGAT-3'

ПЦР

Для проведения ПЦР с целью подтверждения соответствия размеров амплификатов ожидаемым значениям использовали готовую смесь для ПЦР 5X ScreenMix (Evrogen, Россия). В качестве матрицы брали кДНК здоровых доноров. Для постановки реакции использовали амплификатор SimpliAmp (Thermo Fisher, США) и следующий протокол: 95 °C в течение 5 мин. (начальная денатурация), затем 35 циклов при 95 °C в течение 20 с. (денатурация), 56,1 °C в течение 30 с. (отжиг), 72 °C в течение 30 с. (элонгация) и 72 °C в течение 10 мин. (финальная элонгация). Для визуализации продуктов амплификации проводили горизонтальный электрофорез в 1 % агарозном геле с бромистым этидием.

ПЦР в реальном времени (qPCR)

ПЦР в реальном времени (qPCR) проводили с использованием системы CFX96 Real-Time System (Bio-Rad, США). В 5x реакционную смесь qPCRmix-HS SYBR (Evrogen, Россия) добавляли 5 нг кДНК, а также праймеры до конечной концентрации 2 мкм.

При амплификации использовали следующий протокол: 95 °C в течение 3 мин., затем 39 циклов при 95 °C в течение 10 с., 58 °C в течение 35 с., детекцию флуоресцентного анализа проводили после стадии отжига (2-этапный протокол). Анализы кривых плавления выполняли в конце каждого анализа ПЦР для проверки специфичности продуктов ПЦР. Уровни экспрессии мРНК рассчитывали методом $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Экспрессию генов нормализовали к двум референсным генам *GAPdH* и *B2M*.

Все эксперименты проводили в трех технических и трех биологических повторностях. Эффективность ПЦР в режиме реального времени

оценивали методом серийных разведений. При 10-кратном разведении образца ΔC_t между двумя разведениями должно составлять около 3,3, в условиях 100%-ной эффективности амплификации. Также оценивали значения коэффициента вариации (CV) и показателя стабильности генов (M-value) с помощью встроенных алгоритмов программы Bio-Rad CFX Manager 3.1 (3.1.1517.0823). Коэффициент вариации является мерой точности и равен величине стандартного отклонения, деленной на среднее количество групп повторов. Чем ниже значения CV, тем меньше отклонения относительно среднего значения. Значение CV для однородных групп образцов должно быть ниже 0,25. Для гетерогенных групп эти значения могут варьироваться от 0,25 до 0,5. Показатель стабильности генов (M-value) основан на попарных сравнениях между анализируемым эталонным геном-кандидатом и всеми другими генами в наборе данных. При значениях ниже 0,5 гены могут считаться стабильно экспрессируемыми. При значениях от 0,5 до 1 гены стабильно экспрессируемыми считаться не могут.

Для оценки линейности регрессии при оценке качества qPCR использовали параметр slope (угол наклона кривой). Этот параметр связан с эффективностью формулой (1):

$$\text{Efficiency} = 10^{(-1/\text{slope})} - 1 \quad (1)$$

Наклон стандартной кривой $-3,32$ указывает на реакцию ПЦР со 100%-ной эффективностью. Наклоны с более отрицательными значениями, чем $-3,32$ (например, $-3,9$), указывают на реакции, эффективность которых составляет менее 100 %. Наклоны с более положительными значениями, чем $-3,32$ (например, $-2,5$), могут указывать на качество пробы или проблемы с пипетированием.

Эффективность (E), коэффициент детерминации (R^2) и угол наклона кривой (slope) рассчитывались с помощью встроенных алгоритмов программы Bio-Rad CFX Manager 3.1 (3.1.1517.0823). Согласно принятым стандартам [22], эффективность qPCR должна колебаться в пределах 90–110 %, оптимальное значение коэффициента детерминации — > 98 , а наклона кривой — $-3,6 \geq \text{slope} \geq -3,3$.

Статистическая обработка

Эксперименты проводили в трех биологических и трех технических повторностях. Для статистической обработки данных использовали программное обеспечение GraphPad Prism 8. Результаты представлены как среднее значение $\pm$

стандартное отклонение или как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего (результаты ПЦР в реальном времени). Сравнения между группами проводились с использованием t-критерия или критерия Краскела-Уоллиса, а также применяли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Для анализа результатов ПЦР в реальном времени использовали критерий Краскела-Уоллиса. Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$.

Также оценивали значения коэффициента вариации (CV) и показателя стабильности генов (M-value).

Результаты

Подбор референсных генов

Перед началом работы провели оценку пар праймеров генов, выбранных в качестве референсных: *GAPdH*, *B2M*, *ACTB* (β -Actin) и *YWHAZ*. Для этого использовали следующие методы: серийных разведений (для расчета эффективности qPCR), оценки значения коэффициента вариации (CV) и показателя стабильности генов (M-value) для каждой пары референсных генов, а также уровня экспрессии данных генов (табл. 1).

Таблица 1. Показатели эффективности (E), коэффициента детерминации (R^2) и угла наклона прямой (Slope) для подобранных пар праймеров референсных генов при проведении метода серийных разведений

Table 1. Primers efficiency (E), coefficient of determination (R^2), and slope in the serial dilution study (R^2)

Гены	E (%)	R^2	Slope
<i>GAPdH</i>	89,9	0,991	-3,591
<i>B2M</i>	90,1	0,998	-3,585
<i>ACTB</i>	84,4	0,981	-3,763
<i>YWHAZ</i>	68	0,97	-4,439

Таким образом, оптимальные показатели по всем трем параметрам наблюдались для генов *GAPdH* и *B2M*, в отличие от *ACTB* и *YWHAZ*, показатели которых были чуть хуже: эффективность (84,4 %) и наклон кривой (-3,763) гена *ACTB* были ниже относительно принятых стандартов, так же, как и для гена *YWHAZ*: эффективность (68,0 %), коэффициент детерминации (0,970), наклон кривой (-4,439).

Для выбора оптимальной пары референсных генов была проверена возможность сочетания

праймеров с помощью параметра M-value. Так как *GAPdH* является наиболее часто используемым в качестве референсного, то выбор второго гена производили из трех оставшихся. Для этого оценили значения коэффициента вариации (CV) и показателя стабильности генов (M-value) для каждой из трех пар референсных генов: *GAPdH* и *B2M*; *GAPdH* и *ACTB*; *GAPdH* и *YWHAZ* (табл. 2).

Таблица 2. Значения коэффициента вариации (CV) и показателя стабильности генов (M-value) для каждой из пар генов домашнего хозяйства

Table 2. Coefficient of variation (CV) and average expression stability (M-value) for each of the reference genes pairs used in the study

Референсные гены	Коэффициент вариации (CV)	Показатель стабильности (M-value)
<i>GAPdH</i>	0,1444	0,4391
<i>ACTB</i>	0,1605	0,4391

<i>GAPdH</i>	0,1361	0,4182
<i>B2M</i>	0,1405	0,4182

<i>GAPdH</i>	0,1401	0,4054
<i>YWHAZ</i>	0,1401	0,4054

Таким образом, каждая из трех подобранных пар соответствует данным критериям. Учитывая данные таблицы 1, для дальнейшей работы была выбрана пара *GAPdH* и *ACTB*.

Изменение кратности экспрессии генов интереса в кумулюсных клетках доноров и пациенток

На первом этапе было решено проанализировать уровень экспрессии генов интереса без учета исхода беременности (рис. 1).

Уровень экспрессии гена *AREG* в клетках кумулюса пациенток достоверно отличался от показателя здоровых доноров (рис. 1a). У двух пациенток из группы первично бесплодных с наиболее высоким уровнем экспрессии *AREG* в анамнезе присутствовал синдром поликистозных яичников (СПКЯ) — полиэндокринный синдром, сопровождающийся нарушениями функции яичников (отсутствием или нерегулярностью овуляции, повышенной секрецией андрогенов и эстрогенов), поджелудочной железы (гиперсекреция инсулина), коры надпочечников (гиперсекреция надпочечниковых андрогенов), гипоталамуса и гипофиза. Для гена *STAR* достоверно

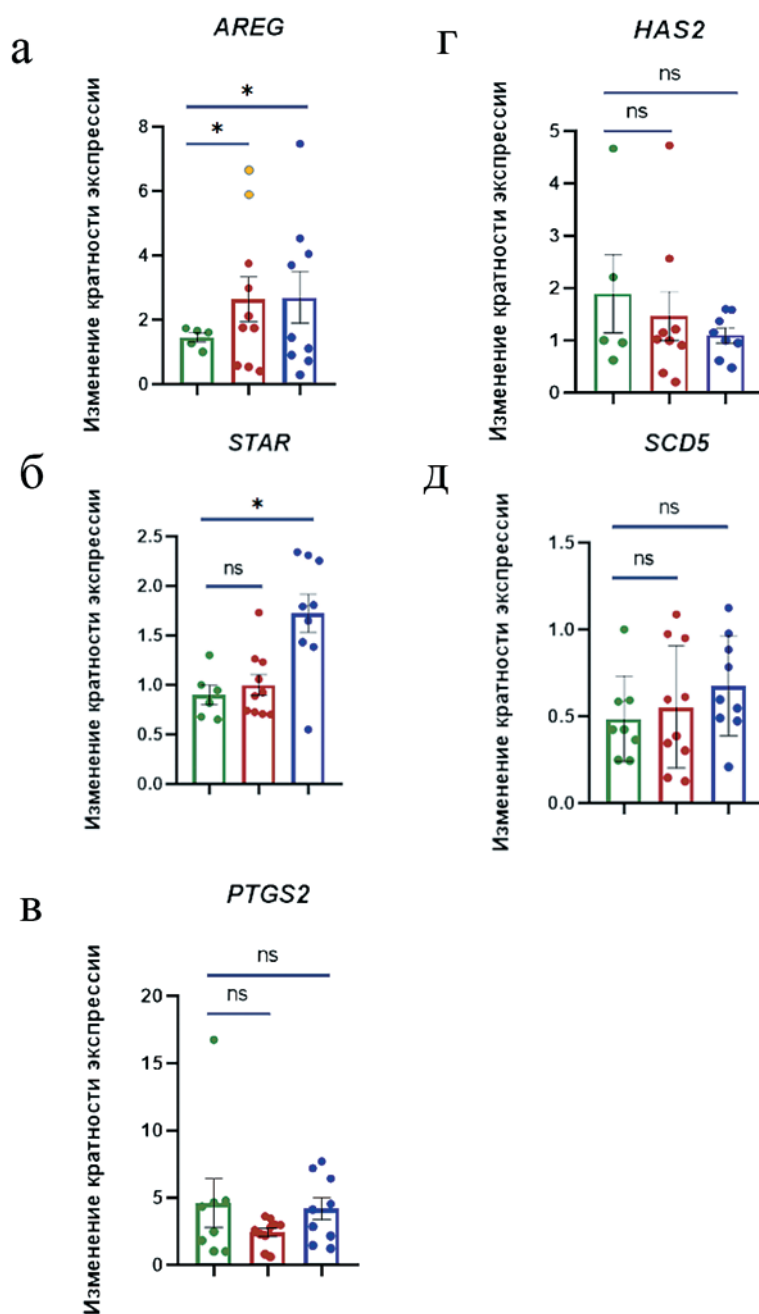


Рис. 1. Изменение кратности экспрессии генов *AREG*, *STAR*, *PTGS2*, *HAS2* и *SCD5* в кумулюсных клетках здоровых доноров и пациенток с первичным и вторичным типами бесплодия без учета исхода беременности (а, б, в, г, д).

Зеленый цвет — доноры, красный — первично бесплодные, синий — вторично бесплодные, ● — пациентки с СПКЯ. Ось Y — изменение кратности экспрессии гена. Ось X — группы женщин, участвующих в данном исследовании. Данные представлены в виде среднего и $\pm$ стандартного отклонения. * — уровень значимости при $p < 0,05$; ns (non-significant) — отличия недостоверны, уровень значимости при $p > 0,05$; отрезки — попарное сравнение исследуемых групп.

Figure 1. *AREG*, *STAR*, *PTGS2*, *HAS2*, and *SCD5* mRNA levels in cumulus cells from healthy donors and patients with primary and secondary infertility regardless of pregnancy outcome (a-d).

Y-axis — fold-change values (internal laboratory reference value for healthy donors was set to 1). Green outline — donors, red outline — patients with primary infertility, blue outline — patients with secondary infertility, ● — infertile patients with polycystic ovary syndrome (PCOS). Data are shown as mean $\pm$ standard deviation. * — $p < 0.05$, ns — non-significant, $p > 0.05$.

ные различия в уровне экспрессии были выявлены только между донорами и вторично бесплодными пациентками. При анализе результатов по генам *HAS2*, *PTGS2* и *SCD5* достоверные различия в уровне экспрессии между донорами и пациентами в обеих группах выявлены не были (рис. 1, а-д).

При анализе экспрессии генов *AREG* и *STAR* наблюдали значительный разброс данных в группах. Поэтому пациентки внутри каждой группы (первично и вторично бесплодные) были далее сгруппированы в соответствии с исходом беременности. Данные об уровне экспрессии были сопоставлены

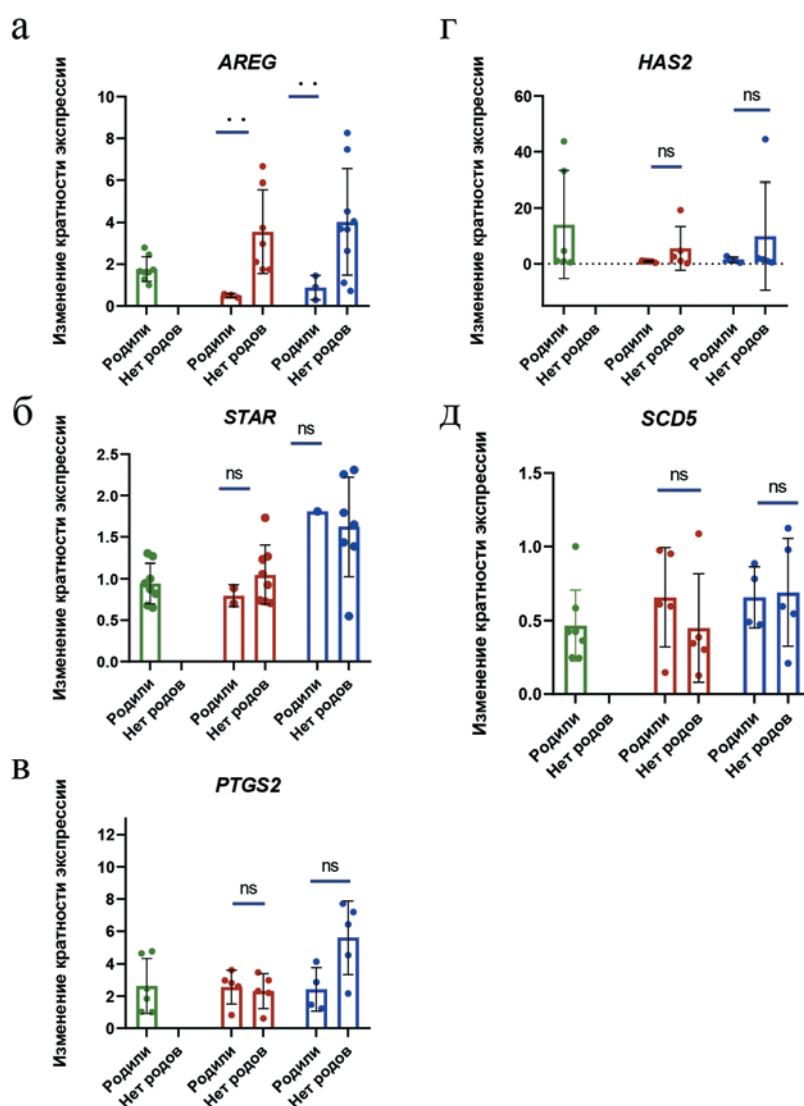


Рис. 2. Изменение кратности экспрессии генов *AREG*, *STAR*, *PTGS2*, *HAS2* и *SCD5* в кумулюсных клетках здоровых доноров и пациенток с первичным и вторичным типами бесплодия с учетом исхода беременности (а, б, в, г, д).

Зеленый цвет — доноры, красный — первично бесплодные, синий — вторично бесплодные. Ось Y — изменение кратности экспрессии гена. Ось X — группы женщин, участвующих в данном исследовании. Данные представлены в виде среднего и $\pm$ стандартного отклонения. * — уровень значимости при $p < 0,05$; ns (non-significant) — отличия недостоверны, уровень значимости при $p > 0,05$; отрезки — попарное сравнение исследуемых групп.

Figure 2. *AREG*, *STAR*, *PTGS2*, *HAS2*, and *SCD5* mRNA levels in cumulus cells from healthy donors and patients with primary and secondary infertility with regard the pregnancy outcome (a-d).

Y-axis — fold-change values (internal laboratory reference value for healthy donors was set to 1). Green outline — donors, red outline — patients with primary infertility, blue outline — patients with secondary infertility.

Data are shown as mean $\pm$ standard deviation. * — $p < 0.05$, ns — non-significant, $p > 0.05$.

с исходом переноса в этом цикле (закончился ли перенос эмбриона в матку наступлением беременности и успешными родами). Были обнаружены достоверные различия в уровне экспрессии гена *AREG* между пациентками с успешным исходом процедуры ЭКО (процедура закончилась родами) и с неудачей ЭКО (рис. 2, а-д). Для генов *STAR*, *HAS2*, *PTGS2* и *SCD5* подобные различия не выявлены.

Полученные данные позволяют рассматривать ген *AREG* как потенциальный кандидат для создания панели маркеров прогнозирования качества ооцита.

Обсуждение

Взаимодействие между ооцитом и окружающими соматическими фолликулярными клетками представляет собой ключевой аспект нормального развития женской половой клетки. Причем главную роль играют образующиеся в ходе фолликулогенеза кумулюсные клетки, создающие тесную взаимосвязь с ооцитом посредством щелевых контактов, благодаря чему происходит обмен большей частью питательных веществ и сигнальных молекул между ооцитом и клетками кумулюса. На основе этих представлений сейчас активно проводятся исследования транскриптома кумулюсных и гранулезных клеток в поиске маркеров, чей уровень экспрессии коррелировал бы с качеством ооцита и/или эмбриона [11, 21, 23–25].

В проведенных нами исследованиях только для гена *AREG* показано достоверное (по сравнению как с донорами, так и с успешно родившими пациентками) увеличение экспрессии у женщин с неудачным исходом ЭКО-беременности среди пациенток как с первичным, так и с вторичным типами бесплодия (рис. 1, 2). Различные исследования на животных показали, что всплеск ЛГ или ХГЧ вызывает быстрое увеличение экспрессии *AREG*, *EREG* и *BTC* в преовуляторных клетках гранулезы, и эти факторы действуют как ключевые посредники действия ЛГ в овуляторных фолликулах, необходимые для успешной овуляции. Известно, что белки *AREG*, *EREG* и *BTC* индуцируют экспрессию простагландинсинтазы-2 (*PTGS2*, также называемой *COX2*), белка, индуцируемого фактором некроза опухоли альфа (*TNFAIP6*), и *HAS2*, необходимых для синтеза и стабилизации внеклеточного матрикса клетками кумулюса [13]. По данным [26], в овулирующих фолликулах уровень *AREG* и *PTGS2* в клетках гранулезы и кумулюса нарастает через 12–18 часов после волны ХГЧ. Показано, что в кумулюсе и гранулезе ооцитов, успешно оплодотворенных и перенесенных пациентке, уровень *SCD4*, *GREM*, *PTGS2* был выше,

чем в кумулюсе и гранулезе ооцитов неудачных циклов переноса (беременность не наступила) [27]. Уровни транскриптов генов *AREG*, *STAR*, *SCD5*, *PTGS2* были ниже в кумулюсных клетках, ооцит которых достигал стадии бластоцисты на 5/6-й день, чем в кумулюсных клетках, чей ооцит был не способен развиваться дальше после оплодотворения [13]. Таким образом, ожидаемым результатом проведенного нами исследования являлось бы снижение уровней экспрессии генов *AREG*, *PTGS2*, *SCD5*, *GREM*, *HAS2* в ооцитах с низкой компетентностью. Однако в нашем исследовании уровень экспрессии гена *AREG* был ниже в клетках кумулюса родивших пациенток, чем у здоровых доноров. У неродивших пациенток, напротив, уровень экспрессии *AREG* был достоверно выше, чем в клетках кумулюса ооцитов здоровых доноров. При этом у неродивших пациенток не наблюдалось повышения экспрессии всех остальных исследованных генов, несмотря на то, что некоторые из них (например, *HAS2*, *PTGS2*) располагаются ниже *AREG* в регуляторных каскадах и активируются вслед за ним [13, 21, 26]. По-видимому, есть некие оптимальные значения количества амфирегулина (*AREG*) в клетках, превышение которых является неблагоприятным фактором. Возможно, повышенное количество амфирегулина в клетках пациенток с первичным и вторичным бесплодием с неудачей оплодотворения связано с нарушением систем обратных связей — отсутствие усиления экспрессии нижележащих в каскаде генов приводит к патологическому нарастанию экспрессии амфирегулина. Последний же, в свою очередь, не может вызвать усиление их экспрессии. Также необходимо учитывать, что некоторые из исследованных генов (*HAS2*, *PTGS2*) в клетках кумулюса находятся под контролем дифференцирующего фактора роста 9 (*GDF9*), экспрессируемого в ооцитах, а также многих других факторов [28]. Например, экспрессия *HAS2* усиливается больше под воздействием ФСГ, чем под воздействием *AREG* [29]. Следует также учитывать различия в дизайне экспериментов: в ряде проведенных работ (особенно выполненных на животных) сравнивали между собой по показателю «наступление беременности» только ооциты здоровых доноров, в исследованиях на ооцитах человека часто сравнивают только ооциты пациенток. В исследовании анализировали ооциты и эмбрионы, полученные в ходе процедуры ICSI (введение сперматозоида в ооцит с помощью микроинъекции). Поэтому состояние компетентности ооцита может отличаться от ооцитов как доноров, так и пациенток стандартной процедуры ЭКО. При этом критерии оценки результата могут

различаться в разных исследованиях. В одних работах успешным исходом считается имплантация эмбриона, в других — завершение беременности родами. В некоторых исследованиях уровень мРНК *AREG* сопоставляется только с качеством эмбриона по принятым критериям его оценки.

Таким образом, из проанализированных пяти генов только ген *AREG* является потенциальным кандидатом на использование в качестве маркера в составе панели для оценки качества ооцита по клеткам кумулюса методом qPCR. Мы планируем продолжить поиск маркерных последовательностей, в том числе среди некодирующих последовательностей генома.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Финансирование / Funding

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 24-24-00533). / This work was financially supported by the Russian Science Foundation (Grantee № 24-24-00533).

Список литературы / References

1. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Dyer S, et al. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, Fertil Steril. 2017;108:393–406. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2017.06.005.
2. Njagi P, Groot W, Arsenijevic J, et al. Financial costs of assisted reproductive technology for patients in low- and middle-income countries: a systematic review. Hum Reprod Open. 2023; 2: hoad007. DOI: 10.1093/hropen/hoad007.
3. Adamian LV, Serov VN, Korsak VS, et al. Clinical recommendations: Assisted reproductive technologies and insemination. 2019. In Russian [Адамян Л.В., Серов В.Н., Корсак В.С., editors. Клинические рекомендации: Вспомогательные репродуктивные технологии и инсеминация. 2019].
4. Gardner DK, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts. Curr Opin Obstet Gynecol 1999; 11:3:307–11. DOI: 10.1097/00001703-199906000-00013.
5. Lemseffer Y, Terret ME, Campillo C, et al. Methods for Assessing Oocyte Quality: A Review of Literature. Biomedicines. 2022; 10:9:4–11. DOI: 10.3390/biomedicines10092184.
6. Sciorio R, Miranian D, Smith GD. Non-invasive oocyte quality assessment. Biol Reprod. 2022; 106:2:274–90. DOI: 10.1093/biolre/ioc009.
7. Shurygina OV, Bachurin AV, Bicheva NK, et al. Evaluation of oocytes and embryos in the ART laboratory. Methodological recommendations of the Russian Association of Human Reproduction. 2021. In Russian [Шурыгина О.В., Бачурин А.В., Бичева Н.К. и др. Оценка ооцитов и эмбрионов в лаборатории ВРТ. Методические рекомендации РАРЧ. 2021].
8. Kokkali G, Coticchio G, Bronet F, et al. ESHRE PGT Consortium and SIG Embryology good practice recommendations for polar body and embryo biopsy for PGT. Hum Reprod Open. 2020; 3: hoaa020. DOI: 10.1093/hropen/hoaa020.
9. Bromer JG, Seli E. Assessment of embryo viability in assisted reproductive technology: Shortcomings of current approaches and the emerging role of metabolomics. Curr Opin Obstet Gynecol. 2008; 20:3:234–41. DOI: 10.1097/GCO.0b013e3282fe723d.
10. Brower PT, Schultz RM. Intercellular communication between granulosa cells and mouse oocytes: Existence and possible nutritional role during oocyte growth. Dev Biol. 1982; 90:1:144–53. DOI: 10.1016/0012-1606(82)90219-6.
11. Uyar A, Torrealday S, Seli E. Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. Fertil Steril. 2013; 99:4: 979–97. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.01.129.
12. Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H, et al. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. Mol Reprod Dev. 2002;61:3:414–24. DOI: 10.1002/mrd.10102.
13. Feuerstein P, Cadoret V, Dalbies-Tran R, et al. Gene expression in human cumulus cells: One approach to oocyte competence. Hum Reprod. 2007;22:3069–77. DOI: 10.1093/humrep/dem336.
14. Fritzsche H, Michelmann HW, Siebzehnrübl, et al. Interactions between oocyte and surrounding cumulus cells influence the results of assisted reproduction. J Fur Reproduktionsmedizin Und Endokrinol. 2006; 3:373–8.
15. Feuerstein P, Puard V, Chevalier C, et al. Genomic assessment of human cumulus cell marker genes as predictors of oocyte developmental competence: Impact of various experimental factors. PLoS One. 2012; 7: e40449. DOI: 10.1371/journal.pone.0040449.
16. Ma Y, Jin J, Tong X, et al. ADAMTS1 and HSPG2 mRNA levels in cumulus cells are related to human oocyte quality and controlled ovarian hyperstimulation outcomes. J Assist Reprod Genet. 2020; 37:3: 657–67. DOI: 10.1007/s10815-019-01659-8.
17. McKenzie LJ, Pangas SA, Carson SA, et al. Human cumulus granulosa cell gene expression: A predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. Hum Reprod. 2004; 19:12:2869–74. DOI: 10.1093/humrep/deh535.
18. Kotova AV, Lobov AA, Dombrovskaya JA, et al. Comparative analysis of dental pulp and periodontal stem cells: Differences in morphology, functionality, osteogenic differentiation and proteome. Biomedicines. 2021; 9:11:1–26. DOI: 10.3390/biomedicines9111606.

19. Ajith A, Portik-Dobos V, Nguyen-Lefebvre AT, et al. HLA-G dimer targets Granzyme B pathway to prolong human renal allograft survival. *FASEB J.* 2019; 33:4:5220–36. DOI: 10.1096/fj.201802017R.

20. Mamo S, Gal AB, Polgar Z, et al. Expression profiles of the pluripotency marker gene POU5F1 and validation of reference genes in rabbit oocytes and preimplantation stage embryos. *BMC Mol Biol.* 2008; 9:1–13. DOI: 10.1186/1471-2199-9-67.

21. Assidi M, Dufort I, Ali A, et al. Identification of potential markers of oocyte competence expressed in bovine cumulus cells matured with follicle-stimulating hormone and/or phorbol myristate acetate in vitro. *Biol Reprod.* 2008; 79:2:209–22. DOI: 10.1095/biolreprod.108.067686.

22. Rogers-Broadway KR, Karteris E. Amplification efficiency and thermal stability of qPCR instrumentation: Current landscape and future perspectives. *Exp Ther Med.* 2015; 10:4:1261–4. DOI: 10.3892/etm.2015.2712.

23. Safronova NA, Kalinina EA, Donnikov AE, et al. Association of cumulus cell gene expression with embryological indicators in assisted reproductive technology programs. *Akush Ginekol (Sofia) = Obstetrics and gynecology.* 2016; 7:60–66. In Russian [Сафронова Н.А., Калинина Е.А., Донников А.Е. и др. Ассоциация экспрессии генов в кумулюсных клетках с эмбриологическими показателями в программах вспомогательных репродуктивных технологий. *Акушерство и гинекология.* 2016; 7: 60–66]. DOI: 10.18565/aig.2016.7.60-66.

24. Sirait B, Wiweko B, Jusuf AA, et al. Oocyte Competence Biomarkers Associated With Oocyte Maturation: A Review. *Front Cell Dev Biol.* 2021; 9:710292. DOI: 10.3389/fcell.2021.710292.

25. Haug LM, Wilson RC, Gaustad AH, et al. Cumulus Cell and Oocyte Gene Expression in Prepubertal Gilts and Sows Identifies Cumulus Cells as a Prime Informative Parameter of Oocyte Quality. *Biology (Basel).* 2023; 12:12:1484. DOI: 10.3390/biology12121484.

26. Choi Y, Wilson K, Hannon PR, et al. Coordinated regulation among progesterone, prostaglandins, and egf-like factors in human ovulatory follicles. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017; 102:6: 1971–82. DOI: 10.1210/jc.2016-3153.

27. Wathlet S, Adriaenssens T, Segers I, et al. Cumulus cell gene expression predicts better cleavage-stage embryo or blastocyst development and pregnancy for ICSI patients. *Hum Reprod.* 2011; 26:5: 1035–51. DOI: 10.1093/humrep/der036.

28. Faizal AM, Elias MH, Jin NM, et al. Unravelling the role of HAS2, GREM1, and PTGS2 gene expression in cumulus cells: implications for human oocyte development competency — a systematic review and integrated bioinformatic analysis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2024; 15: 1274376. DOI: 10.3389/fendo.2024.1274376.

29. Sugimura S, Ritter LJ, Sutton-McDowall ML, et al. Amphiregulin co-operates with bone morphogenetic protein

15 to increase bovine oocyte developmental competence: Effects on gap junction-mediated metabolite supply. *Mol Hum Reprod.* 2014; 20:6: 499–513. DOI: 10.1093/molehr/gau013.

Информация об авторах:

Башенджиева Екатерина Очировна, старший лаборант-исследователь лаборатории не кодирующей ДНК, ФГБУН «Институт цитологии» РАН;

Барашкова Екатерина Алексеевна, врач — акушер-гинеколог-репродуктолог, ООО «Клиника репродукции «Скайферт»;

Татищева Юлия Александровна, к.б.н., эмбриолог, заведующий эмбриологической лабораторией, ООО «Клиника репродукции «Скайферт»;

Калугина Алла Станиславовна, д.м.н., акушер-гинеколог-репродуктолог, профессор кафедры акушерства, гинекологии и неонатологии ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова Минздрава России, генеральный директор ООО «Клиника репродукции «Скайферт»;

Енукашвили Натэлла Иосифовна, к.б.н., заведующий лабораторией не кодирующей ДНК, ФГБУН «Институт цитологии» РАН.

The information about the authors:

Ekaterina O. Bashendjieva, senior research assistant, laboratory of the non-coding DNA study, Institute of Cytology RAS;

Ekaterina A. Barashkova, Obstetrician-gynecologist-reproductologist, Skyfert Assisted Reproductive Technologies Clinic;

Julia A. Tatishcheva, Ph.D., embryologist, head of the embryology laboratory at the Skyfert Assisted Reproductive Technologies Clinic;

Alla S. Kalugina, Doctor of Medical Sciences, obstetrician-gynecologist-reproductologist, Professor of the Department of Obstetrics, Gynecology and Neonatology of the Academician I. P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, General Director of the Skyfert Assisted Reproductive Technologies Clinic;

Natella I. Enukashvily, Ph.D., Head of the Laboratory of the non-coding DNA study, Institute of Cytology RAS.