

На правах рукописи

ДРАПКИНА
Юлия Сергеевна

Оптимизация и индивидуализация программ вспомогательных
репродуктивных технологий с использованием профиля экспрессии малых
некодирующих РНК в культуральной среде эмбриона

14.01.01 – акушерство и гинекология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

МОСКВА – 2020

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор Калинина Елена Анатольевна
кандидат биологических наук Тимофеева Анжелика Владимировна

Официальные оппоненты:

Рудакова Елена Борисовна – доктор медицинских наук, профессор, ГБУЗ МО «Московский областной перинатальный центр», отделение вспомогательных репродуктивных технологий, научный консультант

Вартанян Эмма Врановна - доктор медицинских наук, доцент, ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, кафедра акушерства и гинекологии с курсом перинатологии

Ведущая организация:

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии»

Защита состоится 16.06.2020 года в 13:00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.125.01 на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» по адресу 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

<http://science.ncagp.ru/upfiles/pdf/Drapkina%20J.S.-disser.pdf>

Автореферат разослан «___» _____ 2020г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор Калинина Елена Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В настоящее время распространенность бесплодия среди супружеских пар репродуктивного возраста составляет 10-15% (Vander В.М. et al., 2018). При лечении различных видов бесплодия широкое распространение получили вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ), так как по сравнению с другими доступными методами лечения бесплодия ВРТ остаются наиболее эффективными. Тем не менее, эффективность одной попытки ЭКО в среднем не превышает 40%, а частота родов живым плодом составляет 33,3 % (European IVF-monitoring Consortium et al., 2017).

Среди основных причин отсутствия имплантации в программах ВРТ могут выступать изменения рецептивности и восприимчивости эндометрия, а также нарушения имплантационной способности самого эмбриона (Вартанян Э.В. и соав., 2016). Имплантация эмбриона в эндометрий - многоэтапный процесс, опосредованный многоуровневой регуляцией внутри- и межклеточных взаимодействий (Аполихина И.А. и соав., 2019). Для повышения эффективности программ ВРТ возникает необходимость внедрения дополнительных неинвазивных технологий селективного выбора эмбриона с высоким имплантационным потенциалом (Вартанян Э.В. и соав., 2018). В настоящее время выбор эмбрионов, как правило, осуществляется на основании визуальной оценки их морфологических свойств (Рудакова Е.Б., 2019). Однако данные критерии оценки являются субъективными, точность такого метода отбора эмбрионов остается недостаточно высокой, и не все эмбрионы «отличного» морфологического качества успешно имплантируются (Тимофеева А.В. и соав., 2019).

В последние годы пристальное внимание ученых обращено к изучению роли малых некодирующих РНК (мнкРНК) в культуральной среде эмбриона в процессах имплантации и его нормального развития в связи с доказанным ранее их многофункциональным действием на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях регуляции экспрессии генов (Machtinger R. et al., 2017). Среди всех мнкРНК особый интерес представляют микроРНК и пивиРНК благодаря своему влиянию на фенотип и функцию клеток. Кроме этого, микроРНК и пивиРНК обладают диагностическим и прогностическим потенциалом в отношении определения качества эмбриона и его имплантационной способности при определении уровня их экспрессии в культуральной среде (Heidari F. et al., 2019, Yang J. X. et al., 2016).

Учитывая, что микроРНК и пивиРНК обладают важным регуляторным влиянием на сигнальные пути, участвующие в пролиферации, дифференцировке, миграции и апоптозе клеток, а также секретируются эмбрионом в его культуральную среду, оценка уровня экспрессии данных мнкРНК может быть использована как неинвазивный способ анализа качества эмбриона и его имплантационного потенциала (Paul A.V. et al., 2019).

В связи с вышесказанным представляется актуальным, современным и перспективным изучение профиля экспрессии мнкРНК в культуральной среде, а также прогнозирование результатов лечения бесплодия на основе выбора оптимальных эмбрионов для переноса в полость матки.

Степень разработанности темы исследования

Культуральная среда является уникальным объектом исследования, содержащим информацию о функциональном состоянии внутриклеточных сигнальных систем эмбриона. Стоит отметить, что нарушения функционального статуса эмбриона отражаются в изменениях

молекулярно-биологического профиля культуральной среды (Kim J. et al., 2019). В последние годы среди широкого спектра потенциальных биомаркеров качества эмбриона и его имплантационной способности особое внимание исследователей привлекают микроРНК и пивиРНК, идентифицированные в культуральной среде, а также их роль в процессах раннего эмбриогенеза, имплантации эмбриона и его дальнейшего развития. МикроРНК подавляет экспрессию белок-кодирующих генов, а роль пивиРНК заключается, в основном, в стабилизации генома путем подавления экспрессии транспозонов (Russell S. et al., 2017). Caralbo A. et al проанализировал профиль экспрессии микроРНК в культуральной среде и в клетках эмбриона и показал, что 96,6 % микроРНК, идентифицированных в культуральной среде, имеют эмбриональное происхождение (Caralbo A. et al., 2016). В исследовании Abu-Halima M. et al была обнаружена взаимосвязь между имплантационным потенциалом эмбриона и профилем экспрессии микроРНК в его культуральной среде (Abu-Halima M. et al., 2017).

Успешное эмбриональное развитие сразу после оплодотворения, в том числе в программах ВРТ, зависит от координированной реализации программ по уничтожению материнских мРНК и активации зиготического генома с последующим синтезом эмбриональных мРНК и трансляцией на них белков на этапе материнско-зиготического перехода (МЗП) (Liu C. et al., 2018). Ключевую роль в этом процессе играют пивиРНК и микроРНК. У эмбрионов человека МЗП происходит на 2-3 сутки после оплодотворения и приходится на стадию 8-клеточного эмбриона (Han B. et al, 2015). От своевременного и скоординированного МЗП зависит дальнейшее эмбриональное развитие и последующее течение беременности (Toralova T. et al., 2020).

Таким образом, прорывные исследования в области анализа мнкРНК в культуральной среде, сопоставление их профиля с имплантационной

способностью эмбриона и этапами раннего эмбриогенеза являются отправной точкой для создания диагностических и прогностических тест-систем по выбору наиболее оптимального эмбриона для переноса в полость матки в рамках проведения программ ВРТ.

Цель исследования

Прогнозирование результатов программ вспомогательных репродуктивных технологий по профилю экспрессии малых некодирующих рибонуклеиновых кислот в культуральной среде эмбрионов и выбору эмбриона с максимальным имплантационным потенциалом.

Задачи исследования

1. Проанализировать данные анамнеза, параметры клинического и гормонального статуса у обследуемых пациенток с различными результатами программ ВРТ.
2. Оценить особенности фолликулогенеза, оогенеза и раннего эмбриогенеза у обследуемых пациенток с различными результатами программ ВРТ.
3. Изучить особенности экспрессии мнкРНК в культуральной среде в зависимости от качества эмбриона при селективном переносе в полость матки на 5-е сутки культивирования.
4. Изучить особенности экспрессии мнкРНК в культуральной среде эмбрионов в зависимости от результатов программ ВРТ.
5. Проанализировать исходы программ ВРТ у обследуемых пациенток.
6. Разработать персонифицированный алгоритм проведения программ ВРТ с использованием профиля экспрессии мнкРНК в культуральной среде для выбора эмбрионов с максимальным имплантационным потенциалом.

Научная новизна

На основании проведенного исследования представлены и научно обоснованы новые данные об особенностях развития эмбрионов на основании анализа экспрессии мнкРНК (микро- и пивиРНК) в культуральной среде. Выявлены и проанализированы статистически значимые корреляции уровня экспрессии мнкРНК как с параметрами гаметогенеза, так и с наличием/отсутствием имплантации. Установлен вклад ряда мнкРНК в потенциал развития эмбриона и обнаружено статистически значимое повышение уровня экспрессии let-7b-5p, let-7i-5p, piR020401 у 8-клеточного эмбриона, способного развиться до стадии бластоцисты среднего/отличного качества. Определены мнкРНК, имеющие наибольший вклад в имплантационный потенциал эмбриона (let-7i-5p, let-7b-5p, piR020401, piR20497 и piR19675). Впервые описаны изменения пивиРНК в культуральной среде эмбриона в зависимости от его имплантационного потенциала и скорости развития, а также разработана формула, позволяющая оценивать имплантационный потенциал эмбриона. Предложен алгоритм выбора эмбриона с высоким имплантационным потенциалом в зависимости от профиля экспрессии мнкРНК в культуральной среде. Анализ уровня экспрессии изученных мнкРНК для оценки качества эмбриона и прогнозирования его имплантационной способности дополняет морфологические критерии оценки качества эмбриона, а также позволяет индивидуализировать и оптимизировать выбор эмбриона для переноса в полость матки в программах ВРТ.

Практическая значимость

На основании проведенного анализа обоснована целесообразность и актуальность исследования в культуральной среде мнкРНК, позволяющих прогнозировать морфологическое качество эмбрионов, а также отбирать эмбрионы с наибольшим имплантационным потенциалом. На основании

полученных данных в зависимости от качества эмбрионов, согласно морфологическим критериям оценки, разработан персонализированный алгоритм проведения программы ВРТ с учетом экспрессии мнкРНК в культуральной среде эмбриона, что позволяет оптимизировать выбор эмбрионов для переноса в полость матки, индивидуализировать программы ВРТ и минимизировать экономические и временные затраты. Полученные результаты позволяют предложить инновационный неинвазивный метод оценки качества эмбриона и его имплантационного потенциала для повышения эффективности программ ВРТ.

Методология и методы исследования

Проведено проспективное обследование супружеских пар в программах ВРТ. Пациенты обследованы в соответствии с приказом Минздрава России №107н от 30.08.2012 г. «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению». Культуральная среда была собрана на 4-ые сутки после оплодотворения для определения профиля экспрессии мнкРНК методами глубокого секвенирования и количественной ОТ-ПЦР (полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией) в реальном времени. Анализ среды культивирования эмбриона был выполнен на 4-е сутки после оплодотворения для получения информации об имплантационном потенциале эмбриона к 5-м суткам. Уровень экспрессии 7 мнкРНК был проанализирован в 109 образцах среды культивирования эмбрионов, достигших к 4-м суткам после оплодотворения разных стадий развития.

Положения, выносимые на защиту

1. В исследуемых группах пациентов продолжительность бесплодия и наличие вторичного бесплодия коррелируют с относительным количеством патологических форм сперматозоидов в эякуляте партнера

(чем выше относительное количество патологических сперматозоидов, тем более вероятно развитие вторичного бесплодия в связи с высокой частотой прерывания беременности на ранних сроках в анамнезе). Количество попыток вспомогательных репродуктивных технологий в анамнезе имеет положительную корреляцию с качеством эмбриона на 5 сутки развития, влияющим на результат лечения (за счет проведения специальной подготовки у пациенток с неудачными попытками в анамнезе и индивидуализации эмбриологического этапа).

2. Определяемые в среде культивирования мнкРНК let-7b-5p, let-7i-5p, piR020401, piR16735, piR19675 и piR20326 дифференцируют эмбрионы с различной скоростью развития, а let-7i-5p, piR020401, piR17716, кроме того, отличают бластоцисты разного качества. Отставание в скорости развития эмбриона на сутки не предопределяет отсутствие образование бластоцисты среднего/отличного качества при повышении уровня экспрессии малых некодирующих РНК let-7b-5p, let-7i-5p, piR020401 в культуральной среде.

3. Для идентификации эмбрионов с наибольшим имплантационным потенциалом при оценке профиля экспрессии малых некодирующих РНК в культуральной среде на 4-е сутки после оплодотворения определен наибольший вклад в имплантационный потенциал эмбриона let-7i-5p, let-7b-5p, piR020401, piR20497 и piR19675.

4. Уровни экспрессии малых некодирующих РНК в среде культивирования эмбрионов на 4 сутки после оплодотворения статистически значимо коррелируют с параметрами гаметогенеза: piR16735 и piR020401 - с количеством ооцит-кумулюсных комплексов, let-7b-5p и piR020401 - с числом зрелых ооцитов и зигот, let-7i-5p и piR20497 - с количеством сперматозоидов в 1 мл эякулята, piR19675 - с относительным числом прогрессивно подвижных сперматозоидов.

Личный вклад автора

Автор непосредственно участвовал в выборе научного исследования, разработке цели и задач исследования, сборе материала, проведении экспериментов по анализу профиля экспрессии мнкРНК в культуральной среде эмбриона, анализе, статистической обработке полученных данных. Автор лично принимал участие в обследовании и лечении пациенток на всех этапах лечения бесплодия в программе ЭКО/ИКСИ и ПЭ.

Соответствие диссертации паспорту полученной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 14.01.01 – «акушерство и гинекология». Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 4 и 5 паспорта акушерства и гинекологии.

Апробация материалов диссертации

Работа обсуждена на межклинической конференции отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия 19.02.2020 и заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ Акушерства, Гинекологии и Перинатологии им. В.И. Кулакова» Минздрава России 23.03.2020.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены и используются в практической работе отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. профессора Б.В. Леонова (заведующая д.м.н., профессор Калинина Е.А.) и лаборатории прикладной транскриптомики отдела системной биологии в репродукции (заведующая к.б.н. Тимофеева А.В.) ФГБУ «НМИЦ Акушерства, Гинекологии и Перинатологии им. В.И. Кулакова»

Минздрава России (директор - академик РАН, д.м.н., профессор Сухих Г.Т.).

По теме диссертации опубликовано 5 печатных работы, из которых 3 входят в перечень рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК, в том числе 1 статья была опубликована в иностранном журнале IJMS с Impact Factor 4,182.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена в традиционной форме на 143 страницах машинописного текста. Состоит из оглавления, введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и списка литературы. Работа иллюстрирована 17 таблицами и 8 рисунками. Библиографический указатель включает 179 литературных источника, из них 17 русскоязычных и 162 иностранные работы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

Обследована 41 супружеская пара, обратившаяся для проведения программы ВРТ в отделение вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова ФГБУ «НМИЦ АГиП им. академика В.И. Кулакова» Минздрава России. Критерии включения: возраст от 18 до 37 лет, женское бесплодие трубно-перитонеального происхождения, мужской фактор бесплодия (при отсутствии выраженной патозооспермии), регулярный менструальный цикл, наличие информированного согласия на участие в исследовании. В процессе лечения методом ВРТ пациентки были разделены на две группы: 1 группа

- 25 пациенток, с отрицательным результатом лечения; 2 группа - 16 пациенток, у которых наступила беременность.

Стимуляцию функции яичников проводили по стандартному протоколу с препаратами рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона (рФСГ) и антагонистами гонадотропного релизинг гормона (антГнРГ) со 2-3 дня менструального цикла. Морфологическую оценку эмбрионов осуществляли согласно Стамбульскому консенсусу (классификация ESHRE, 2011). Перенос одного эмбриона проводили на 5 сутки, ведение посттрансферного периода и диагностику беременности - по стандартизированной методике. Всего было собрано 109 образцов среды культивирования эмбрионов объемом 25 мкл на 4 сутки после оплодотворения, которые к 5-м суткам достигли стадии бластоцист отличного качества (32 образца), бластоцист хорошего качества (16 образцов), бластоцист среднего качества (11 образцов), бластоцист плохого качества (6 образцов), морул (36 образцов), 3-10-клеточных эмбрионов (8 образцов). Образцы замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C . Эмбрионы на 4-е сутки после оплодотворения были перенесены в свежую культуральную среду с последующей оценкой их морфологических свойств на 5-е сутки согласно Стамбульскому консенсусу по оценке качества эмбрионов (ESHRE, 2011 г). Идентификация всех имеющихся мнкРНК в среде культивирования эмбриона была осуществлена методом глубокого секвенирования с использованием набора по синтезу кДНК-библиотек в лаборатории прикладной транскриптомики отдела системной биологии в репродукции (заведующая лабораторией – к.б.н. Тимофеева А.В). Данные секвенирования были валидированы методом количественной ОТ-ПЦР в реальном времени. Относительный уровень экспрессии кДНК оценивали по кратности изменения (КИ) методом $\Delta\Delta\text{Ct}$.

Для статистической обработки результатов использовали скрипты, написанные на языке R, и программу RStudio. Статистически значимыми считали отличия при $p \leq 0,05$.

Результаты собственных исследований и их обсуждение

При изучении и анализе клинико-anamnestических и лабораторных данных, а также основных параметров данного цикла ВРТ отмечено отсутствие межгрупповых различий по возрасту пациенток, их антропометрическим данным, частоте первичного и вторичного бесплодия, количеству и исходам беременностей у пациенток с вторичным бесплодием, показателям гормонального статуса, параметрам стимулированного цикла и раннего эмбриогенеза (табл. 1).

Таблица 1

Сравнение клинико-лабораторных параметров пациенток, включенных в исследование

Изучаемые параметры	Группа I (отрицательный результат имплантации) 25 пациентов	Группа II (положительный результат имплантации) 16 пациентов	P
ИМТ*	22,1 (2,0)	22,2 (1,4)	> 0,05
Продолжительность менструального цикла (дней)*	29,9 (1,6)	28,4 (0,9)	> 0,05
Средний возраст (лет)*	32,3 (3,5)	32,0 (3,1)	> 0,05
Бесплодие первичное**	13 (46%) имели первичное бесплодие	8 (44%) имели первичное бесплодие	> 0,05

Концентрация ФСГ на 2-3 день менструального цикла (МЕ/мл)*	7,8 (1,4)	7,2 (1,4)	> 0,05
Концентрация АМГ (нг/мл)*	2,4 (1,0)	2,4 (0,7)	> 0,05
Количество антральных фолликулов на 2-3 день менструального цикла*	8,2 (1,6)	7,8 (1,5)	> 0,05
Число фолликулов в день триггера *	6,56 (2-12)	5,43 (2-15)	> 0,05
% морфологически нормальных сперматозоидов в день ТВП *	1,81 (2-4)	1,84 (2-3)	> 0,05
% прогрессивно подвижных сперматозоидов *	53,48 (20-85)	53,7 (25-72)	> 0,05
Общая концентрация сперматозоидов в 1 мл эякулята *	67,72 (16-181)	73,56 (10-131)	> 0,05
Число ооцит-кумулясных комплексов, полученных во время пункции*	7,8 (3,7)	7,4 (4,5)	> 0,05
Количество зрелых ооцитов *	6,16 (1-12)	4,75 (1-13)	> 0,05

Количество зигот *	5,52 (1-12)	4,18 (1-12)	> 0,05
Число полученных бластоцист*	1,4 (1,3)	1,4 (1,2)	> 0,05

* данные представлены как среднее арифметическое (M) и стандартное отклонение (SD) в формате M (SD) с указанием значимости отличий при использовании ANOVA теста;

** данные представлены как абсолютные числа N и процентные доли от общего числа пациенток в группе P в формате N(P%) с указанием значимости отличий при использовании χ^2 -тест;

При построении корреляционной матрицы с использованием метода ранговой корреляции Спирмена по данным клинико-инструментальных методов исследования супружеской пары было обнаружено, что возраст пациенток статистически значимо коррелировал с уровнем ФСГ, количеством антральных фолликулов (КАФ) и уровнем АМГ. При этом уровень ФСГ обратно коррелировал с уровнем АМГ и КАФ (рис. 1). АМГ, в свою очередь, положительно коррелировал с КАФ, числом фолликулов в день назначения триггера и имел отрицательную взаимосвязь с продолжительностью бесплодия. Качество эмбрионов на 5 сутки после оплодотворения напрямую влияло на результат лечения. Данные корреляционной матрицы также показали, что длина менструального цикла отрицательно коррелировала с количеством попыток ЭКО в анамнезе, имеющие положительную корреляцию с качеством эмбриона на 5 сутки после оплодотворения за счет проведения специальной подготовки пациенток с неудачными попытками ЭКО в анамнезе и индивидуализации эмбриологического этапа. Статистически значимые корреляции были получены в отношении продолжительности бесплодия супружеской пары, которое коррелировало с относительным количеством патологических сперматозоидов, при этом наличие вторичного бесплодия у пациентки обратно коррелировало с данным параметром. Полученные данные подтверждают важное значение качества сперматозоидов в определении

исхода беременности. Согласно представленным результатам, чем выше процент патологических сперматозоидов, тем более вероятно развитие вторичного бесплодия в связи с высокой частотой прерывания беременности на ранних сроках в анамнезе.

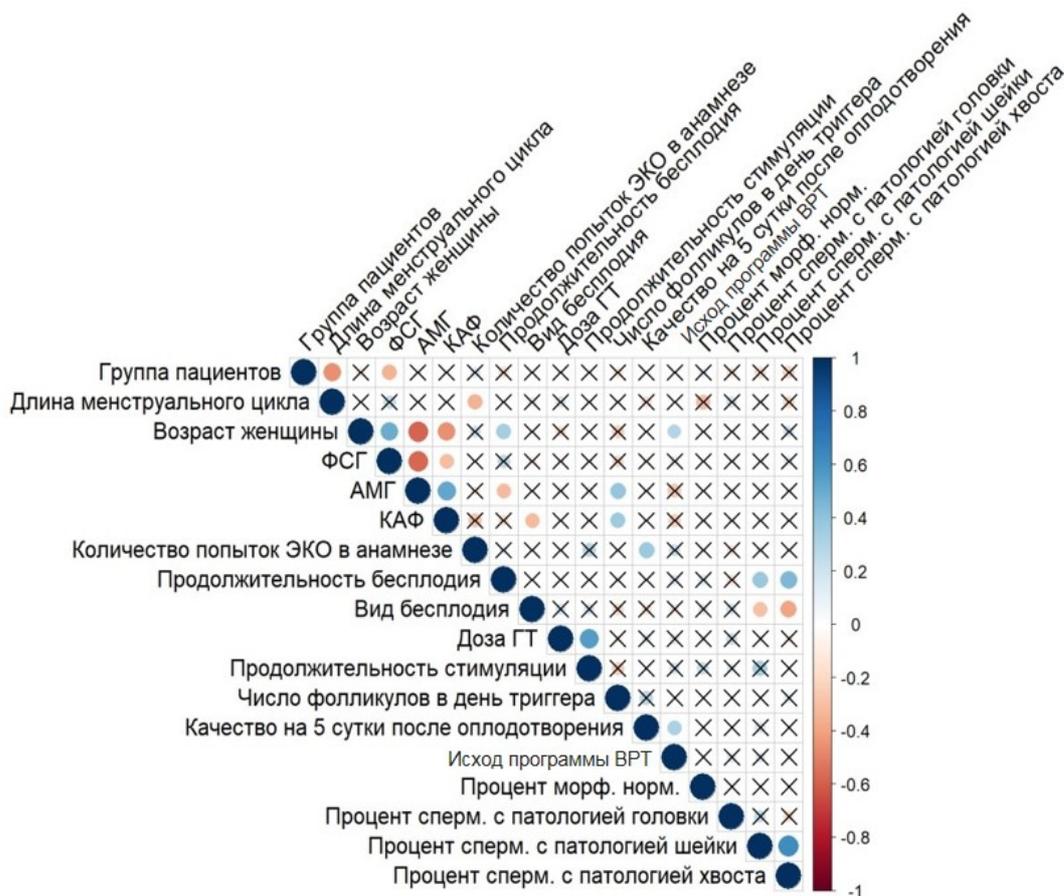


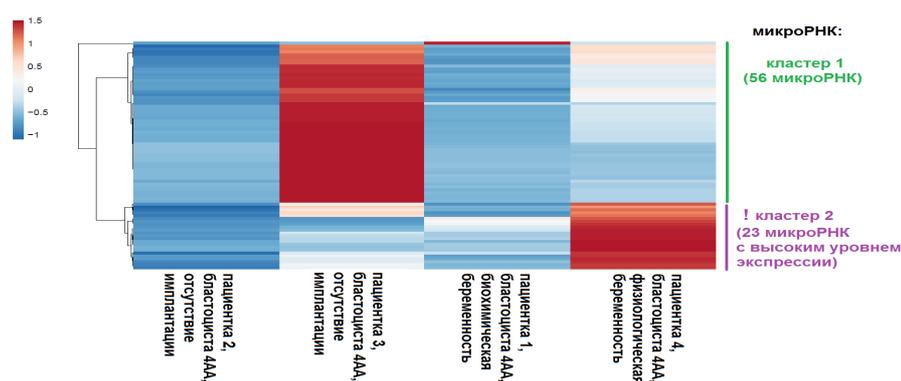
Рисунок 1. Корреляционная матрица клинично-анамнестических данных, параметров стимулированного цикла и характеристик эмбриогенеза

Для идентификации мнкРНК, дифференцирующих бластоцисты с различным имплантационным потенциалом, было выполнено глубокое секвенирование среды культивирования бластоцист отличного качества, полученной на 5 сутки после оплодотворения. Было проанализировано 4 образца среды культивирования эмбрионов в зависимости от исхода программы ВРТ: наличие имплантации и развитие биохимической

беременности (пациентка 1), отсутствие имплантации (пациентка 2, пациентка 3) и наличие имплантации с развитием физиологической беременности (пациентка 4) (рис. 2).

При проведении иерархического кластерирования данных секвенирования было обнаружено, что несмотря на одинаковую морфологическую характеристику бластоцист, их молекулярно-биологический профиль резко отличается в зависимости от их способности к имплантации и дальнейшего развития беременности. Обращает на себя внимание резкое увеличение уровня экспрессии 23 микроРНК из 2 кластера и 29 пивиРНК из 4 кластера у бластоцисты, обладающей высоким имплантационным потенциалом (рис. 2 А, В).

А



В

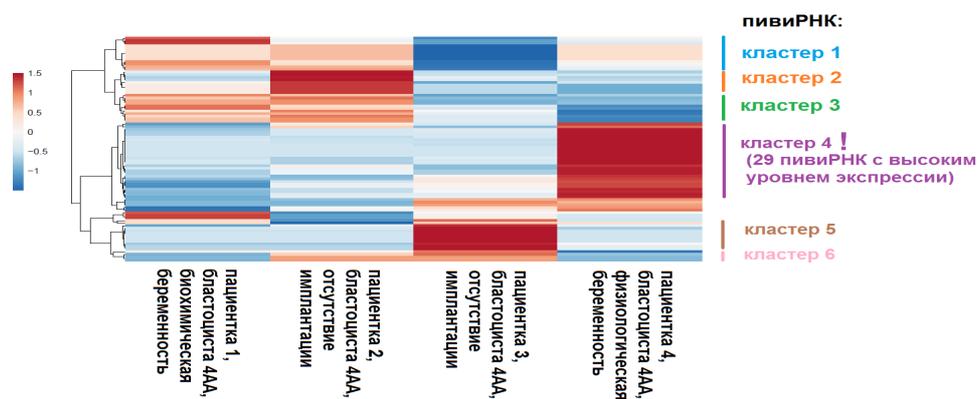


Рисунок 2. Тепловые карты профиля экспрессии мнкРНК среды культивирования эмбрионов, полученных от 4 пациенток. А. Иерархическое кластерирование данных глубокого секвенирования микроРНК. В. Иерархическое кластерирование данных глубокого секвенирования пивиРНК

Для дальнейшего анализа микроРНК и пивиРНК методом количественной ПЦР в реальном времени были отобраны 24 молекулы, дифференцирующие бластоцисты по имплантационному потенциалу, и уровень их экспрессии был проанализирован в 109 образцах среды культивирования эмбрионов на 4 сутки после оплодотворения. Значимые сигналы (Ct менее 35 циклов) и специфичные продукты реакции были получены для 7 мнкРНК в анализируемых образцах среды культивирования.

Важно отметить, что к 4-м суткам после оплодотворения эмбрионы, полученные от пациенток, включенных в исследование, имели разную скорость развития (3-10 клеточный эмбрион, морула, кавитирующая морула, бластоциста плохого, среднего, хорошего и отличного качества). Согласно данным количественной ПЦР в реальном времени профили экспрессии анализируемых мнкРНК дифференцируют эмбрионы с разной скоростью развития и бластоцисты различного качества (табл. 2).

Установлено, что уровень экспрессии анализируемых мнкРНК в среде культивирования эмбрионов с нормальной скоростью развития и достигших стадии бластоцисты к 5-м суткам после оплодотворения повышается и отличается от такового в среде культивирования эмбрионов, отстающих в развитии на сутки (морула, кавитирующая морула) и более (3-10 клеточный эмбрион). Так, например, определяемые в среде культивирования мнкРНК let-7b-5p, let-7i-5p, piR020401, piR16735, piR19675 и piR20326 дифференцируют эмбрионы с различной скоростью развития, а let-7i-5p, piR020401, piR17716, кроме того, дифференцируют бластоцисты разного качества.

Таблица 2

Попарное сравнение кратности изменения уровня экспрессии мнкРНК, у эмбрионов с разной скоростью развития по сравнению с культуральной средой без эмбриона

мнкРНК*	Группа 1–Группа 2**	Р-значение	КИ медиана* ** Группа 1	КИ медиана*** Группа 2
let-7b-5p	3–10 клеточный эмбрион - морула	0.04	6.16	10.1
	морула–бластоциста среднего качества	0.02	10.1	4.18
	морула–бластоциста отличного качества	0.05	10.1	7.24
let-7i-5p	морула–бластоциста плохого качества	0.02	2.2	6.2
	кавитирующая морула–бластоциста плохого качества	0.01	3.17	6.2
	бластоциста плохого качества-бластоциста отличного качества	0.01	6.2	3.26
piR02040 1	морула–бластоциста среднего качества	0.02	2.12	1.92
	бластоциста среднего качества-бластоциста хорошего качества	<0.001	1.92	2.14
piR16735	3–10 клеточный эмбрион -	<0.001	1.21	6.78

	кавитирующая морула			
	3–10 клеточный эмбрион-бластоциста хорошего качества	0.01	1.21	6.3
	Кавитирующая морула–бластоциста среднего качества	0.04	6.78	1.74
	Кавитирующая морула–бластоциста отличного качества	0.02	6.78	2.61
piR17716	бластоциста плохого качества-бластоциста хорошего качества	0.04	0.72	0.88
piR19675	3–10 клеточный эмбрион-бластоциста хорошего качества	0.02	0.1	1.26
	3–10 клеточный эмбрион-бластоциста отличного качества	0.03	0.1	1.23
piR20326	3–10 клеточный эмбрион-бластоциста хорошего качества	0.02	0.06	2.88

* Данные представлены в виде медианы (Me) и квартилей Q1 и Q3 в формате Me (Q1; Q3).

** Морфологическая характеристика эмбрионов дана на 5-е сутки после оплодотворения, а количественный анализ уровня экспрессии мнкРНК выполнен на 4-е сутки после оплодотворения.

*** КИ (кратность изменения) уровня экспрессии мнкРНК в среде культивирования эмбриона по сравнению со средой культивирования в отсутствие эмбриона

Для прогнозирования имплантационного потенциала эмбриона в зависимости от профиля экспрессии мнкРНК построена модель логистической регрессии (рис. 3). По оси абсцисс отложены значения «1 - специфичность теста» (доля ложноположительных случаев), по оси ординат – «чувствительность теста».

Уровень отсечки в данной модели был смещён в сторону максимальной специфичности для повышения вероятности идентификации эмбрионов с низким имплантационным потенциалом в целях оптимизации финансово-экономических и временных затрат при проведении преимплантационного генетического тестирования (ПГТ) и криопротокола. Для определения прогностической способности исследуемых мнкРНК оценена площадь под кривой для разных комбинаций молекул и максимальная площадь была получена для мнкРНК let-7i-5p, let-7b-5p, piR020401, piR20497 и piR19675. На основании профиля экспрессии let-7i-5p, let-7b-5p, piR020401, piR20497 и piR19675 в среде культивирования эмбрионов на 4 сутки после оплодотворения (стадия морулы) с отсутствием или наступлением имплантации после их переноса на пятые сутки культивирования (стадия бластоцисты) получена формула, позволяющая прогнозировать имплантационный потенциал (ИП) эмбриона, при уровне отсечки, равном 0.4, с 87 %-ной специфичностью и 60 %-ной чувствительностью теста (Формула 1):

$$\text{ИП} = 1 / (1 + \text{EXP}(0.54571 + 0.38224 * (-\Delta\Delta\text{Ct}_{\text{let-7i-5p}}) + 0.01095 * (-\Delta\Delta\text{Ct}_{\text{let-7b-5p}}) - 0.007912 * (-\Delta\Delta\text{Ct}_{\text{piR020401}}) + 0.19217 * (-\Delta\Delta\text{Ct}_{\text{piR20497}}) + 0.26999 * (-\Delta\Delta\text{Ct}_{\text{piR19675}})))$$

Формула 1. Имплантационный потенциал эмбриона в зависимости от профиля экспрессии мнкРНК в культуральной среде

Согласно данной формуле, если значение ИП составляет более 0.4 - такие эмбрионы характеризуются высокой имплантационной способностью и с высокой долей вероятности приведут к наступлению беременности после их переноса в полость матки, при наличии рецептивного и восприимчивого эндометрия.

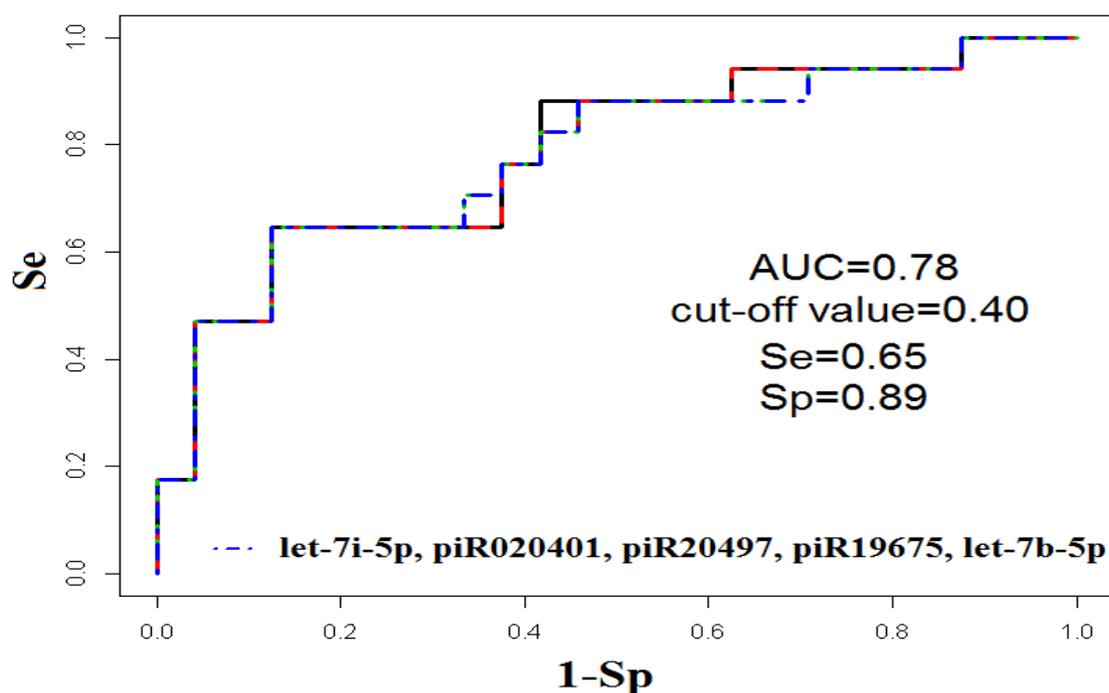


Рисунок 3. Модель логистической регрессии для прогнозирования наступления беременности по профилю экспрессии мнкРНК в среде культивирования эмбриона на 4 сутки после оплодотворения

На следующем этапе работы с целью анализа взаимосвязи наступления беременности с качеством полученных во время пункции ооцитов, готовых к оплодотворению, фертильностью спермы, стадией развития эмбриона к 4-м суткам после оплодотворения, количеством полученных бластоцист, профилем экспрессии мнкРНК в среде культивирования эмбриона на 4-е сутки после оплодотворения была построена корреляционная матрица (рис. 4).

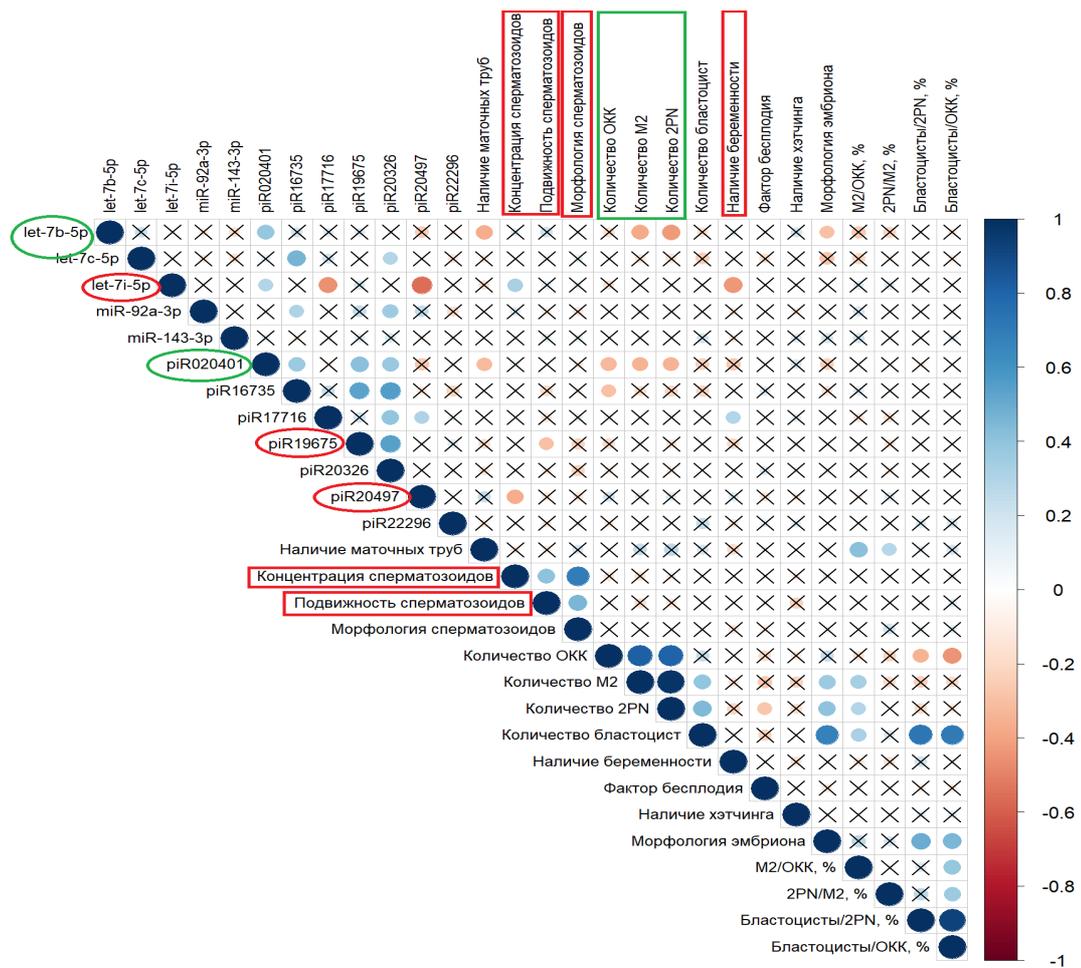


Рисунок 4. Корреляционная матрица, построенная непараметрическим методом ранговой корреляции по Спирмену

Выявлено, что let-7i-5p, piR020401, piR20497, piR17716, piR19675 статистически значимо коррелируют с показателями спермограммы, количеством ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК), степенью зрелости ооцита (количество M2) и его способностью к оплодотворению (количество зигот 2PN2PB), что в итоге вносит значительный вклад в формирование имплантационного потенциала получаемого эмбриона.

Очевидно, что на результативность программ ВРТ влияет не только своевременность прохождения эмбрионом той или иной стадии развития, но и сам потенциал развития эмбриона, определяемый качеством МЗП. На следующем этапе исследования был проведен анализ способности к бластуляции эмбриона, отстающего в развитии на сутки, в зависимости от

уровня экспрессии мнкРНК в среде его культивирования на 4-е сутки после оплодотворения. В данное исследование включено 22 образца культуральной среды, отобранной из общей коллекции собранного материала. Выбранные образцы среды культивирования соответствовали 8-клеточным эмбрионам на 4 сутки после оплодотворения, которые на 5 сутки достигли стадии морулы. Было обнаружено, что среда культивирования отстающего в развитии на сутки эмбриона, содержит повышенный профиль экспрессии мнкРНК *let-7b-5p*, *let-7i-5p*, *piR020401* при его развитии в бластоцисту среднего/отличного качества (рис. 5).

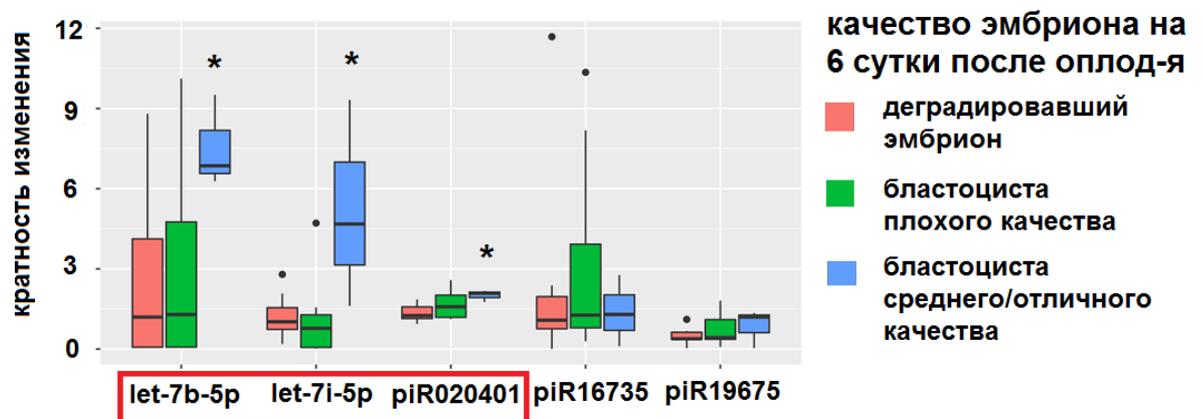


Рисунок 5. Кратность изменения мнкРНК в культуральной среде эмбриона на 4 сутки после оплодотворения в зависимости от его качества на 6 сутки

На завершающем этапе работы в электронной базе данных DianaTools были изучены экспериментально доказанные гены-мишени микроРНК *let-7b-5p* и *let-7i-5p*. Было обнаружено, что *let-7b* и *let-7i* играют важную роль в контроле метаболизма валина, изолейцина и лейцина путем регуляции уровня экспрессии гена трансаминазы *BCAT1*. Согласно результатам других научных работ эмбрионы, активно потребляющие данные аминокислоты, характеризуются быстрой скоростью развития и высоким имплантационным потенциалом (Leary C. et al., 2020). Кроме того, микроРНК семейства *Let7*, по-видимому, играют ключевую роль в процессах дифференцировки бластомеров в трофобласт и эмбриобласт

при образовании бластоцисты, так как согласно базе данных DianaTools let7b-5p и let7i-5p контролируют уровень экспрессии генов, белковые продукты которых формируют сигнальный путь, регулирующий плюрипотентность стволовых клеток (KEGG, hsa04550), Wnt-сигнальный путь (KEGG, hsa04310), Hippo-сигнальный путь (KEGG, hsa04390) и TGF β -сигнальный путь (KEGG, hsa04350). Ингибируя трансляцию мРНК гена-мишени N-ацетилгалактозаминилтрансферазы GALNT1, микроРНК let7b-5p и let7i-5p подавляют уровень экспрессии муцина1, чье локальное исчезновение на пиноподиях эндометрия обеспечивает адгезию бластоцисты к эпителию эндометрия (Крылова Ю.С. и соав., 2013; Massimiani M. et al., 2020). Кроме того, let7b-5p и let7i-5p контролируют уровень экспрессии белков внеклеточного матрикса (KEGG, hsa04512), в частности, коллагеновых белков, обеспечивая их взаимодействие с определенным паттерном интегринов клеток трофобласта. Данный тип взаимодействия не только активирует синтез металлопротеиназ клетками трофобласта для обеспечения инвазии в децидуальный слой матки, но и определяет их дифференцировку, необходимую для дальнейшего развития беременности (Massimiani M. et al., 2020). Потенциальная роль let7b-5p и let7i-5p на разных стадиях имплантации бластоцисты схематично представлена на Рисунке 6.

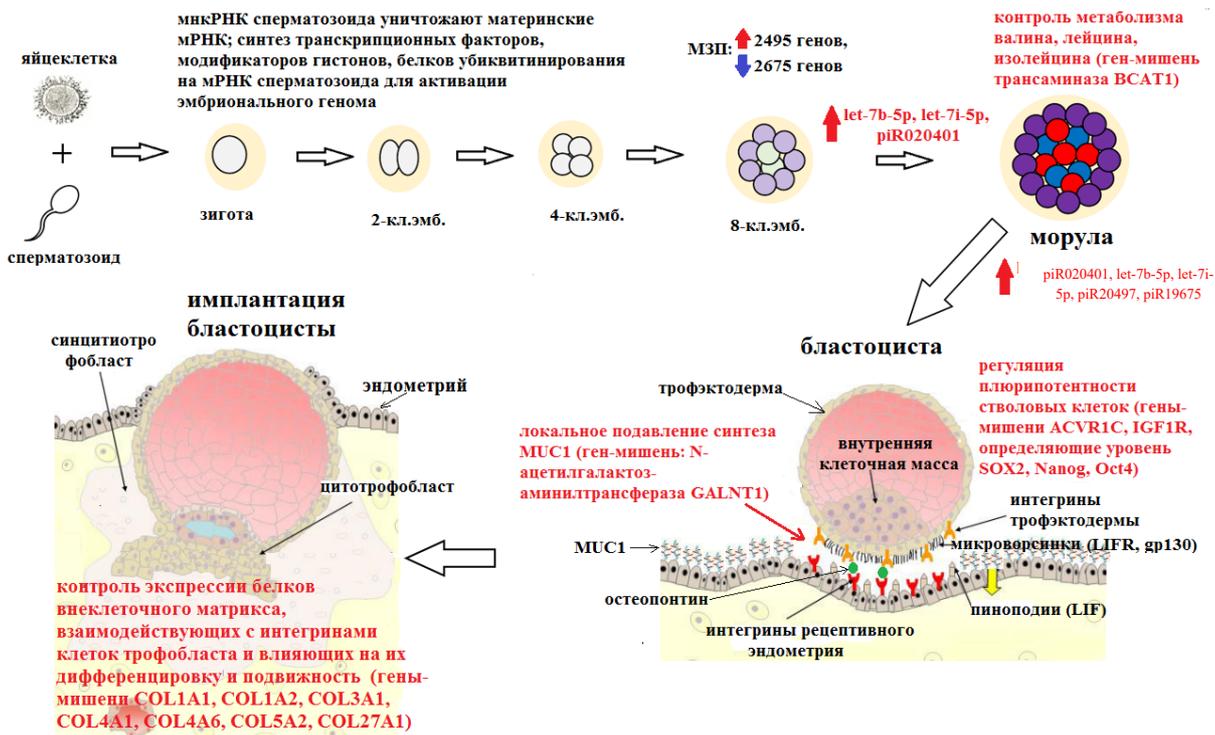


Рисунок 6. Гены-мишени и сигнальные пути, регулируемые *let-7b-5p* и *let-7i-5p*

Таким образом, в ходе настоящей исследовательской работы было показано, что мнкРНК в культуральной среде могут дифференцировать эмбрионы с разной скоростью развития и бластоцисты различного качества, а также служить маркером имплантационной способности эмбриона. Для понимания вклада мнкРНК в определение способности эмбриона к бластуляции изучен профиль экспрессии мнкРНК в культуральной среде эмбриона на стадии 8 клеток в зависимости от исхода его развития на 6 сутки после оплодотворения. Функциональная значимость проанализированных мнкРНК с точки зрения их регуляторной роли на разных стадиях имплантации сформулирована путем анализа их генов-мишеней по данным электронной базы DianaTools.

Учитывая, что количественный анализ мнкРНК сочетает в себе все основные критерии, предъявляемые к наиболее перспективным способам современной диагностики и на сегодняшний день служит доступной и отработанной технологией, полученные данные позволяют

оптимизировать лечение бесплодия методом ВРТ, в том числе у пациенток с неудачными попытками ЭКО в анамнезе. На основании проведенного исследования предложен алгоритм выбора эмбриона с высоким имплантационным потенциалом на основании профиля экспрессии мнкРНК в культуральной среде (рисунок 7).

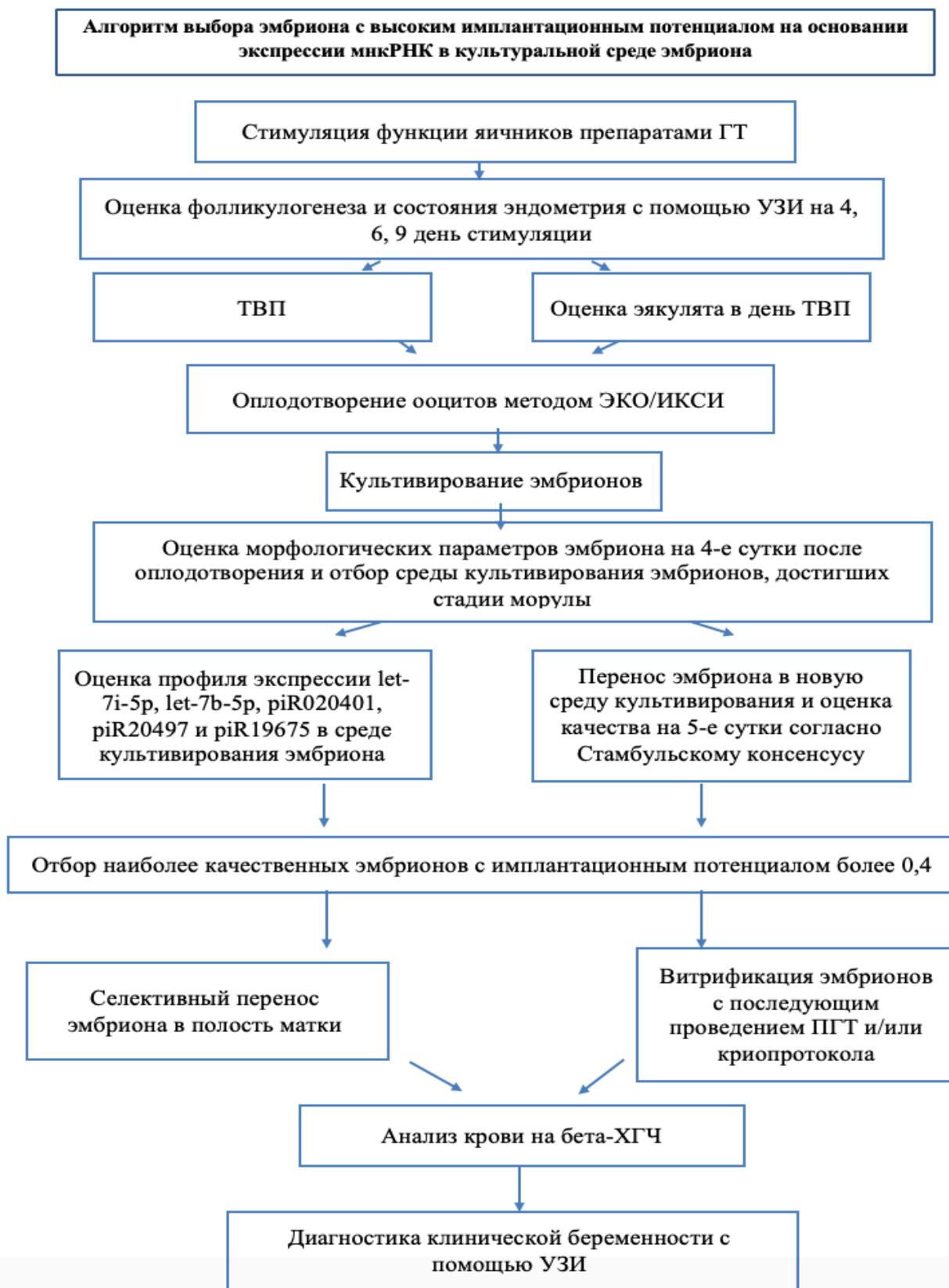


Рисунок 7. Алгоритм выбора эмбриона с максимальным имплантационным потенциалом на основании профиля экспрессии мнкРНК в культуральной среде

ВЫВОДЫ

1. У пациентов в исследуемых группах имплантационный потенциал получаемого эмбриона различен несмотря на сопоставимые клинико-анамнестические данные, характеристики гаметогенеза и параметры стимулированного цикла.
2. Количество попыток вспомогательных репродуктивных технологий в анамнезе коррелирует с качеством получаемого эмбриона за счет проведения специальной подготовки у пациенток и индивидуализации эмбриологического этапа. Обнаружена прямая корреляция продолжительности бесплодия супружеской пары с относительным количеством патологических сперматозоидов в эякуляте партнера и наличием вторичного бесплодия у пациентки.
3. Малые некодирующие РНК let-7b-5p, let-7i-5p, piR020401, piR16735, piR19675, piR20326, piR17716, выявленные в среде культивирования эмбриона на 4 сутки после оплодотворения, дифференцируют эмбрионы с различной скоростью развития. Потенциал развития 8-клеточного эмбриона в бластоцисту определяют let-7b-5p, let-7i-5p, piR020401.
4. Уровень экспрессии piR16735 и piR020401 в среде культивирования эмбрионов на 4 сутки после оплодотворения статистически значимо коррелирует с количеством ооцит-кумулюсных комплексов, let-7b-5p и piR020401 - с числом зрелых ооцитов и зигот, let-7i-5p и piR20497 - с количеством сперматозоидов в 1 мл эякулята, piR19675 с относительным числом прогрессивно подвижных сперматозоидов.
5. Эмбрионы с имплантационным потенциалом более 0,4 согласно профилю экспрессии малых некодирующих РНК в культуральной среде на 4-е сутки обладают высоким имплантационным потенциалом и коррелируют с частотой наступления беременности в программах вспомогательных репродуктивных технологий.

6. Сочетанное определение уровня экспрессии piR020401, let-7b-5p, let-7i-5p, piR20497 и piR19675 в среде культивирования эмбриона на 4 сутки после оплодотворения позволяет идентифицировать эмбрионы с низким имплантационным потенциалом в программах вспомогательных репродуктивных технологий с 87 %-ной специфичностью и 60 %-ной чувствительностью.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для прогнозирования наступления беременности в программах вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток с неудачными попытками в анамнезе рекомендуется оценивать не только клиничко-анамнестические данные супружеской пары и морфологические параметры эмбриона, но и профиль экспрессии let-7i-5p, let-7b-5p, piR020401, piR20497 и piR19675 в культуральной среде на 4 сутки после оплодотворения (стадия морулы). Имплантационный потенциал эмбриона определяется в лаборатории молекулярно-биологических методов исследования по формуле, полученной на основании модели логистической регрессии.

$$\text{ИП} = 1 / (1 + \text{EXP}(0.54571 + 0.38224 * (-\Delta\Delta\text{Ct}_{\text{let-7i-5p}}) + 0.01095 * (-\Delta\Delta\text{Ct}_{\text{let-7b-5p}}) - 0.007912 * (-\Delta\Delta\text{Ct}_{\text{piR020401}}) + 0.19217 * (-\Delta\Delta\text{Ct}_{\text{piR20497}}) + 0.26999 * (-\Delta\Delta\text{Ct}_{\text{piR19675}})))$$

При значении ИП > 0,4 эмбрионы обладают высоким имплантационным потенциалом.

2. Преимплантационное генетическое тестирование и криоконсервацию наиболее целесообразно проводить у эмбрионов с имплантационным потенциалом > 0.4 по данным профиля экспрессии let-7i-5p, let-7b-5p, piR020401, piR20497 и piR19675 в культуральной среде для оптимизации

финансово-экономических и временных затрат в программах вспомогательных репродуктивных технологий.

3. Неудачные попытки вспомогательных репродуктивных технологий с неоднократным получением эмбриона с имплантационным потенциалом $< 0,4$ свидетельствуют об отсутствии влияния дополнительных эмбриологических мероприятий (хетчинг, различная среда культивирования и др.) на качество получаемого эмбриона и ориентируют на проведение мероприятий, направленных на повышение качества гамет.

4. Супружескую пару следует информировать о том, что снижение уровня экспрессии малых некодирующих РНК let-7b-5p, let-7i-5p, piR02040 в культуральной среде эмбриона, отстающего в развитии на сутки, является неблагоприятным прогностическим маркером в отношении развития данного эмбриона в бластоцисту.

5. Дополнительным диагностическим маркером качества бластоцисты кроме морфологических критериев оценки может являться профиль экспрессии малых некодирующих РНК let-7i-5p, piR020401 и piR17716, определяемый в культуральной среде.

6. Пациенткам с неудачными попытками вспомогательных репродуктивных технологий в анамнезе рекомендовано включить в алгоритм ведения эмбриологического этапа исследование профиля экспрессии малых некодирующих РНК в среде культивирования.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Применение омиксных технологий в решении проблем репродуктивной медицины. / Драпкина Ю.С., Тимофеева А.В., Чаговец В.В., Кононихин А.С., Франкевич В.Е., Калинина Е.А. // Акушерство и гинекология.– 2018. -№ 9. – С. 24-32.

2. Оценка качества эмбриона по профилю экспрессии малых некодирующих РНК в культуральной среде эмбриона в программах вспомогательных репродуктивных технологий. / Тимофеева А.В., Калинина Е.А., **Драпкина Ю.С.**, Чаговец В.В., Макарова Н.П., Сухих Г.Т. // Акушерство и гинекология. - 2019. -№ 6. – С. 79-86.
3. Cell-Free, Embryo-Specific sncRNA as a Molecular Biological Bridge between Patient Fertility and IVF Efficiency. / Timofeeva A.V., Chagovets V.V., **Drapkina Y.S.**, Makarova N.P., Kalinina E.A., Sukhikh G.T. // International Journal of Molecular Sciences. – 2019. -№ 20. – С. 204-227.
4. Small non-coding RNA and their potential role in embryo quality and implantation. / **Драпкина Ю.С.**, Тимофеева А.В., Чаговец В.В., Макарова Н.П., Калинина Е.А. //Материалы III Всероссийской научно-практической конференции «Неотложные состояния в акушерстве». - 2019. - P.2-3.
5. SncRNA expression profile in spent culture media obtained from embryos with different development potential. / Timofeeva A.V., **Drapkina Y.S.**, Chagovets V.V., Makarova N.P., Kulakova E.V., Kalinina E.A., Sukhikh G.T. // Assisted reproductive technology World Congress. – New York, USA. - 2019. - P.43.