
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

**ВЛИЯНИЕ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ ГРАНУЛОЦИТАРНОГО
КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ,
АССОЦИРОВАННЫХ С ХРОНИЧЕСКИМ ЭНДОМЕТРИТОМ**

© 2025 г. Ю. Р. Рыжов^{1,*}, К. В. Объедкова¹, В. В. Халенко¹, А. М. Гзгян¹,
Н. И. Тапильская¹

¹НИИ Акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта,
Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: julian.ryzhov@gmail.com

Поступила в редакцию 09.07.2025 г.

После доработки 09.08.2025 г.

Принята к публикации 10.08.2025 г.

Классической функцией гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) является регуляция роста и дифференцировки нейтрофилов, однако при этом Г-КСФ играет важную роль в процессах фолликулогенеза, эмбриогенеза, имплантации и инвазии трофобlasta, что формирует большой интерес к его применению в программах вспомогательных репродуктивных технологий. Установлено, что внутриматочное введение Г-КСФ в протоколах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) у пациенток с хроническим эндометритом и повторными неудачами имплантации повышает частоту наступления беременности, однако задействованные патогенетические механизмы его воздействия требуют дальнейшего изучения. Нами разработана липосомальная форма Г-КСФ, характеризующаяся большей биодоступностью при внутриматочном введении в сравнении с водным раствором Г-КСФ. В исследовании участвовали 22 пациентки с бесплодием, гипопластичным эндометрием и повторными неудачами протоколов ВРТ, пациентки на протяжении 6 месяцев получали терапию хронического эндометрита путем внутриматочного введения липосомальной формы Г-КСФ с частотой 2 раза в неделю. С помощью ПЦР в реальном времени определяли экспрессию генов *TVP23A*, *IL10*, *TGF-β1* в биоптатах эндометрия до и спустя 6 месяцев лечения с помощью липосомальной формы Г-КСФ. Терапия липосомальной формой Г-КСФ достоверно снижала экспрессию гена *TVP23A* ($p < 0.001$), а также повышала экспрессию генов *IL10* ($p < 0.001$) и *TGF-β1* ($p < 0.001$) в эндометрии. Отмечалось достоверное ($p < 0.001$) увеличение толщины эндометрия (М-эха) с 5.6 ± 0.6 до 6.8 ± 0.8 мм. Полученные данные демонстрируют, что терапия хронического эндометрита с помощью внутриматочного введения липосомальной формы Г-КСФ в течение 6 месяцев нормализует экспрессию ряда генов, ассоциированных с хроническим воспалением эндометрия.

Ключевые слова: гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, хронический эндометрит, вспомогательные репродуктивные технологии, экстракорпоральное оплодотворение, бесплодие

DOI: 10.7868/S2658655X25120059

ВВЕДЕНИЕ

Хронический эндометрит (ХЭ) характеризуется фиброзом, фибропластической трансформацией, мононуклеарной инфильтрацией, очаговой гиперплазией эндометрия, которые определяются на гистологических срезах с помощью стандартной окраски гематоксилином и эозином [1], и может приводить к формированию гипопластического эндометрия, который характеризуется максимальной толщиной менее 7 мм. По результатам метаанализа, включающего 4145 пациенток, показано, что наличие ХЭ достоверно снижает частоту наступления клинической беременности и живорождения в протоколах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) [2]. При этом определяющую роль имеет не столько наличие ХЭ, сколько степень его выраженности, для оценки которой в дополнение к стандартной окраске гистологических срезов гематоксилином и эозином используют иммуногистохимический метод – определение наличия лимфоцитов, экспрессирующих на поверхности клеток трансмембранный гепарансульфатпротеогликан CD138. Показано, что пациентки с выраженным ХЭ имели меньшую частоту наступления клинической беременности и живорождения в протоколах ВРТ в сравнении с пациентками с легкой степенью хронического эндометрита. В то же время легкая степень ХЭ не оказывала воздействия на исходы ЭКО [2].

Использование иммуногистохимического исследования с определением числа CD138 в поле зрения для диагностики и оценки выраженности ХЭ является основным способом диагностики ХЭ, однако общепризнанные референсные значения их количества как для определения наличия ХЭ, так и для оценки степени его выраженности отсутствуют. К тому же CD138 экспрессируется не только плазмоцитами [3], сама плазмоцитарная инфильтрация зависит от дня менструального цикла [4], а при фиброзе стромы, развивающемся после воспаления, CD138 могут вовсе не определяться, что в совокупности служит причиной противоречивости результатов, полученных разными научными группами [5], и формирует необходимость проведения дальнейших исследований, направленных на разработку критериев наличия ХЭ и определения степени его выраженности. Перспективной является разработка диагностических панелей генов (*TVP23A*, *IL10*, *TGF- β 1*), ассоциированных с пролиферацией, воспалением и внутриклеточным метаболизмом, экспрессия которых может меняться в условиях хронического воспаления эндометрия [6, 7].

Гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ) представляет собой цитокин, секретируемый большим спектром клеток, среди которых мононуклеары, фибробласты, NK-клетки, клетки костного мозга, классической функцией которого является стимуляция пролиферации и дифференцировки нейтрофилов в костном мозге. Однако поступает все больше данных в пользу того, что Г-КСФ играет важную роль в процессах фолликулогенеза, эмбриогенеза, имплантации и инвазии трофобласта [8, 9]. В связи с этим использование Г-КСФ в протоколах ВРТ вызывает большой интерес многих научных групп – по данным последних метаанализов [10, 11] внутриматочное введение Г-КСФ повышает частоту наступления беременности в протоколах ВРТ у пациенток с повторными неудачами имплантации и синдромом тонкого эндометрия – состояниями, ассоциированными с ХЭ [12].

Целью данной работы являлось изучение экспрессии генов *TVP23A*, *IL10*, *TGF- β 1*, ассоциированных с хроническим эндометритом, у пациенток с повторными неудачами протоколов ЭКО и гипопластичным эндометрием до и спустя 6 месяцев терапии липосомальной формой Г-КСФ.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Общий дизайн исследования

С марта 2024 по апрель 2025 г. включительно проведено пилотное лонгитудинальное исследование по оценке влияния липосомальной формы Г-КСФ на экспрессию в эндометрии генов: транс-везикулярного белка сети Гольджи 23А (*TVP23A*), интерлейкина 10 типа (*IL10*) и трансформирующего фактора роста бета-1 (*TGF-β1*) при лечении ХЭ. В исследовании участвовали 22 пациентки репродуктивного возраста, соответствующие критериям включения и не имеющие критерии невключения.

Всем пациенткам проводилось внутриматочное введение специально разработанной липосомальной формы Г-КСФ два раза в неделю на протяжении 6 месяцев с помощью стандартного инсеминационного катетера. В период менструации введение лекарственного препарата производилось со смещением процедуры визита до или после менструации.

Критерии включения:

- бесплодие;
- возраст от 25 до 36 лет на момент включения в исследования;
- диагноз ХЭ, установленный на основании гистологического и ИГХ-исследования [1];
- максимальная толщина эндометрия в двух последующих циклах ≤ 7 мм по данным ультразвукового исследования;
- две и более неудачные попытки ЭКО или ЭКО/ИКСИ при условии переноса эмбриона качества ЗВВ и выше по классификации Гарднера [13];
- подписание письменного информированного согласия на участие в исследовании.

Критерии невключения:

- наличие злокачественных новообразований, в том числе и в анамнезе;
- нарушения углеводного обмена;
- индекс массы тела более 34.9 кг/м² в момент включения в исследование;
- любое состояние организма, которое по заключению исследователя может повлиять на прохождение процедур протокола и других мероприятий в рамках исследования;
- низкая комплаентность пациентки.

Критерии исключения:

- наступление беременности в период лечения;
- наличие любого значимого клинического события, которое способно отразиться на данных исследования;
- отзыв добровольного информированного согласия.

Липосомальная форма Г-КСФ

Лиофилизированный Г-КСФ был предоставлен ООО “Научно-технологический центр “БиоИнвест” (Москва, Россия). В исследовании использовались следующие реагенты: соевый фосфатидилхолин Lipoid S-100 (Lipoid, Германия, CAS: 97281-47-5, состав жирных кислот: пальмитиновая кислота – 15%; стеариновая кислота – 3%; олеиновая кислота – 12%; линолевая кислота – 62%; линоленовая кислота – 5%), хлороформ (ХЧ, Химмед, Россия), натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы с молекулярной массой Mw ~ 250 000, степенью замещения 0.7 (Na-КМЦ, Sigma-Aldrich, Германия,

CAS: 9004-32-4), гиалуронат натрия высокомолекулярный (Shanxi Delta Biotech Co., Китай, CAS: 9067-32-7), глицерин (Glaconchemie, Германия) и фосфатно-солевой буфер (PBS, ООО “Росмедбио”, Санкт-Петербург, Россия).

Получение липосомальной формы гранулоцитарного колониестимулирующего фактора

Липосомы готовили методом тонкопленочной гидратации [14]. Вкратце, раствор фосфатидилхолина (50 мг/мл) в хлороформе упаривали при температуре 30 ± 2 °C под давлением 43 ± 2 мбар (Hei-Vap Advantage ML/G3B, Heidolph, Германия) для получения тонкой сухой пленки. После этого тонкую сухую пленку высушивали в условиях высокого вакуума (23 ± 2 мбар) до достижения постоянного веса. Для приготовления суспензии липосом, нагруженных Г-КСФ, с концентрацией фосфолипидов 50 мг/мл липидную пленку диспергировали в PBS, содержащем Г-КСФ (0.5 мг/мл, pH 7.4), путем непрерывного перемешивания в течение 30 мин до полного диспергирования тонкой липидной пленки. Для получения липосом однородной формы дисперсия подвергалась пяти циклам замораживания–оттаивания и обрабатывалась ультразвуком с использованием ультразвуковой ванны (3DT, Stegler, Россия) в течение 10 мин (40 кГц, 3 раза). Метод замораживания–оттаивания включал быстрое замораживание путем погружения колбы в жидкий азот на 2 мин с последующим медленным оттаиванием, которое проводилось путем погружения и осторожного встряхивания пробирки в водяной бане при температуре 30 ± 2 °C в течение 2 мин. Последним этапом получения липосом была мембранный фильтрация через стерилизующий фильтр с размером пор 0.22 мкм (мембрана Express® PLUS PES GPWP02500, Merck Millipore, США).

Получение нанокомпозитного гидрогеля

Общий объем дистиллированной воды (83.5 г) условно делили на две части. Натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ) предварительно подвергали термообработке при температуре 120 ± 2 °C в течение 10 мин в сушильном шкафу. Затем термообработанный Na-КМЦ (1.5 г) равномерно распределяли тонким слоем по поверхности одной части воды дистиллированной и оставляли на 2 ч для набухания. Параллельно натриевую соль гиалуроновой кислоты с высоким молекулярным весом (1.0 г) растворяли в оставшемся объеме дистиллированной воды при постоянном перемешивании на верхнеприводной мешалке Hei-TORQUE 400 (Heidolph, Германия) в течение 2 ч в атмосфере азота. После полного набухания Na-КМЦ добавляли глицерин (2.0 г) и приготовленный ранее гиалуроновый гель при постоянном перемешивании до образования однородной гелевой массы. Полученную гелевую основу термостатировали на водяной бане при температуре 60 ± 2 °C в течение 2 ч. После стерилизации основы в асептических условиях при постоянном перемешивании на магнитной мешалке Intelli-Stirrer MSH-300i (Biosan, Латвия) к гелевой основе добавляли липосомальную форму Г-КСФ (12.0 г). Затем полученный нанокомпозитный гидрогель подвергали ультразвуковой обработке в течение 10 мин для обеспечения равномерного распределения компонентов по всему объему. Таким образом был получен нанокомпозитный гидрогель с липосомальной формой Г-КСФ с концентрацией Г-КСФ ~90 мкг (9 млн. ЕД) в 1.0 мл.

Полученный нанокомпозитный гидрогель с липосомальной формой Г-КСФ представлял собой однородную массу молочного цвета, который остается стабильным при сроке хранения в течение 3 месяцев при температуре 5 ± 3 °C. Его физико-химические свойства: pH 10%-ной водной суспензии – 7.2 ± 0.2 ; вязкость при температуре 23 ± 2 °C, скорости сдвига 7.5 ± 0.1 с⁻¹ и скорости шпинделя (SC4-29) 30 об/мин – 13.7 ± 2.1 Па·с (Brookfield RVDV-II+Pro, Brookfield Engineering Laboratories, Германия).

Биопсия эндометрия

Аспирационную биопсию эндометрия выполняли с помощью Пайпель-зонда (“Цзянсу Яда Технолоджи Групп Ко., Лтд”, Китай) на 19–21-й день менструального цикла до начала терапии липосомальной формой Г-КСФ, а также спустя 6 месяцев после терапии. Полученные биоптаты эндометрия замораживали при температуре -80°C . Диагностика хронического эндометрита проводилась в отделе патоморфологии НИИ Акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта с использованием гистологического и иммуногистохимического методов.

Праймеры для ПЦР

Праймеры к последовательностям генов интереса подбирали с помощью программы Primer3 и/или на основе данных библиотеки праймеров UGENE. Праймеры для идентификации мРНК исследуемых генов (табл. 1) синтезировали на твердофазном олигонуклеотидном автоматическом ДНК/РНК синтезаторе Spectronika H-28 (K&A Laborgeraete, Германия) 4-стадийным фосфорамидитным методом синтеза на пористом стекле (CPG). Очистку синтезированных праймеров осуществляли на гель-фильтрующей системе P-8 (K&A Laborgeraete, Германия).

Таблица 1. Последовательности праймеров для ПЦР

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер
<i>TVP23A</i>	5'-GCAACAGTGACATTGGCAAG-3'	5'-GAATCTCCAGCCCCCTGAG-3'
<i>IL10</i>	5'-GACTTTAAGGGTTACCTGGGTTG-3'	5'-TCACATGCGCCTTGATGTCTG-3'
<i>TGF-β1</i>	5'-AGATCCCTCCAAAATCAAGTGG-3	5'-GGCAGAGATGATGACCCTTTT-3'
<i>GAPDH</i>	5'-AGACAGCCGCATCTTCTTGT-3'	5'-TACTGAGATGGGTGCCGTT-3'
<i>ACTB</i>	5'-CCAACTGGGACGACATGG-3'	5'-GGGCACAGTGTGGGTGAC-3'

TVP23A – трансвезикулярный белок сети Гольджи 23а, *IL10* – интерлейкин 10-го типа, *TGF- β 1* – трансформирующий фактор роста бета-1, *GAPDH* – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, *ACTB* – актин-бета.

Обратная транскрипция с ПЦР в режиме реального времени (OT-ПЦР-PB)

Выделение тотальной фракции нукleinовых кислот из тканей эндометрия проводили по стандартному протоколу экстракции. Для экстракции мРНК использовали соответствующие тест-системы (7E303H9, Vazyme, Китай). Концентрацию выделенной мРНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, США).

мРНК была транскрибирована в кДНК с помощью набора обратной транскрипции (Vazyme, R232-01, Китай). Полученные в результате обратной транскрипции образцы кДНК использовали для проведения реакций ПЦР в реальном времени (циклер CFX384 Touch, Biorad-Laboratories, США) с использованием флуоресцентного количественного ПЦР-инструмента Agilent Real-time (AriaMx) и SYBR Green (New England Biolabs, e30051, США). Амплификацию выполняли на приборе ДТ-Прайм (ДНК-Технология, Россия). Реакцию производили с трехкратным повтором каждой пробы с обязательным присутствием отрицательных контролей. Относительная экспрессия генов была рассчитана с использованием метода $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. Так как количество материала в биоптатах было отличным друг от друга, для оценки экспрессии генов использовали алгоритм *post hoc* со-поставления относительных величин экспрессии генов с идентификацией/значимостью

количества мРНК, усредненному по уровням мРНК референсных генов домашнего хозяйства: β -актина (ACTB) и глициеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH), – выраженному в виде десятичного логарифма от количества копий мРНК в мл.

Статистический анализ

Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилка. При $p > 0.05$ считали, что данные распределены нормально.

Количественные данные представлены в виде среднее \pm стандартная ошибка. Достоверность различий по количественным признакам оценивали с помощью критерия Манна–Уитни. При $p < 0.05$ считали, что между выборками есть статистически значимые различия.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Социально-демографическая характеристика пациенток, участвующих в исследовании, а также данные объективного статуса и акушерско-гинекологического анамнеза представлены в табл. 2. Участвующие в исследовании пациентки преимущественно имели высшее образование, нормальную массу тела и отсутствие артифициальныхabortов в анамнезе.

Таблица 2. Социально-демографические данные и особенности анамнеза и объективного статуса обследованных пациенток

Возраст, лет	29.9 \pm 0.6	
Индекс массы тела		
18.5–24.0 кг/м ²	16	(72.7%)
25–29.9 кг/м ²	5	(22.7%)
30.0–34.9 кг/м ²	1	(4.6%)
Курение		
Да	13	(59.1%)
Нет	9	(40.9%)
Длительность бесплодия, лет		3.7 \pm 2.2
Число неудачных попыток ЭКО в анамнезе		3.6 \pm 1.7
Беременность в анамнезе		
не было	10	(45.5%)
1 и более	12	(54.5%)
Роды в анамнезе		
не было	14	(63.6%)
1 и более	8	(36.4%)
Артифициальные abortы в анамнезе		
не было	19	(86.4%)
1 и более	3	(13.6%)
Полипэктомия в анамнезе		
не было	9	(40.9%)
1 и более	13	(59.1%)

После 6 месяцев терапии липосомальной формой Г-КСФ отмечалось достоверное ($p < 0.001$) увеличение М-эха с 5.6 ± 0.6 до 6.8 ± 0.8 мм. Минимальные-максимальные значения величины М-эха до и после лечения составили 4.2–6.6 мм и 4.9–8.1 мм соответственно. В результате проведенного лечения у 11 пациенток (50%) зарегистрировались значения М-эха ≥ 7.0 мм (рис. 1).

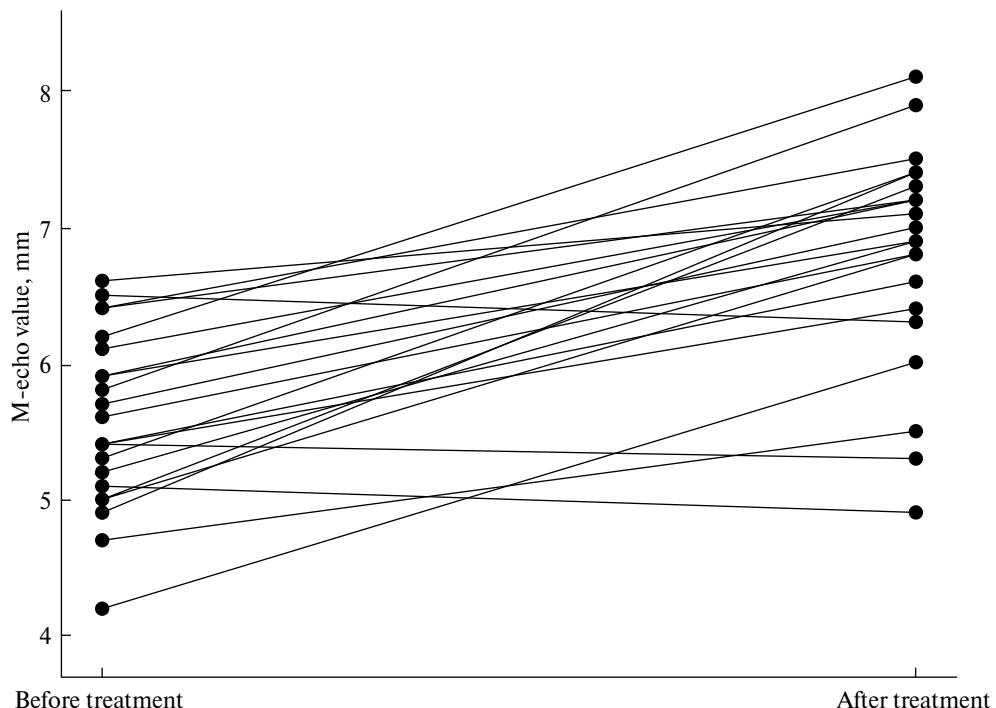


Рис. 1. Изменение величины М-эха после лечения липосомальной формой гранулоцитарного колониести-мулирующего фактора.

При анализе уровней экспрессии исследуемых генов с поправкой по среднему геометрическому референсных генов до и после лечения ХЭ были установлены достоверные различия в уровнях экспрессии по всем трем исследуемым генам – *TVP23A*, *IL10* и *TGF-β1* (рис. 2). В результате лечения липосомальной формой Г-КСФ отмечалось достоверное снижение экспрессии *TVP23A* (1.86 ± 0.43 против 0.88 ± 0.23 ; $U = 19$, $z = 5.22$, $p < 0.001$), а также увеличение экспрессии *IL10* (1.09 ± 0.19 против 1.49 ± 0.34 ; $U = 62.5$, $z = -4.20$, $p < 0.001$) и *TGF-β1* (0.77 ± 0.30 против 1.14 ± 0.23 ; $U = 83$, $z = -3.72$, $p = 0.002$) в эндометрии.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В представленной работе в эндометрии пациенток с ХЭ до и спустя 6 месяцев после терапии липосомальной формой Г-КСФ изучалась экспрессия генов *TVP23A*, *IL10* и *TGF-β1*, ассоциированных с пролиферацией, воспалением и внутриклеточным метаболизмом. Отличительной особенностью проведенной работы по изучению влияния липосомальной формы Г-КСФ на течение ХЭ является его продолжительность,

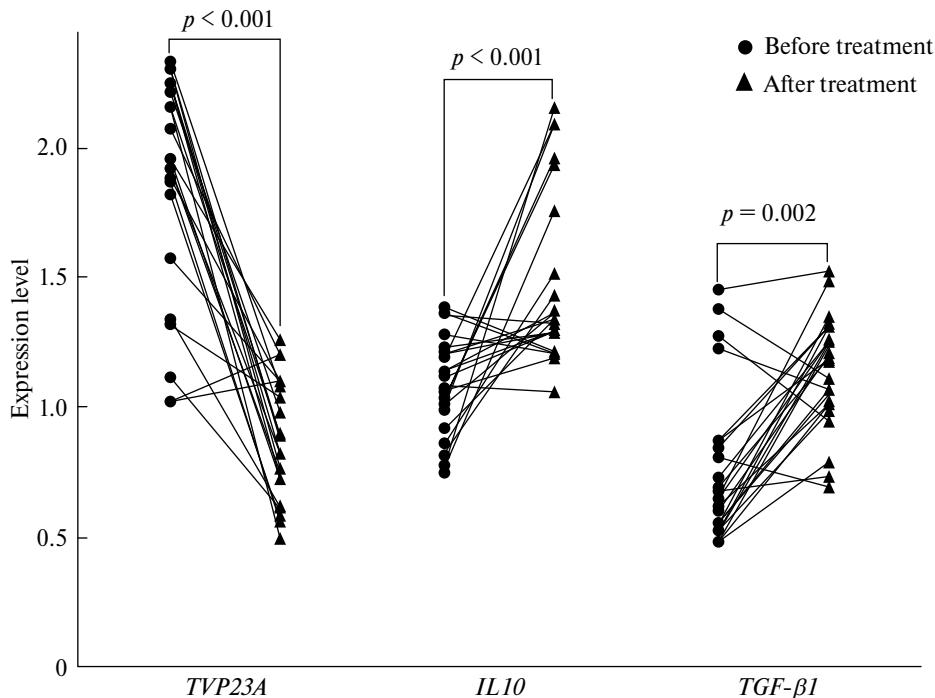


Рис. 2. Уровни мРНК исследуемых генов в биоптате эндометрия до и после терапии Г-КСФ. Данные представлены в виде уровней мРНК (log-трансформированное количество копий на 1 мл) с поправкой по среднему геометрическому референсных генов.

поскольку нередко добиться регенерации поврежденного эндометрия при использовании коротких курсов лечения не удается. При внутриматочном введении растворов лекарственных препаратов в силу анатомических свойств и их фармакокинетики трудно добиться достаточного воздействия препарата на эндометрий, что диктует необходимость разработки и применения разнообразных скаффолдов и гелевых форм препаратов, способствующих увеличению экспозиции препарата [15].

Трансвезикулярный белок сети Гольджи 23А (*TVP23A*) кодируется геном *TVP23A*, расположенным на коротком плече 16-й хромосомы, и, вероятно, вовлечен в систему внутриклеточного везикулярного транспорта и метаболизма аминокислот [16]. Экспрессия *TVP23A* обнаружена во многих тканях [17]. Большой интерес ген *TVP23A* представляет в контексте этиопатогенеза болезни Паркинсона, являясь одним из генов-кандидатов ее развития [18]. В работе [6] показано, что при гистологически и иммуно-гистохимически верифицированном ХЭ отмечается более высокий уровень экспрессии гена *TVP23A* в эндометрии в сравнении с пациентками без ХЭ. При этом уровень экспрессии *TVP23A* не коррелировал с количеством CD138 в поле зрения, что делает экспрессию гена *TVP23A* самостоятельным маркером ХЭ. В нашем исследовании было установлено, что экспрессия *TVP23A* в эндометрии снижается после терапии липосомальной формой Г-КСФ, это может являться признаком уменьшения интенсивности воспаления при ХЭ.

Ген *IL10* кодирует первичную структуру IL-10 – одного из основных противовоспалительных цитокинов. Этот цитокин секретируется множеством лейкоцитов: CD4 и CD8 Т-лимфоцитами, макрофагами, моноцитами, нейтрофилами, NK-клетками,

а также В-лимфоцитами [19]. Основной противовоспалительный эффект IL-10 реализуется посредством специфического связывания IL-10 с рецептором IL-10R и активации сигнального каскада JAK1-TYK2-STAT3, который приводит к фосфорилированию и активации транскрипционного фактора STAT3, его транслокации в ядро и реализации регуляторного влияния на транскрипцию большого спектра белков с про- и противовоспалительными эффектами. Помимо активации STAT3, IL-10 способен проявлять свою противовоспалительную активность посредством регуляторного воздействия на активность транскрипционного фактора STAT1, интегрального энергетического сенсора клетки AMPK, а также mTORC и PI3K/Akt-пути.

Помимо классической противовоспалительной активности также описана нейропротективная роль IL-10 при нейровоспалении, вовлечение IL-10 в регуляцию энергетического обмена, а также стимулирующее воздействие IL-10 на пролиферацию эпителиальных клеток и процессы регенерации, что вызывает большой интерес в контексте повреждения эндометрия при ХЭ.

В исследовании [20] показано, что у пациенток с аденомиозом отмечается снижение экспрессии IL-10 в эндометрии, которое коррелирует со снижением экспрессии транскрипционного фактора HOXA-10, вовлеченного в регуляцию рецептивности эндометрия и имплантации. При этом активация IL-10R приводила к STAT3-опосредованному повышению экспрессии HOXA-10, а также стимулировала имплантацию в модели *in vitro*.

В работе [7] показано снижение экспрессии IL-10 в эндометрии пациенток с повторными неудачами имплантации и ХЭ. По данным [21], в эндометрии пациенток с ХЭ отмечается повышение экспрессии провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-1 β и снижение экспрессии противовоспалительного цитокина IL-10. В нашей работе терапия липосомальной формой Г-КСФ приводила к повышению экспрессии IL-10, что может служить маркером повышения рецептивности эндометрия и его регенерации.

Трансформирующий фактор роста- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) является изоформой трансформирующего фактора роста- β наряду с изоформами TGF- $\beta 2$ и TGF- $\beta 3$ – семейства цитокинов с плейотропным эффектом на клеточный метаболизм [22]. Наиболее значимыми являются роли TGF- β в канцерогенезе, фиброгенезе и воспалении. При этом оказываемый TGF- β эффект является контекстно-зависимым и может быть противоположно направленным – в физиологических условиях TGF- β посредством активации регуляторных белков Smad способен стимулировать апоптоз и препятствовать канцерогенезу, однако при чрезмерной активации PI3K/AKT-пути оказываемый TGF- β эффект меняется на туморогенный [23].

В работе [24] изучалась экспрессия маркеров, ассоциированных с фиброгенезом, – TGF- β и матриксной металлопротеиназы-9 (MMP-9), а также экспрессия маркера рецептивности эндометрия $\alpha v \beta 3$ в биоптатах эндометрия, полученных при проведении гистероскопического разделения внутриматочных синехий при синдроме Ашермана. С помощью иммуногистохимического исследования по наличию в тканях эндометрия CD138-лимфоцитов у 46% пациенток с преимущественно выраженным спаечным процессом в полости матки был диагностирован ХЭ. В группе пациенток с ХЭ экспрессия профибротического фактора TGF- β , способного посредством активации Smad-пути ингибировать деградацию внеклеточного матрикса, была повышена, в то время как экспрессия противофибротического фактора MMP-9, стимулирующего деградацию внеклеточного матрикса, была снижена. Наблюдаемые изменения сопровождались также снижением экспрессии $\alpha v \beta 3$ в группе пациенток с ХЭ и снижением частоты наступления беременности и живорождения.

Использование мезенхимальных стволовых клеток (МСК) является перспективным направлением терапии для пациенток с внутриматочными синехиями, обеспечивающим регенерацию поврежденного эндометрия и способствующим наступлению беременности [25]. Регенерирующий эффект МСК достигается за счет большого спектра факторов роста и миРНК, содержащихся в их секретоме, обеспечивающих мощное

параакринное воздействие и так называемое перепрограммирование окружающих клеток, что открывает возможность к выделению и использованию самого секретома МСК для лечения пациенток с синдромом Ашермана. Показано, что микроРНК miR-125b-5р, miR-30c-5р и miR-23a-3р, содержащиеся в экзосомах плацентарных МСК, способны ингибировать экспрессию Smad2 и Smad3, подавляя профибротический TGF- β /Smad-сигнальный каскад.

По нашим данным, применение липосомальной формы Г-КСФ сопровождается повышением экспрессии TGF- β 1, что, однако, нельзя расценивать как активацию профибротического пути, принимая во внимание плеiotропное действие TGF- β 1. Наши результаты согласуются с работой [7], в которой обнаружено, что наличие ХЭ сопровождается снижением экспрессии TGF- β . Таким образом, повышение экспрессии TGF- β 1 в ходе лечения ХЭ с помощью липосомальной формы Г-КСФ можно расценить скорее как нормализацию уровня его экспрессии.

Ограничениями представленной работы являются размер выборки и ограниченный спектр изученных генов, принимая во внимание комплексный характер их взаимодействий.

Таким образом, полученные данные демонстрируют, что терапия хронического эндометрита с помощью внутриматочного введения липосомальной формы Г-КСФ в течение 6 месяцев нормализует экспрессию ряда генов, ассоциированных с хроническим воспалением эндометрия, а также повышает толщину эндометрия у пациенток с повторными неудачами программ ВРТ и гипопластическим эндометрием.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея исследования, привлечение финансирования (Н.И.Т., К.В.О., А.М.Г.), клиническое ведение пациентов и сбор данных (Р.Ю.Р., К.В.О., В.В.Х.), обработка данных (Р.Ю.Р., В.В.Х.), написание и редактирование рукописи – Р.Ю.Р., В.В.Х., А.М.Г.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках поискового научного исследования №1022040800281-8-3.2.2 (FGWN-2023-0014) "Исследование безопасности и эффективности применения препаратов липосомальной формы гранулоцитарного колониестимулирующего фактора роста у пациенток с повторными неудачами ЭКО и наличием гипопластических изменений эндометрия".

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, соответствуют этическим стандартам национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Проведение исследования одобрено заседании локального этического комитета ФГБНУ "НИИ Акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта" – протокол № 125 от 12.05.2023 г.

По этическим соображениям группа сравнения не предполагалась. Размер выборки был определен с учетом сопоставления пользы и рисков с учетом ранее доказанной эффективности лечения и наличия инвазивных процедур.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tolibova GK, Tral' TG, Kleshchov MA, Kvetnoy IM, Aylamazyan EK (2015) Endometrial dysfunction: an algorithm for histological and immunohistochemical studies. *J Obstetrics and Women's Diseases* 64(4): 69–77. (In Russ).
2. Vitagliano A, Laganà AS, De Ziegler D, Cincinelli R, Santarsiero CM, Buzzaccarini G, Chiantera V, Cincinelli E, Marinaccio M (2022) Chronic Endometritis in Infertile Women: Impact of Untreated Disease, Plasma Cell Count and Antibiotic Therapy on IVF Outcome-A Systematic Review and Meta-Analysis. *Diagnostics (Basel)* 12(9): 2250.
<https://doi.org/10.3390/diagnostics12092250>
3. Inki P (1997) Expression of syndecan-1 in female reproductive tract tissues and cultured keratinocytes. *Mol Hum Reprod* 3(4): 299–305.
<https://doi.org/10.1093/molehr/3.4.299>
4. Ryan E, Tolani AT, Zhang J, Cruz GI, Folkins AK, Lathi RB (2022) The menstrual cycle phase impacts the detection of plasma cells and the diagnosis of chronic endometritis in endometrial biopsy specimens. *Fertil Steril* 118(4): 787–794.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2022.07.011>
5. Yasuo T, Kitaya K (2022) Challenges in Clinical Diagnosis and Management of Chronic Endometritis. *Diagnostics (Basel)* 12(11): 2711.
<https://doi.org/10.3390/diagnostics12112711>
6. Oshina K, Kuroda K, Nakabayashi K, Tomikawa J, Kitade M, Sugiyama R, Hata K, Itakura A (2023) Gene expression signatures associated with chronic endometritis revealed by RNA sequencing. *Front Med (Lausanne)* 10: 1185284.
<https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1185284>
7. Wang WJ, Zhang H, Chen ZQ, Zhang W, Liu XM, Fang JY, Liu FJ, Kwak-Kim J (2019) Endometrial TGF- β , IL-10, IL-17 and autophagy are dysregulated in women with recurrent implantation failure with chronic endometritis. *Reprod Biol Endocrinol* 17(1): 2.
<https://doi.org/10.1186/s12958-018-0444-9>
8. Ding J, Wang J, Cai X, Yin T, Zhang Y, Yang C, Yang J (2022) Granulocyte colony-stimulating factor in reproductive-related disease: Function, regulation and therapeutic effect. *Biomed Pharmacother* 150: 112903.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112903>
9. Lédee N, Gridelet V, Ravet S, Jouan C, Gaspard O, Wenders F, Thonon F, Hincourt N, Dubois M, Foidart JM, Munaute C, Perrier d'Hauterive S (2013) Impact of follicular G-CSF quantification on subsequent embryo transfer decisions: a proof of concept study. *Hum Reprod* 28(2): 406–413.
<https://doi.org/10.1093/humrep/des354>
10. Fu LL, Xu Y, Yan J, Zhang XY, Li DD, Zheng LW (2023) Efficacy of granulocyte colony-stimulating factor for infertility undergoing IVF: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biol Endocrinol* 21(1): 34.
<https://doi.org/10.1186/s12958-023-01063-z>
11. Su Q, Pan Z, Yin R, Li X (2024) The value of G-CSF in women experienced at least one implantation failure: a systematic review and meta-analysis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 15: 1370114.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2024.1370114>
12. Kimura F, Takebayashi A, Ishida M, Nakamura A, Kitazawa J, Morimune A, Hirata K, Takahashi A, Tsuji S, Takashima A, Amano T, Tsuji S, Ono T, Kaku S, Kasahara K, Moritani S, Kushima R, Murakami T (2019) Review: Chronic endometritis and its effect on reproduction. *J Obstet Gynaecol Res* 45(5): 951–960.
<https://doi.org/10.1111/jog.13937>
13. Gardner DK, Schoolcraft WB (1999) Culture and transfer of human blastocysts. *Curr Opin Obstet Gynecol* 11(3): 307–311.
<https://doi.org/10.1097/00001703-199906000-00013>

14. Bangham AD, Standish MM, Watkins JC (1965) Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* 13(1): 238–252.
[https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(65\)80093-6](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(65)80093-6)

15. Obedkova KV, Khalenko VV, Tovpeko DV, Ryzhov JR, Bespalova ON, Tapiskaya NI (2025) Formulation and In Vitro Characterization of Granulocyte-Colony-Stimulating-Factor-Loaded Liposomes: Future Prospective in Reproductive Medicine. *Int J Mol Sci* 26(6): 2689.
<https://doi.org/10.3390/ijms26062689>

16. Stein IS, Gottfried A, Zimmermann J, Fischer von Mollard G (2009) TVP23 interacts genetically with the yeast SNARE VTI1 and functions in retrograde transport from the early endosome to the late Golgi. *Biochem J* 419(1): 229–236.
<https://doi.org/10.1042/BJ20081973>

17. Karlsson M, Zhang C, Mear L, Zhong W, Digre A, Katona B, Sjöstedt E, Butler L, Odeberg J, Dusart P, Edfors F, Oksvold P, von Feilitzen K, Zwahlen M, Arif M, Altay O, Li X, Ozcan M, Mardinoğlu A, Fagerberg L, Mulder J, Luo Y, Ponten F, Uhlen M, Lindskog C (2021) A single-cell type transcriptomics map of human tissues. *Sci Adv* 7(31): eabh2169.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.abb2169>

18. Gialluisi A, Reccia MG, Modugno N, Nutile T, Lombardi A, Di Giovannantonio LG, Pietracupa S, Ruggiero D, Scala S, Gambardella S, International Parkinson's Disease Genomics Consortium (IPDGC), Iacoviello L, Gianfrancesco F, Acampora D, D'Esposito M, Simeone A, Ciullo M, Esposito T (2021) Identification of sixteen novel candidate genes for late onset Parkinson's disease. *Mol Neurodegener* 16(1): 35.
<https://doi.org/10.1186/s13024-021-00455-2>

19. Saraiva M, Vieira P, O'Garra A (2020) Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *J Exp Med* 217(1): e20190418.
<https://doi.org/10.1084/jem.20190418>

20. Wang J, Huang C, Jiang R, Du Y, Zhou J, Jiang Y, Yan Q, Xing J, Hou X, Zhou J, Sun H, Yan G (2018) Decreased Endometrial IL-10 Impairs Endometrial Receptivity by Downregulating HOXA10 Expression in Women with Adenomyosis. *Biomed Res Int* 2018: 2549789.
<https://doi.org/10.1155/2018/2549789>

21. Ju J, Li L, Xie J, Wu Y, Wu X, Li W (2014) Toll-like receptor-4 pathway is required for the pathogenesis of human chronic endometritis. *Exp Ther Med* 8(6): 1896–1900.
<https://doi.org/10.3892/etm.2014.1990>

22. Massagué J, Sheppard D (2023) TGF-β signaling in health and disease. *Cell* 186(19): 4007–4037.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.07.036>

23. Eritja N, Felip I, Dosil MA, Vigezzi L, Mirantes C, Yeramian A, Navaridas R, Santacana M, Llobet-Navas D, Yoshimura A, Nomura M, Encinas M, Matias-Guiu X, Dolcet X (2017) A Smad3-PTEN regulatory loop controls proliferation and apoptotic responses to TGF-β in mouse endometrium. *Cell Death Differ* 24(8): 1443–1458.
<https://doi.org/10.1038/cdd.2017.73>

24. Liu L, Yang H, Guo Y, Yang G, Chen Y (2019) The impact of chronic endometritis on endometrial fibrosis and reproductive prognosis in patients with moderate and severe intrauterine adhesions: a prospective cohort study. *Fertil Steril* 111(5): 1002–1010.e2.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.01.006>

25. Liu H, Zhang X, Zhang M, Zhang S, Li J, Zhang Y, Wang Q, Cai JP, Cheng K, Wang S (2024) Mesenchymal Stem Cell Derived Exosomes Repair Uterine Injury by Targeting Transforming Growth Factor-β Signaling. *ACS Nano* 18(4): 3509–3519.
<https://doi.org/10.1021/acsnano.3c10884>

Effect of Granulocyte Colony-Stimulating Factor Liposomal Form on the Expression of Genes Associated with Chronic Endometritis

**J. R. Ryzhov^{a,*}, K. V. Obedkova^a, V. V. Khalenko^a, A. M. Gzgzyan^a,
and N. I. Tapilskaya^a**

*^aThe Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology named after D.O. Ott,
St. Petersburg, Russia
e-mail: julian.ryzhov@gmail.com

The classic function of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) is the regulation of neutrophil growth and differentiation, but G-CSF is one of the cytokines which plays important roles in folliculo- and embryogenesis, embryo implantation and trophoblast invasion. G-CSF administration may have beneficial effect on outcomes after assisted reproductive technology (ART). The intervention of administration G-CSF into the uterine cavity in patients with chronic endometritis or/and repeated implantation failures increases the pregnancy rate, but mechanisms of action G-CSF on endometrial receptivity are not clear. The study involved 22 patients with infertility, unsuccessful ART attempts and thin endometrium who received intrauterine administrations of liposomal G-CSF twice a week for 6 months as chronic endometritis therapy. Real-time PCR was used to determine the expression of *TVP23A*, *IL10*, *TGF-β1* genes in endometrial biopsies before and after 6 months of treatment with liposomal G-CSF. Intrauterine liposomal G-CSF administration significantly reduced the expression of the *TVP23A* gene ($p < 0.001$), and increased the expression of the *IL10* ($p < 0.001$) and *TGF-β1* ($p < 0.001$) genes in the endometrium. A significant ($p < 0.001$) increase in endometrial thickness (M-echo) from 5.6 ± 0.6 to 6.8 ± 0.8 mm was observed. The obtained data demonstrate that therapy of chronic endometritis with intrauterine administration of liposomal form of G-CSF during 6 months normalizes the expression of a number of genes associated with chronic inflammation of the endometrium.

Keywords: granulocyte colony-stimulating factor, chronic endometritis, assisted reproductive technologies, in vitro fertilization, infertility