

## Значение нарушения протеомного спектра фолликулярной жидкости в прогнозировании эффективности программ экстракорпорального оплодотворения у женщин с бесплодием

Ольга Сергеевна Золотых\*, Светлана Витальевна Ломтева,  
Карина Юрьевна Сагамонова

Центр репродукции человека и ЭКО, г. Ростов-на-Дону, Россия

### Реферат

DOI: 10.17816/KMJ2018-496

**Цель.** Изучить протеомный профиль фолликулярной жидкости у пациенток с бесплодием в программах вспомогательных репродуктивных технологий.

**Методы.** В исследование вошли женщины с бесплодием, включённые в программу вспомогательных репродуктивных технологий: 15 женщин, у которых экстракорпоральное оплодотворение завершилось наступлением беременности (первая группа), и 16 женщин с отрицательным исходом этой программы (вторая группа). Фракционирование образцов фолликулярной жидкости выполняли, используя наборы специальных магнитных микрочастиц. Протеомное профилирование проводили методом тандемной MALDI-масс-спектрометрии. Содержание антимюллерова гормона определяли методом иммуноферментного анализа.

**Результаты.** Установлены различия в выявляемости белков фолликулярной жидкости с различными регуляторными свойствами у пациенток первой и второй групп. При отрицательном исходе программы экстракорпорального оплодотворения в фолликулярной жидкости женщин была снижена экспрессия ряда белков, участвующих в процессах фолликулогенеза, овуляции, селекции доминантного фолликула, а также белков, необходимых для развития зиготы и бластоцисты. Повышенная экспрессия у женщин второй группы отмечена для белков, усиливающих протеолитические реакции, процессы апоптоза клеток, в том числе овоцитов, нарушающих позитивное действие активина и повреждающих структурно-функциональное состояние митохондрий. Обнаружена определённая зависимость между уровнем антимюллерова гормона и частотой обнаружения ряда белков, в частности протокадгерина-2а, цистатина С, бетагликана, простатической кислой фосфатазы, дермицидина.

**Вывод.** Выявленные изменения в протеомном профиле фолликулярной жидкости, очевидно, играют важную роль в молекулярных механизмах, определяющих эффективность программ вспомогательных репродуктивных технологий; идентифицированные дифференциально-экспрессирующиеся белки могут служить объективными маркерами прогнозирования исходов программы экстракорпорального оплодотворения.

**Ключевые слова:** ЭКО, протеомный анализ, фолликулярная жидкость, дифференциально-экспрессирующиеся белки.

### Significance of disorders of proteomic profile of follicular fluid for predicting the effectiveness of *in vitro* fertilisation in women with infertility

O.S. Zolotkyh, S.V. Lomteva, K.Yu. Sagamonova

The Center for Human Reproduction and IVF, Rostov-on-Don, Russia

**Aim.** To study the proteomic profile of follicular fluid in patients with infertility in assisted reproductive technology programs.

**Methods.** The study included women with infertility included in assisted reproductive technology programs: 15 women who had *in vitro* fertilisation which resulted in pregnancy (group 1) and 16 women with a negative result of this program (group 2). Fractionation of the follicular fluid samples was performed using the sets of special magnetic beads. Proteomic profiling was performed by tandem MALDI-mass-spectrometry. The anti-Müllerian hormone level was measured by ELISA.

**Results.** The study revealed differences in the detectability of follicular fluid proteins with different regulatory properties in patients of groups 1 and 2. With the negative outcome of *in vitro* fertilisation, expression of a number of proteins involved in the processes of folliculogenesis, ovulation, selection of the dominant follicle, as well as proteins necessary for the development of the zygote and blastula was reduced in females' follicular fluid. Increased expression in women from group 2 was registered for proteins enhancing proteolytic reactions, cell apoptosis, including oocytes, which disrupt the positive action of activin and damage structural and functional state of mitochondria. A definite relationship was found between the level of anti-Müllerian hormone and rate of detection of a number of proteins, in particular protocadherin-2a, cystatin C, betaglycan, prostatic acid phosphatase, and dermicidin.

**Conclusion.** The revealed changes in proteomic profile of the follicular fluid obviously play an important role in the molecular mechanisms that determine the effectiveness of assisted reproductive technologies; the identified differentially expressed proteins can serve as objective markers for predicting the outcomes of *in vitro* fertilisation.

**Keywords:** IVF, proteomic analysis, follicular fluid, differentially expressed proteins.

В последние годы отмечают несомненный рост числа женщин, длительное время страдающих бесплодием, у которых беременность наступила после экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). Благодаря успехам этого метода в мире родились более 7 млн детей, в России — более 160 тыс. [1]. Однако частота наступления беременности при ЭКО составляет 30–40%, что по-прежнему не удовлетворяет потребности репродуктологов в дальнейшем снижении количества бесплодных браков [2].

Трудности с достижением более высокого процента беременностей и рождения здоровых детей связаны прежде всего с разнообразием факторов, влияющих на результат имплантации [3]. Важно отметить, что развитие фолликулов в яичниках при индукции суперовуляции может сопровождаться атрезией части фолликулов или неполноценностью развития овоцитов, что, естественно, влияет на исход ЭКО [4, 5]. При этом возможны значительные изменения состава и физико-химических свойств фолликулярной жидкости, которые во многом определяют условия роста и созревания овоцитов.

По данным ряда авторов, большое значение в процессах оплодотворения яйцеклетки имеет её микроокружение: белки, липиды, гормоны, цитокины и другие биологически активные соединения фолликулярной жидкости [6]. Среди перечисленных компонентов фолликулярной жидкости ключевую роль играют белки, которые, реализуя информационную программу клеток, участвуют во всех процессах, происходящих на молекулярном уровне: регуляторных, пластических, рецепторных, ферментативных, про- и антиоксидантных и др. Исследования белков фолликулярной жидкости носят отрывочный характер и выполняются с привлечением недостаточно информативных методов [7, 8].

В настоящее время не вызывает сомнения то обстоятельство, что для наиболее успешного решения проблем репродуктивной медицины необходимо привлечение современных высокоинформативных технологий. К числу таких технологий относятся протеомные исследования, представляющие собой качественно новый этап в развитии системного изучения белковых молекул [9]. Применение протеомного анализа, направленного на изучение совокупности экспрессируемых геномом белков — протеома исследуемого биологического объекта, в частности фолликулярной жидкости,

позволяет выявлять специфические маркеры нарушения фолликулогенеза и прогнозировать неудачи результатов ЭКО.

В связи с вышеизложенным целью настоящей работы было изучение протеомного профиля фолликулярной жидкости у пациенток с бесплодием в программах ЭКО.

В исследование включены женщины репродуктивного возраста ( $n=31$ ) от 25 до 36 лет (средний возраст  $29,3 \pm 3,9$  года) с бесплодием различного генеза, получавшие лечение с использованием вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ). Обследованные пациентки были условно разделены на две группы. Первую группу составили обследуемые, у которых в результате программы ВРТ наступила беременность ( $n=15$ ). Во вторую группу были включены обследуемые с отсутствием эффекта от проводимого лечения с использованием методов ЭКО ( $n=16$ ).

Критериями включения пациенток в исследование были отсутствие беременности более 12 мес и уровень антимюллера гормона (АМГ):

- менее 1 нг/мл ( $n=11$ );
- от 1 до 10 нг/мл ( $n=10$ );
- более 10 нг/мл ( $n=10$ ).

Критериями исключения из исследования были перенесённые ранее оперативные вмешательства на одном или обоих яичниках (цистэктомии, клиновидные резекции яичников, овариэктомии).

Материалом для исследования служила фолликулярная жидкость. Образцы фолликулярной жидкости получали во время пункции доминантных фолликулов, достигших размера более 17 мм, в стимулированных в лечебных циклах ВРТ. Образцы помещали в пробирки и замораживали (при температуре  $-80^\circ\text{C}$ ) для последующего исследования.

Фракционирование образцов фолликулярной жидкости выполняли, используя наборы магнитных микрочастиц с обращённо-фазовой (MB-HIC C8), металл-аффинной (MB-IMAC Cu) и слабой катионообменной (MB-WCX) поверхностями по методике производителя (Bruker Daltonics, Германия).

Профилирование протеома сыворотки крови проводили на tandemном MALDI-TOF-масс-спектрометре Ultraflex II (Bruker Daltonics, Германия) с помощью программ FlexAnalysis 3.0 и ClinProTools 2.1. Идентификацию белков осуществляли с помощью программы Mascot Search (Matrix Science, США) в базе данных UniProt.

**Таблица 1.** Дифференциально-экспрессирующиеся белки, идентифицированные в фолликулярной жидкости женщин первой и второй групп

Название белка	№ в базе UniProt	Mm, Да	Первая группа (n=15)	Вторая группа (n=16)
Ангиотензиноген	P01019	53 154	↓	↑
Гистидин-содержащий гликопротеин	P04196	59 578	↓	↑
Дермицидин	P81605	11 284	↓	↑
Ингибитор 2 металлопротеиназы	P16035	24 399	↑	↓
Калсинтенин-1	O94985	109 793	↓	↑
Коллагеназа IV типа	P08253	73 882	↓	↑
ADAMTS-1	Q9UHI8	105 358	↑	↓
Пантетеиназа	O95497	57 012	↑	↓
Простатическая (фракция) кислая фосфатаза	P15309	44 566	↓	↑
Протокадгерин-2α	Q9Y5H9	102 063	↑	↓
Рецептор к макрофагальному колониестимулирующему фактору 1	P07333	107 984	↓	↑
Рецептор III типа к трансформирующему фактору роста-β	Q03167	93 499	↑	↓
Субъединица белка, связывающего инсулиноподобный фактор роста	P35858	66 035	↑	↓
α-Цепь ингибина	P05111	39 670	↓	↑
Цистатин С	P01034	15 799	↑	↓
Цитохром С	P99999	11 749	↓	↑

Примечание: Mm — молекулярная масса; «↑» — повышение экспрессии белка; «↓» — снижение экспрессии белка; \*достоверные различия между группами (p=0,023).

Содержание АМГ определяли методом иммуноферментного анализа, используя наборы фирмы «БекменКультер, Инк» США, АМГ Gen II ELISA.

Статистический анализ проводили с использованием непараметрического критерия  $\chi^2$  (программа Statistica 6.0). Межгрупповые различия считали достоверными при p=0,023.

В ходе протеомного анализа были выделены и идентифицированы белки с различными регуляторными функциями, отражающие особенности молекулярного профиля фолликулярной жидкости при разных исходах программы ЭКО:

- компоненты ренин-ангиотензиновой системы;
- белки, вовлечённые в процессы клеточной адгезии, протеолиза, апоптоза,

созревания фолликулов, состояния овоцит-кумулюсного комплекса;

- белки, влияющие на внутри- и межклеточные взаимодействия, обеспечивающие трансмембранный перенос лигандов, важных для эффективности оплодотворения.

Сопоставление белкового состава фолликулярной жидкости у женщин первой и второй групп выявило различную частоту обнаружения ряда белков. В табл. 1 приведены белки, экспрессия которых достоверно различается при разных исходах ЭКО (дифференциально-экспрессирующиеся белки/белки отличия).

В фолликулярной жидкости женщин, у которых после проведения ЭКО не наступила беременность, была снижена экспрессия цистатина С, белка ADAMTS-1, пантетеиназы, ингибитора 2 металло-

протеиназы, коагуляционного фактора X, протокадгерина-2 $\alpha$ , рецептора III типа к трансформирующему фактору роста- $\beta$  (ТФР- $\beta$ ), субъединицы белка, связывающего инсулиноподобный фактор роста (ИПФР).

*Цистатин С* — секретируемый белок, относящийся к семейству ингибиторов цистеиновых протеиназ [10]. Он регулирует активность катепсинов — лизосомальных цистеиновых протеиназ, которые также могут секретироваться из клеток и воздействовать на белки внеклеточного матрикса, в том числе и на те, которые поддерживают целостность стенки фолликула [11]. Кроме того, катепсины способны нарушать развитие овоцита, приводя к деструкции мембраны митохондрий и выходу в цитозоль митохондриальных компонентов, что влечёт за собой активацию апоптотического пути [12]. Сниженный уровень цистатина С в фолликулярной жидкости женщин, беременность у которых не наступила, отражает нарушение баланса в системе протеаза-ингибитор в сторону повышения активности протеолитических процессов.

*Протокадгерин-2 $\alpha$*  — кальций-зависимый трансмембранный гликопротеин, относящийся к молекулам клеточной адгезии, которые играют ключевую роль в регулировании взаимодействий клеток друг с другом и внеклеточным матриксом, в том числе в процессах оплодотворения, эмбриогенеза, имплантации, плацентации и эмбрионального развития [13]. Кадгерины экспрессируются на поверхности зрелых овулировавших яйцеклеток, обеспечивая контакт со сперматозоидом и образование оболочки оплодотворения. Они также необходимы для развития зиготы и бластулы [14]. Сниженный уровень экспрессии протокадгерина-2 $\alpha$  у женщин основной группы, учитывая особое значение молекул клеточной адгезии в процессах оплодотворения, можно рассматривать как один из механизмов, приводящих к отрицательным исходам при проведении ЭКО.

Не менее значимую роль, по-видимому, играет и снижение в фолликулярной жидкости пациенток второй группы экспрессии субъединицы ИПФР, связывающего белок. В последнее время установлено значение системы ИПФР в фолликулогенезе, селекции доминантного фолликула. Показано, что доминантный фолликул содержит ИПФР-1 в большей концентрации, чем недоминантные. Уровень этого фактора роста

положительно коррелирует как с содержанием эстрадиола и прогестерона, так и с объёмом фолликулярной жидкости. Высокие концентрации ИПФР-1 и ИПФР-2 усиливают воздействие фолликулостимулирующего гормона на клетки гранулёзы, а также индуцируют апоптоз [15]. Суммарный эффект этих факторов определяется состоянием сигнального пути, в который входят ИПФР-1 и -2, рецептор ИПФР I типа, а также белки, связывающие ИПФР, важным компонентом которых служит субъединица ИПФР, изменение выявляемости которой, как указано выше, отмечают при ненаступлении беременности после использования программы ЭКО.

*Рецептор III типа к ТФР- $\beta$ , или бетагликан*, не участвует непосредственно в трансдукции сигнала ТФР- $\beta$ . Он связывает различные члены надсемейства ТФР- $\beta$  на поверхности клетки, функционируя как резервуар этих лигандов. Экспрессия данного рецептора, наибольшую величину которой отмечают в клетках теки антральных и преовуляторных фолликулов, индуцируется эстрадиолом [16]. Бетагликан способствует связыванию ТФР- $\beta$  со своим рецептором II типа, а также ингибина с рецептором активина II типа. Данные свойства бетагликана свидетельствуют о его важной роли в контроле функции яичников для модуляции эффектов активина [17].

*ADAMTS-1* (A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motifs 1) — протеиназа, принадлежащая к семейству адамализинов, содержит дезинтегрированные и металлопротеиназоподобные домены. Экспрессия гена ADAMTS-1 индуцируется под действием лютеинизирующего гормона, хорионического гонадотропина человека и рецептора прогестерона в кумулюсных клетках преовуляторных фолликулов. Этот белок регулирует межклеточные взаимодействия, так как осуществляет протеолиз внеклеточных фрагментов белков клеточной адгезии и компонентов внеклеточного матрикса. ADAMTS-1 участвует также в структурном ремоделировании во время роста фолликулов, поддержании нормального слоя гранулёзных клеток в фолликулах и лимфангиогенезе [18].

Более высокое содержание этой протеиназы в фолликулярной жидкости выявлено у женщин первой группы. Полученные нами данные согласуются с результатами Y. Yung и соавт. [19], которые показали, что уменьшенный уровень экспрессии

ADAMTS-1 в кумулюсных клетках коррелирует с низким уровнем оплодотворения соответствующего овоцита при проведении ЭКО/интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в яйцеклетку. Поскольку ADAMTS-1 является белком, участвующим в процессах роста фолликула и овуляции, он может быть предложен в качестве потенциального маркера компетентности овоцитов и их способности к оплодотворению.

К числу белков, выявляемость которых у женщин второй группы, напротив, увеличилась, относятся ангиотензиноген, дермицидин, гистидин-содержащий гликопротеин, простатическая кислая фосфатаза,  $\alpha$ -цепь ингибина, коллагеназа IV, калситенин, рецептор 1 к макрофагальному колонизирующему фактору, цитохром C. Степень выявляемости белков в фолликулярной жидкости женщин, у которых программа ЭКО завершилась наступлением беременности, противоположна.

*Ангиотензиноген* — белок, являющийся частью ренин-ангиотензиновой системы, которая играет важную роль в процессах фолликулярного развития, стероидогенеза, созревания овоцитов, овуляции и атрезии фолликулов. Повышенное содержание ангиотензиногена в фолликулярной жидкости женщин второй группы, по-видимому, связано со снижением протеолитической активности ренина. Показано, что фолликулы с высоким уровнем ренина, отражающего локальную активность ренин-ангиотензиновой системы, обладают лучшим качеством овоцитов во время проведения программ ЭКО [20].

Ещё одной причиной повышения количества ангиотензиногена может быть уменьшение его использования для синтеза ангиотензиновых пептидов, в частности ангиотензина II, единственным предшественником которого он является. Ангиотензин II модулирует стероидогенез яичников и образование жёлтого тела, а также стимулирует процессы созревания овоцитов и овуляцию с помощью рецепторов на клетках гранулёзы [21]. Кроме того, этот пептид — основной фактор в регулировании функции атретических фолликулов [22].

Более высокий уровень ангиотензиногена в фолликулярной жидкости женщин второй группы, очевидно, отражает низкую активность ренин-ангиотензиновой системы в яичнике и, как следствие, может указывать на плохой исход в циклах ЭКО.

*Дермицидин* известен как протеолиз-индуцирующий фактор. Он активирует убиквитин-протеасомную систему, усиливая протеолиз и подавляя синтез белка *in vitro* и *in vivo*. Дермицидин также влияет на шеддинг (сход с поверхности клеток) синдеканов, относящихся к молекулам клеточной адгезии. В свою очередь синдеканы участвуют в регулировании клеточных функций гранулёзы, роста фолликула и созревании овоцита [23]. Модификация поверхности клетки и внеклеточного матрикса вследствие усиления протеолитических процессов под действием дермицидина, уровень которого был повышен в фолликулярной жидкости у женщин второй группы, также может быть одним из механизмов, приводящих к неудачным исходам циклов ЭКО.

Продуцируемая кумулюсными клетками  *$\alpha$ -субъединица ингибина* входит в состав как ингибина А, так и ингибина В. Свободная форма  *$\alpha$ -субъединицы* ингибирует потенциал развития овоцит-кумуляного комплекса. Ингибины и их свободные субъединицы играют разные паракринные роли в регуляции созревания фолликула и яйцеклетки. При этом  *$\alpha$ -субъединица* ингибирует связывание фолликулостимулирующего гормона со своим рецептором на кумулюсных клетках, тем самым уменьшая стимулирующее действие этого гонадотропина на созревание овоцит-кумуляного комплекса. Также установлено, что свободные  *$\alpha$ -субъединицы* препятствуют позитивному действию активина А на созревание овоцитов. Сверхэкспрессия этой субъединицы связана с плохим качеством эмбрионов: уровень мРНК<sup>1</sup>  *$\alpha$ -субъединицы* ингибина значительно ниже в фолликулах, из которых были получены более качественные эмбрионы.

Повышенное содержание свободной  *$\alpha$ -субъединицы* ингибина в фолликулярной жидкости женщин второй группы, очевидно, создаёт неблагоприятные условия для цитоплазматического и ядерного созревания овоцитов, препятствуя наступлению беременности в программах ВРТ.

Локализованный на внутренней мембране митохондрий гемсодержащий белок — *цитохром С* — участвует в энергетическом метаболизме клетки и контроле апоптоза. Высвобождение цитохрома С в цитоплазму вследствие повышения проницаемости митохондриальной мембраны под действием различных дестабилизирующих факторов

<sup>1</sup> Матричная рибонуклеиновая кислота.

(таких, как накопление активных форм кислорода или повреждение ДНК<sup>2</sup>) запускает каскад реакций с участием каспаз, приводящий к апоптозу клеток, в том числе и овоцитов.

Митохондрии — наиболее многочисленные органеллы в цитоплазме овоцита. Они поставляют аденозинтрифосфат для поддержания как функционирования самих овоцитов, так и дальнейших процессов оплодотворения и развития эмбрионов [24]. Это определяет важную роль структурно-функционального состояния митохондрий как критического показателя качества овоцитов [25]. Повышение уровня цитохрома С, сигнального маркера апоптоза, в фолликулярной жидкости пациенток второй группы подтверждает это положение в связи с отсутствием наступления беременности.

Влияние увеличения уровня *коллагеназы IV* заключается в усилении деструкции важного компонента эндотелия сосудов, и как следствие, ухудшения кровотока в ткани яичника.

Ещё один белок с повышенной экспрессией у женщин второй группы — *простатическая кислая фосфатаза*, которая обнаруживается не только в предстательной железе (где отмечают наиболее высокую её концентрацию), но и в фолликулярной жидкости, играет немаловажную роль в овуляции и оплодотворении. Этот лизосомальный фермент катализирует дефосфорилирование субстрата и модификацию его структуры. Оптимальный уровень данного фермента представляет собой важное, хотя и не единственное, условие для созревания яйцеклеток и напрямую связан с качеством полученного овоцита. Содержание кислой фосфатазы коррелирует со скоростью апоптоза кумулюсных клеток, которые в норме поддерживают ядерное созревание овоцитов до стадии метафазы II и ускоряют их цитоплазматическое созревание. В связи с этим не вызывает сомнения, что повышение уровня простатической кислой фосфатазы в фолликулярной жидкости женщин, беременность у которых не наступила в ходе цикла ЭКО, вносит наряду с другими, описанными выше модификациями протеомного спектра определённый вклад в нарушение процессов фолликулогенеза.

Нарушение экспрессии некоторых белков (гистидин-содержащего гликопротеина, ингибитора 2 матриксной метал-

лопротеиназы, калситенина 1, рецептора 1 к макрофагальному колониестимулирующему фактору), очевидно, непосредственно не влияет на результативность ЭКО, так как они не связаны с регуляцией фолликулогенеза или созреванием овоцитов. В то же время изменение их содержания, безусловно, отражается на состоянии метаболических процессов в яичниках.

Представляет интерес сопоставление экспрессии белков отличия в фолликулярной жидкости пациенток обеих групп с уровнем плазменного АМГ, который в настоящее время рассматривают как лучший маркер функциональной активности яичников и диагностический критерий сохранности фолликулярного резерва [26]. Однако, кроме фолликулярного запаса, на уровень АМГ, обычно определяемого в плазме крови, могут влиять чисто лабораторные факторы, такие как метод тестирования, калибровка, условия транспортировки и хранения крови [27]. Содержание АМГ зависит также от полиморфизма АМГ и его рецептора [28], длительного приёма некоторых лекарственных препаратов, этнической принадлежности [29] и других факторов. По этой причине точность оценки содержания АМГ отражается на диагностической и прогностической ценности, а именно в этом заключается основное значение его определения.

Что касается протеомного анализа, то наряду с выявлением белков-маркёров прогнозирования исходов программ ЭКО он позволяет выяснить молекулярные механизмы, приводящие к её эффективности или неэффективности.

Для определения взаимосвязи между протеомным спектром фолликулярной жидкости и содержанием АМГ в плазме крови пациентки обеих групп были распределены по трём подгруппам: в первой подгруппе уровень АМГ был менее 1 нг/мл, во второй — от 1 до 10 нг/мл, в третьей — более 10 нг/мл.

В зависимости от уровня АМГ в протеомном профиле фолликулярной жидкости установлены определённые закономерности. При нормальном содержании АМГ (1–10 нг/мл) наиболее выраженные отличия при разных исходах программ ЭКО обнаружены для следующих дифференциально-экспрессирующихся белков: ADAMTS-1, простатической кислой фосфатазы, бетагликана. При высоком уровне АМГ (>10 нг/мл) различия в выявляемости белков характерны для дермицидина, протокадгерина-2а,

<sup>2</sup> Дезоксирибонуклеиновая кислота.

цистатина С и цитохрома С. Низкая концентрация АМГ (<1 нг/мл) в большей степени сочетается с изменённой экспрессией субъединицы ИПФР, связывающего белок, и ангиотензиногена.

Важно отметить, что вышеперечисленные белки играют важную роль в фолликулогенезе, созревании овцита и могут служить информативными молекулярными маркерами прогнозирования исходов программы ЭКО.

Анализ приведённых данных свидетельствует о том, что различия в протеомном профиле фолликулярной жидкости пациенток первой и второй групп выявляются не только в зависимости от уровня АМГ, но и независимо от него. Это свидетельствует о более широком спектре белков, которые можно использовать в диагностических целях.

## ВЫВОДЫ

1. Результаты настоящей работы позволяют заключить, что исход программ вспомогательных репродуктивных технологий во многом зависит от особенностей протеомного состава фолликулярной жидкости. При отрицательных исходах программ экстракорпорального оплодотворения содержание ряда белков, необходимых для обеспечения процессов фолликулогенеза и созревания овцитов, снижается на фоне увеличения экспрессии белков, создающих неблагоприятные условия для созревания овцитов и обеспечения оплодотворения.

2. Полученные данные расширяют наши представления о молекулярных механизмах, обеспечивающих эффективность экстракорпорального оплодотворения.

3. Идентифицированные белки отличия могут служить объективными маркерами исходов экстракорпорального оплодотворения.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Паскарь С.С., Калугина А.С. Возможности и перспективы применения прогностических моделей в лечении бесплодия (обзор литературы). *Пробл. репродукции*. 2017; 23 (3): 8–11. [Paskar' S.S., Kalugina A.S. Perspectives and opportunities of prognostic models use in infertility treatment (a review). *Problemy reproduksii*. 2017; 23 (3): 8–11. (In Russ.)] DOI: 10.17116/repro20172338-11.

2. Назаренко Т.А., Мамедова Н.Р., Монахова И.В. и др. Принципы выбора препаратов для стимуляции яичников у пациенток программ ЭКО. *Пробл. репродукции*. 2012; 18 (3): 45–49. [Nazarenko T.A.,

Mamedova N.R., Monakhova I.V. et al. The choosing of gonadotropins for ovary stimulation in IVF programs. *Problemy reproduksii*. 2012; 18 (3): 45–49. (In Russ.)]

3. Войташевский К.В., Симоновская Х.Ю., Руднева О.Д. и др. Овариальный резерв и фертильность: сложности XXI века. Рациональный подход к сохранению репродуктивного резерва как залог фертильности и осознанного деторождения. М.: Status Praesens. 2015; 24 с. [Voytashevskiy K.V., Simonovskaya Kh.Yu., Rudneva O.D. et al. *Ovarial'nyy rezerv i fertil'nost': slozhnosti XXI veka. Ratsional'nyy podkhod k sokhraneniuyu reproduktivnogo rezerva kak zalog fertil'nosti i osoznannogo detorozhdeniya*. (Ovarian reserve and fertility: difficulties of 21st century. Rational approach to reproductive reserve maintenance as the pledge of fertility and conscious reproduction.) Moscow: Status Praesens. 2015; 24 p. (In Russ.)]

4. Красношока О.Е., Смольникова В.Ю., Калинина Е.А., Елагин В.В. Роль морфологической оценки овцита и эмбриона при использовании вспомогательных репродуктивных технологий (обзор литературы). *Пробл. репродукции*. 2015; 21 (1): 54–58. [Krasnoshoka O.E., Smol'nikova V.Yu., Kalinina E.A., Elagin V.V. The role of morphological evaluation of oocyte and embryo quality in ART programs (a review). *Problemy reproduksii*. 2015; 21 (1): 54–58. (In Russ.)] DOI: 10.17116/repro20152154-58.

5. Петров И.А., Дмитриева М.Л., Тихоновская О.А. и др. Тканевые и молекулярные основы фолликулогенеза. Старение яичников. *Пробл. репродукции*. 2017; 23 (4): 18–23. [Petrov I.A., Dmitrieva M.L., Tikhonovskaya O.A. et al. The tissue and molecular basis of folliculogenesis. The aging ovaries. *Problemy reproduksii*. 2017; 23 (4): 18–23. (In Russ.)] DOI: 10.17116/repro201723418-23.

6. Андреева Е.А., Хонина Н.А., Пасман Н.М. и др. Цитокины в регуляции овариального фолликулогенеза (обзор литературы). *Пробл. репродукции*. 2017; 23 (1): 8–14. [Andreeva E.A., Khonina N.A., Pasman N.M. et al. Cytokines in the regulation of ovarian folliculogenesis (a review). *Problemy reproduksii*. 2017; 23 (1): 8–14. (In Russ.)] DOI: 10.17116/repro20172318-14.

7. Маркина Л.А., Зорина Р.М., Зорина В.Н. Белки, цитокины и антигенспецифические иммунокомплексы фолликулярной жидкости и сыворотки крови у женщин при экстракорпоральном оплодотворении. *Вопр. акушерства, гинекол. и перинатол.* 2008; 7 (5): 29–32. [Markina L.A., Zorina R.M., Zorina V.N. Proteins, cytokines and antigen-specific immunocomplexes of follicular fluid and blood serum in women in *in vitro* fertilisation. *Voprosy akusherstva, ginekologii i perinatologii*. 2008; 7 (5): 29–32. (In Russ.)]

8. Герилевич Л.А., Салмина А.Б., Егорова А.Т. и др. Роль маркеров ангиогенеза у пациенток с различными формами бесплодия в программах вспомогательных репродуктивных технологий. *Пробл. репродукции*. 2013; (5): 60–63. [Gerilovich L.A., Salmina A.B., Egorova A.T. et al. The role of angiogenesis markers in assisted reproductive technology programs in patients with different forms of infertility. *Problemy reproduksii*. 2013; (5): 60–63. (In Russ.)]

9. Говорун В.М., Иванов В.Т. Протеомика и пептидомика в фундаментальных и прикладных медицинских исследованиях. *Биоорганич. химия*. 2011; (2): 199–215. [Govorun V.M., Ivanov V.T. Proteomics and peptidomics in fundamental and applied

- medical studies. *Bioorganicheskaya khimiya*. 2011; (2): 199–215. (In Russ.)]
10. Baston-Buest D.M., Schanz A., Buest S. et al. The embryo's cystatin C and F expression functions as a protective mechanism against the maternal proteinase cathepsin S in mice. *Reproduction*. 2010; 139 (4): 741–748. DOI: 10.1530/REP-09-0381.
11. Robker R.L., Russell D.L., Espey L.L. et al. Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000; 97 (9): 4689–4694. DOI: 10.1073/pnas.080073497.
12. Balboul A.Z., Yamanaka K., Sakatani M. et al. Cathepsin B activity has a crucial role in the developmental competence of bovine cumulus-oocyte complexes exposed to heat shock during *in vitro* maturation. *Reproduction*. 2013; 146 (4): 407–417. DOI: 10.1530/REP-13-0179.
13. Hayashi S., Takeichi M. Emerging roles of protocadherins: from self-avoidance to enhancement of motility. *J. Cell. Sci.* 2015; 128 (8): 1455–1464. DOI: 10.1242/jcs.166306.
14. Simopoulou M., Nikolopoulou E., Dimakakos A. et al. Cell adhesion molecules and *in vitro* fertilization. *In Vivo*. 2014; 28 (5): 683–690. PMID: 25189878.
15. Silva J.R., Figueiredo J.R., van den Hurk R. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Theriogenology*. 2009; 71 (8): 1193–1208. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2008.12.015.
16. Juengel J.L., McNatty K.P. The role of proteins of the transforming growth factor-beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. *Hum. Reprod. Update*. 2005; 11 (2): 143–160. DOI: 10.1093/humupd/dmh061.
17. Omori Y., Nakamura K., Yamashita S. et al. Effect of follicle-stimulating hormone and estrogen on the expression of betaglycan messenger ribonucleic acid levels in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*. 2005; 146 (8): 3379–3386. DOI: 10.1210/en.2004-1665.
18. Doyle K.M., Russell D.L., Sriraman V., Richards J.S. Coordinate transcription of the ADAMTS-1 gene by luteinizing hormone and progesterone receptor. *Mol. Endocrinol.* 2004; 18 (10): 2463–2478. DOI: 10.1210/me.2003-0380.
19. Yung Y., Maman E., Konopnicki S. et al. ADAMTS-1: a new human ovulatory gene and a cumulus marker for fertilization capacity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2010; 328 (1–2): 104–108. DOI: 10.1016/j.mce.2010.07.019.
20. Herr D., Bekes I., Wulff C. Local renin-angiotensin system in the reproductive system. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2013; 4: 150. DOI: 10.3389/fendo.2013.00150.
21. Portela V.M., Zamberlam G., Gonçalves P.B. et al. Role of angiotensin II in the periovulatory epidermal growth factor-like cascade in bovine granulosa cells *in vitro*. *Biol. Reprod.* 2011; 85 (6): 1167–1174. DOI: 10.1095/biolreprod.111.094193.
22. Palumbo A., Ávila J., Naftolin F. The Ovarian Renin-Angiotensin System (OVRAS): A major factor in ovarian function and disease. *Reprod. Sci.* 2016; 23 (12): 1644–1655.
23. Colombe S., Houllier L., Fleurot E. et al. Syndecan 1 represses cell growth and FSH responsiveness in human granulosa cells. *Reproduction*. 2017; 153 (6): 797–808. DOI: 10.1530/REP-17-0074.
24. Wang L.Y., Wang D.H., Zou X.Y., Xu C.M. Mitochondrial functions on oocytes and preimplantation embryos. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*. 2009; 10 (7): 483–492. DOI: 10.1631/jzus.B0820379.
25. Schatten H., Sun Q.Y., Prather R. The impact of mitochondrial function/dysfunction on IVF and new treatment possibilities for infertility. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2014; 12: 111. DOI: 10.1186/1477-7827-12-111.
26. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Endometriosis and infertility: a committee opinion. *Fertil. Steril.* 2012; 98 (3): 591–598. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.05.031.
27. Rustamov O., Smith A., Roberts S.A. et al. Anti-Müllerian hormone: poor assay reproducibility in a large cohort of subjects suggests sample instability. *Hum. Reprod.* 2012; 27: 3085–3091. DOI: 10.1093/humrep/des260.
28. Kevenaar M.E., Themmen A.P., Laven J.S. et al. Anti-Müllerian hormone and anti-Müllerian hormone type II receptor polymorphisms are associated with follicular phase estradiol levels in normo-ovulatory women. *Hum. Reprod.* 2007; 22 (6): 1547–1554. DOI: 10.1093/humrep/dem036.
29. Dölleman M., Verschuren W.M., Eijkemans M.J. et al. Reproductive and lifestyle determinants of anti-Müllerian hormone in a large population-based study. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 2013; 98 (5): 2106–2115. DOI: 10.1210/jc.2012-3995.