

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ**

**федеральное государственное бюджетное учреждение
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР АКУШЕРСТВА, ГИНЕКОЛОГИИ И ПЕРИНАТОЛОГИИ
ИМЕНИ АКАДЕМИКА В.И. КУЛАКОВА»**

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

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

**НАУЧНЫЕ РУКОВОДИТЕЛИ:
доктор медицинских наук, профессор
Калинина Е.А.
кандидат биологических наук
Тимофеева А.В.**

МОСКВА – 2020

Оглавление

Оглавление	2
ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1 СОВРЕМЕННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА ЭМБРИОНОВ В ПРОГРАММАХ ВРТ (обзор литературы)	15
1.1. Причины отсутствия наступления беременности в программах ВРТ.....	16
1.2 Способы оценки качества эмбрионов в клинической практике в программах ВРТ	18
1.3 Новые современные подходы для определения фертильности на стадиях оогенеза, сперматогенеза и раннего эмбрионального развития с помощью «омиксных» технологий	21
1.3.1 Анализ метаболомного профиля эмбриона	22
1.3.2. Анализ протеомного профиля эмбриона	24
1.4 Анализ мнкРНК как основных регуляторов репродуктивной функции	25
1.4.1. Биогенез и механизм действия мнкРНК	26
1.4.1.1. МикроРНК (miRNAs)	26
1.4.1.2. Эндогенные малые интерферирующие РНК (endo-siRNAs)	27
1.4.1.3. Пиви-взаимодействующие РНК (piwiRNAs)	27
1.4.2. Участие мнкРНК в гаметогенезе	28
1.4.2.1. Оогенез	28
1.4.2.2. Сперматогенез	30
1.5. Роль мнкРНК в эмбриональном развитии и имплантации эмбриона	34
1.6. Материнско-зиготический переход и механизмы его регуляции	37
Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	38
2.1. Материал исследования	38
2.2. Методы исследования	40
2.2.1. Общеклинические методы исследования	41
2.2.2. Гормональное исследование	42
2.2.3. Ультразвуковое исследование органов малого таза	43
2.2.4. Спермиологическое исследование эякулята	43
2.2.5. Протокол овариальной стимуляции и трансвагинальная пункция яичников	44
2.2.6 Протокол оплодотворения	45
2.2.7. Селективный перенос эмбриона и ведение посттрансферного Периода	46
2.3. Специальные методы исследования	47
2.5. Статистический анализ полученных данных	50

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	51
3.1. Клинико-anamnestическая характеристика включенных в исследование пациенток	52
3.2. Гормональный профиль пациенток, включенных в исследование	57
3.3. Характеристика стимулированного цикла	58
3.4. Клинические исходы лечебного цикла ЭКО	60
3.5. Корреляционный анализ данных клинико-инструментальных методов исследования супружеской пары	62
3.6. Данные глубокого секвенирования среды культивирования эмбрионов отличного качества у пациенток с различными исходами программ ВРТ	64
3.7. Наиболее значимые мнкРНК в определение качества эмбриона...	69
3.8. Наиболее значимые мнкРНК в определении имплантационного потенциала эмбриона	72
3.9. МнкРНК и параметры гаметогенеза	75
3.10. Анализ способности к бластуляции отстающего в развитии эмбриона по профилю экспрессии мнкРНК	79
Глава 4 ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	82
Заключение	95
ВЫВОДЫ	97
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	98
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	101
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	103

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В настоящее время распространенность бесплодия среди супружеских пар репродуктивного возраста составляет 10-15% [1]. При лечении различных видов бесплодия широкое распространение получили вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ), так как по сравнению с другими доступными методами лечения бесплодия ВРТ наиболее эффективны и имеют высокие показатели наступления беременности и рождения живых детей. Тем не менее, эффективность одной попытки ЭКО в среднем не превышает 40%, а частота родов живым плодом составляет 33,3 % [2].

Положительный результат в программах ВРТ во многом зависит от сбалансированного взаимодействия качественного эмбриона с рецептивным эндометрием. Имплантация эмбриона в эндометрий - многоэтапный процесс, опосредованный многоуровневой регуляцией внутри- и межклеточных взаимодействий [3]. Эти процессы необходимы для дальнейшего развития бластоцисты и адаптации организма матери к беременности.

Нарушения имплантации эмбриона в программах ВРТ могут быть связаны как с мужскими, так и с материнскими факторами. К мужским факторам, определяющим качество получаемого эмбриона и его имплантационный потенциал, относят возраст пациента, наличие урогенитальных инфекций, генетических нарушений, крипторхизма, варикоцеле, гипогонадизма, а также общих и системных заболеваний [4]. Среди основных женских факторов, влияющих на имплантацию эмбриона, следует выделить анатомические аномалии матки (3,5 % женщин, страдающих бесплодием), тромбофилии (20 % женщин, страдающих бесплодием), заболевания, приводящие к нарушению рецептивности эндометрия, например, наружный генитальный эндометриоз, частые внутриматочные вмешательства или хроническое воспаление (10-15% случаев бесплодия), а также совместимость супругов более чем по 3 антигенам системы HLA II класса (5-15% случаев бесплодия в паре) [5]. Согласно данным некоторых исследований пациентки с трубно-перитонеальным фактором бесплодия, в частности, с наличием гидросальпинкса, имеют нарушения рецептивности эндометрия за счет изменения экспрессии интегрина альфа-V/бета-3, влияющего на формирование пиноподий [6].

Несмотря на то, что материнские факторы играют важную роль в наступлении и дальнейшем прогрессировании беременности, селекция наиболее качественного и жизнеспособного эмбриона для переноса в полость матки представляется одной из наиболее важных задач в программах ВРТ. Выбор таких эмбрионов, как правило, осуществляется на основании визуальной

оценки их морфологических свойств. Морфологические критерии оценки качества эмбрионов включают равномерность деления клеток, форму бластомеров, степень их фрагментации, а также измерение размера эмбриона и скорости его развития, изучение его внутренней клеточной массы и трофэктодермы. Однако данные критерии оценки являются субъективными, и точность такого метода отбора эмбрионов остается недостаточно высокой. Более того, не все эмбрионы «хорошего» морфологического качества успешно имплантируются [7]. Учитывая, что, на сегодняшний день, становится очевидным преимущество переноса одного эмбриона в полость матки в программах ВРТ, возникает необходимость внедрения дополнительных неинвазивных технологий селективного выбора эмбриона с высоким имплантационным потенциалом.

За последние годы было изучено значительное число биомаркеров качества эмбрионов и их имплантационной способности. Достаточно многообещающим методом выступает предимплантационное генетическое тестирование (ПГТ) [8]. Хромосомная патология у переносимых эмбрионов может быть основной причиной отрицательных результатов лечения бесплодия. Однако среди недостатков данного метода стоит выделить невозможность диагностики при малом количестве материала, риск повреждения эмбриона при биопсии бластомера, вероятность мозаицизма и сбалансированных хромосомных aberrаций и точечных мутаций генов [9]. Также ПГТ остается дорогостоящей инвазивной диагностической процедурой, что приводит к некоторому ограничению использования данного метода в клинической практике. Поэтому поиск маркеров, которые дополнят общепринятый стандарт оценки качества эмбриона и его имплантационного потенциала, продолжается.

К основным требованиям, предъявляемым к потенциальным предикторам эффективности программ ВРТ, относят возможность оценки качества эмбриона без инвазивных вмешательств, четкие и воспроизводимые количественные характеристики, а также применимость в рутинной клинической практике [10]. В последние годы пристальное внимание ученых обращено к выявлению роли малых некодирующих РНК (мнкРНК), секретируемых в среду при культивировании эмбриона, в процессах имплантации эмбриона и его нормального развития в связи с доказанным ранее их многофункциональным действием на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях регуляции экспрессии генов [11]. К мнкРНК относят рибосомальные РНК, транспортные РНК, эндогенные малые интерферирующие РНК, микроРНК, пи-виРНК, а также малые ядерные и ядрышковые РНК. Такие мнкРНК, как транспортные РНК, рибосомальные РНК, малые ядерные и малые ядрышковые РНК

главным образом поддерживают функцию клеток (участие в модификации малых РНК, сплайсинге, трансляции) без весомого вклада в определение её фенотипа [12]. В отличие от других мнкРНК микроРНК и пивиРНК определяют клеточный фенотип за счет регуляции сигнальных путей, участвующих в основных клеточных процессах (пролиферации, дифференцировке, миграции, апоптозе клеток) [13]. Функцией микроРНК является подавление экспрессии белок-кодирующих генов, функция пивиРНК заключается, в основном, в стабилизации генома путем подавления экспрессии транспозонов, равно как и в регуляции уровня метилирования ДНК, влияющей на транскрипционную активность различных участков генома [14]. Кроме того, было доказано, что микроРНК и пивиРНК участвуют в МЗП, заключающемся в уничтожении материнских мРНК и запуске транскрипции генов эмбриона. От своевременного и скоординированного МЗП зависит раннее эмбриональное развитие и последующее течение беременности [15].

Поскольку была доказана секреция микроРНК и пивиРНК в культуральную среду многих клеточных линий, в том числе в среду культивирования эмбрионов, оценка уровня их экспрессии может быть использована в качестве неинвазивного способа анализа качества эмбриона и его имплантационного потенциала, а значит может обладать прогностической и диагностической ценностью в определении результативности программ ВРТ [16].

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, чему посвящено данное исследование.

Степень разработанности темы исследования

В последние годы отмечается рост интереса к разработке дополнительных неинвазивных методов оценки качества эмбриона и его имплантационного потенциала. Одним из перспективных подходов служит изучение культуральной среды, которая является уникальным объектом исследования, содержащим информацию о функциональном состоянии внутриклеточных сигнальных систем эмбриона. Стоит отметить, что нарушения функционального статуса эмбриона отражаются в изменениях метаболомного профиля культуральной среды [17]. Однако на пути внедрения анализа метаболитов в рутинную клиническую практику стоят два основных затруднения: 1) высокая зависимость скорости изменения метаболизма эмбрионов от состава культуральной среды и концентрации кислорода; 2) необходимость использования аналитических инструментов с высокой точностью и чувствительностью для определения незначительных изменений концентрации метаболитов в результате жизнедеятельности единичного эмбриона [18].

Изучение протеомного профиля эмбриона с помощью масс-спектрометрического (МС) анализа культуральной среды выявило дополнительные диагностически значимые маркерные белки для выбора новых мишеней в лечении бесплодия [19]. Однако исследование протеомного состава культуральной среды эмбрионов также сопряжено с рядом технических трудностей, связанных с искусственным обогащением среды мажорными белками сыворотки для нормального развития эмбриона, что требует дополнительных этапов пробоподготовки, в ходе которых возможны потери потенциально значимых низкопредставленных белков [20].

Последние несколько лет ученые активно изучают роль мнкРНК в процессах раннего эмбриогенеза, имплантации эмбриона и его дальнейшего развития. Среди некодирующих РНК особый интерес представляют микроРНК и пивиРНК благодаря своему влиянию на фенотип и функцию клеток [21]. Именно данные представители мнкРНК обладают диагностическим и прогностическим потенциалом при определении уровня их экспрессии на ранних стадиях развития эмбриона [22]. Учитывая, что микроРНК и пивиРНК секретируются клетками в их культуральную среду, изучение профиля данных молекул в эмбриональной среде во время проведения программ ВРТ представляется актуальной задачей [11].

Несмотря на то, что на сегодняшний день прогнозирование имплантационного потенциала эмбриона осуществляется на основании оценки его хромосомного набора, а также морфологических характеристик, около 50 % эупло-

идных бластоцист хорошего/отличного качества не имплантируются при переносе в полость матки [23]. Отсутствие имплантации можно объяснить изменениями в рецептивности эндометрия, так как результаты многих исследований неоднократно показали, что эмбрион и эндометрий находятся в постоянном взаимодействии. Основными медиаторами этих реакций служат микроРНК, образующиеся в клетках эмбриона и рецептивном эндометрии [24]. В настоящий момент в мировой литературе представлено 6 основных исследований, посвященных изучению профиля мРНК в культуральной среде в зависимости от качества и имплантационного потенциала эмбриона.

Первое исследование, посвященное данной проблеме, было представлено Rosenbluth et al в 2014 г [11]. Результаты данной исследовательской работы показали, что профиль микроРНК в культуральной среде зависит от хромосомного набора эмбриона и его способности к имплантации. Было проанализировано 55 образцов среды культивирования эмбрионов с помощью количественной ПЦР. Уровень miR-191 был выше в культуральной среде анэуплоидных эмбрионов, а также в культуральной среде эмбрионов с отсутствием имплантации. Профиль экспрессии miR-372 и miR-645 были также повышены у эмбрионов, которые не имплантировались. Более того, было обнаружено, что уровень микроРНК был выше в культуральной среде у эмбрионов, полученных с помощью ИКСИ.

В 2015 г. была опубликована еще одна работа под руководством Cuman S. et al. [25] Ученые доказали, что секретлируемые эмбрионом микроРНК влияют не только на имплантационный потенциал эмбриона, но и на рецептивность эндометрия. Было обнаружено, что уровень miR-661 был значительно повышен в культуральной среде эмбрионов, которые не имплантировались. Результаты исследования также показали, что miR-661 захватывается клетками эндометрия с помощью белка Argonaute 1, что приводит к нарушению имплантации. Argonaute 1 относится к группе белков, которые являются каталитическими компонентами RISC комплекса. RISC комплекс представляет собой белковый комплекс, обеспечивающий сайленсинг генов по механизму РНК-интерференции. Белки Argonaute также участвуют в образовании и регуляции активности микроРНК.

В 2016 г. были представлены любопытные результаты двух научных работ Borges E Jr. et al и Capalbo et al [26, 27]. В исследовании Borges E Jr. et al была изучена среда культивирования эмбрионов на 3 сутки после оплодотворения с последующим переносом эмбрионов на 5 сутки. В среде культивирования эмбрионов с отсутствием имплантации было обнаружено значительное повышение уровня экспрессии miR-142-3p. Основная функция данной микроРНК была доказана ранее и заключается в ингибировании клеточного цикла.

Были также зафиксированы статистически не значимые изменения уровня микроРНК miR-21, miR-19b и miR-92a. Caralbo et al. проанализировал профиль микроРНК в культуральной среде и в клетках внутренней клеточной массы эмбриона. Было обнаружено, что 96,6 % микроРНК, идентифицированных в культуральной среде, имеют происхождение из клеток внутренней клеточной массы. Кроме этого, среда культивирования, полученная от эмбрионов на стадии дробления и на стадии морулы, содержала меньший уровень микроРНК по сравнению с культуральной средой бластоцисты. Таким образом, наиболее активно эмбрион секретирует микроРНК в культуральную среду именно на стадии бластоцисты. Ученые также обнаружили, что у эмбрионов, которые не имплантировались, был повышен профиль экспрессии miR-20a и miR-30c.

В исследовании Abu-Halima M. et al. была также изучена взаимосвязь наступления беременности и профиля экспрессии микроРНК в культуральной среде эмбриона [28]. Ученые обнаружили, что miR-634, идентифицированная в среде культивирования эмбриона, может быть использована для прогнозирования наступления беременности и обладает точностью 71 % и чувствительностью 85 %. Среди обнаруженных 621 микроРНК в среде культивирования 102 молекулы имели разный паттерн экспрессии у эмбрионов, которые имплантировались, и у эмбрионов с отсутствием имплантации. Наиболее выраженные изменения были зафиксированы для miR-29c-3p. Учитывая, что микроРНК сперматозоида имеют важное значение в регуляции транскриптомного гомеостаза в оплодотворенном ооците, зиготе и эмбрионе на стадии 2 клеток, ученые проанализировали профиль экспрессии микроРНК сперматозоида и микроРНК в культуральной среде. Из 101 микроРНК, секретируемой сперматозоидом, 83 (82,2 %) были обнаружены в культуральной среде эмбриона. Таким образом, большинство микроРНК, обнаруженных в среде культивирования, могут быть привнесены именно сперматозоидом.

Одна из самых недавних работ, посвященная микроРНК и имплантационному потенциалу эмбриона, была опубликована Cimadomo D. et al. в 2019 г. [29]. В исследовании было показано изменение профиля экспрессии 6 микроРНК в культуральной среде эмбриона в зависимости от наличия/отсутствия имплантации. Уровень miR-182-5p, miR-519d-3p, miR-372-3p, miR-373-3p, miR-302a-3p и miR-518a-3p был ниже в культуральной среде имплантировавшихся эмбрионов. Ранее было доказано, что miR-182-5p является антиапоптотической микроРНК, влияющей на жизнеспособность клетки, а также процессы митоза, и участвует в регуляции репарации ДНК [30]. МикроРНК miR-519d-3p и miR-518a-3p участвуют в формировании материнско-фетальных вза-

имоотношений и могут быть обнаружены в кровотоке матери на ранних сроках беременности [31]. МикроРНК miR-518a-3p служит супрессором клеточной пролиферации за счет активации процессов апоптоза, а miR-519d-3p выступает ингибитором инвазии и миграции клеток трофобласта [32]. МикроРНК miR-372-3p и miR-373-3p предотвращают дисрегуляцию клеточной пролиферации и активно экспрессируются в недифференцированных клетках, а также в клетках плаценты, тем самым участвуя в прогрессировании беременности. Наконец, основная функция микроРНК miR-302a-3p заключается в регуляции клеточного цикла, апоптоза и аутофагии [33].

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 МЗП [15]. Ключевую роль в этом процессе играют пивиРНК. Было обнаружено, что ингибирование пивиРНК приводит к нарушению формирования эмбриона и вызывает выраженные дефекты головной части плода [34]. В некоторых организмах роль регулятора МЗП отводится также микроРНК. Результатом недавних исследований также явилось доказательство использования специфических микроРНК и пивиРНК в качестве маркёров хромосомного набора эмбриона и его имплантационного потенциала [35].

Таким образом, прорывные исследования в области анализа мнкРНК в культуральной среде и их сопоставление с морфологическими параметрами эмбриона и его имплантационной способностью являются отправной точкой для создания диагностических и прогностических тест-систем по оценке качества эмбрионов в рамках проведения программ ВРТ, а также прогнозирования и оптимизации исходов лечения.

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 вспомогательных репродуктивных технологий.
2. Оценить особенности фолликулогенеза, оогенеза и раннего эмбриогенеза у обследуемых пациенток с различными результатами программ вспомогательных репродуктивных технологий.
3. Изучить особенности экспрессии малых некодирующих РНК в культуральной среде в зависимости от качества эмбриона при селективном переносе в полость матки на 5-е сутки культивирования.
4. Изучить особенности экспрессии малых некодирующих РНК в культуральной среде эмбрионов в зависимости от результатов программ вспомогательных репродуктивных технологий.
5. Проанализировать исходы программ вспомогательных репродуктивных технологий у обследуемых пациенток.
6. Разработать персонафицированный алгоритм проведения программ вспомогательных репродуктивных технологий с использованием профиля экспрессии малых некодирующих РНК 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 развиваться до стадии бластоцисты хорошего качества. Определены мнкРНК, имеющие наибольший

вклад в имплантационный потенциал эмбриона (let-7i-5p, piR020401, piR20497).

Анализ уровня экспрессии данных мнкРНК для оценки качества эмбриона и прогнозирования его имплантационного потенциала дополняет морфологические критерии качества эмбриона, принятые Стамбульским консенсусом по оценке качества эмбрионов, а также позволяет индивидуализировать и оптимизировать выбор эмбриона для переноса в полость матки.

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 персонафицированный 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 затраты. Полученные результаты позволяют предложить инновационный неинвазивный метод оценки качества эмбриона и его имплантационного потенциала для повышения эффективности программ ВРТ.

Положения, выносимые на защиту

1. В исследуемых группах пациентов продолжительность бесплодия и наличие вторичного бесплодия коррелируют с процентом патологических форм сперматозоидов в эякуляте партнера (чем выше процент 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 пациенток с неудачными попытками ЭКО в анамнезе и индивидуализации эмбриологического этапа).
2. Определяемые в среде культивирования малые некодирующие РНК let-7b-5p, let-7i-5p, piR020401, piR16735, piR19675 и piR20326 дифференцируют эмбрионы с различной скоростью развития: let-7i-5p, piR020401, piR17716,

кроме того, дифференцируют blastocysts разного качества. Отставание в скорости развития эмбриона на сутки не предопределяет отсутствие образование blastocysts 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 эмбриона 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 процентом 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 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 4 печатные работы, из которых 3 входят в перечень рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК, 1 статья была опубликована в иностранном журнале IJMS с Impact Factor 4,182.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена в традиционной форме на 114 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 7 рисунками. Библиографический указатель включает 176 литературных источника, из них 17 русскоязычных и 159 иностранных работ.

Глава 1. СОВРЕМЕННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА ЭМБРИОНОВ В ПРОГРАММАХ ВРТ (обзор литературы)

Несмотря на многолетние исследования ученых, бесплодный брак в настоящее время остается актуальной проблемой современной медицины. Частота бесплодия в браке в мире достигает 10-15% и не имеет тенденции к снижению [1]. Среди всех доступных в настоящее время методов лечения наиболее эффективными являются вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) [2]. Учитывая, что в последние годы во всем мире отмечается тенденция к стремительному росту числа программ ВРТ, необходимость повышения результативности проводимых циклов выходит на первый план [36]. Немаловажное значение для наступления беременности имеет качество эндометрия, однако, решающую роль для достижения положительных результатов при применении ВРТ играет выбор эмбриона с максимальным имплантационным потенциалом. В клинической практике качество переносимых эмбрионов на стадии бластоцисты оценивается согласно морфологическим критериям, принятых Стамбульским консенсусом по оценке качества эмбрионов [37]. В последние годы в процессах имплантации эмбриона и его нормального развития была доказана значительная роль мнкРНК в культуральной среде эмбриона [11]. В связи с этим, представляется актуальным изучение профиля мнкРНК в культуральной среде с целью идентификации потенциальных биомаркеров для оценки качества эмбрионов, а также прогнозирования результатов лечения бесплодия на основе выбора оптимальных эмбрионов для переноса. Кроме этого, мнкРНК регулируют МЗП, который заключается в уничтожение материнских мРНК и запуске транскрипции генов эмбриона [38]. Именно благодаря своевременному и четко координированному МЗП происходит дальнейшее развитие качественного эмбриона с высоким имплантационным потенциалом, способного привести к наступлению и развитию физиологической беременности [15].

Таким образом, анализ профиля мнкРНК в качестве предикторной оценки имплантационного потенциала и качества эмбриона чрезвычайно перспективно, так как, с одной стороны, мнкРНК – широко используемый объект медицинской диагностики и в настоящий момент доступен широкий спектр отработанных методик, аппаратной и реагентной базы. С другой стороны, мнкРНК-диагностика является объективным, автоматизируемым, алгоритмируемым методом и сочетает в себе все основные качества, предъявляемые к наиболее перспективным способам диагностики. Наличие взаимосвязи между морфологическими критериями эмбриона, качеством МЗП, наступлением бе-

ременности и конкретными неcodирующими РНК в культуральной среде данных эмбрионов - перспективный и современный метод прогнозирования успеха в программах ВРТ [39].

1.1. Причины отсутствия наступления беременности в программах ВРТ

С момента внедрения ЭКО частота наступления беременности значительно возросла. Тем не менее, на эффективность программы ЭКО помимо качества переносимого эмбриона в значительной степени влияет возраст супружеской пары, фактор бесплодия, реакция яичников на стимуляцию, а также наличие внутриматочных синехий, миоматозных узлов, сопутствующих инфекций и других экстрагенитальных заболеваний [40]. Стоит отметить, что в настоящее время отмечается тенденция к увеличению числа женщин старшего репродуктивного возраста, обращающихся за медицинской помощью по поводу бесплодия, что обуславливает накопление гинекологических и соматических заболеваний, снижающих эффективность программ ЭКО [41]. Кроме этого, общеизвестен тот факт, что с возрастом снижается овариальный резерв и ухудшается качество ооцитов. У большинства женщин способность к зачатию резко снижается к 40 годам и практически полностью прекращается в 41—43 года [42]. Стоит отметить, что эффективность программы ЭКО снижается на 4,7% из расчета на каждый год жизни женщины после 30 лет [43]. Одним из наиболее эффективных способов преодоления бесплодия у пациенток старшего репродуктивного возраста служит использование донорских ооцитов, однако для многих супружеских пар принципиальным остается вопрос применения собственного генетического материала.

В циклах ВРТ одним из важнейших этапов является идеальное взаимодействие между генетически здоровым эмбрионом и рецептивным эндометрием. В случае нескольких неудачных попыток ЭКО с переносом эмбриона хорошего или отличного качества причина отсутствия имплантации, чаще всего, заключается в изменениях эндометрия. Таким образом, адекватная структура и толщина эндометрия в период «окна имплантации» считается одним из основных требований для успешного наступления беременности в программах ВРТ.

Результаты исследований, в которых приняли участие пациентки с донорскими эмбрионами, показали, что наиболее высокая рецептивность эндометрия приходится на 6-й день после овуляции и продолжается 4-5 дней до 20-24 дня менструального цикла [44]. Молекулярные механизмы, лежащие в основе

этого сложного процесса, были изучены на моделях животных. Данные исследования позволили идентифицировать гены, отвечающие за рецептивность эндометрия (фактор, ингибирующий лейкемию-ЛИФ, белок Nomeobox X3), за ответ эндометрия на имплантацию эмбриона (циклооксигеназа2-ЦОГ2) и за процесс децидуализации (рецептор интерлейкина11-IL-11R) [45].

Для определения точного времени «окна имплантации» и, соответственно, наиболее подходящего момента для переноса эмбриона в полость матки были изучены разные маркеры. Результаты многих научных работ показали, что члены семейства молекул клеточной адгезии (интегрины и т. д.) активно экспрессируются на поверхности эпителиальных клеток во время «окна имплантации». В настоящее время в качестве маркеров рецептивности эндометрия активно изучается муцин (MUC-1), L-селектин, а также члены семейства Wnt [46]. Цитокины и хемокины, секретируемые клетками эндометрия, рассматриваются в качестве еще одного перспективного маркера «окна имплантации». Было показано, что такие цитокины как интерлейкин-11, ЛИФ, интерлейкин-15, интерлейкин-1 и члены суперсемейства трансформирующего фактора роста (TGF) играют важную роль в оптимальном взаимодействии между эмбрионом и эндометрием [47].

В качестве маркеров имплантации могут быть использованы белки, которые, напротив, препятствуют прикреплению эмбриона. Одним из наиболее известных антиимплантационных белков служит аполипопротеин А-I (Аро А-I), активно секретируемый клетками эндометрия у пациенток с наружным генитальным эндометриозом [48]. У пациенток с неудачными попытками ЭКО в анамнезе было обнаружено снижение уровня экспрессии генов, отвечающих за клеточный цикл, межклеточные взаимодействия и Wnt - сигнальный путь. В данной группе пациенток было зафиксировано повышение уровня экспрессии генов Slug и DKK1. Ген DKK1 служит проапоптотическим агентом и ингибирует Wnt- сигнальный путь, который регулирует активность гена Slug и влияет на эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) [49].

На сегодняшний день для оценки рецептивности эндометрия в клинической практике активно применяется молекулярно-генетический подход, основанный на персонализированном изучении уровня активности 238 генов (тест ERA). Анализ выполняется с помощью технологии высокопроизводительного секвенирования (NGS), позволяющего получить данные не только об уровне активности генов, но и о микроорганизмах, колонизирующих полость матки [50].

Центральное место в структуре патологических изменений эндометрия, существенно снижающих эффективность программ ВРТ, продолжает занимать хронический эндометрит [51]. Частота выявления хронического эндометрита у пациенток с бесплодием варьирует от 10 - 60 %, достигая максимальной распространенности у женщин с трубно-перитонеальным фактором бесплодия и неудачными попытками ЭКО в анамнезе [52]. Кроме этого, у женщин с хроническим эндометритом отмечается снижение рецептивности эндометрия, которое характеризуется неполноценной секреторной трансформацией эндометрия, снижением числа зрелых пиноподий, развитием очаговой лимфоплазмочитарной инфильтрации и фиброзом строфы эндометрия.

Учитывая огромную роль эндометрия в процессах имплантации эмбриона, восстановление функционирования данной структуры приводит к повышению частоты имплантации и наступлению беременности. Были предложены различные подходы к улучшению рецептивности эндометрия, среди которых следует выделить локальную травматизацию эндометрия (скретчинг), применение иммуномодулирующих агентов (внутривенное введение иммуноглобулинов IgG), стволовых клеток, антибактериальных и эстрогенсодержащих препаратов, витамина Е, пентоксифиллина, проведение физиотерапевтических процедур, а также внутриматочное введение аутологичной тромбоцит-обогащенной плазмы крови [53]. Несмотря на широкий выбор средств для восстановления рецептивности эндометрия, ни один из предложенных методов не показал однозначного преимущества, что обуславливает необходимость дальнейшего поиска новых лекарственных препаратов.

1.2 Способы оценки качества эмбрионов в клинической практике в программах ВРТ

Жизнеспособность эмбрионов при культивировании в программах ВРТ зависит от ключевых параметров: температуры, рН и осмолярности культуральной среды. Развитие оплодотворенной яйцеклетки до стадии бластоцисты не обязательно происходит по строго определенному графику. Независимо от особенностей среды, в которой протекало развитие эмбриона, в идеале через 120 ч (на 5-й день) здоровый человеческий эмбрион должен достичь стадии бластоцисты [54]. Развитие эмбриона в течение первых двое суток после оплодотворения и до активации собственного генома обеспечивается благодаря трансляции материнских мРНК, происходящих из яйцеклетки. На стадии 8-клеточного человеческого эмбриона происходит уничтожение материнских

мРНК и убиквитинирование материнских белков, которые затем отправляются в протеасомный комплекс для деградации. Стадия 8-клеточного эмбриона приходится на 2-3 сутки и характеризуется активацией синтеза белков на мРНК сперматозоида, среди которых транскрипционные факторы и модификаторы гистонов обеспечивают МЗП для дальнейшей реализации эмбриональной программы [55]. Собственный геном эмбриона человека активируется через 2-3 суток после оплодотворения. На 5 день своего развития эмбрион должен состоять из 50-200 клеток, 20-30 % которых приходится на внутреннюю клеточную массу, а 70% - на трофобласт [56].

В соответствии с рекомендациями Стамбульского Консенсуса, качественная оценка эмбрионов должна включать в себя морфологические характеристики. Оценка состояния морулы производится на 3-4 день после оплодотворения и включает в себя изучение количества фрагментированных клеток, процента компактизации бластомеров, морфологию компактизированного эмбриона и симметричность бластомеров [37]. В рутинной клинической практике оценка качества морулы производится на основании наличия или отсутствия первичной полости (полость бластоцисты) и его объема. Если полость бластоцисты занимает до 20 % полости эмбриона, то такой эмбрион принято считать кавитирующей морулой. Эмбрион находится на стадии морулы, когда первичная полость еще не сформировалась. При этом границы между клетками у морулы могут быть слегка различимы или могут не визуализироваться (компактная морула). Стоит, отметить, что морфологическая оценка качества эмбриона на любой стадии развития остается субъективной методикой и зависит от опыта эмбриолога и разрешения микроскопа.

В клинической практике для оценки качества бластоцисты применяется классификация, принятая Стамбульским консенсусом по оценке качества эмбрионов в модификации, ESHRE, 2011 г., (таблица 1) [37]. Данные критерии включают в себя оценку внутренней клеточной массы, трофэктодермального слоя, прозрачной оболочки, а также скорость развития бластоцисты.

Таблица 1. Классификация качества эмбрионов согласно Стамбульскому консенсусу по оценке качества эмбрионов в модификации, ESHRE, 2011 г.) [37]

Эмбрионы	Качество
Отличные	Больше, чем 3АА
Хорошие	3-6 АВ, 3-6 ВА, 1-2 АА
Средние	3-6 ВВ, 3-6 АС, 3-6 СА, 1-2 АВ, 1-2 ВА
Плохие	1-6 ВС, 1-6 СВ, 1-6 СС, 1-2 ВВ

Согласно Стамбульскому консенсусу по оценке качества эмбрионов в модификации, цифрой обозначена степень зрелости бластоцисты [37]:

- 1 степень - ранняя бластоциста, полость бластоцисты меньше половины объема эмбриона.
- 2 степень - полость бластоцисты больше половины объема эмбриона.
- 3 степень - полная бластоциста, полость полностью занимает объем эмбриона.
- 4 степень - расширенная бластоциста, полость бластоцисты становится больше и начинает истончаться прозрачная оболочка.
- 5 степень - трофэктодерма начинает проникать через прозрачную оболочку.
- 6 степень — вылупившаяся бластоциста, покинувшая zona pellucida (ZP).

Первая буква в классификации характеризует состояние внутренней клеточной массы:

I класс (А) – хорошо различима, содержит много компактно расположенных, плотно упакованных клеток;

II класс (В) – хорошо различима, но имеет незначительные дефекты (небольшой объем, неплотно упакована, мало клеток);

III класс (С) – трудно различима, содержит всего несколько клеток.

Вторая буква в классификации характеризует состояние трофэктодермального слоя:

I класс (А) – хорошо организована, многоклеточная, формирует плотный эпителий;

II класс (B) – содержит малое количество неравномерно распределенных клеток;

III класс (C) – незначительное количество клеток.

В рекомендациях, предложенных Стамбульским консенсусом по оценке качества эмбрионов (ESHRE, 2011), также описаны способы оценки качества эмбриона на стадии дробления, где каждому классу эмбриона присвоено буквенное обозначение от A до D в зависимости от количества клеток, % фрагментированных клеток, симметричности клеток, наличия/отсутствия многоядерных клеток, наличия/отсутствия вакуолей и состояния блестящей оболочки [37].

A = эмбрионы отличного качества

B = эмбрионы хорошего качества

C = эмбрионы среднего качества

D = эмбрионы плохого качества (включает все многоядерные эмбрионы, не рекомендованы для переноса в полость матки)

Таким образом, неинвазивных способов оценки качества эмбрионов и их жизнеспособности крайне мало. Возможный метод в программах ВРТ - ПГТ, но он трудоемкий, дорогостоящий и инвазивный. Более того, 50 % эмбрионов, которые по результатам ПГТ оказываются эуплоидными, при переносе в полость матки не приводят к беременности [57]. На сегодняшний день в рутинной клинической практике для оценки жизнеспособности эмбриона используются морфологические критерии, принятые Стамбульским консенсусом по оценке качества эмбрионов, и ПГТ, что обуславливает поиск новых и дополнительных неинвазивных методов и критериев.

1.3 Новые современные подходы для определения фертильности на стадиях оогенеза, сперматогенеза и раннего эмбрионального развития с помощью «омиксных» технологий

Одним из перспективных подходов для неинвазивной оценки качества эмбриона и его имплантационного потенциала является масс-спектрометрический (МС) анализ культуральной среды. МС метод позволяет оценить качество эмбриона по метаболомному и протеомному профилю среды его культивирования. МС - один из наиболее информативных методов для молекулярного профилирования путем измерения отношения массы к заряду ионов, об-

разующихся из молекул анализируемой смеси; также при использовании меченых стандартов возможно и количественное определение молекулярных компонент в анализируемой пробе.

1.3.1 Анализ метаболомного профиля эмбриона

Метаболомика - это наука, изучающая функционирование живой системы путем анализа качественного и количественного состава метаболитов, являющихся субстратами, интермедиатами или продуктами большинства биохимических реакций. К метаболитам относятся нуклеотиды, составляющие основу генома и транскриптома; аминокислоты, необходимые для синтеза белков; липиды: холестерин, фосфолипиды, триглицериды, липопротеины, и др. [17]. Любые изменения метаболомного профиля отражают изменения функциональной активности живого объекта. Метаболомика может предоставить информацию для оценки функционального статуса половых клеток, эмбрионов и эндометрия, что позволит внести некие коррективы в лечение бесплодия супружеских пар, хотя в настоящее время остается много открытых и не решенных вопросов в этой области [58]. Из всего многообразия метаболитов, известных в настоящее время, наибольшее внимание уделяют углеводам и аминокислотам. Более 50 лет изучают возможность их использования для оценки физиологического состояния эмбрионов и прогнозирования вероятности их успешной имплантации. В настоящее время это стало возможным в программах ВРТ.

На начальных стадиях эмбриогенеза делящиеся клетки в основном используют пируват, лактат и аминокислоты, в то время как на более поздних этапах развития эмбрионы начинают активно поглощать глюкозу [59]. Это наблюдение применили для оценки жизнеспособности коровьих бластоцист. Оказалось, что эмбрионы, у которых потребление глюкозы было выше 5 мкг/ч, обладали большим потенциалом развития, нежели эмбрионы с более низкими показателями поглощения глюкозы [60]. Аналогичным образом, повышенная скорость поглощения глюкозы также была ассоциирована с более высокой эффективностью имплантации эмбрионов мыши и человека [61]. В то же время, в ходе дальнейших исследований авторы пришли к выводу, что запредельные показатели поглощения глюкозы наблюдаются у эмбрионов, потерявших способность регулировать свой метаболизм, что приводило к значительному ухудшению жизнеспособности. Напротив, эмбрионы, сохранившие способность контролировать метаболические процессы при наличии высокого

уровня поглощения глюкозы, обладают высокой жизнеспособностью. В настоящее время анализ углеводов нельзя предложить для надежной оценки качества эмбрионов, так как пока не определены четкие количественные диапазоны потребления глюкозы эмбрионом, ассоциированные с высокой и низкой его жизнеспособностью.

Аминокислоты играют несколько ключевых ролей во время эмбриогенеза, в числе которых - обеспечение энергии, биосинтетических предшественников, буферов внутриклеточного рН, антиоксидантов и регуляторов дифференцировки [62, 63, 64]. Было показано, что добавление заменимых и незаменимых аминокислот в культуральную среду значительно увеличивает скорость перехода от ранней стадии дробления к стадии бластоцисты [65, 66]. Учитывая участие аминокислот в широком спектре важных метаболических функций, разумно предположить, что эмбрионы с наибольшим потенциалом развития будут иметь характерный профиль аминокислот. Первоначальные исследования, проведенные Хаутоном и его коллегами, в которых концентрации аминокислот измеряли в содержащей эмбрион культуральной среде, выявили более низкое поглощение глутамина, аргинина и метионина, а также более низкое выделение аланина и аспарагина у 2-3-дневных эмбрионов, способных в дальнейшем дорасти до стадии бластоцисты, по сравнению с неразвивающимися эмбрионами [67]. К сожалению, как и в случае анализа углеводного профиля, не удалось вынести окончательную оценку применимости уровня поглощения/выделения аминокислот эмбрионами с наибольшим потенциалом развития. Измерение уровня аминокислот, как и уровня углеводов в культуральной среде может, в конечном итоге, найти клиническое применение, но в настоящее время ограничивается только исследовательскими задачами. Два основных затруднения, которые стоят на пути внедрения анализа метаболитов в рутинную клиническую практику: 1) высокая зависимость скорости изменения метаболизма эмбрионов от состава культуральной среды и концентрации кислорода; 2) необходимость использования аналитических инструментов с высокой точностью и чувствительностью для определения незначительных изменений концентрации метаболитов в результате жизнедеятельности единичного эмбриона. Расхождения в получаемых данных разными научными коллективами в связи с использованием культуральных сред различного состава, а также разных масс-спектрометрических платформ не позволяют пока создать единый протокол по отбору эмбрионов с высокими показателями жизнеспособности по оценке уровня метаболитов в культуральной среде, что требует дальнейших исследований.

1.3.2. Анализ протеомного профиля эмбриона

Масс-спектрометрический анализ протеомного профиля эмбриона позволяет выявить новые диагностически значимые маркерные белки для выбора новых мишеней в лечении бесплодия методом ВРТ.

На данный момент основные исследования по изучению протеомного состава бластоцисты проведены с использованием лабораторных животных, в частности, эмбрионов мышей [19]. Однако существует ряд работ по исследованию единичных бластоцист человека [68]. Авторам данных работ удалось идентифицировать 182 белка полости бластоцисты, которые можно разделить на три группы: 1) белки материнского происхождения *OOEP*, *NLRP5*, *TLE6*, *PADI6*, *ESAT1*, экспрессия которых важна при МЗП и сохраняется после активации эмбрионального генома; 2) белки, участвующие в локальном иммунном ответе и межклеточных взаимодействиях, например, *S100A8* и *S100A9*, обладающие провоспалительной функцией и имеющие повышенный уровень при раннем прерывании беременности; 3) белки цитоплазматической локализации, участвующие в метаболических процессах. Кроме того, авторами этих работ был проведен корреляционный анализ уровня экспрессии мажорных белков (*GAPDH*, *ACTA*, *H2A*) в полости бластоцисты 13 эмбрионов с данными цитогенетического анализа, полученными в ходе забора жидкости из бластоцисты. Выявлены достоверные отличия в уровне экспрессии *GAPDH* ($p=0,029$) между эуплоидными и анеуплоидными эмбрионами. Несмотря на полученные оптимистичные результаты, авторами исследования подчеркивается необходимость подтверждения этих данных на независимой более многочисленной выборке.

В исследовании других авторов было проведено протеомное профилирование бластоцист человека для выявления возможных механизмов влияния возрастных параметров женщин репродуктивного возраста на их фертильность, а также для поиска потенциальных биомаркеров качества бластоцист и положительного исхода в программах ВРТ [69]. В данном эксперименте были проанализированы эмбрионы женщин разных возрастных групп (<37 лет, >37 лет). В обеих группах было идентифицировано 148 белков, среди которых 108 белков были описаны впервые в жидкости полости бластоцисты. По уровню экспрессии 109 белков были выявлены отличия двух групп. Большинство дифференциально экспрессированных белков участвуют в процессах, связанных с убиквитинированием, среди которых убиквитин-конъюгирующий фермент (*UBC*), С-концевая убиквитин-гидролаза (*UCHL1*), *RNF223*, *KLHL17*, *PSMD4*

(компонент протеасомного комплекса 26S, отвечающий за распад убиквитинированных белков) и ZFAND6 (полиубиквитин-связывающий белок, участвующий в регуляции транскрипционного фактора NF- κ B) имеют резко сниженный уровень экспрессии или она вообще отсутствует, как в случае ZFAND6, в жидкости полости бластоцист, полученных от женщин из второй возрастной группы (>37 лет). Авторы работы пришли к выводу, что дисрегуляция системы убиквитинирования белков в растущем эмбрионе может быть причиной неудач в программах ВРТ.

Jensen P et al с коллегами провели исследования секретомы эмбриона на ранних стадиях его развития [70]. Исследование было направлено на выявление потенциальных маркеров, характеризующих способность бластоцисты к эффективной имплантации. В эксперименте при использовании технологии микрочипов проводили сравнение протеомного профиля среды культивирования эмбрионов, обладающих доказанной впоследствии способностью имплантироваться в децидуальный слой матки и не обладавших такой активностью, относительно культуральной среды, не содержащей эмбрион. Было выявлено снижение уровней секреции GM-SCF и CXCL13 у эмбрионов, обладающих имплантационным потенциалом [71].

Изучение протеомного состава культуральной среды эмбрионов сопряжено с рядом технических трудностей, связанных с искусственным обогащением среды мажорными белками сыворотки для нормального развития эмбриона, что требует дополнительных этапов пробоподготовки, в ходе которых возможны потери потенциально значимых низкопредставленных белков. Среди потенциальных биомаркеров имплантационной способности эмбриона следует выделить такие белки, как интегрин альфа-X и FRAS1 [72]. Многообещающие результаты недавних исследований показали, что интерлейкин-6, обнаруженный в содержащей эмбрион культуральной среде, может выступать еще одним маркером имплантационного потенциала эмбриона. Было доказано, что уровень интерлейкина-6 значительно повышен в культуральной среде эмбрионов с подтвержденной имплантацией в децидуальный слой матки [73].

1.4 Анализ мнкРНК как основных регуляторов репродуктивной функции

По результатам двух основных проектов по анализу генома человека HGP и ENCODE было установлено, что около 2/3 генома активно транскрибируется, из которых лишь 1,9% кодирует белки, а остальная часть транскриптома выполняет регуляторную функцию [74, 75], из которой чуть больше половины транскриптома приходится на долю длинных некодирующих РНК

(днРНК, длиной более 200 нуклеотидов) и мнкРНК, длиной менее 200 нуклеотидов [76]. Известна роль днРНК в эпигенетическом контроле хроматина, промотор-специфичной регуляции экспрессии гена, стабильности мРНК, инактивации X-хромосомы и геномном импринтинге. К мнкРНК относятся РНК, участвующие в трансляции (транспортные РНК, рибосомальные РНК), сплайсинге (малые ядерные РНК), модификации малых РНК (малые ядрышковые РНК), посттранскрипционной регуляции экспрессии генов (пиви-ассоциированные РНК, эндогенные малые интерферирующие РНК, микроРНК) [77]. Регуляция экспрессии генов на посттранскрипционном уровне является одним из механизмов, определяющих различный фенотип и функции клеток организма [21]. Клетки и ткани, отвечающие за выполнение репродуктивных функций, уникальны в том, что они непрерывно подвергаются существенной реорганизации как на транскриптомном, так и протеомном уровнях во время гаметогенеза и эмбриогенеза. Временные изменения протеомного профиля под контролем мнкРНК в последние десятилетия находятся в поле пристального внимания ученых-репродуктологов. Основными методами анализа уровня экспрессии мнкРНК являются технологии, основанные на гибридизации флуоресцентно-меченого зонда с РНК-мишенью, метод глубокого секвенирования и количественная ПЦР в реальном времени, сопряженная с обратной транскрипцией [39].

1.4.1. Биогенез и механизм действия мнкРНК

1.4.1.1. МикроРНК (miRNAs)

МикроРНК – эндогенные, короткие, не кодирующие белок молекулы РНК длиной 21-24 нуклеотида, присущие всем многоклеточным организмам и регулирующие экспрессию гена на пост-транскрипционном уровне путем связывания с комплементарными последовательностями мРНК-мишени [78]. Большинство микроРНК транскрибируется РНК-полимеразой II с образованием первичного транскрипта (pri-микроРНК) длиной 2-4 тысячи оснований с 5'-7-метил-гуанозиновой кэп-структурой, 3'-поли(А)-хвостом и сложной вторичной структурой. Дальнейший процессинг pri-микроРНК происходит в ядре под действием высоко консервативной РНКазы III Droscha в комплексе с кофактором DGCR8 с формированием 70-100 нуклеотидной шпилечной структуры – предшественника микроРНК (pre-микроРНК). Последний активно экспортируется в цитоплазму с участием экспортина-5 в комплексе с RAN-ГТФазой, где подвергается процессингу с образованием двухцепочечной зрелой микроРНК в среднем длиной 22 нуклеотида под действием РНКазы III Dicer в

комплексе с Tag РНК-связывающим белком (TRBP) (рисунок 1). Впоследствии, одна цепь дуплекса микроРНК встраивается в мультибелковый (белки Argonaute) РНК-ингибирующий комплекс (RISC) для целенаправленного транспорта RISC к мРНК-мишени и блокирования ее трансляции, в то время как другая цепь (микроРНК*) подвергается деградации [79].

1.4.1.2. Эндогенные малые интерферирующие РНК (endo-siRNAs)

Малые интерферирующие РНК (миРНК) образуются из эндогенных двухцепочечных РНК-предшественников в результате двунаправленной транскрипции генов/псевдогенов или транскрипции инвертированных повторов с последующим процессингом рибонуклеазой III Dicer без предшествующего процессинга с участием Drosha [80], что отличает биогенез миРНК от такового микроРНК. Процессированные молекулы миРНК образуют комплекс с AGO-белками, обеспечивающими взаимодействие направляющей цепи миРНК с мРНК-мишенью с последующим эндонуклеазным расщеплением и деградацией мРНК.

1.4.1.3. Пиви-взаимодействующие РНК (piwiRNAs)

Биогенез пиви-взаимодействующих РНК (пивиРНК) менее изучен и понятен чем таковой микроРНК и миРНК (рисунок 1). ПивиРНК являются продуктом расщепления длинных, одноцепочечных РНК-предшественников посредством Dicer-независимого механизма [81]. По данным глубокого секвенирования существует несколько разновидностей пивиРНК [82]: одна фракция пивиРНК происходит из кластеризованных геномных локусов в повторяющихся последовательностях (Класс I), вторая фракция пивиРНК является продуктом расщепления РНК транспозонов (Класс II) и оставшаяся фракция пивиРНК происходит из различных геномных областей, в том числе 3'-нетранслируемой области некоторых мРНК, предполагая наличие у пивиРНК функции регулятора уровня экспрессии гена помимо контроля хромосомных перестроек путем репрессии транспозонов. Пополнение пула пивиРНК и одновременная репрессия транспозонов происходит по механизму «пинг-понг» [83]. Белки Piwi и Aub связывают антисмысловую первичную пивиРНК, синтезированную на кластеризованных геномных локусах, с формированием комплексов Piwi-piRISCs и Aub-piRISCs, соответственно. Piwi-piRISCs импортируется в ядро и блокирует экспрессию транспозона путем тройного метилирования лизина 9 гистона H3 (H3K9me3) и локального формирования гетерохро-

матина. Aub-piRISCs связывается с мРНК транспозона и расщепляет ее с образованием смысловой вторичной пивиРНК. Последняя образует комплекс с AGO3 для связывания с антисмысловой первичной пивиРНК, синтезированной с геномного кластера, для пополнения пула первичных пивиРНК.

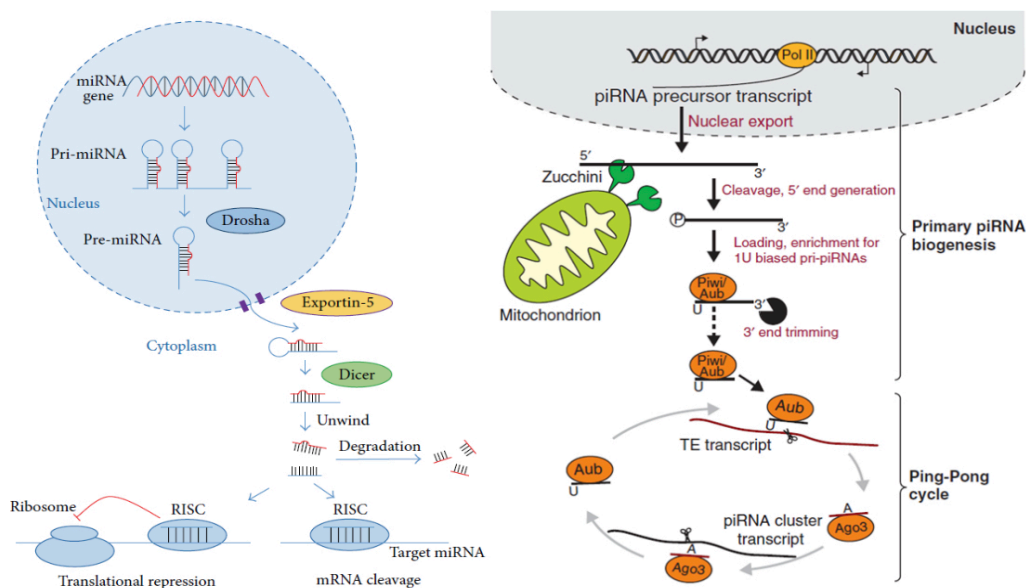


Рисунок 1. Биогенез микроРНК и пивиРНК

1.4.2. Участие мнкРНК в гаметогенезе

1.4.2.1. Оогенез

Оогенез млекопитающих включает в себя 3 фазы – митотическое деление овогоний (эмбриональный период до 1 года жизни), фаза роста (образование ооцитов 1-го порядка), фаза созревания (два мейотических деления). Доказано, что сразу после оплодотворения ооцит транскрипционно неактивен; активация эмбрионального генома происходит только на стадии двух-восьмиклеточного уровня развития в зависимости от вида млекопитающих.

Отсутствие способности транскрибировать гены на ранних стадиях развития эмбриона навело на мысль различных ученых о возможной посттранскрипционной регуляции экспрессии генов. Была обнаружена экспрессия микроРНК, миРНК и пивиРНК в ооцитах различных видов млекопитающих на разных стадиях развития [84]. Ученые описали изменения профиля экспрессии miR-205, miR-150, miR-122, miR-96, miR-146a и miR-146b-5p в зависимости от степени зрелости ооцита. Более того, экспрессия данных микроРНК увеличивалась у эмбрионов на раннем этапе развития и снижалась, когда эмбрион достигал стадии 8 клеток.

В результате секвенирования мнкРНК из ооцитов и клеток кумулюса свиньи во время фазы созревания *in vitro* было выявлено значительное повышение экспрессии miR-21 и снижение экспрессии miR-574-3p [85]. Ингибирование экспрессии miR-21 негативно влияет на мейотическое деление и достижение метафазы-II, подавляет овуляцию и индуцирует апоптоз, что возможно объясняется повышением уровня экспрессии гена-мишени miR-21 – PDCD4 (Programmed cell death-4) – регулятора апоптотического процесса. Что касается пивиРНК, наиболее представленными оказались 63 транскрипта, кодируемые 6 хромосомой (участок 246415-259463), среди которых наибольший уровень экспрессии был выявлен у piR84651 (41,6%-80,7% от общего числа прочтений пивиРНК в зависимости от стадии созревания ооцита и эмбриона).

Важно отметить, что у разных видов млекопитающих вклад мнкРНК в оогенез и раннее эмбриональное развитие различен. Хотя микроРНК в большом изобилии экспрессируются в ооцитах мышей, было доказано, что Dgcr8 не влияет ни на регуляцию уровня экспрессии мРНК, ни на созревание ооцитов, в то время как Dicer и Ago2 необходимы для полноценного оогенеза [86, 87]. Эти исследования позволили предположить, что ключевую роль в развитии и созревании ооцитов у мышей играют эндогенные микроРНК или синтезируемые неканоническим путем (Dgcr8-независимым) микроРНК [88]. Кроме того, в ооцитах мышей была выявлена экспрессия белков Piwi, но авторы исследования пришли к выводу, что ни один из них не оказывает влияния на фертильность самок равно как и пивиРНК, уровень экспрессии которых в ооцитах мышей оказался ничтожно низким. Напротив, Elke F. Roovers et al представил доказательства выраженной экспрессии PIWIL1, PIWIL2, PIWIL3 и пивиРНК в ооцитах человека, быка и макаки, причем спектр пивиРНК в данных ооцитах был сходен с таковым в сперматозоидах яичек на пахитенной стадии мейоза, на которой основная роль пивиРНК заключается в регуляции экспрессии транспозонов [89]. В таких модельных организмах, как *Drosophila* и *zebrafish*, белки PIWI и пивиРНК оказались существенно важными как во время оогенеза, так и сперматогенеза [90].

Фолликулярная жидкость заполняет полость фолликула и содержит множество белков, метаболитов и ионных компонентов, регулирующих созревание и качество ооцита. Результаты недавних исследований показали, что микроРНК miR-132, miR-320, miR-520c-3p, miR-24 и miR-222 регулируют уровень эстрадиола в фолликулярной жидкости, а miR-24, miR-193b и miR-483-5p влияет на концентрацию прогестерона [91]. Кроме этого, было показано, что экспрессия miR-132 и miR-320 значительно статистически значимо снижена в фолликулярной жидкости у пациенток, страдающих СПКЯ, по сравнению со здоровыми женщинами ($p = 0,005$ и $p = 0,0098$, соответственно) [92].

В другом исследовании ученые описали взаимосвязь между профилем экспрессии внеклеточных микроРНК в фолликулярной жидкости и способностью ооцита к оплодотворению, а также качеством получаемого эмбриона [93]. Было обнаружено, что фолликулярная жидкость, содержащая ооциты, с наибольшей способностью к оплодотворению, имеет профиль экспрессии мнкРНК miR-202-5p, miR-206, miR-16-1-3p и miR-1244, отличный от такового в фолликулярной жидкости, содержащей ооциты более низкого качества. Также ученые показали, что уровень экспрессии miR-766-3p, miR-663b, miR-132-3p и miR-16-5p в фолликулярной жидкости коррелирует с качеством получившегося эмбриона на 3 сутки.

Ооцит окружен клетками кумулюса, которые образуют ооцит-кумулюсный комплекс (ОКК). Клетки кумулюса сопровождают ооцит во время овуляции, при оплодотворении и в течение некоторого времени после проникновения сперматозоида в яйцеклетку. Было показано, что профиль микроРНК в клетках кумулюса коррелирует с количеством ооцитов, полученных во время трансвагинальной пункции яичников. У пациенток с бедным ответом яичников на стимуляцию были обнаружены статистически значимые изменения профиля экспрессии 104 микроРНК. Результаты количественной ПЦР в реальном режиме времени показали, что у пациенток с бедным ответом яичников в анамнезе уровень miR-21-5p значительно повышена, в то время как уровень miR-21-3p в клетках кумулюса наоборот понижается. У женщин, включенных в исследование, было получено недостаточное количество ооцитов в программе ЭКО/ИКСИ на фоне стимуляции суперовуляции препаратами гонадотропинов. При этом повышенный уровень miR-21-5p в данной группе пациенток не изменяется при снижении уровня эстрадиола в сыворотке крови [94].

1.4.2.2. Сперматогенез

Сперматогенез является высоко регулируемым процессом, в основном, на транскрипционном и пост-транскрипционном уровнях, важную роль в котором играют мнкРНК. Сперматогенез состоит из трех фаз: 1) самообновление сперматогоний путем митотических делений, 2) дифференцировка сперматогоний с образованием первичных сперматоцитов, которые проходят два мейотических деления для образования вторичных сперматоцитов и гаплоидных сперматид, 3) морфологические изменения гаплоидных сперматид с образованием зрелого сперматозоида. Недавние исследования выявили регуляторную роль определенного спектра микроРНК на разных стадиях сперматогенеза. Так, например, в поддержании популяции стволовых клеток сперматогоний существенную роль играют miR-21, Mir-17-92 (Mirc1) и Mir-106b-25 (Mirc3)

кластеров, Mir146, miR-221/222, miR-135a и ее ген-мишень FOXO1 [95]. Важную роль в инициации дифференцировки сперматогоний играет семейство Mirlet7 [96]. Для сперматогоний и первичных сперматоцитов характерна экспрессия miR-383, влияющая на фертильность мужских особей. Другие микроРНК специфичным образом функциональны во время профазы мейоза, а именно: miR-214, miR-24, miR-206, miR-202, miR-298 [97]. Важную роль в инициации/предотвращении апоптоза во время мейотической гомологичной рекомбинации сперматоцитов играют кластер miR-449, кластер miR-17-92 и miR-34b/c, воздействуя либо на транскрипционный фактор E2F-1, либо на фактор активации транскрипции 1 ATF1 [98]. Некоторые виды микроРНК участвуют в регуляции экспрессии генов в постмейотических сперматидеях. Например, miR-122a и miR-469 обуславливают снижение уровня замещающего белка Tnp2, ядерного белка, вовлеченного в перестройку хроматина при замещении гистаминов на протамины для обеспечения возможности морфологических изменений ядра во время спермиогенеза [99, 100]. Дисрегуляция удлинения сперматидов за счет структурных цитоплазматических и ядерных перестроек приводит к азооспермии.

В отличие от микроРНК, которая высоко представлена на всех стадиях сперматогенеза, пик экспрессии пивиРНК приходится только на стадию образования пахитенных сперматоцитов и круглых сперматидов. Пахитенные пивиРНК отличаются от других видов пивиРНК тем, что образуются по основному пути биогенеза независимо от «пинг-понг»-механизма амплификации пивиРНК (см. выше) [101]. Функциональное значение такого всплеска экспрессии пахитенных пивиРНК интенсивно анализируется. Известно, что пивиРНК участвуют в MIWI-опосредованной регуляции экспрессии транспозонов. Однако популяция пахитенных пивиРНК гетерогенна и только 20% пивиРНК картируется на гены транспозонов. Большинство пахитенных пивиРНК кодируется межгенными участками, не содержащими повторов, а также кодирующими белок генами, причем для этой популяции пивиРНК не было найдено РНК-мишеней [102]. Vourekas A et al предположили, что эта фракция пивиРНК является продуктом деградации мейотических РНК, не требующихся более в гаплоидных клетках. Роль пивиРНК и ассоциированных с ними белков PIWI на других стадиях сперматогенеза подробно описана в обзорной статье [103], в которой подчеркивается роль пивиРНК в эпигенетической модификации ДНК, регуляции трансляции мРНК и ее стабильности, поддержании и самообновлении герминальных стволовых клеток.

Изменения профиля мнкРНК могут выступать в качестве маркера мужского бесплодия. Результаты недавних исследований показали, что у пациен-

тов с азооспермией и другими нарушениями сперматогенеза (олигозооспермией, тератозооспермией, олигоастенотератозооспермией, астенозооспермией) происходят изменения профиля экспрессии микроРНК в сперме и в биоптате яичка, при этом для каждого типа нарушения сперматогенеза характерен свой профиль изменения микроРНК [104].

Дополнительный спектр мнкРНК, участвующий в развитии мужского бесплодия, был описан в еще одном исследовании [105]. В сыворотке крови у 12 пациентов методом глубокого секвенирования (small RNA-Seq) были идентифицированы микро- и пивиРНК, которые затем были проанализированы с помощью количественной ОТ-ПЦР в сыворотке крови, полученной от 57 пациентов с нарушениями сперматогенеза и с нормозооспермией. Было обнаружено, что уровень микроРНК hsa-miR-542-5p и hsa-let-7i-3p, а также пивиРНК hsa-piR-26399 в сыворотке крови заметно отличается у субфертильных пациентов по сравнению со здоровыми мужчинами.

Стоит подчеркнуть, что зрелый сперматозоид транскрипционно и трансляционно не активен. МнкРНК, в том числе микроРНК, играют важную функциональную роль как в сперматогенезе, так и на пост-тестикулярном уровне. Было показано, что большинство спермальных мнкРНК содержатся в головке сперматозоида, при этом каждый подтип мнкРНК различается по длине нуклеотидной цепочки, способу реализации их биологической функции, а также имеет свой собственный механизм биогенеза [106]. Далеко не все мнкРНК, обнаруженные в сперматозоиде, имеют тестикулярное или эпидидимальное происхождение. Эти данные подтверждают, что сперматозоиды могут реагировать на сигналы секретируемых другими тканями экзосом, содержащих микроРНК [107]. Спермальные мнкРНК участвуют в отцовском эпигенетическом наследовании, а также в формировании фенотипа потомства [108,109]. В экспериментах на мышах было обнаружено, что эпидидимальные мнкРНК влияют на процессы имплантации эмбриона и пост-имплантационное развитие [110]. МнкРНК сперматозоида уничтожают материнские мРНК, при этом за счет трансляционного аппарата яйцеклетки происходит синтез белков на мРНК сперматозоида, среди которых транскрипционные факторы (например, BVX, ZNF646), компоненты системы убиквитинирования (FBXO2, MAP1LC3A), модификаторы гистонов (HDAC11) обеспечивают МЗП для дальнейшей реализации эмбриональной программы [111].

Для мужских половых клеток более специфичными являются пивиРНК, подавляющие экспрессию транспозонов и повторяющихся элементов генома для поддержания его стабильности, в то время как аналогичные функции, но на территории ооцитов в большей степени выполняют миРНК [112]. МикроРНК экспрессируются на всех стадиях сперматогенеза и, в конечном итоге,

отвечают за правильное формирование сперматозоидов. Основная функция микроРНК в сперматозоидах заключается в подавление экспрессии белок-кодирующих генов. При нарушении баланса уровня экспрессии микроРНК/пивиРНК возникает патозооспермия и/или снижение оплодотворяющей способности спермы. По данным базы данных DIANA-microT v.3.0 в фертильной сперме идентифицировано 48 пар микроРНК, участвующих в модификации хроматина, миграции, пролиферации, дифференцировке клеток, эмбриогенезе, морфогенезе, а также регулирующих сигнальные пути [113].

В работе Jodar M et al были изучены мРНК сперматозоидов, трансляция которых происходит в ооците после оплодотворения [106]. Ученые обнаружили, что спермальные мнкРНК участвуют в трансляции мРНК и синтезе 11 белков (ANKRD12, ARHGAP26, ATP7B, BBX, CYP2R1, FGD4, KIAA0586, RASSF8, SIPA1L3, SPIRE1, ZNF646), которые имеют важное регуляторное значение в нормальном развитии эмбриона. Стоит отметить, что данные белки не были обнаружены в ооците, в клетках кумулюса и фолликулярной жидкости. Однако соответствующие РНК в большом количестве содержались в сперматозоиде, с постепенным снижением их уровня по мере роста и созревания эмбриона. Учитывая, что транскрипция собственного эмбрионального генома отсутствует, пока эмбрион не достигнет стадии 4- 8 клеток, а также отсутствие данного набора белков и соответствующих РНК в ооците и ооцит-ассоциированных структурах, обнаруженные в бластоцисте белки, могут быть транслированы только при наличии мРНК, привнесенных из сперматозоида. Более того, было описано, что спермальные РНК регулируют экспрессию генов в клетках у женщин, определяя общий иммунный ответ на имплантацию эмбриона. Полученные данные позволяют сделать предположение о том, что микроРНК, полученные из сперматозоида, обладают огромным значением в процессах раннего эмбриогенеза, имплантации эмбриона и развитии физиологической беременности.

Несмотря на то, что сперматозоид, действительно, привносит определенный спектр мнкРНК в ооцит во время процесса оплодотворения, остается не вполне понятным, какими именно функциями обладают данные спермальные РНК на доимплантационном этапе эмбрионального развития. Ученые провели эксперимент, в котором изучили эмбрионы, полученные от мышей, нокаутных по гену Dicer и Drosha [114]. Мыши, нокаутные по данному гену, образуют гаметы (сперматозоиды и ооциты) с дефицитом микроРНК и миРНК, что позволяет изучить их роль в процессах оплодотворения и раннем эмбриональном развитии. Результаты данного исследования показали, что сперматозоиды с нарушенным процессингом микроРНК и миРНК могли опло-

дотворять ооциты, но получившиеся эмбрионы значительно отставали в развитии. Однако отставание в эмбриональном развитии можно было скорректировать при добавлении отсутствующих мнкРНК. Стоит подчеркнуть, что в случае аналогичных нарушений в процессинге мнкРНК в ооцитах, подобные нарушения в эмбриональном развитии зафиксированы не были. Ученые сделали вывод, что мнкРНК, привнесенные из сперматозоида, играют более значимую роль нежели мнкРНК ооцитарного происхождения в раннем эмбриогенезе. Эти результаты подтверждают важную роль спермальных микроРНК и миРНК в процессах активации зиготического генома и дальнейшем развитии эмбриона.

Таким образом, микроРНК и пивиРНК играют существенную роль в процессах оогенеза и сперматогенеза. Профиль экспрессии данных мнРНК в фолликулярной жидкости и семенной плазме может выступать неинвазивным маркером качества гамет у пациентов с различными видами бесплодия, а также маркером прогнозирования дальнейшего развития эмбриона в программах ВРТ.

1.5. Роль мнкРНК в эмбриональном развитии и имплантации эмбриона

Значительным диагностическим и прогностическим потенциалом в отношении качества эмбриона и его имплантационной способности обладают мнкРНК при определении уровня их экспрессии в культуральной среде эмбриона. Обнаружение специфических микроРНК не только в эмбриональных клетках, но и в культуральной среде эмбрионов позволило рассматривать микроРНК в качестве удобного неинвазивного маркера плоидности генома эмбриона [11]. Результатом недавних исследований явилось доказательство использования специфических микроРНК и пивиНК в качестве маркёров хромосомного набора эмбриона и его имплантационного потенциала. Rosenbluth et al. обнаружили, что профиль экспрессии микроРНК в культуральной среде различается в эуплоидных и анеуплоидных эмбриональных клетках, а именно: в анеуплоидных эмбрионах плохого качества экспрессируется повышенное количество miR-372 и miR-191. Авторы еще одного исследования отмечают, что уровень экспрессии miR-20a и miR-30c напрямую коррелирует с частотой имплантации эмбриона [115]. В свою очередь, Noli L et al обнаружили, что повышенное содержание miR-142-3p в культуральной среде эмбриона свидетельствует о предстоящем нарушении процесса имплантации бластоцисты при ее переносе в полость матки [116]. В зависимости от стадии развития эмбриона концентрация микроРНК в культуральной среде варьирует [117].

Например, 4-х клеточный эмбрион в 2 раза более активно секретирует микроРНК, нежели 2-х клеточный эмбрион. По мере развития эмбриона секреция микроРНК в культуральную среду усиливается. Таким образом, наиболее специфичными выступают микроРНК, полученные из культуральной среды эмбрионов на более поздних стадиях развития.

Однако стоит подчеркнуть, что на наступление беременности влияет не только качество и имплантационный потенциал самого эмбриона, но и рецептивность эндометрия. Доказано наличие тонкой системы регуляции имплантации путем межклеточного взаимодействия перенесенного в полость матки эмбриона и эндометрия как непосредственно через белки межклеточной адгезии, так и опосредованно через внеклеточные везикулы, содержащие мкРНК, мРНК, белки и другие молекулы эмбрионального и эндометриоидного происхождения. La Ferlita A et al представили крайне важные данные о влиянии мнкРНК в эндометрии на рецептивность и, соответственно, на наличие/отсутствие имплантации [118]. В исследовании было показано, что уровень экспрессии микроРНК miR-30b и miR-30d значительно повышен, а содержание miR-494 понижено в рецептивном эндометрии во время окна имплантации. Было обнаружено, что гены-мишени данных микроРНК участвуют в циклическом ремоделировании эндометрия, включая созревание эндометрия до рецептивного состояния [119]. Одним из основных гликопротеинов, которые препятствуют имплантации эмбриона, является Муцин 1 (Muc1). Muc1 представляет собой трансмембранный гликопротеин, экспрессирующийся на апикальной поверхности клеток эндометрия. У мышей экспрессия Muc1 существенно понижается во время окна имплантации и обусловлена негативной регуляцией микроРНК miR-199a, let-7a и let-7b [120, 121]. Таким образом, экспрессия данных молекул клетками эндометрия и эмбрионом регулирует имплантацию бластоцисты. Важным участником в формировании рецептивного эндометрия также служит рецептор инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1R), который начинает активно экспрессироваться на поверхности клеток эндометрия во время рецептивной фазы. IGF1R участвует в эндокринной, аутокринной и паракринной регуляции процессов роста, развития и дифференцировки клеток и тканей организма. Повышение экспрессии IGF1R на клетках эндометрия приводит к более «прочному» прикреплению эмбриона [122]. Было продемонстрировано, что повышенный уровень экспрессии miR-145, имеющую в качестве мишени мРНК, которая участвует в синтезе IGF1R, ингибирует прикрепление эмбриона. Индукция синтеза miR-145 в клетках эндометрия была зафиксирована у пациентов с множественными неудачными попытками ЭКО в анамнезе. В исследовании Vilella F et al было также показано, что при добав-

лении miR-30d к культуральной среде, эмбрионы начинают активнее экспрессировать молекулы адгезии (интегрин бета-3 (ITGB3), интегрин альфа-7 (ITGA7) и кадгерин 5 (CDH5)) на доимплантационном этапе [123].

Еще одной очень важной характеристикой рецептивности эндометрия является ЭМП. При ЭМП клетки лишаются своей полярности и происходит ремоделирование клеточных соединений для облегчения взаимодействия с трофэктодермой эмбриона. Было показано, что у мышей уровень экспрессии микроРНК miR-429, отвечающей за подавление ЭМП, снижается во время окна имплантации. Активация экспрессии miR-429 приводит к подавлению миграции и инвазии клеток, вероятно, за счет воздействия на протокадерин 8 [124]. Протокадгерин 8 - белок, синтезирующийся на мембране клеток и принимающий активное участие в процессах клеточной адгезии [125]. В отличие от miR-429, уровень экспрессии микроРНК miR-126-3p повышается в потенциальном месте имплантации, что приводит к активации миграционной и инвазивной способности клеток за счет регуляции экспрессии интегрин $\alpha 11$ [126].

Более того, уровень экспрессии микроРНК в эндометрии изменяется за счет половых гормонов, например, избыточный уровень прогестерона индуцирует экспрессию miR-125b в клетках эндометрия человека. Активация экспрессии miR-125b ингибирует клеточную миграцию и нарушает имплантацию за счет подавления экспрессии матриксной металлопротеиназы 26 (MMP26), члена семейства матриксных металлопротеиназ, участвующих в деградации внеклеточного матрикса [127]. Эти исследования показали, что, помимо ранее описанных циклических изменений эндометрия, существует очень сложная, тонкая и многоступенчатая система регуляции рецептивности эндометрия, опосредованная воздействием микроРНК на целевые мРНК и изменением уровня экспрессии белков, связанных с рецептивностью эндометрия.

Таким образом, при нарушении секреции микроРНК и белков клетками эндометрия процесс имплантации будет нарушен и беременность не наступит, даже несмотря на то, что профиль экспрессии мнкРНК эмбриона соответствует бластоцисте с высоким имплантационным потенциалом. Поэтому для того, чтобы повысить результативность программ ВРТ может быть целесообразным определение не только эмбрионального профиля мнкРНК, но и оценка рецептивности эндометрия, в том числе с помощью исследования профиля мнкРНК в образце клеток эндометрия, полученного во время окна имплантации.

1.6. Материнско-зиготический переход и механизмы его регуляции

Успешное эмбриональное развитие сразу после оплодотворения 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 МЗП. Было обнаружено, что пивиРНК играют важную роль в МЗП [128]. Для уничтожения материнской мРНК активируется процесс ее деаденилирования, участником которого являются пивиРНК путем взаимодействия с основными белками ферментативного комплекса - деаденилазой CCR4 и РНК-связывающим белком Smaug [128]. В некоторых организмах роль регулятора МЗП отводится также микроРНК и миРНК [129]. Именно благодаря правильной активации эмбрионального генома возможен дальнейший запуск всей эмбриональной программы. У разных животных МЗП происходит в разное время. У эмбрионов человека запуск транскрипции генов эмбриона и уничтожение материнских мРНК начинается на 8-клеточной стадии. Новаторские работы по профилированию мРНК с использованием мультиплексной количественной ПЦР, технологии микрочипов или глубокого секвенирования определили гены, участвующие в созревании ооцитов, активации эмбрионального генома, сегрегации внутренней клеточной массы и трофэктодермы. Наибольшие изменения в экспрессии генов у эмбрионов человека были замечены на 8-клеточной стадии с активацией 2495 генов и значительным снижением уровня экспрессии 2675 генов, что соответствует основному МЗП [130]. При этом происходит активация именно тех генов, чьи продукты участвуют в процессинге, сплайсинге, трансляции мРНК, биогенеза рибосом, структурной организации хроматина, клеточном цикле. Важно отметить, что профили экспрессии мРНК на 8-клеточной стадии схожи с таковыми на стадии 12-16 клеток (стадия морулы), но резко отличаются от стадии бластоцисты [131]. Поэтому изучение уровня экспрессии генов для более детального понимания механизма активации зиготического генома и прогнозирования дальнейшего развития эмбриона наиболее перспективно и удобно именно на стадии морулы. В связи с этим, стадия морулы является ключевой в развитии эмбриона, поскольку именно на этом этапе начинается процесс компактизации бластомеров, от которого зависит как дальнейшее формирование полости бластоцисты, эмбриобласта и трофобласта бластоцисты, так и имплантационная способность эмбриона и развитие физиологической беременности.

Таким образом, инновационные исследования в области анализа профилей белков, метаболитов и мнкРНК, секретируемых эмбрионом, и их сопоставление с возрастными особенностями супружеской пары, цитогенетическими

данными эмбриона и его имплантационной способностью являются отправной точкой для создания диагностических и прогностических тест-систем по предикции исходов и повышению результативности программ ВРТ. На сегодняшний день создание молекулярного портрета эмбриона с различными морфометрическими показателями и профилем экспрессии мнкРНК в культуральной среде чрезвычайно перспективно для внедрения в клиническую практику в программах ВРТ.

Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материал исследования

В соответствии с целью исследования и поставленными для ее решения задачами на базе отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова (заведующая отделением – д.м.н., профессор Калинина Е.А.) и лаборатории прикладной транскриптомики отдела системной биологии в репродукции (заведующая лабораторией – к.б.н. Тимофеева А.В) федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – академик РАН Сухих Г.Т.), в период с сентября 2017 г. по декабрь 2017 г. осуществлялся набор пациенток согласно критериям включения/исключения.

Критерии включения пациенток в исследование:

- Возраст пациенток от 18 до 37 лет с нормальным овариальным резервом
- Женское бесплодие трубно-перитонеального происхождения
- Регулярный менструальный цикл
- Мужской фактор бесплодия (без выраженной патозооспермии)
- Информированное согласие на участие в исследовании

Критерии исключения:

- Пациентки с противопоказаниями для проведения ЭКО, в том числе с экстрагенитальной патологией, онкологическими, психическими заболеваниями
- Верифицированный лапароскопически и/или ультрасонографически наружный генитальный эндометриоз III – IV стадии распространения
- СПКЯ
- Патология эндометрия
- Интерстициальная и/или субсерозная миома матки более 4 см, субмукозная миома, деформирующая полость матки
- Генетические аномалии
- Пороки развития половых органов
- Перенесенные оперативные вмешательства на яичниках
- Тяжелые формы мужского бесплодия

В исследование была включена 41 супружеская пара, прошедшая лечение в программе ЭКО/ИКСИ, подписавшие добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Исследование было одобрено комиссией по этике биомедицинских исследований при ФГБУ «НМИЦАГиП им. академика В.И. Кулакова» МЗ РФ (протокол No 9, от 16.11.2017). Все пациенты, включенные в исследование, проходили программу ЭКО/ИКСИ по стандартному протоколу овариальной стимуляции со 2-3 дня менструального цикла с препаратами андГнРГ и гонадотропинами. У пациенток, включённых в исследование, проводился анализ данных анамнеза, параметров клинического и гормонального статуса, а также исходов программ ВРТ (отсутствие/наступление беременности).

2.2. Методы исследования

Предварительно перед началом программы ВРТ всем пациенткам было проведено полное клинико-лабораторное обследование в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации № 107н "О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению" от 2013г. Обследование проводилось в амбулаторных условиях по месту жительства пациентов или в ФГБУ «НМИЦАГиП им.В.И. Кулакова» МЗ РФ.

1. Рентгеновские снимки матки и труб (по показаниям);
2. Гормоны крови (на 2-3 день менструального цикла): ЛГ, ФСГ, эстрадиол, ТТГ, Т4св, АТ-ТПО, ДГА-С, пролактин, СТГ, кортизол, тестостерон, АМГ;
3. Исследование на инфекции методом ПЦР: хламидии, микопlasма, уреаплазма;
4. Анализ крови на ВПГ, ЦМВ, токсоплазмоз, краснуху;
5. Мазок на микрофлору;
6. Бакпосев на флору из влагалища и шейки матки;
7. Кольпоскопия, мазок на онкоцитологию;
8. УЗИ органов малого таза на 5-8 день цикла;
9. УЗИ щитовидной железы;
10. Маммография или УЗИ молочных желез;
11. Анализ крови на антитела к ВИЧ, HBsAg, anti-HCV, реакция Вассермана (оба супруга);
12. Группа и резус-фактор крови;
13. Клинический анализ крови;
14. Биохимический анализ крови;
15. Гемостазиограмма;
16. Общий анализ мочи;
17. ЭКГ;

18. Флюорография;
19. Консультация врача-терапевта;
20. Консультация генетика (по показаниям);
21. Консультация андролога, спермограмма мужа.

2.2.1. Общеклинические методы исследования

Сбор анамнеза проводился с учетом паспортных данных, профессиональных вредностей, вредных привычек, особенностей питания и физической активности, соматического анамнеза, перенесенных заболеваний. Изучался аллергологический анамнез, данные о наследственных заболеваниях, перенесенных заболеваниях, уточнялся характер становления менструальной функции, регулярность и продолжительность менструаций, а также половой функции (возраст начала половой жизни, количество половых партнеров, длительность половых отношений с настоящим партнером, регулярность половых актов, методы контрацепции). Производился сбор данных о репродуктивной функции пациенток (количество беременностей, их исходы и осложнения). Отмечались перенесенные гинекологические заболевания, их локализация, а также методы лечения. Подробно выяснялась история бесплодия, а также анамнез ранее проведенных программ ЭКО/ИКСИ и ПЭ (схема протокола стимуляции овуляции, количество полученных зрелых ооцитов на ТВП, качество эмбрионов, исход программы).

Объективно оценивали такие параметры, как общее состояние пациентки, тип телосложения, вычисляли индекс массы тела (ИМТ) по формуле: $ИМТ = \text{масса тела (кг)} / \text{рост}^2 (\text{м}^2)$. Для оценки гинекологического статуса пациенток проводился осмотр наружных половых органов, влагалища и шейки матки с помощью зеркал, выполнено влагалищно-абдоминальное и ректо-абдоминальное исследование, в ходе которых определяли состояние влагалища, матки, придатков, характер выделений из половых путей, а также выявляли наличие объемных образований органов малого таза.

У партнеров пациенток, включенных в исследование, производился сбор данных о перенесенных заболеваниях, репродуктивной функции, наследственных заболеваниях, урологических нарушениях, отмечались динамические изменения в спермограмме.

2.2.2. Гормональное исследование

До начала программы ВРТ всем пациенткам производилась оценка гормонального статуса в раннюю фолликулярную фазу (на 2-3й день) менструального цикла. Было проведено исследование концентрации ФСГ, ЛГ, АМГ, эстрадиола (Е2), пролактина (ПРЛ), кортизола (К), дегидроэпиандростерона сульфата (ДЭА-С), тестостерона (Т), тиреотропного гормона (ТТГ), свободного тироксина (Т4св), 17-оксипрогестерона (17-ОН). Концентрацию прогестерона (П) оценивали в плазме крови в лютеиновую фазу менструального цикла (на 20-22й день). Нормативные значения концентрации гормонов в плазме крови у женщин фертильного возраста приведены в таблице 2.

Таблица 2. Нормативные значения концентрации гормонов в плазме крови у женщин репродуктивного возраста

Показатели	Референсные значения
ФСГ, МЕ/л	2,0 - 10,0
ЛГ, МЕ/л	2,3 – 15,0
АМГ, нг/мл	1,0 -10,6
Эстрадиол, пмоль/л	150,0 – 450,0
Прогестерон, нмоль/л (лютеиновая фаза цикла)	16,0 – 95,0
Пролактин, мМЕ/л	120,0 – 500,0
Кортизол, нмоль/л	200,0 - 550,0
Тестостерон, нмоль/л	0,5 - 2,5
ТТГ, мМЕ/л	0,4 - 3,5
Т4, пмоль/л	10,0 – 25,0
ДГЭА-С, мкмоль/сут	0,9 – 11,7
17-ОП, нмоль/л	0,3 – 3,0

2.2.3. Ультразвуковое исследование органов малого таза

Ультразвуковое исследование (УЗИ) органов малого таза проводилось всем пациенткам на 2-3 день менструального цикла с целью исключения возможных противопоказаний для начала проведения лечебного цикла программы ЭКО/ИКСИ. При выполнении УЗИ оценивались размеры тела матки, структура миометрия, в случае родоразрешения путем операции кесарева сечения измерялась толщина рубца, производилась оценка структуры и толщины эндометрия, выраженность фолликулярного аппарата, количество и размер антральных фолликулов, наличие/отсутствие объемных образований органов малого таза. Следующее УЗИ выполнялось на 6 день стимуляции суперовуляции для проведения фолликулометрии и оценки роста толщины эндометрия. Учитывая индивидуальный ответ яичников на стимуляцию суперовуляции, а также динамику роста эндометрия осуществлялась коррекция дозы гонадотропинов. Исследование проводилось с использованием ультразвуковых аппаратов компании «ВК Medical» (Дания) трансвагинальным датчиком с частотой 3,5- 7,5 МГц при опорожненном мочевом пузыре.

2.2.4. Спермиологическое исследование эякулята

Параметры спермограммы оценивали в ходе предварительной подготовки к программе ВРТ и в день трансвагинальной пункции яичников (ТВП). Перед сдачей материала пациенту были даны необходимые рекомендации. Сбор материала производился в стерильный контейнер. Оценку качества спермы выполняли согласно рекомендациям ВОЗ от 2010 г. (таблица 3).

Таблица 3. Нормативные значения показателей спермограммы (ВОЗ, 2010)

Показатель	Норматив, единицы измерения
Общий объем эякулята	$\geq 1,5$ мл
pH	$\geq 7,2$
Концентрация сперматозоидов в 1 мл эякулята	≥ 15 млн/мл

Общее количество сперматозоидов	≥ 39 млн
Время разжижения	10-60 минут
Подвижность сперматозоидов Общая подвижность сперматозоидов (A+B)	$\geq 40\%$
Сперматозоиды с прогрессивным движением (A)	$\geq 32\%$
Морфология	$\geq 4\%$ нормальных форм
Жизнеспособность сперматозоидов	$\geq 58\%$ живых сперматозоидов
Концентрация лейкоцитов	< 1 млн/мл
Агглютинация	Отсутствует
Эритроциты	Отсутствуют
MAR-тест IgG	0-50 %

2.2.5. Протокол овариальной стимуляции и трансвагинальная пункция яичников

Начало введения гонадотропинов приходилось на 2-3 день менструации по протоколу с использованием антагонистов гонадотропин-рилизинг гормона (ант-ГнРГ) и рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона (р-ФСГ). Начальную дозу гонадотропинов рассчитывали в зависимости от возраста, веса, а также овариального резерва пациентки. Далее выполняли фолликулометрию с помощью УЗИ, а также производили изменение дозы препаратов в зависимости от динамики роста фолликулов и эндометрия. Для предотвращения преждевременного пика ЛГ при достижении фолликулом диаметра 14 мм назначался препарат ант-ГнРГ в дозе 0,25 мг/сутки подкожно. Для финального созревания ооцитов по достижении диаметра фолликулов ≥ 17 мм

назначался человеческий хорионический гонадотропин (чХГ) в дозе 8000-10000 МЕ в качестве триггера овуляции.

В специально оборудованной операционной в стерильных условиях под внутривенной анестезией и ультразвуковым контролем через 35 часов после введения триггера овуляции производился забор ооцитов с помощью трансвагинальной пункции фолликулов с последующей оценкой качества полученного материала.

2.2.6 Протокол оплодотворения

Сразу же после аспирации фолликулярной жидкости во время трансвагинальной пункции производили идентификацию ОКК и оценку степени зрелости ооцитов под стереомикроскопом на нагретой поверхности стерильного ламинарного бокса. Во время производимых манипуляций постоянно поддерживали стабильную температуру (+37,0 С). ОКК отмывали от фолликулярной жидкости и крови и помещали в стерильные планшеты (Nunc, Дания) с культуральной средой Continuous Single Culture (CSCM, Irvine Sc., USA) на 2-3 часа с целью предварительной инкубации при температуре +37,0 С и атмосфере с 6% CO₂. Полученные ооциты были оплодотворены методом ИКСИ. Перед проведением ИКСИ после периода предварительной инкубации производилось денудирование ооцитов – их ферментативное очищение от клеток кумулюса при помощи раствора гиалуронидазы в течение 20 секунд (Irvine Sc., USA). После этого ОКК отмывали в среде Continuous Single Culture (CSCM, Irvine Sc., USA) и возвращали в лунки.

После проведения оплодотворения методом ИКСИ ооциты переносили в культуральную среду Continuous Single Culture (CSCM, Irvine Sc., USA) с целью дальнейшего культивирования. Оценка наступления стадии двух пронуклеусов (формирования зиготы) проводили через 14-16 часов после оплодотворения. В случае отсутствия двух пронуклеусов оплодотворение считали несостоявшимся. Все этапы культивирования проводили в мультигазовых инкубаторах COOK (Ирландия) в каплях по 25 мкл под маслом (Irvine Sc., USA). Среду Continuous Single Culture (CSCM, Irvine Sc., USA) не меняли в течение 3-х суток культивирования. На 4-е сутки культивирования была проведена морфометрическая оценка качества эмбрионов, перенос эмбрионов в свежую среду CSCM для дальнейшего культивирования до 5-х суток после оплодотворения и замораживание 4-х дневной среды культивирования эмбрионов в стерильных пробирках типа эппендорф (SSI, USA) при -70°С для последующего анализа уровня экспрессии мнкРНК методом глубокого секвенирования и количественной ПЦР в реальном времени.

2.2.7. Селективный перенос эмбриона и ведение посттрансферного периода

На 5 сутки после оплодотворения осуществляли перенос 1 эмбриона в полость матки с помощью мягкого катетера Wallace (Германия) или СооК (Австралия). Оставшиеся эмбрионы, подходящие по качеству для дальнейшего применения в криопротоколе, витрифицировали. В день переноса эмбриона у всех пациенток, включенных в исследование, была оценена толщина и структура эндометрия с помощью трансабдоминального УЗИ. По данным УЗИ М-эхо составляло не менее 8,0- 9,0 мм, эндометрий имел характерную трехслойную структуру. Ни у одной пациентки, включенной в исследование, не были выявлены объемные образования в области малого таза и признаки хронического эндометрита.

Поддержку лютеиновой фазы цикла осуществляли препаратами прогестерона (микронизированный прогестерон 300 мг/сутки интравагинально или дидрогестерон 30 мг/сутки внутрь), начиная со дня ТВП. После переноса эмбрионов повышали дозу микронизированного прогестерона до 600 мг/сутки интравагинально или дидрогестерона до 60 мг/сутки per os.

На 14 день после переноса эмбриона пациентки сдавали кровь на содержание бета-субъединицы хорионического гонадотропина человека (β -ХГЧ) для диагностики беременности. Положительный результат соответствовал уровню β -ХГЧ более 35 МЕ/л. При положительном результате β -ХГЧ для диагностики клинической внутриматочной беременности на 21 день после переноса эмбриона выполняли трансвагинальное УЗИ.

При отрицательном результате β -ХГЧ у пациенток с витрифицированными эмбрионами был проведен криопротокол. Подготовку эндометрия осуществляли препаратом эстрадиола валерата с 5-6 дня менструального цикла. Дозу препарата подбирали индивидуально (4-6 мг/сут). Эмбрион переносили в полость матки на 19-20 день менструального цикла. Толщина эндометрия в день переноса эмбриона составляла 9-12 мм. Поддержку лютеиновой фазы цикла, а также посттрансферного периода выполняли аналогично тактике, примененной в стимулированном цикле. Диагностика беременности также не отличалась от протокола переноса нативного эмбриона.

2.3. Специальные методы исследования

На 4-е сутки после оплодотворения оценивали качество эмбриона, планируемого к переносу в полость матки, согласно Стамбульскому консенсусу по оценке качества эмбрионов, и осуществляли забор культуральной среды объемом на 50 мкл в виалы с соответствующей маркировкой с последующим хранением при -80°C . Четырехдневные эмбрионы были перенесены в свежую культуральную среду. Всего было собрано 109 образцов среды культивирования эмбрионов 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).

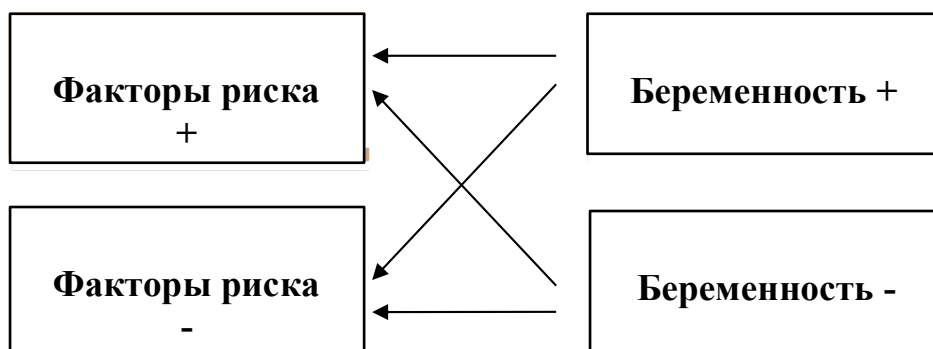
Из собранных образцов были выделены РНК колоночным способом с использованием набора «miRNeasy Serum/Plasma Kit» (Qiagen). Идентификация всех имеющихся мнкРНК в среде культивирования эмбриона была осуществлена методом глубокого секвенирования с использованием набора по синтезу кДНК-библиотек NEBNext® Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina® (Set11, New England Biolab®, Germany) на платформе NextSeq 500 platform (Illumina, USA). Относительный уровень экспрессии кДНК оценивали по кратности изменения (КИ) методом $\Delta\Delta\text{Ct}$.

$M0s1 / M0s2 = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, где $M0s1$ и $M0s2$ – исходные количества кДНК в образцах $s1$ и $s2$, $\Delta\Delta\text{Ct} = (\text{Cts1} - \text{Ctnorm1}) - (\text{Cts2} - \text{Ctnorm2})$, Ct - значение цикла амплификации в точке пересечения кинетической кривой накопления продукта амплификации с линией порогового уровня флуоресценции, который определяется автоматически программным обеспечением амплификатора StepOnePlus; Cts1 и Cts2 - значение порогового цикла амплификации кДНК анализируемой мнкРНК в двух сравниваемых образцах $s1$ и $s2$; Ctnorm1 и Ctnorm2 - значение порогового цикла амплификации кДНК нормировочной эндогенной мнкРНК в двух сравниваемых образцах $s1$ и $s2$. Образцом сравнения служила среда культивирования без эмбриона; для нормировки данных ПЦР анализируемых мнкРНК была выбрана [hsa-piR023338|gb|DQ601914](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/hsa-piR023338.gb) ввиду стабильной экспрессии во всех образцах.

2.4. Дизайн исследования

Дизайн исследования для задачи №1

Проспективное исследование случай-контроль.



Группы:

Группа 1 – пациентки с отсутствием беременности после ЭКО и ПЭ.

Группа 2 – пациентки с наступившей беременностью после ЭКО и ПЭ.

Конечные точки исследования:

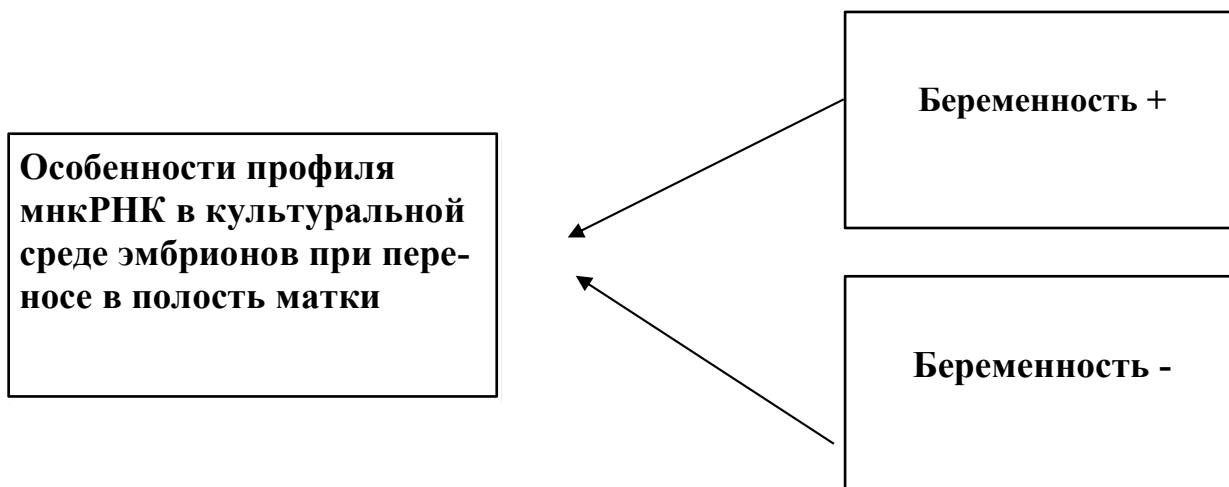
- Средние значения и частоты параметров клинического и гормонального статуса в сравниваемых группах.

Дизайн исследования для задачи №2

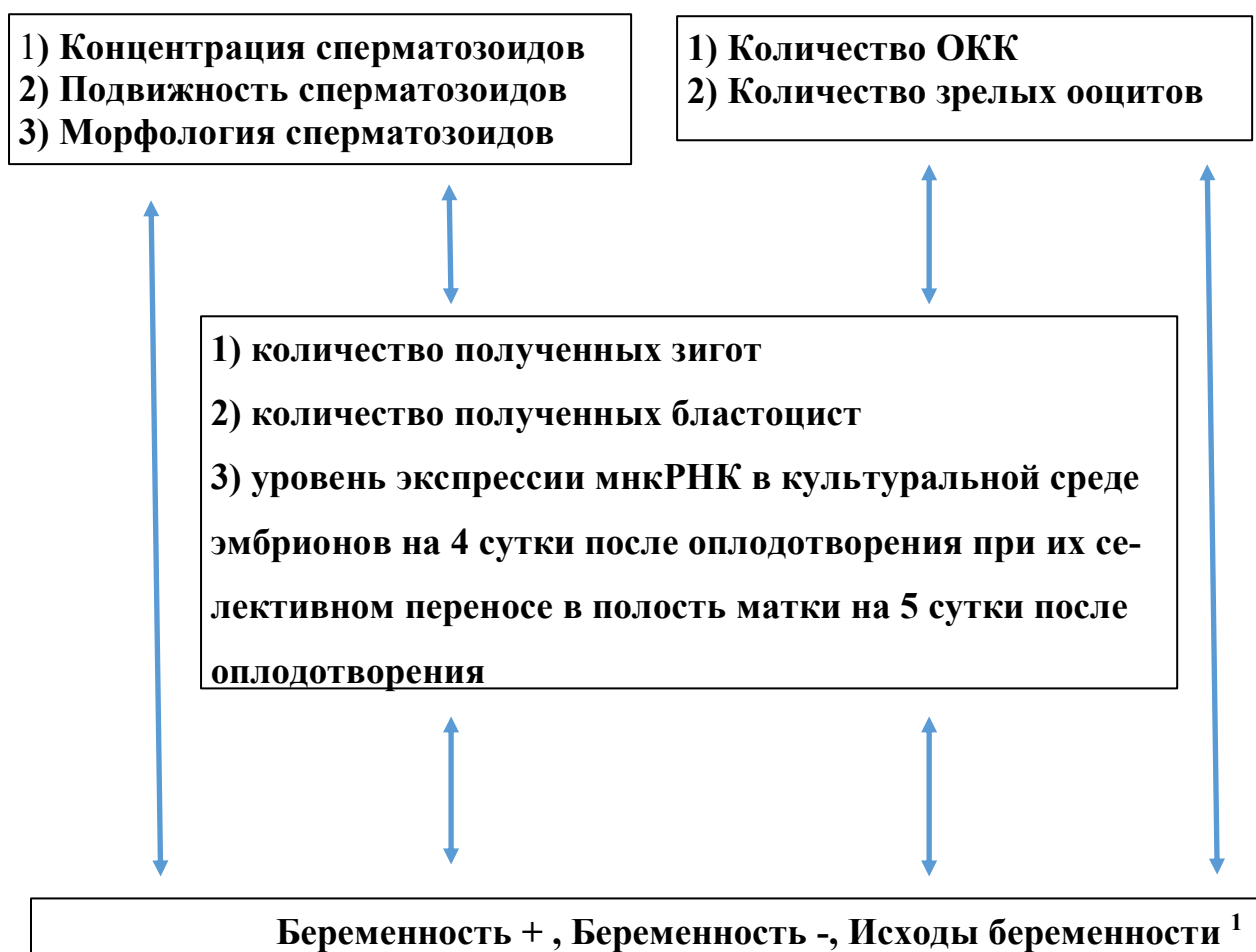


Дизайн исследования для задачи №3

Проспективное исследование случай-контроль.

**Дизайн исследования для задачи №4**

Проспективное исследование случай-контроль.



¹ Исходы беременности:

- биохимическая беременность (%)
- клиническая беременность (%)
- самопроизвольный выкидыш в I триместре беременности (%)
- неразвивающаяся беременность в I триместре (%)
- своевременные роды (%)

2.5. Статистический анализ полученных данных

Для статистической обработки результатов использовали скрипты, написанные на языке R [132], и программу RStudio [133]. Соответствие анализируемых параметров закону нормального распределения оценивали по значениям теста Шапиро-Уилка. Статистический анализ проводили с помощью χ^2 -теста для сравнения категориальных данных, метода ANOVA при анализе трех групп и нормальном распределении исследуемой величины или теста Манна-Уитни при парном сравнении в случае, когда распределение не соответствовало закону нормального распределения. Для описания категориальных бинарных данных использовали абсолютные числа N и процентные доли от общего числа пациенток в группе P в формате $N (P\%)$. Для описания количественных данных, имеющих нормальное распределение, использовали среднее арифметическое (M) и стандартное отклонение (SD) в формате $M (SD)$. При распределении признаков с распределением, отличающимся от нормального, их описывали в виде медианы (Me) и квартилей $Q1$ и $Q3$ в формате $Me (Q1; Q3)$. Поскольку анализировали как количественные, так и качественные признаки, то корреляционный анализ проводили с использованием непараметрического корреляционного критерия Спирмена. 95% доверительный интервал для коэффициента корреляции определяли с помощью преобразования Фишера. Величину порогового уровня значимости p принимали равной 0,05. Если значение p было меньше 0,001, то p указывали в формате $p < 0,001$. Кроме того, морфологическую характеристику эмбрионов и полученные экспериментальные данные анализировали с помощью дискриминантного анализа методом частных наименьших квадратов.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Согласно поставленным целям и задачам исследования была обследована 41 супружеская пара, обратившаяся с целью проведения программы ЭКО или ЭКО/ИКСИ и ПЭ по поводу бесплодия, обусловленного трубно-перитонеальным фактором, соответствовавшая критериям включения/исключения (см. главу 2). Ни одна супружеская пара не была исключена из исследования. От 41 супружеской пары было получено 109 эмбрионов, соответственно 109 образцов среды культивирования было отправлено на дальнейший анализ.

3.1. Клинико-anamнестическая характеристика включенных в исследование пациенток

В зависимости от исхода программы ЭКО или ИКСИ все супружеские пары были разделены на две группы:

I группа: 25 супружеских пар, проходивших лечение со стимуляцией супероуляции и селективном переносом эмбриона в стимулированном цикле, с отрицательным результатом имплантации.

II группа: 16 супружеских пар, проходивших лечение со стимуляцией супероуляции и селективном переносом эмбриона в стимулированном цикле, с положительным результатом имплантации.

Все пациенты были подобраны таким образом, чтобы минимизировать влияние вмешивающихся факторов на результаты программ ВРТ. Возраст пациенток достоверно не отличался и составил в среднем $32,3 \pm 3,5$ года в группе I, а в группе II $32,0 \pm 3,1$ года. Средний возраст пациенток был сопоставим в двух группах. Средний возраст мужчин, включенных в первую группу, составил 35,4 года, а во вторую группу - 33,5 года (таблица 4). Таким образом, возраст пациентов, включенных в исследование, достоверно не отличался.

Таблица 4. Возрастная характеристика включенных в исследование пациентов

Изучаемые параметры	Группа I (отрицательный результат имплантации) (n=25)	Группа II (положительный результат имплантации) (n=16)	p
Средний возраст женщин (лет)	32,3 (3,5)	32,0 (3,1)	> 0,05
Средний возраст мужчин (лет)	35,4	33,5	> 0,05

У всех участвующих в исследовании пациенток отмечали нормальный женский тип телосложения с правильным развитием вторичных половых признаков. Среднее значение индекса массы тела (ИМТ) пациенток в группе I составило $22,1 \pm 2,0$ кг/м², а в группе II - $22,2 \pm 1,4$ кг/м², что является нормальным значением ИМТ (таблица 5).

Таблица 5. Характеристика ИМТ включенных в исследование пациенток

Изучаемые параметры	Группа I (отрицательный результат имплантации) (n=25)	Группа II (положительный результат имплантации) (n=16)	p
ИМТ	22,1 (2,0)	22,2 (1,4)	> 0,05

При анализе особенностей менструального цикла, овариального резерва, репродуктивного анамнеза и структуры перенесенных гинекологических заболеваний в группах статистически значимых различий также не выявлено.

Данные по оценке менструальной функции пациенток (возраст менархе, продолжительность цикла, длительность менструальных выделений) представлены в таблице 6.

Таблица 6. Характеристика менструальной функции включенных в исследование пациенток

Показатель	Группа I (отрицательный результат имплантации) (n=25)	Группа II (положительный результат имплантации) (n=16)	P
Возраст менархе (лет)*	13,4 (12-15)	13,8 (13-15)	> 0,05
Продолжительность менструального цикла (дней)*	30 (27-33)	28,4 (27-30)	> 0,05
Продолжительность менструального кровотечения (дней)*	4,32 (3-5)	4,25 (3-5)	> 0,05
Болезненные менструации**	5 (20 %)	3 (18,75 %)	> 0,05
Безболезненные менструации**	20 (80 %)	13 (81,25 %)	> 0,05

Примечания

*данные представлены как медиана, 25 – 75 процентиля;

**данные представлены как доли пациенток в % и абсолютное число пациенток.

При изучении характеристик менструального цикла выявлено, что у большинства пациенток возраст менархе не превышал 13 лет, самый ранний возраст менархе составил 12 лет (в I группе), а самый поздний – 15 лет (в I и II группе). Медиана продолжительности менструального цикла составила 30 дней в I группе и 28 дней во II группе. В обеих группах средняя продолжительность менструального кровотечения составляла 4 дня, у большинства пациенток отмечались безболезненные менструации. Начало половой жизни отмечалось в возрасте 19 (18– 20) лет.

Анализ данных о наличии/отсутствии беременности в анамнезе у женщин, включенных в исследование, выявил преобладание случаев вторичного бесплодия у пациенток из II группы (56,2 %) по сравнению с I группой (52 %) (таблица 7).

Таблица 7. Данные о наличии/отсутствии беременности в анамнезе у пациенток, включенных в исследование

Бесплодие*	Группа I (отрицательный результат имплантации) (n=25)	Группа II (положительный результат имплантации) (n=16)	P
Первичное бесплодие	12 (48 %)	7 (43,8 %)	> 0,05
Вторичное бесплодие	13 (52 %)	9 (56,2 %)	> 0,05

Примечания

*данные представлены как доли пациенток в % и абсолютное число пациенток.

Анализ репродуктивного анамнеза женщин с вторичным бесплодием (общее число прерываний беременности на раннем сроке, внематочных беременностей и своевременных родов с рождением здорового ребенка) представлен в таблице 8.

Таблица 8. Акушерский анамнез включенных в исследование пациенток, имеющих вторичное бесплодие

Акушерский анамнез*	Группа I (отрицательный результат имплантации) (n=13)	Группа II (положительный результат имплантации) (n=9)	P
Прерывание беременности на раннем сроке	7	3	> 0,05
Внематочная беременность	7	5	> 0,05
Своевременные роды с рождением живого ребенка	2	5	> 0,05

Примечания

* данные представлены как абсолютное число пациенток.

В структуре исходов беременностей у пациенток с вторичным бесплодием отмечается преобладание случаев своевременных родов у пациенток из II группы. Из 13 пациенток с вторичным бесплодием из первой группы у 7 пациенток беременность прервалась на раннем сроке (до 12 недель гестации), у 7 был случай внематочной беременности в анамнезе и у 2 пациенток из группы I беременность завершилась рождением здоровых детей. В группе II у 3 пациенток беременность прервалась на раннем сроке, у 5 была внематочная беременность и у 5 женщин беременность закончилась родами. Стоит подчеркнуть, что количество прерываний беременности, внематочных беременностей и родов не соответствует количеству пациентов в группе, так как у одной пациентки могло быть несколько беременностей с соответствующим исходом.

Попытки ЭКО в анамнезе ранее проведены у 11 пациенток (44%) из группы I: 8 (32%) имели 1 попытку, 2 (8%) – 2 попытки ЭКО, 1 (4%) пациентка имела 4 попытки ЭКО в анамнезе. При этом у 4 пациенток из 11 женщин

циклы ЭКО завершились беременностями, 1 из которых завершилась самопроизвольными родами в срок, а три другие - неразвивающимися беременностями. Из группы II у 7 из 16 пациенток были попытки ЭКО в анамнезе: у 5 пациенток была 1 попытка ЭКО, у 2 - 2 попытки ЭКО. Беременности наступили у 2 пациенток, 1 завершилась самопроизвольными родами, 1 - внематочной беременностью и тубэктомией (таблица 9).

Таким образом, женщины в I и II группе были сопоставимы по частоте и исходам ранее проведенных циклов ЭКО, а также по количеству наступивших беременностей.

Таблица 9. Частота и количество ранее проведенных циклов ЭКО у включенных в исследование пациенток

Исходы беременности	Группа I (отрицательный результат имплантации) n=25	Группа II (положительный результат имплантации) n=16	p
Отсутствие циклов ЭКО в анамнезе	14 (56 %)	9 (56,2%)	> 0,05
Циклы ЭКО в анамнезе:	11 (44 %)	7 (43,7 %)	> 0,05
1 цикл ЭКО	8 (32%)	5 (31,2 %)	> 0,05
2 цикла ЭКО	2 (8%)	2 (12,5 %)	> 0,05
3 и более цикла ЭКО	1 (4%)	0	> 0,05

3.2. Гормональный профиль пациенток, включенных в исследование

Перед подготовкой к программе ЭКО/ИКСИ всем пациенткам была выполнена оценка гормонального статуса на 3-5 день менструации в одном из циклов, предшествующих стимуляции суперовуляции (таблица 10).

Таблица 10. Гормональный статус включенных в исследование пациенток

Название гормона	Группа I (отрицательный результат имплантации) (n=25)	Группа II (положительный результат имплантации) (n=16)	Нормативные показатели	P
ФСГ мЕд/мл*	7,8 (5,3 - 9,2)	7,2 (5,8 - 8,6)	3,0-10,0	> 0,05
ЛГ, мЕд/мл*	10,3 (3,2-15,8)	9,5 (3,3-12,3)	2,3-15,0	> 0,05
АМГ нг/мл*	2,4 (1,4– 3,4)	2,4 (1,7 - 3,1)	1,0- 4,5	> 0,05
Эстрадиол, пмоль/л*	215 (80-384)	150 (100 -369)	150,0- 450,0	> 0,05
Пролактин, мЕд/л*	271 (171 - 378)	201 (158-354)	120,0- 500,0	> 0,05
Тестостерон, нмоль/л*	1,5 (0,7 - 2,6)	1,2 (0,5-2,1)	0,5-2,5	> 0,05
ТТГ, мЕд/л*	2,1 (1,1-4,3)	1,7 (1,0-2,4)	0,4-3,5	> 0,05

Т4св пмоль/л*	17,2 (10-24)	15,3 (10-24)	10,0-25,0	> 0,05
Прогестерон, нмоль/л *	29,3 (20-68)	40,3 (19-70)	16,0-95,0	> 0,05
17-ОН, нмоль/л *	1,5 (0,3-2,8)	1,4 (0,8-2,8)	0,3-3,0	> 0,05
ДГЭА-С, мкмоль/сут *	4,3 (1,2-10,2)	3,3 (1,3-8,3)	0,9-11,7	> 0,05
Кортизол, нмоль/л*	301,3 (261-566)	327,4 (256-800)	200,0- 550,0	> 0,05

Примечания

*Данные представлены как медианы с интерквартильным размахом, тест Манна Уитни

Согласно данным таблицы 10 уровень гормонов в сыворотке крови женщин в обеих группах не имел значимых межгрупповых различий и находился в пределах референсных значений. Статистически значимые различия между группами не выявлены.

3.3. Характеристика стимулированного цикла

Параметры стимулированного цикла и раннего эмбриогенеза у пациенток, включенных в исследование, представлены в таблице 11.

Таблица 11. Параметры стимулированного цикла и раннего эмбриогенеза

Показатели*	Группа I (беременность не наступила) n=25	Группа II (беременность наступила) n=16	P

Суммарная доза гонадотропина, МЕ	1618 (900-2500)	1645,3 (1125-2400)	> 0,05
Продолжительность стимуляции, дни	9,04 (7-11)	8,87 (8-12)	> 0,05
Число фолликулов в день триггера	6,56 (2-12)	5,43 (2-15)	> 0,05
Число ОКК	7,8 (2-15)	7,18 (1-14)	> 0,05
Количество зрелых ооцитов	6,16 (1-12)	4,75 (1-13)	> 0,05
% морфологическ и нормальных сперматозоидо в в день ТВП	1,81 (2-4)	1,84 (2-3)	> 0,05
% прогрессивно подвижных сперматозоидо в	53,48 (20-85)	53,7 (25-72)	> 0,05
Общая концентрация сперматозоидо в в 1 мл эякулята	67,72 (16-181)	73,56 (10-131)	> 0,05
Количество зигот	5,52 (1-12)	4,18 (1-12)	> 0,05
Количество бластоцист	1,44 (0-5)	1,5 (0-4)	> 0,05

Примечания

*данные представлены как медиана, 25 – 75 процентиля;

Параметры стимулированного цикла достоверно не отличались между сравниваемыми группами. Всем пациенткам была назначена практически одинаковая доза гонадотропинов для стимуляции функции яичников, средняя продолжительность стимуляции составляла примерно 9 дней. Число полученных ОКК, зрелых ооцитов, зигот, а также число бластоцист достоверно не отличалось между группами. Параметры сперматогенеза в день ТВП были схожими у пациентов, распределенных в I и II группу.

3.4. Клинические исходы лечебного цикла ЭКО

В стимулированном цикле клиническая беременность в исходе лечебного цикла ЭКО наступила у 16 (39 %) из 41 обследованной женщин, у 25 пациенток (61 %) результат лечения был отрицательным.

Своевременными родами с рождением живых здоровых детей завершились 8 (50%) беременностей из 16 беременностей. В одном случае роды завершились рождением двойни. Неразвивающаяся беременность диагностирована у 7 пациенток (43,7 %) из 16 женщин. Всем пациенткам с диагностированной неразвивающейся беременностью было выполнено выскабливание полости матки. У одной пациентки была диагностирована внематочная беременность справа с последующей тубэктомией (таблица 12).

Таблица 12. Клинические исходы стимулированного цикла у включенных в исследование пациенток

Показатель*	Пациентки с наступившей беременностью (n=16)
Общее число своевременных родов	8
Общее число самопроизвольных прерываний беременностей (до 22 недель гестации)	0
Общее число внематочных беременностей	1
Общее число неразвивающихся беременностей	7

Примечания

*данные представлены как абсолютное число пациенток

Учитывая отрицательный результат имплантации в стимулированном цикле и наличие витрифицированных эмбрионов хорошего/отличного качества, 4 пациенткам из группы I был проведен последующий криопротокол с переносом 1 размороженного эмбриона. В двух случаях (50%) наступившая беременность завершилась своевременными родами и рождением живых здоровых детей, а у двоих пациенток (50%) было выполнено выскабливание полости матки в результате неразвивающейся беременности после переноса витрифицированного эмбриона (таблица 13).

Таблица 13. Клинические исходы криопротокола у включенных в исследование пациенток

Показатель*	Пациентки с наступившей беременностью (n=4)
Общее число своевременных родов	2
Общее число самопроизвольных прерываний беременностей (до 22 недель гестации)	0
Общее число внематочных беременностей	0
Общее число неразвивающихся беременностей	2

Примечания

*данные представлены как абсолютное число пациенток

3.5. Корреляционный анализ данных клинико-инструментальных методов исследования супружеской пары

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 ($p = 0,0003$, коэффициент корреляции $r = 0,49$), количеством антральных фолликулов (КАФ) ($p = 0,0007$, $r = -0,49$) и уровнем АМГ ($p = 0,0005$, $r = -0,59$). При этом уровень ФСГ обратно коррелировал с уровнем АМГ и КАФ ($p = 0,0004$, $r = -0,58$ и $p = 0,02$, $r = -0,31$, соответственно) (рисунок 2). Уровень АМГ, в свою очередь, положительно коррелировал с КАФ ($p = 0,0001$, $r = 0,51$), числом фолликулов в день назначения триггера ($p = 0,006$, $r = 0,38$) и имел отрицательную взаимосвязь с продолжительностью бесплодия ($p = 0,02$, $r = -0,32$). Качество эмбрионов на 5 сутки после оплодотворения напрямую влияло на результат ($p = 0,02$, $r = 0,31$). Кроме этого, возраст женщин положительно коррелировал с продолжительностью бесплодия ($p = 0,01$, $r = 0,33$) и исходом результата цикла ЭКО/ИКСИ ($p = 0,03$, $r = 0,29$). Данные корреляционной матрицы также показали, что длина менструального цикла отрицательно коррелировала с количеством попыток ЭКО в анамнезе ($p = 0,01$, $r = -0,35$). Количество попыток ЭКО в анамнезе также имели положительную корреляцию с качеством эмбриона на 5 сутки после оплодотворения ($p = 0,01$, $r = 0,36$). Статистически значимые корреляции были получены в отношении продолжительности бесплодия супружеской пары. Продолжительность бесплодия супружеской пары положительно коррелировала с % патологических сперматозоидов ($p = 0,008$, $r = 0,37$), при этом вид женского бесплодия обратно коррелировал с данным параметром ($p = 0,03$, $r = -0,3$). Стоит отметить, что доза гонадотропинов во время стимуляции супероуляции имела положительную корреляцию с продолжительностью стимуляции ($p = 0,001$, $r = 0,55$).

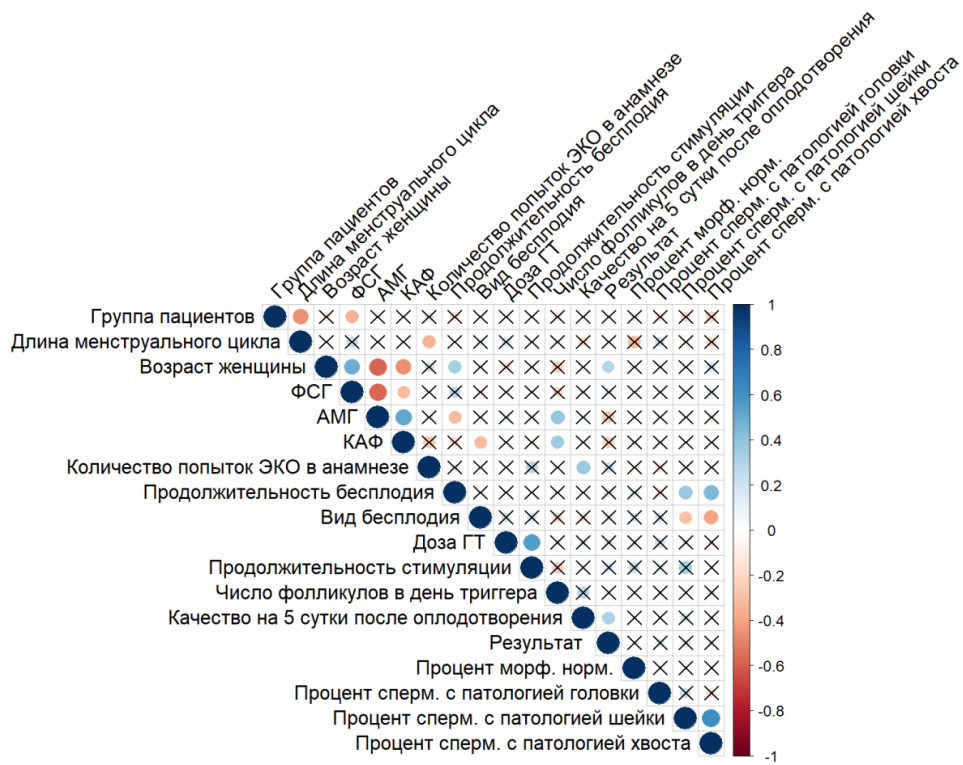


Рисунок 2. Корреляционная матрица клиничко-анамнестических данных пациентов, включенных в исследование, параметров стимулированного цикла и характеристик эмбриогенеза

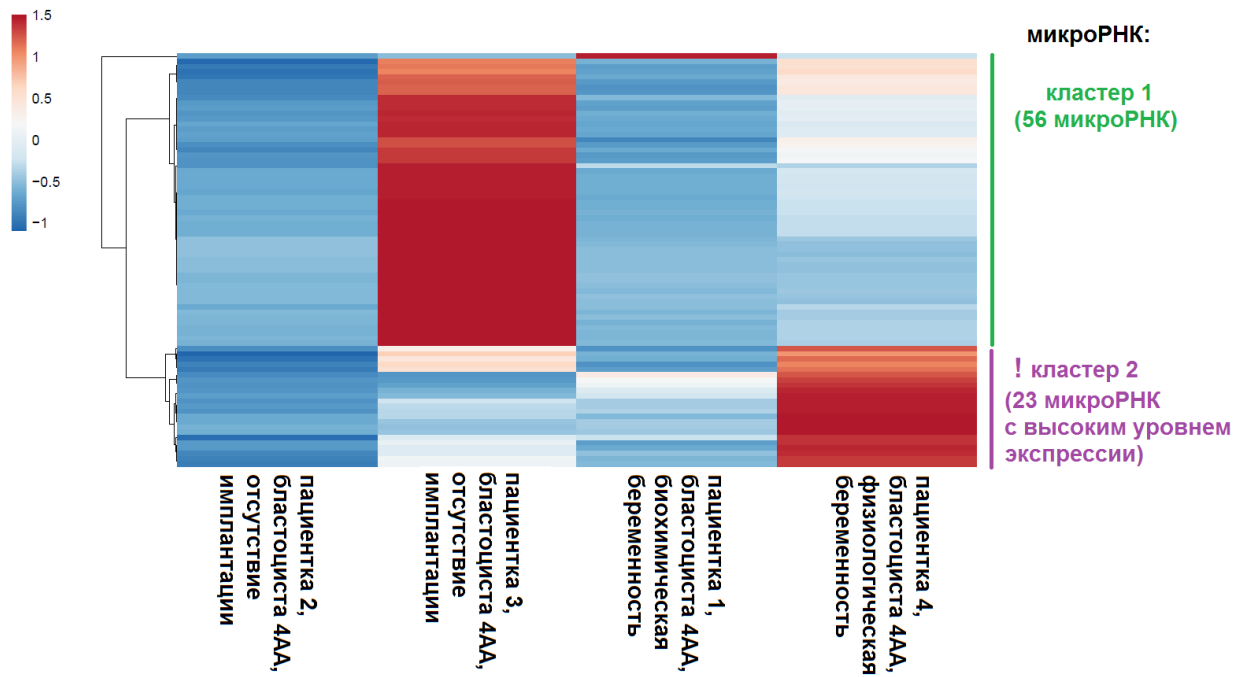
3.6. Данные глубокого секвенирования среды культивирования эмбрионов отличного качества у пациенток с различными исходами программ ВРТ

Для идентификации микроРНК и пивиРНК, дифференцирующих бластоцисты с различным имплантационным потенциалом, было выполнено глубокое секвенирование среды культивирования бластоцист отличного качества 4АА согласно Стамбульскому консенсусу по оценке качества эмбрионов, 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 (рисунок 3).

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 у бластоцисты, обладающей высоким имплантационным потенциалом, и отсутствие увеличения уровня экспрессии этих микроРНК в среде культивирования эмбрионов, которые не имплантировались или привели к наступлению биохимической беременности (рисунок 3 А). Аналогичную картину можно наблюдать и в случае 29 пивиРНК из 4 кластера, чей уровень экспрессии резко повышен лишь у бластоцисты, способной к имплантации и дальнейшему развитию после подсадки в полость матки (рисунок 3 В).

Для дальнейшего анализа микроРНК и пивиРНК методом количественной ОТ-ПЦР 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. Было решено анализировать среду культивирования методом ОТ-ПЦР в реальном режиме времени на 4-е сутки после оплодотворения эмбриона, так как к 5 суткам была необходима информация об имплантационном потенциале эмбриона, переносимого в полость матки.

А



В

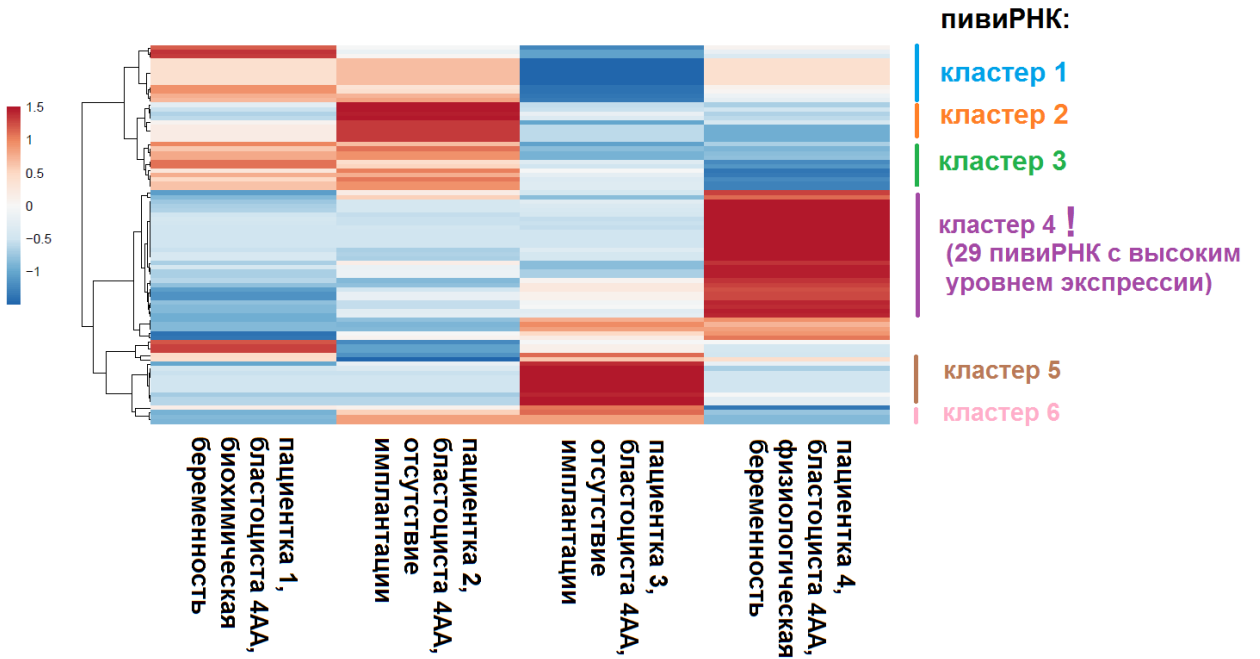


Рисунок 3. Тепловые карты профиля экспрессии мнкРНК среды культивирования эмбрионов с разным имплантационным потенциалом, полученных от 4 пациенток. **А.** Иерархическое кластерирование данных глубокого секвенирования микроРНК. **В.** Иерархическое кластерирование данных глубокого секвенирования пивиРНК

Значимые сигналы (Ct менее 35 циклов) и специфичные продукты реакции были получены для 5 микроРНК и 8 пивиРНК в анализируемых образцах. (таблица 14).

Таблица 14. Идентификация мнкРНК в среде культивирования эмбрионов методом глубокого секвенирования (NGS) и ПЦР (н/о – сигнал ниже порогового уровня идентификации)

мнкРНК	Среднее число прочтения, данные NGS	5'-3' последовательность специфичного праймера, Tm	ПЦР (наличие детектируемого сигнала флуоресценции)
hsa-let-7b-5p	12120	Hs_let-7b_1 miScript Primer Assay, Cat.No. MS00003122, Tm=55°C	+
hsa-let-7a-5p	2872	Hs_let-7a_2 miScript Primer Assay, Cat.No. MS00031220, Tm=55°C	н/о
hsa-miR-99a-5p	18878	Hs_miR-99a_2 miScript Primer Assay, Cat.No. MS00032158, Tm=55°C	н/о
hsa-miR-148a-3p	68267	Hs_miR-148a_1 miScript Primer Assay, Cat.No. MS00003556, Tm=55°C	н/о
hsa-let-7i-5p	2561	Hs_let-7i_1 miScript Primer Assay, Cat.No. MS00003157, Tm=55°C	+
hsa-miR-26a-5p	920	Hs_miR-26a_2 miScript Primer Assay, Cat.No. MS00029239, Tm=55°C	н/о
hsa-let-7c-5p	1392	Hs_let-7c_1 miScript Primer Assay, Cat.No. MS00003129, Tm=55°C	+
hsa-let-7g-5p	273	Hs_let-7g_2 miScript Primer Assay, Cat.No. MS00008337, Tm=55°C	н/о
hsa-miR-92a-3p	4168	Hs_miR-92_1 miScript Primer Assay, Cat.No. MS00006594, Tm=55°C	+

hsa-miR-143-3p	3806	Hs_miR-143_1 miScript Primer Assay, Cat.No. MS00003514, Tm=55°C	+
hsa-miR-125b-5p	951	Hs_miR-125b_1 miScript Primer Assay, Cat.No. MS00006629, Tm=55°C	H/o
hsa-miR-100-5p	2714	Hs_miR-100_2 miScript Primer Assay, Cat.No. MS00031234, Tm=55°C	H/o
hsa-miR-125a-5p	196	Hs_miR-125a_1 miScript Primer Assay, Cat.No. MS00003423, Tm=55°C	H/o
hsa-miR-320a	4420	Hs_miR-320a_1 miScript Primer Assay, Cat.No. MS00014707, Tm=55°C	H/o
hsa-miR-27b-3p	496	Hs_miR-27b_2 miScript Primer Assay, Cat.No. MS00031668, Tm=55°C	H/o
hsa-miR-200c-3p	409	Hs_miR-200c_1 miScript Primer Assay, Cat.No. MS00003752, Tm=55°C	H/o
Hsa-piR020401, DQ598029	47616	GGCTGGTCTCGAACTCCTGACCTCA GGT, Tm=45°C	+
Hsa-piR023338, DQ601914	9242	TAGTCCCAGCTACTTGGGAGGCTGA GGCA, Tm=45°C	+
Hsa-piR019675, DQ596992	2513	GCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTT AGA, Tm=53°C	+
Hsa-piR016735, DQ593039	444	CCTGGGAATACCGGGTGCTGTAGGC TTA, Tm=50°C	+
Hsa-piR017716, DQ594453	2653	TTCCCTGGTGGTCTAGTGGTTAGGA TTCGGC, Tm=45°C	+
Hsa-piR020326, DQ597916	7784	GGCATTGGTGGTTCAGTGGTAGAAT TCTCGC, Tm=60°C	+
Hsa-piR020497, DQ598177	369	TGTAGCTCAGTGGTAGAGCGCGTGC T, Tm=45°C	+

Hsa-piR022296, DQ600515	8840	TACTCAGGAGGCTGAGGCAGGAGA ATGGC, T _m =45°C	+
----------------------------	------	---	---

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 ОТ-ПЦР профили экспрессии анализируемых мнкРНК дифференцируют эмбрионы с разной скоростью развития и бластоцисты разного качества (таблица 15).

Стоит отметить, 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 на сутки (морула, кавитирующая морула) и более (3-10 клеточный эмбрион). Так, например, мнкРНК let-7b-5p, let-7i-5p, piR020401, piR16735, piR19675 и piR20326 дифференцируют эмбрионы с разной скоростью развития. А мнкРНК let-7i-5p, piR020401, piR17716 дифференцируют как эмбрионы с разной скоростью развития, так и бластоцисты разного качества.

Таблица 15: 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**	P-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

piR020401	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 - кавитирующая морула	<0.001	1.21	6.78
	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

Примечания

* 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

3.7. Наиболее значимые мнкРНК в определение качества эмбриона

Для классификации 45 образцов среды культивирования эмбрионов, переносимых в полость матки, по их качеству в зависимости от схожести профилей экспрессии микроРНК и пивиРНК был использован метод PLS-DA. Об-

разцы были ранжированы в порядке возрастания качества эмбриона: ряд «морула - кавитирующая морула - бластоциста плохого качества - бластоциста среднего качества - бластоциста хорошего качества - бластоциста отличного качества» был преобразован в ряд «0, 1, 2, 3, 4, 5». Модель PLS-DA строили на основании данных ОТ-ПЦР в виде $2^{-\Delta\Delta Ct}$ для каждой из исследуемых мнкРНК в образце. На Рис. 4 представлены графики счетов, построенные по результатам PLS-DA анализа. Точки, соответствующие эмбрионам отличного, хорошего и среднего качества сгруппировались вместе, преимущественно в первом и четвертом квадранте графика, а большая часть точек, соответствующих моруле и кавитирующей моруле, образовали кластер в третьем квадранте (Рис. 4а). Вклад шести мнкРНК в возможность классификации эмбрионов по качеству характеризуют значения параметра важности переменной в проекции (variable importance in projection - VIP). Наибольшее значение этого параметра имеют четыре мнкРНК: piR020401 (VIP=1,46027), let-7c-5p (VIP=1,17416), let-7b-5p (VIP=0,994657), let-7i-5p (VIP=0,942665), а наименьшее – miR-143-5p (VIP=0,623108) и miR-92a-3p (VIP=0,471951).

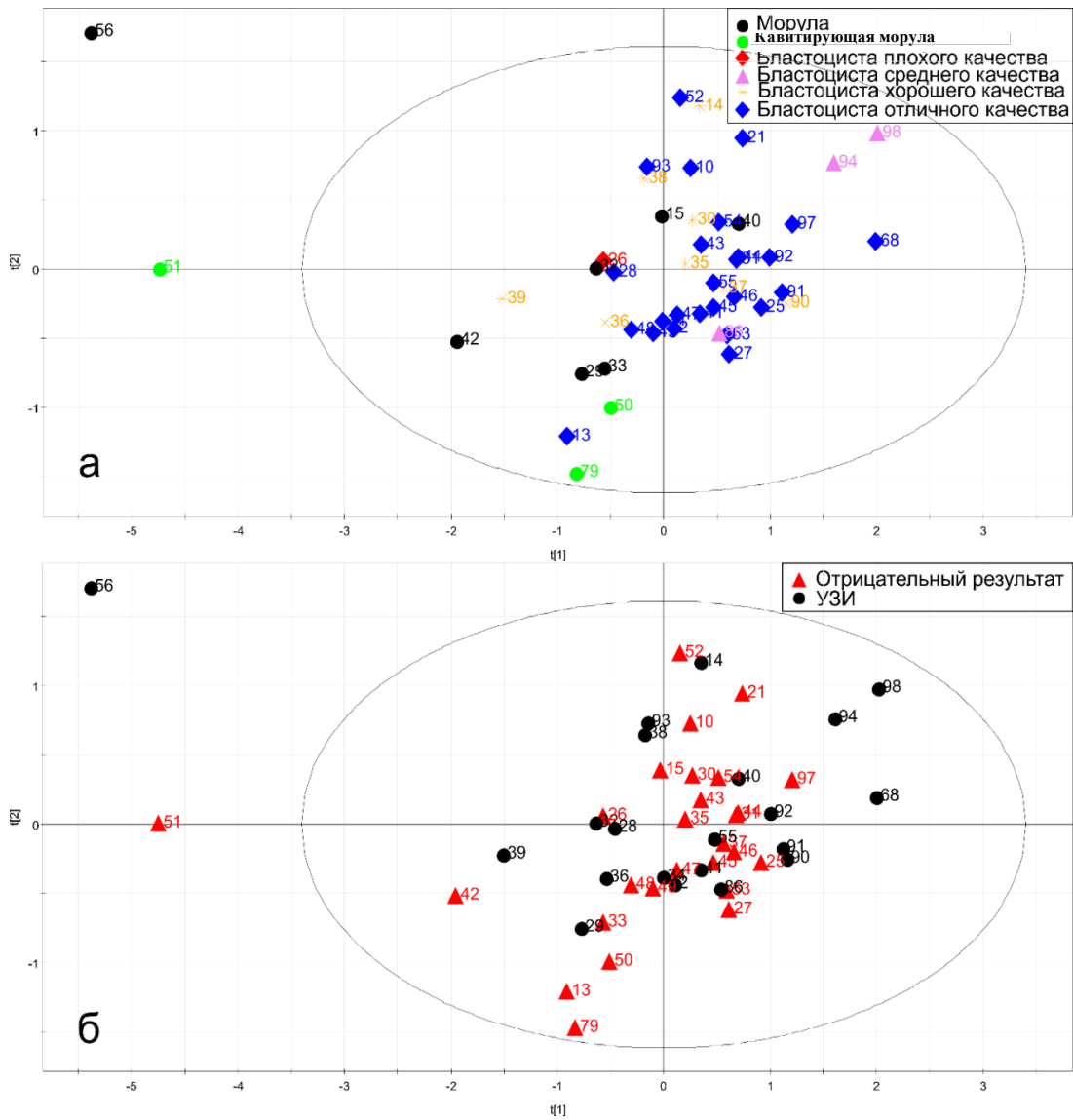


Рисунок 4. Графики счетов, построенные по результатам PLS-DA анализа 2- $\Delta\Delta C_t$ ОТ-ПЦР данных по экспрессии шести мкРНК в среде культивирования эмбрионов. Арабскими цифрами обозначен номер образца. а – график счетов с наложением данных о качестве эмбрионов, б – график счетов с наложением информации о результатах имплантации в матку.

Таким образом, можно судить о качестве эмбриона не только по морфофункциональным характеристикам, но и по уровню экспрессии *piR020401*, *let-7c-5p*, *let-7b-5p* и *let-7i-5p*, ориентируясь на местоположение значений уровня их экспрессии на графике счетов созданной модели PLS-DA.

3.8. Наиболее значимые мнкРНК в определении имплантационного потенциала эмбриона

Для прогнозирования имплантационного потенциала эмбриона в зависимости от профиля экспрессии мнкРНК была построена модель логистической регрессии (рисунок 5). По оси абсцисс отложены значения «1 - специфичность теста» (доля ложноположительных случаев), по оси ординат – «чувствительность теста».

Стоит отметить, что модель с высокой чувствительностью дает истинный результат при наличии положительного исхода (то есть наступление беременности). Наоборот, модель с высокой специфичностью чаще дает истинный результат при наличии отрицательного исхода (то есть отсутствие наступления беременности). Поскольку для проведения ПГТ и витрификации эмбрионов важно исключить эмбрионы с низким имплантационным потенциалом с целью снижения финансовых затрат на проведение программы ВРТ, уровень отсечки в данной модели был смещён в сторону максимальной специфичности. Для определения прогностической способности исследуемых мнкРНК была оценена площадь под кривой для разных комбинаций молекул и максимальная площадь была получена 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 подсадки на пятые сутки культивирования (стадия бластоцисты) была получена формула, позволяющая прогнозировать имплантационный потенциал (ИП) эмбриона, при уровне отсечки (cut-off), равном 0.4, 87 %-ной специфичности и 60 %-ной чувствительности теста:

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

где $\Delta\Delta\text{Ct} = (\text{Ct}_{\text{si}} - \text{Ct}_{\text{norm}_i}) - (\text{Ct}_{\text{sk}} - \text{Ct}_{\text{norm}_k})$, Ct - значение цикла амплификации в точке пересечения кинетической кривой накопления продукта амплификации с линией порогового уровня флуоресценции, который определяется автоматически программным обеспечением амплификатора; Ct_{si} - значение порогового цикла амплификации кДНК анализируемой мнкРНК в образце среды, собранной на 4 сутки культивирования эмбриона; $\text{Ct}_{\text{norm}_i}$ - значение порогового цикла амплификации кДНК нормировочной эндогенной пивиРНК piR023338 в образце среды, собранной на 4 сутки культивирования эмбриона; Ct_{sk} - значение порогового цикла амплификации кДНК анализируемой мнкРНК в контрольном образце среды без инкубации с эмбрионом; $\text{Ct}_{\text{norm}_k}$ - значение порогового цикла амплификации кДНК нормировочной эндогенной пивиРНК piR023338 в контрольном образце среды без инкубации с эмбрионом.

Согласно данной формуле, если значение ИП составляет менее 0.4, то такие эмбрионы характеризуются низкой имплантационной способностью и с высокой долей вероятности не приведут к наступлению беременности после их подсадки в полость матки, несмотря на рецептивный и восприимчивый эндометрий.

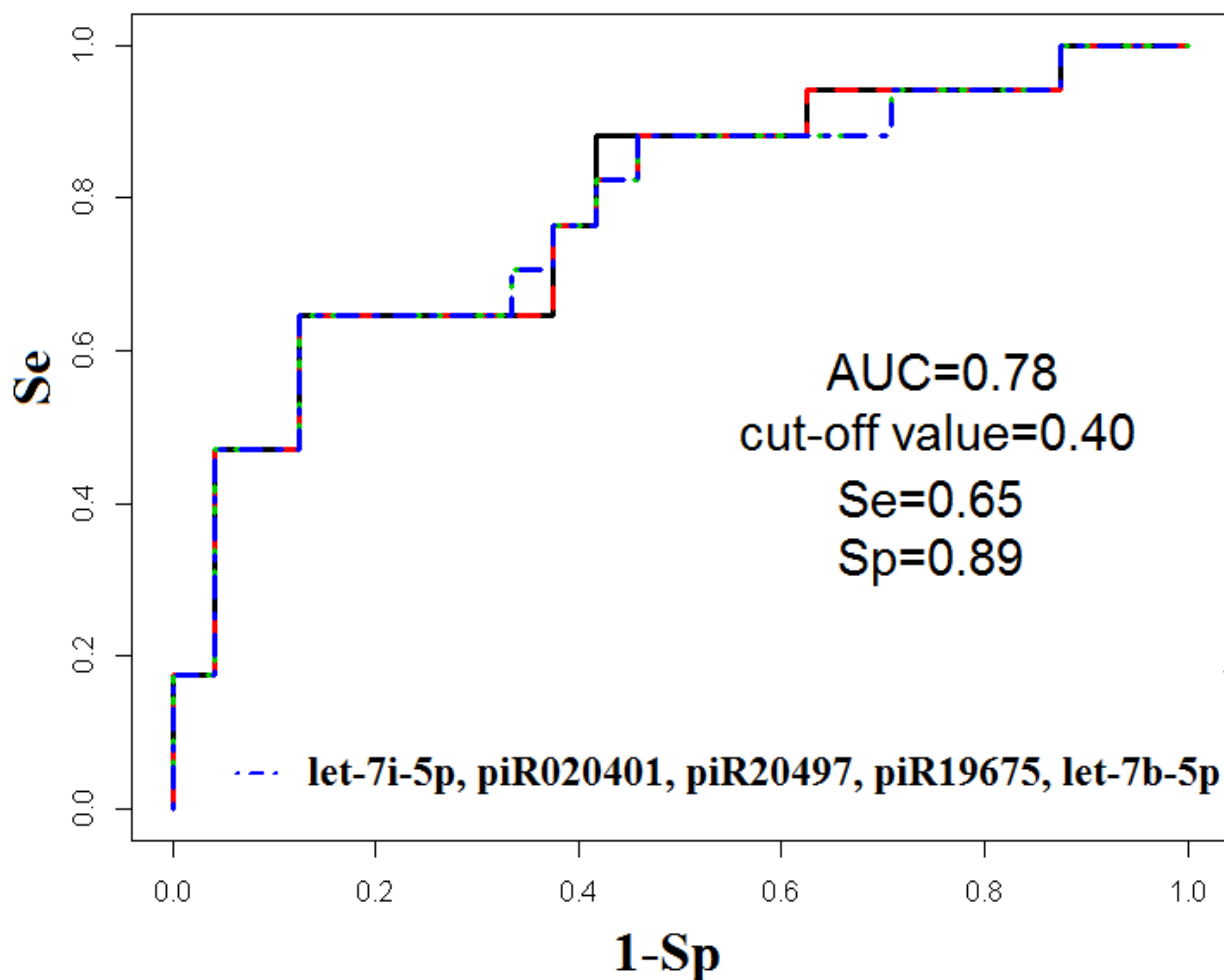


Рисунок 5. Модель логистической регрессии для прогнозирования наступления беременности по профилю экспрессии мнкРНК в среде культивирования эмбриона на 4 сутки после оплодотворения

Примеры значений имплантационного потенциала (ИП), рассчитанных по формуле модели логистической регрессии, приведены в Таблице 16. Из 21 бластоцисты, не имплантировавшихся в матку, 18 эмбрионов имели значение $ИП < 0.4$ (85,7%) и лишь 3 эмбриона (номера образцов 47, 21, 97) имели значение $0.56 < ИП < 0.87$. Отсутствие имплантации при $ИП > 0.4$ может быть обусловлено другими причинами, например, нарушениями рецептивности и восприимчивости эндометрия или хромосомными аномалиями. Из 17 имплантировавшихся бластоцист 11 эмбрионов имели значение $ИП > 0.4$ (64,7%) и лишь 6 эмбрионов (35%) имели значение $0.2 < ИП < 0.3$, среди которых в одном случае наступила внематочная беременность (номер образца 55), а в другом случае – неразвивающаяся беременность (номер образца 38). Таким образом, предложенная модель позволяет идентифицировать эмбрионы с низким имплантационным потенциалом с 87 %-ной специфичностью и 60 %-ной чувствительностью.

Таблица 16. Имплантационный потенциал бластоцист, перенесенных в полость матки, рассчитанный по формуле модели логистической регрессии

идентификационный номер образца	качество бластоцисты	имплантация	имплантационный потенциал (ИП)
37	2AA	отсутствие	0.174567632
30	3BA	отсутствие	0.194491321
31	3AA	отсутствие	0.19926445
10	3AA	отсутствие	0.211484957
52	4AA	отсутствие	0.213270746
43	4AA	отсутствие	0.229961427
25	3AA	отсутствие	0.245120269
44	4AA	отсутствие	0.245945013
13	4AA	отсутствие	0.252939555
53	3AA	отсутствие	0.260629949
27	4AA	отсутствие	0.26957462
26	2BB	отсутствие	0.285834888
54	5AA	отсутствие	0.300068151
35	3BA	отсутствие	0.308232654
45	4AA	отсутствие	0.337774332
48	4AA	отсутствие	0.35097459
49	3AA	отсутствие	0.379156742
46	4AA	отсутствие	0.384411484
47	4AA	отсутствие	0.569706168
21	4AA	отсутствие	0.608142619
97	4AA	отсутствие	0.875798752
55	4AA	наличие	0.200299987
38	2AA	наличие	0.24115372
41	4AA	наличие	0.267128808
39	3BA	наличие	0.277594414
36	2AA	наличие	0.286545318
68	4AA	наличие	0.300438846
28	4AA	наличие	0.422454538
86	3BB	наличие	0.422662266
34	4AA	наличие	0.470981778
2	4AA	наличие	0.6109559
14	3AB	наличие	0.613076866
92	4AA	наличие	0.822528971
94	3BB	наличие	0.86040765
91	4AA	наличие	0.871898547
90	3AB	наличие	0.888759607
93	4AA	наличие	0.89831061
98	3BB	наличие	0.911742388

3.9. МнкРНК и параметры гаметогенеза

На следующем этапе работы с целью анализа взаимосвязи наступления беременности с 1) качеством полученных во время пункции яйцеклеток, готовых к оплодотворению, 2) фертильностью спермы, 3) стадией развития эмбриона к 4-м суткам после оплодотворения, 4) количеством полученных blastocysts, 4) профилем экспрессии мнкРНК в 4-х дневной среде культивирования эмбрионов, перенесенных в полость матки на 5 сутки после оплодотворения была построена корреляционная матрица с использованием метода ранговой корреляции Спирмена (рисунок 6).

В первую очередь, обращает на себя внимание высокая статистически значимая корреляция профилей экспрессии мнкРНК как внутри одного класса (микроРНК или пивиРНК), так и между классами данных молекул (Рисунок 6А). Уровни экспрессии piR17716 и piR20497, отрицательно коррелирующие со стадией развития эмбриона, положительно коррелируют друг с другом равно как и с miR-92a-3p и let-7c-5p, в то время как с piR16735, piR20326, let-7b-5p и let-7i-5p наблюдается отрицательная корреляция (Рисунок 6А). В свою очередь, уровень экспрессии let-7c-5p, отрицательно коррелирует с профилем экспрессии других членов семейства Let7 (let-7b-5p и let-7i-5p) и piR020401 (рисунок 6А). Такая сложная взаимосвязь паттернов экспрессии мнкРНК в образцах среды культивирования эмбрионов различного качества возможно является проявлением тонкой системы регуляции сигнальных путей, необходимых для реализации программы эмбриогенеза.

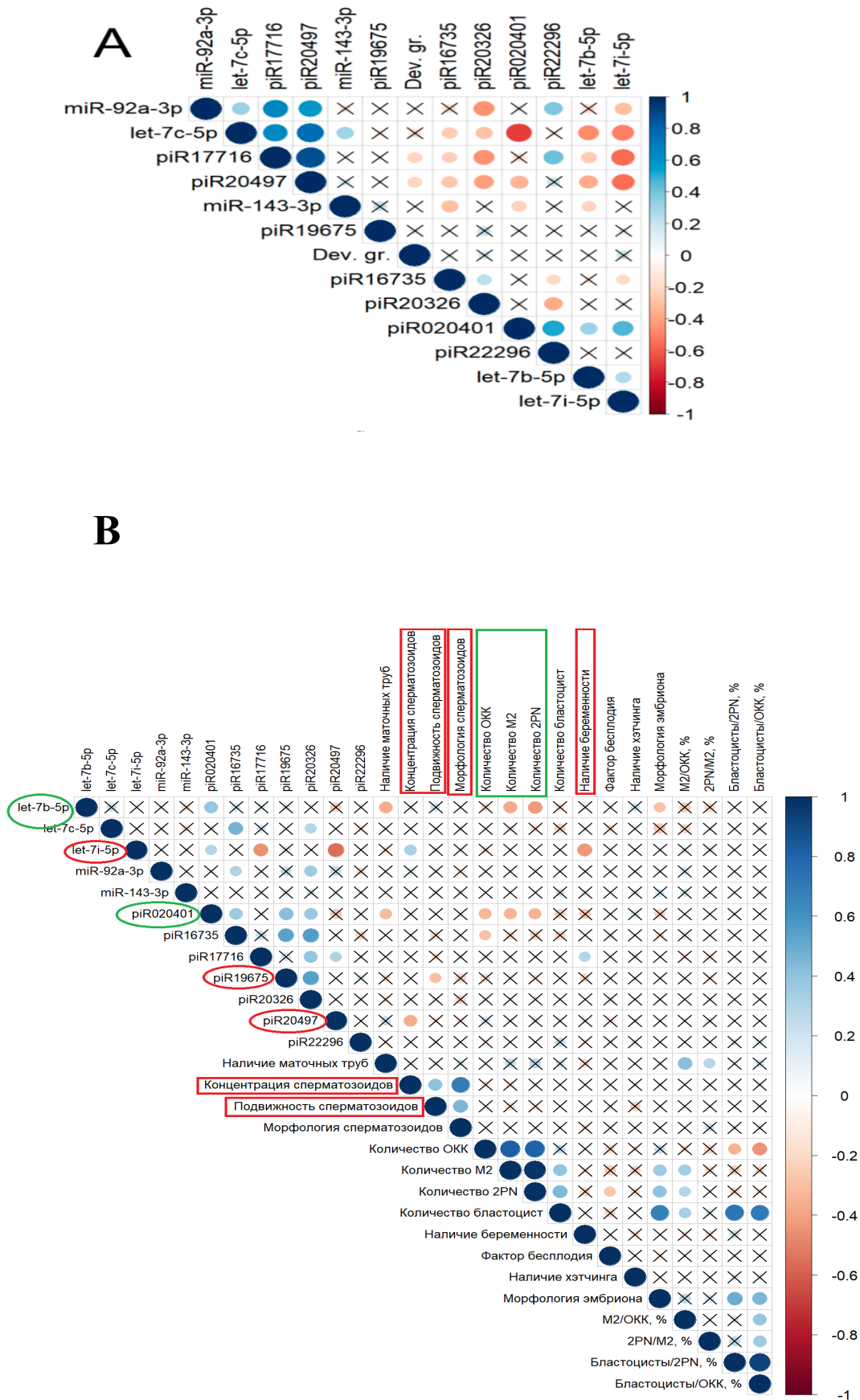


Рисунок 6. Корреляционная матрица, построенная непараметрическим методом ранговой корреляции по Спирмену.

Примечания

Значимые ($p < 0,05$) корреляции обозначены точкой, незначимые корреляции обозначены крестиком, положительные корреляции отмечены синим, а отрицательные корреляции красным - чем сильнее корреляция, тем больше размер точки. (А) Корреляционный анализ уровня экспрессии мнкРНК в образцах среды культивирования эмбрионов и стадий развития эмбриона. (В) Корреляционный анализ уровня экспрессии мнкРНК в 45 образцах среды культивирования эмбрионов, перенесенных в полость матки, и следующих параметров: наличие маточных труб - наличие маточных труб у пациентки; концентрация сперматозоидов - количество сперматозоидов на 1 миллилитр эякулята у партнера; подвижность сперматозоидов - процент линейно подвижных сперматозоидов от партнера; морфология сперматозоидов - процент морфологически нормальных сперматозоидов у партнера; число ОКК - число ооцит-кумулюсных комплексов у пациентки; число МП клеток - число зрелых ооцитов на стадии метафазы II у пациентки; число 2PN - число зигот; число бластоцист - число бластоцист у каждой пары; беременность - наступление беременности после переноса эмбриона в полость матки; фактор бесплодия - первичное или вторичное бесплодие у пациентки; хэтчинг - хэтчинг эмбриона перед переносом в полость матки; стадия развития эмбриона - стадия и качество развития эмбриона, согласно Стамбульскому консенсусу по оценке качества эмбрионов; морфология эмбрионов - морфологические параметры эмбрионов согласно Стамбульскому консенсусу по оценке качества эмбрионов; МП / ОКК, % - число ооцитов метафазы II в процентах от числа ОКК; зиготы/ зрелые ооциты, % - число зигот на стадии двух пронуклеосов в процентах от числа зрелых ооцитов; бластоцисты / зиготы, % - число бластоцист в процентах от зигот; бластоцисты / ОКК, % - число бластоцист в процентах от ОКК.

Из корреляционной матрицы, представленной на Рисунке 6В видно, что семейство *Let7* может быть потенциальным биомаркером оценки результативности программы ВРТ, основываясь на профиле экспрессии представителей этого семейства в среде культивирования эмбрионов. Например, уровень экспрессии *let-7b-5p* отрицательно коррелировал как с качеством эмбриона ($r = -0.3$, $p = 0.0352$), так и с числом зрелых ооцитов ($r = -0.38$, $p = 0.0075$) и зигот ($r = -0.43$, $p = 0.0022$), относительные количества которых (зрелые ооциты/ОКК и зиготы/зрелые ооциты) положительно коррелировали с наличием маточных труб у женщины ($r = 0.41$, $p = 0.0034$; и $r = 0.28$, $p = 0.0472$, соответственно). Последнее согласуется с литературными данными о влиянии эпителия маточных труб на созревание яйцеклетки и ее способность к оплодотворению [6].

Кроме того, было обнаружено, что уровень экспрессии *let-7b-5p* положительно коррелировал с профилем экспрессии *piR020401* ($r = 0.38$, $p = 0.0068$), который, в свою очередь, отрицательно коррелировал с количеством ОКК ($r = -0.33$, $p = 0.0227$), зрелых ооцитов ($r = -0.34$, $p = 0.0172$) и зигот ($r = -0.34$, $p = 0.0155$) (Рисунок 6В). Кроме того, уровень экспрессии *piR020401* положительно коррелировал с паттернами экспрессии *piR16735* ($r = 0.36$, $p = 0.0106$), *piR19675* ($r = 0.41$, $p = 0.0037$) и *piR20326* ($r = 0.37$, $p = 0.0101$). Уровень экспрессии *piR16735* отрицательно коррелировал с числом ОКК ($r = -0.3$, $p = 0.036$), а концентрация *piR19675* отрицательно коррелировала с подвижностью сперматозоидов ($r = -0.3$, $p = 0.0392$). Между тем, концентрация сперматозоидов положительно коррелировала с процентом прогрессивно подвижных сперматозоидов ($r = 0.4$,

$p=0.0043$) и сперматозоидов с нормальной морфологией ($r=0.69$, $p=0.000001$). Обнаружены корреляционные связи между уровнями экспрессии *let-7i-5p*, *piR17716* и *piR20497*, а именно: паттерн экспрессии *let-7i-5p* отрицательно коррелировал с профилями экспрессии *piR17716* ($r=-0.46$, $p=0.0009$) и *piR20497* ($r=-0.55$, $p=0.0001$); при этом уровень экспрессии *piR17716* положительно коррелировал с наличием имплантации ($r=0.29$, $p=0.041$), в то время как уровень экспрессии *piR20497* отрицательно коррелировал с концентрацией сперматозоидов ($r=-0.37$, $p=0.0087$). При этом, в случае *let-7i-5p* была получена обратная корреляция. Было обнаружено, что уровень экспрессии *let-7i-5p* имел отрицательную корреляцию с наличием имплантации ($r=-0.44$, $p=0.0014$) и положительную корреляцию с концентрацией сперматозоидов в эякуляте ($r=0.32$, $p=0.0255$).

Также наблюдалась положительная корреляция *let-7c-5p* с *piR16735* и *piR19675* (Рисунок 6В). Уровень экспрессии *piR16735* отрицательно коррелировал с ОКК ($r=-0.3$, $p=0.036$), тогда как профиль *piR19675* отрицательно коррелировал с количеством подвижных сперматозоидов ($r=-0.3$, $p=0.0392$). Было трудно определить, анализируемая мнкРНК в среде культивирования эмбрионов была привнесена из сперматозоида/ооцита или из активированного эмбрионального генома после МЗП. Однако существуют убедительные литературные данные в пользу того, что именно РНК, находящиеся в сперматозоиде, потенцируют дальнейшую способность эмбриона к имплантации, что требует дальнейшего изучения [114].

На рисунке 9В также представлено, что число ОКК, полученное в одном стимулированном цикле в программе ВРТ, отрицательно коррелировало с процентом получаемых бластоцист, вычисленным относительно либо ОКК, либо зигот ($r=-0.45$, $p=0.0012$ и $r=-0.35$, $p=0.015$, соответственно). При этом качество бластоцист положительно коррелировало как с числом зрелых ооцитов ($r=0.36$, $p=0.0122$) и зигот ($r=0.4$, $p=0.0041$), так и с процентом получаемых бластоцист относительно либо ОКК ($r=0.45$, $p=0.0013$), либо зигот ($r=0.49$, $p=0.0004$). Полученные данные согласуются с литературными данными об отрицательной корреляции между общим числом ооцитов, получаемых в стимулированных циклах программ ВРТ, и числом получаемых бластоцист.

Таким образом, *let-7i-5p*, *piR020401*, *piR20497*, *piR17716*, *piR19675* статистически значимо коррелируют с показателями спермограммы, количеством ОКК, степенью зрелости ооцита и его способностью к оплодотворению, что в итоге вносит значительный вклад в имплантационный потенциал получаемого эмбриона.

3.10. Анализ способности к бластуляции отстающего в развитии эмбриона по профилю экспрессии мнкРНК

Очевидно, что на результативность программ ВРТ влияет не столько своевременность прохождения эмбрионом той или иной стадии развития, сколько сам потенциал реализации эмбриональной программы, определяемый качеством МЗП. Таким образом, на следующем этапе исследования проводился анализ способности к бластуляции эмбриона, отстающего в развитии на сутки, в зависимости от уровня экспрессии мнкРНК в среде его культивирования, что позволило бы получить более точное представление о дальнейшем развитии данного эмбриона.

В данное исследование было 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 развились в морулу. Разделение образцов на три группы было выполнено в соответствии с морфофункциональной характеристикой эмбриона на 6 сутки, а именно: группа I - бластоцисты среднего/отличного качества (1 - 4AA, 1 -4BB, 1 -6BB, 1- 3AA, 1 - 3BB), группа II - бластоцисты плохого качества (3 -4CC, 4 -3CC, 1 -2CC, 1 -3CB, и 1 -4CB) и группа III - эмбрионы, которые дегенерировали (7). Оценку морфологических показателей эмбриона проводили согласно Стамбульскому консенсусу по оценке качества эмбрионов.

Бокс-диаграммы, представленные на рисунке 7, отражают данные из таблицы 17 и наглядно демонстрируют кратность изменения изучаемых молекул в культуральной среде анализируемых групп эмбрионов. Было обнаружено, что культуральная среда 8-клеточного эмбриона с последующей деградацией или развитием в бластоцисту плохого качества содержит практически одинаковый уровень *let-7i-5p* в отличие от среды культивирования эмбриона, способного достичь стадии бластоцисты среднего/отличного качества, в которой уровень *let-7i-5p* статистически значимо был резко выше. Аналогичную ситуацию можно проследить и в случае *let-7b-5p*. Полученные данные подтверждают важную роль семейства *let-7* в определении потенциала развития эмбриона. На бокс-диаграммах также прослеживается изменение уровня экспрессии *piR020401* в зависимости от дальнейшего развития эмбриона в виде увеличения кратности изменения экспрессии в культуральной среде 8-клеточного эмбриона, обладающего способностью развиваться в бластоцисту среднего/отличного качества, но не в бластоцисту плохого качества. Никаких отличий по уровню экспрессии *piR16735* и *piR19675* в сравниваемых группах выявлено не было.

let-7b-5p	I. Морула дегенерировавшая	1,20	0,07	4,12	0.702	0.066	0.041
	II. Блaстоциста плохого качества	1,29	0,07	4,76			
	III. Блaстоциста среднего/отличного качества	6,86	6,57	8,18			
let-7i-5p	I. Морула дегенерировавшая	1,02	0,74	1,55	0.081	0.011	0.002
	II. Блaстоциста плохого качества	0,78	0,06	1,28			
	III. Блaстоциста среднего/отличного качества	4,68	3,15	7,00			
piR020401	I. Морула дегенерировавшая	1,25	1,14	1,58	0.507	0.025	0.124
	II. Блaстоциста плохого качества	1,58	1,19	2,02			
	III. Блaстоциста среднего/отличного качества	2,09	1,93	2,13			
piR16735	I. Морула дегенерировавшая	1,08	0,76	1,96	0.917	0.528	0.553
	II. Блaстоциста плохого качества	1,27	0,79	3,93			
	III. Блaстоциста среднего/отличного качества	1,30	0,70	2,03			

piR19675	I. Морула де-генерировавшая	0,39	0,37	0,63	1	0.113	0.179
	II. Блостоциста плохого качества	0,43	0,37	1,10			
	III. Блостоциста среднего/отличного качества	1,20	0,62	1,27			

**Примечания*

Римскими цифрами обозначены сравниваемые группы эмбрионов. МнкРНК - малые некодирующие РНК. (Me) КИ - медиана кратности изменения. Q1- квартиль 1. Q3 -квартиль 3. P-value - статистическая значимость изменений. I vs II - попарное сравнение I и II группы. I vs III - попарное сравнение I и III группы. II vs III - попарное сравнение II и III группы.

Таким образом, в ходе настоящей исследовательской работы было показано, что мнкРНК в культуральной среде могут дифференцировать стадии развития эмбриона, а также служить маркером его имплантационной способности. Для более детального понимания вклада данных молекул в потенциал развития, бластуляцию и имплантацию эмбриона был изучен профиль экспрессии мнкРНК в культуральной среде эмбриона на стадии 8 клеток в зависимости от исхода развития этого эмбриона на 5 сутки после оплодотворения. Полученные данные позволяют оптимизировать алгоритм наблюдения за эмбрионами разных стадий развития в программах ВРТ.

Глава 4 ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на стремительное развитие ВРТ как основного метода лечения бесплодных пар, процент эффективности терапии составляет 30-35% и не имеет тенденции к повышению [2]. Среди основных причин отрицательного исхода программ ВРТ принято выделять низкое качество гамет партнеров, обусловленное генетическими и метаболическими нарушениями, изменения

рецептивности эндометрия, а также низкое качество самого эмбриона и нарушение его имплантационного потенциала [3].

На сегодняшний день выбор эмбриона для переноса в полость матки осуществляется на основании морфологических критериев, согласно Стамбульскому консенсусу по оценке качества эмбрионов, а также результата ПГТ [37]. Однако оба метода имеют свои недостатки и, в связи с этим, поиск новых критериев, определяющих качество эмбрионов и прогнозирующих их потенциал к имплантации, становится актуальной и важной задачей, направленной на индивидуализацию и оптимизацию циклов ЭКО, а также на повышение эффективности программ ВРТ.

Активное развитие инновационных биомедицинских технологий открывает новые возможности в лечении супружеских пар, страдающих бесплодием. Среди наиболее перспективных маркеров качества и имплантационного потенциала эмбриона стоит отметить мнкРНК, определяемые в культуральной среде, а именно микроРНК и пивиРНК [134]. Кроме этого, микроРНК и пивиРНК участвуют в регуляции МЗП, определяющего дальнейшую бластуляцию и развитие эмбриона [129]. Для достижения поставленной цели в настоящей работе было проведено исследование, на первом этапе которого производилась оценка качества эмбриона на основании профиля экспрессии мнкРНК, а на втором этапе была изучена вероятность наступления беременности в зависимости от профиля данных молекул в культуральной среде. В ходе выполнения данной работы с помощью реакции количественной ПЦР в реальном режиме времени был также проанализирован профиль мнкРНК в культуральной среде, полученной от эмбрионов на стадии 8 клеток на 4 сутки в зависимости от исхода их развития на 6 сутки.

Оценка возрастных и антропометрических характеристик пациенток в исследуемых группах не выявила статистически значимых различий. Группы были сопоставимы по данным параметрам и подобраны таким образом, чтобы минимизировать влияние вмешивающихся факторов на результаты программ ВРТ. В ходе анализа клинико-anamнестических и лабораторных данных пациенток, разделенных на группы в зависимости от результата цикла ЭКО/ИКСИ (наступление беременности или отсутствие наступления беременности), а также параметров данного цикла ЭКО не было обнаружено межгрупповых различий по возрасту женщин, их антропометрическим данным, частоте первичного и вторичного бесплодия, количеству и исходам беременностей у женщин с вторичным бесплодием, данными гормонального статуса, а также параметрам стимулированного цикла и раннего эмбриогенеза. Кроме этого, возраст мужчин, включенных в исследование, а также показатели их спермограммы статистически достоверно не отличались между группами.

Данные корреляционной матрицы показали взаимосвязь между уровнем гормонов, КАФ и возрастом женщины. Полученные результаты согласуются с данными об особенностях синтеза и содержания гормонов в крови у женщин в зависимости от возраста: у пациенток старшего репродуктивного возраста отмечается повышение уровня ФСГ, снижение АМГ и уменьшение КАФ по данным УЗИ [135]. В зависимости от возраста изменяется ответ яичников на гормональную стимуляцию, примером чему служит положительная корреляция АМГ с КАФ и числом фолликулов в день назначения триггера. При этом статистически значимых различий в дозах гонадотропинов у молодых женщин по сравнению с более возрастными пациентками, включенных в исследование, обнаружено не было.

Согласно данным мировой литературы, доза гонадотропинов положительно влияет на динамику роста фолликулов, соответственно, продолжительность стимуляции сокращается при применении более высоких доз [136]. Тем не менее, результаты данного исследования показали, что продолжительность стимуляции суперовуляции увеличивается на фоне применения более высоких доз гонадотропинов. Эти данные необходимо интерпретировать с точки зрения изначальных показателей овариального резерва. У пациенток с более низким овариальным резервом доза гонадотропинов для стимуляции суперовуляции, как правило, выше, однако длительность стимуляции может быть более продолжительной из-за нарушений рецепторного аппарата яичника и снижения чувствительности яичников на гормональную стимуляцию [137].

Стоит отметить, что процент бластоцист отличного качества относительно ОКК, а также процент зрелых ооцитов и зигот резко ниже в группе с отсутствием имплантации по сравнению с группой пациентов с успешным наступлением беременности. Данные различия между группами можно объяснить с позиции правильного МЗП, необходимого для формирования эмбрионов с высоким имплантационным потенциалом. Несмотря на наличие эмбриона хорошего или отличного качества, согласно Стамбульскому консенсусу по оценке качества эмбрионов, основанной на визуальной оценке, МЗП в таком эмбрионе может быть нарушен. О данных нарушениях свидетельствуют лишь изменения молекулярно-биологического профиля эмбриона, в том числе изменения профиля экспрессии мнкРНК.

В рамках данной диссертационной работы особое внимание уделено изучению роли мнкРНК, обнаруженных в среде культивирования, в зависимости от его качества, способности к бластуляции и его имплантационного потенциала. Результаты многих зарубежных исследований также показали изменения в профилях экспрессии микроРНК у эмбрионов с разным имплантаци-

онным потенциалом. Однако, при сравнении результатов большинства научных работ полученные профили экспрессии микроРНК не совпадают. Несоответствие профилей экспрессии микроРНК в разных исследованиях может быть связано с отличиями в технике выделения микроРНК из изучаемого образца и состава сред культивирования, содержащих сыворотку крови человека, богатой, в том числе, мнкРНК, информация о качественном и количественном составе которых производителями сред культивирования не указывается. Кроме того, стоит подчеркнуть, что уровень экспрессии мнкРНК в культуральной среде подвергается волнообразным изменениям в зависимости от стадии развития эмбриона, что было обнаружено в настоящем исследовании и зарубежными коллегами [13]. Данное наблюдение может также быть причиной расхождений в результатах по оценке профиля экспрессии мнкРНК, получаемых различными исследовательскими группами.

Основной функцией мнкРНК является регуляция экспрессии генов на посттранскрипционном уровне путем взаимодействия с комплементарными участками мРНК. Потенциальные и экспериментально доказанные мРНК-мишени анализируемых в настоящем исследовании мкРНК были определены путем использования электронных баз данных: DianaTools microT-CDS, DianaTools_TargetScan, DianaTools_Tarbase и miRtargetlink. Объединение информации из энциклопедии генов и геномов Института химических исследований в Киото (KEGG) с базой данных Diana Tools позволило идентифицировать сигнальные пути, регулируемые несколькими мкРНК одновременно со статистической значимостью $p < 0,05$. Внимательное изучение сигнальных путей, регулируемых микроРНК miR-92a-3p, let-7b-5p, let-7c-5p и let-7i-5p, и обращение к литературным данным в базе данных PubMed позволило нам предположить возможное участие эффекторных молекул данных сигнальных путей в процессах гаметогенеза и эмбриогенеза. Среди них – сигнальные пути, регулирующие плюрипотентность стволовых клеток (KEGG, hsa04550), взаимодействие внеклеточного матрикса с рецепторным аппаратом клетки (hsa04512), адгезионные контакты (hsa04520), транспорт РНК (hsa03013), процессинг белка в эндоплазматическом ретикулуме (hsa04141), расщепление и абсорбцию белка (hsa04974), убиквитин-опосредованный протеолиз (hsa04120), биосинтез или деградацию валина, лейцина и изолейцина (hsa00290, hsa00280), мейоз ооцита (hsa04114), эстроген-опосредованный сигнальный путь (hsa04915), PI3K/АКТ-сигнальный путь (hsa04151), Wnt-сигнальный путь (hsa04310), Hippo-сигнальный путь (hsa04390), FoxO-сигнальный путь (hsa04068), MAPK-сигнальный путь (hsa04010), TGFβ-сигнальный путь (hsa04350) и p53-сигнальный путь (hsa04115). Согласно литературным

данным, PI3K/АКТ-, MAPK-, Hippo- и Wnt-сигнальные пути участвуют в синтезе белка, поддержании жизнеспособности, миграции и инвазии клеток, клеточном цикле, процессах пролиферации и дифференцировки [138,139]. Первый этап дифференцировки клеток в ходе эмбриогенеза происходит во время формирования трофэктодермы из наружного слоя бластомеров эмбриона и внутренней клеточной массы из оставшихся бластомеров. При этом внутренняя клеточная масса дает начало эмбриональным стволовым клеткам, которые имеют потенциал к самообновлению и дифференцировке в разные типы клеток и тканей. Баланс между процессами дифференцировки и самообновлением в эмбриональных стволовых клетках поддерживается, помимо прочего, активностью Hippo-сигнального пути [139,140]. Более того, были опубликованы данные о том, что Hippo-сигнальный путь взаимодействует с другими сигнальными путями для поддержания плюрипотентности клеток. Например, основным медиатором Hippo-сигнального пути транскрипционный ко-активатор TAZ взаимодействует с Smad2/3 (напрямую фосфорилируются рецепторами TGF β) и поддерживает накопление комплексов Smad в ядре клеток, инициируя, тем самым, экспрессию маркеров плюрипотентности (Oct4, Nanog) в ответ на стимуляцию TGF β [140]. В свою очередь, работа TGF β -сигнального пути модулируется деубиквитинированием TGFBR1, TGFBR2, R-SMAD, co-SMAD и I-SMAD [141]. Ключевую роль в эмбриогенезе играет Wnt-сигнальный путь, определяющий судьбу стволовых клеток, процессы их самообновления, цефалокаудальную ось у позвоночных эмбрионов и регулирующий процесс гаструляции [142].

В данном исследовании были обнаружены статистически значимые корреляции между профилем экспрессии *let-7b-5p* и числом зрелых ооцитов, числом зигот и стадией развития эмбрионов. Было также показано, что профиль экспрессии *let-7i-5p* коррелирует с числом сперматозоидов в 1 миллилитре эякулята, а также с имплантационным потенциалом эмбриона. Изучение таргетных сигнальных путей показало, что микроРНК *let-7b-5p* и *let-7i-5p* регулируют FoxO-сигнальный путь (KEGG, hsa04068), влияя на уровень экспрессии 50 генов, среди которых FOXO1 по данным Kuscu N et al. играет важную роль в процессах оогенеза и раннего эмбриогенеза [143]. Данным коллективом авторов было показано, что сигнальный путь PI3K/АКТ регулирует синтез белков FoxO1, FoxO3 и FoxO4 у мышей, уровень экспрессии которых различается в ооцитах на стадии профазы I, метафазы I, метафазы II, в оплодотворенных ооцитах, а также у эмбрионов на стадии 2-, 4-, 8 -клеток и на стадии бластоцисты.

Согласно базам данных Targetscan и Tarbase, семейство *let-7* регулирует катаболизм и анаболизм валина, лейцина и изолейцина (hsa00290, hsa00280).

Perkel K.J., et al. продемонстрировали, что эмбрионы с разным потенциалом и скоростью развития имеют значительные отличия в уровне потребления пирувата, лактата, ацетата, изолейцина, лейцина валина, треонина, аланина, метионина, лизина, глицина, аргинина, фенилаланина, гистидин триптофана и тирозина из культуральной среды [144]. Например, методом протонного ядерно-магнитного резонанса были обнаружены более высокие уровни потребления валина, лейцина и изолейцина у 16-клеточных быстрорастущих эмбрионов по сравнению с эмбрионами, отстающими в развитии на 12-24 часа. В исследовании Brison et al снижение уровня лейцина в культуральной среде эмбриона статистически значимо коррелировало с частотой наступления беременности [145]. Полученные данные показывают, что оценка эмбриона по морфологическим параметрам не дает полной информации о его качестве. Исследование метаболомного и транскриптомного профиля может дополнить общепринятую систему оценки качества, а также имплантационного потенциала эмбриона и дать более четкое представление о его функциональном состоянии.

Для анализа экспериментально доказанных генов-мишеней let-7c-5p была использована база данных miRtargetlink, поскольку в базе данных «DianaTools_Tarbase» отсутствовала эта информация. Список генов, мРНК которых являются мишенями let-7c-5p согласно данным репортерного анализа (категория «сильных взаимодействий» (strong interactions) пары «микроРНК/ген-мишень») был объединен со списком экспериментально-доказанных генов-мишеней для miR-92a-3p, let-7b-5p и let-7i-5p и проанализирован с помощью системы классификации PANTHER (доступна онлайн: <http://pantherdb.org/>) с точки зрения биологической функции. Среди них общими генами-мишенями для let-7c-5p и let-7i-5p являются GPS1, COPS6 и COPS8. Ген GPS1 подавляет митоген-активируемую передачу сигнала в клетки млекопитающих, а COPS6 и COPS8 являются субъединицами 6 и 8 белка COP9 и участвуют во многих клеточных процессах, например, в регуляции конъюгации убиквитина. Let-7b-5p и let-7c-5p регулируют уровень экспрессии 1) гена HMGA2, который является важным компонентом энхансомы и регулирует процесс транскрипции; 2) протоонкогена NRAS, обладающего внутренней ГТФ-азной активностью и контролирующего клеточную пролиферацию и антиапоптотические процессы [146]; 3) AGO1, который участвует в распаде мРНК и подавлении ее трансляции в составе комплекса RISC, а также вызывает сайленсинг транскрипции генов в промоторных областях, связанных с комплементарными короткими РНК; 4) IGF1R, контролирующего клеточный рост и жизнеспособность клетки; 5) TGFBR1, регулирующего деление, дифференцировку, подвижность, адгезию и гибель клеток; 6)

TNFRSF10B, вызывающего апоптоз клеток посредством адапторной молекулы FADD и эффекторных каспаз. Стоит отметить, что единственным общим экспериментально доказанным геном-мишенью *let-7b-5p* и *let-7i-5p* является TLR4, представляющий собой трансмембранный рецептор на поверхности клетки, первоначально обнаруженный у *D. Melanogaster* в качестве регулятора органогенеза во время эмбрионального развития [147], и играющий ключевую роль во врожденной иммунной системе [148]. Более этого, экспрессия TLR4 доказана в эпителии эндометрия и цервикального канала [149, 150]. Взаимодействие TLR4 с различными патогенами индуцирует выработку провоспалительных цитокинов. Изменение экспрессии генов TLR4 приводит к нарушению механизмов защиты от инфекции в системе «мать–плод» [150].

Значительная роль семейства *let-7* и *miR-92* в определении потенциала развития и имплантационной способности эмбриона была подтверждена результатами, полученными Kim J et al. [151]. Коллектив авторов выявил существенное повышение уровня экспрессии *let-7b-5p* и *miR-92a-3p* в клетках эмбрионов, которые продолжали культивировать более 6 суток («прогрессивно развивающиеся эмбрионы»), по сравнению с бластоцистами и эмбрионами, не обладающими способностью к дальнейшему развитию. В нашем исследовании мы проанализировали профиль экспрессии микроРНК только до стадии бластоцисты, что объясняет неизменный уровень экспрессии *miR-92a-3p*, начинающий повышаться на последующих стадиях эмбриогенеза согласно Kim J et al. [151].

Регуляция сигнального пути биосинтеза О-гликанов муцинового типа (KEGG, hsa00512) находится под контролем *let-7b-5p*, *let-7c-5p* и *let-7i-5p* согласно базе данных DianaTools. В свою очередь, уровень экспрессии IGF1R регулируется *let-7b-5p* согласно информации базы данных miRtargetlink (см. выше). Известно, что муцин 1 является основным трансмембранным муциновым гликопротеином, экспрессирующимся на апикальной поверхности клеток эндометрия и препятствующим прикреплению эмбриона [121, 152]. Напротив, повышение экспрессии IGF1R на поверхности клеток эндометрия во время рецептивной стадии необходимо для адгезии и имплантации эмбриона [118]. Поэтому одновременный контроль уровня экспрессии муцина 1 и IGF1R микроРНК *let-7b-5p*, *let-7c-5p* и *let-7i-5p* на территории «эндометрий-эмбрион» важен для успешного развития беременности.

Семейство *let-7* заслуживает особого внимания, так как во многих исследованиях была показана значимая роль представителей данной группы в процессах раннего эмбриогенеза и имплантации эмбриона. Семейство *let-7* состоит из 13 консервативных микроРНК, из них подробно изучены 9 представителей [153]. Liu et al показали, что уровень экспрессии 5 членов семейства

let-7 (let-7a, -7d, -7e, -7f и -7g) понижен в 2 раза у эмбрионов с высоким имплантационным потенциалом [154]. При избыточной секреции let-7a эмбриональными клетками снижается количество “точек” имплантации за счет воздействия на интегрин $\beta 3$. При имплантации эмбриона интегрин $\beta 3$ влияет на формирование пиноподий, представляющих собой микроскопические выпячивания на апикальной поверхности эпителиальных клеток эндометрия [155]. Let-7a связывается с 3'-нетранслируемой областью мРНК интегрин $\beta 3$, что приводит к ингибированию его экспрессии и, следовательно, к снижению рецептивности эндометрия [154].

Влияние семейства Let-7 не ограничивается исключительно регуляцией репродуктивной функции. Представители данного семейства принимают активное участие в процессах супрессии опухолевого роста. При различных онкологических заболеваниях уровень различных микроРНК семейства Let-7 резко снижен в клетках опухоли по сравнению со здоровыми клетками [156]. Семейство Let-7 контролирует клеточную пролиферацию за счет негативной регуляции генов *cyclin D2, A2, CDK6, CDC25A, CDC34, Aurora A и B* киназы (STK6 и STK12), E2F5 и CDK8. Семейство let-7 также принимает активное участие в посттранскрипционной регуляции иммунного ответа на патогенные микроорганизмы путем воздействия на синтез интерлейкинов IL-6, IL-10, IL-13 и толл-подобного рецептора 4 (TLR4) [157].

Результаты недавних исследований показали, что пивирНК, помимо стабилизации генома путем подавления экспрессии транспозонов, влияют на функцию мРНК [158, 159, 160]. Гены-мишени для пивирНК у мышей и дрозофил описаны в базе данных piRBase. В виду отсутствия информации о потенциальных генах-мишенях пивирНК человека в базе данных piRBase был использован подход, основанный на применении программы BLAST (доступна на сайте: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) и альтернативный таковому, предложенному S. Russell [161]: мРНК считалась потенциальной мишенью для изучаемой пивирНК, если имелось обратное направление картирования для пары пивирНК-мРНК. Список потенциальных генов-мишеней был получен для piR020401, piR019675 и piR022296. Мы уделили особое внимание 25 генам-мишеням piR020401 и piR019675, профиль экспрессии которых по данным настоящего исследования коррелировал с числом ОКК, зрелыми ооцитами, числом зигот и процентом прогрессивно подвижных сперматозоидов. Анализ онтологии генов (GO) по выполняемой ими молекулярных функций в биологической ткани в системе PANTHER Classification (доступна на сайте: <http://pantherdb.org/>) показал, что 28% генов регулируют процессы связывания (например, TCFL5, ARHGEF10L, PAK3, EEF1D, PHC3, RBM28, FER); 24% генов обладают каталитической активностью (METTL22, POLH, PAK3, члены

семейства онкогенов RAS, LIAS, FER); ARHGEF10L является основным регулятором молекулярных функций; ZHX3 и PNC3 участвуют в регуляции транскрипции генов; EEF1D участвует в процессах трансляции; SACNA2D1 контролирует транспортную активность клетки. Согласно литературным данным функция белковых продуктов некоторых из вышеперечисленных генов-мишеней может быть связана с репродуктивными процессами. Например, Lawrence M. Roth et al обозначили важную роль TCFL5 во время сперматогенеза у человека [162]. ARHGEF10L участвует в организации цитоскелета, и, следовательно, регулирует динамические изменения микротрубочек при делении клеток, контролирует передачу сигналов, экспрессию генов и ферментативную активность [163]. PNC3 является членом семейства генов группы polycomb, кодирующей разнообразные наборы регуляторных белков, которые, с одной стороны, поддерживают на определенном уровне экспрессию целых паттернов генов для обеспечения развития организма, а с другой стороны, обеспечивают долговременный сайленсинг генов за счет изменения структуры хроматина путем деацетилирования гистонов и ингибирования (АТФ)-зависимого механизма ремоделлинга хроматина [164,165]. Нарушения функции PNC3 может приводить к онкогенезу за счет изменения способности клетки оставаться в фазе G0 [166]. POLH осуществляет репликацию ДНК независимо от наличия каких-либо повреждений, что обеспечивает безостановочный синтез комплементарной цепи ДНК позади участка повреждения. Ohkumo T. et al. в работе по анализу активности POLH в *Caenorhabditis elegans* предположили, что POLH обуславливает устойчивость клеток к повреждениям от УФ-облучения для обеспечения успешного завершения раннего эмбриогенеза [167]. Данные наблюдения подтверждают огромное значение POLH в формировании устойчивости ДНК к повреждению в стволовых и эмбриональных клетках. ZHX3 входит в состав семейства гомеодоменовых транскрипционных факторов и играет ключевую роль в развитии организма, начиная с раннего эмбриогенеза и вплоть до клеточной дифференцировки, включая нейрональную [168].

Во многих исследованиях важная роль мнкРНК была описана не только с позиции эмбрионального развития, но и с точки зрения гаметогенеза. Результаты недавних научных работ подтверждают огромное значение мнкРНК в процессах оогенеза и сперматогенеза. При этом наиболее важными мнкРНК служат молекулы, привнесенные из сперматозоида, так как именно они уничтожают материнские мРНК и используют трансляционный аппарат ооцита для дальнейшей трансляции спермальных мРНК [106]. В настоящей работе были описаны статистически значимые корреляции между профилем экспрессии piR16735 и piR020401 с количеством ОКК, let-7b-5p и piR020401 с числом зрелых ооцитов и зигот, let-7i-5p и piR20497 с количеством сперматозоидов в

1 миллилитре эякулята, piR19675 с процентом прогрессивно подвижных сперматозоидов. Эти данные подтверждают, что вышеописанные мнкРНК имеют важное регуляторное и функциональное значение в процессах гаметогенеза. Стоит отметить, что полученные данные об отрицательной корреляции между общим числом ооцитов, получаемых в стимулированных циклах программ ВРТ, и числом получаемых бластоцист, согласуются с данными литературы об оптимальном выборе протокола стимуляции и дозы гонадотропинов. В исследовании Jingjuan Ji et al было показано, что частота живорождения при лечении бесплодия в стимулированном цикле резко снижалась при получении более 15 ооцитов в ходе выполнения ТВП. Авторы исследования пришли к заключению, что для повышения частоты наступления беременности в стимулированном цикле наиболее оптимальное число ооцитов, получаемых во время пункции должно быть не менее 6 и не более 15 [169]. Таким образом, не рекомендуется проведение агрессивной или слишком мягкой гормональной стимуляции, если у пациентки планируется перенос эмбрионов в лечебном цикле.

Кроме этого, было обнаружено, что относительное количество зрелых ооцитов и зигот (зрелые ооциты/ОКК и зиготы/зрелые ооциты) положительно коррелировали с наличием маточных труб у пациенток. Результаты недавних исследований показали, что эпителий маточных труб влияет на рост и созревание яйцеклетки. В научном эксперименте клетки эпителия маточных труб, полученных от собаки, культивировали вместе с незрелыми яйцеклетками, что приводило к их активации роста и созреванию. Было обнаружено, что эпителиальные клетки маточных труб экспрессируют эпителиальные маркеры E-кадгерин и цитокератин. Стоит подчеркнуть, что у собаки окончательное созревание яйцеклетки происходит именно в маточных трубах, поэтому сокультивирование эпителиальных клеток маточных труб и незрелых яйцеклеток представлялось более физиологичным [170]. Эпителиальные клетки маточных труб активировали мейотическое деление и инициировали созревание ядра в незрелых яйцеклетках. Более того, кровоснабжение яичников осуществляется за счет яичниковой артерии, которая кровоснабжает и маточные трубы. Таким образом, при любых операциях на маточных трубах происходит нарушение кровообращения в яичниках, что может приводить к снижению овариального резерва.

В данной исследовательской работе была обнаружена статистически значимая корреляция между профилем мнкРНК в культуральной среде и стадией развития эмбриона. Такие мнкРНК как let-7b-5p, let-7i-5p, piR020401, piR16735, piR19675, piR20326 и piR17716 дифференцируют эмбрионы на раз-

ной стадии развития и отличают их в зависимости от качества, согласно морфологическим критериям, принятых Стамбульским консенсусом по оценке качества эмбрионов.

Стоит отметить, что отставание эмбриона в развитии на доимплантационном этапе не всегда служит неблагоприятным признаком в отношении его развития до стадии бластоцисты хорошего/отличного качества. Успешное эмбриональное развитие сразу после оплодотворения 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 МЗП, ключевыми регуляторами которого являются микроРНК и пивиРНК [128,129]. Основным вкладом в образование хороших/отличных эмбрионов вносит именно качество самого МЗП. Именно поэтому в нашем исследовании часть эмбрионов развились до бластоцисты хорошего/отличного качества, несмотря на отставание в развитии на 4 сутки, но по профилю экспрессии мнкРНК данные эмбрионы соответствовали эмбрионам с качественным МЗП. У млекопитающих раннее эмбриональное развитие контролируется исключительно белковыми продуктами трансляции материнской мРНК, привносимыми в эмбрион из оплодотворенной яйцеклетки. Время активации зиготического генома видо- и геноспецифично. На сегодняшний день предложено несколько механизмов МЗП: 1) истощение избытка высокоаффинных репрессоров транскрипции материнского происхождения по мере уничтожения материнских мРНК и зиготического деления, 2) модификация структуры хроматина путем изменения статуса метилирования и ацетилирования гистонов, 3) деметилирование ДНК [171]. МЗП зависит от координированной работы молекул, привнесенных яйцеклеткой и сперматозоидом, однако наиболее важными в отношении дальнейшего развития эмбриона служат мнкРНК спермального происхождения. [106]. Транслируемые белки (ANKRD12, ARHGAP26, ATP7B, BBX, CYP2R1, FGD4, KIAA0586, RASSF8, SIPA1L3, SPIRE1, ZNF646) относятся к группе транскрипционных и эпигенетических факторов и могут быть причастны к МЗП. При этом изменяется активность промотерных участков эмбриональных генов, что приводит к целому каскаду реакций транскрипции как кодирующих белок областей генома, так и широкого спектра регуляторных молекул, в том числе мнкРНК. Примером этому служат результаты, представленные в статье об активации 2495 генов у эмбриона на 8-клеточной стадии и значительному снижению уровня экспрессии 2675 генов, что соответствует основному МЗП [130]. Наши данные о повышении уровня экспрессии *let-7i-5p*, *let-7b-5p* и *piR020401* в культуральной среде, полученной от эмбрионов, способных к качественной бластуляции, подтверждают вышеописанные данные.

Стоит подчеркнуть, что на этапе МЗП происходит активация именно тех генов, чьи продукты участвуют в процессинге, сплайсинге, трансляции мРНК, биогенеза рибосом, структурной организации хроматина, клеточном цикле. В свою очередь, если в сперматозоиде, который оплодотворяет ооцит нарушен процессинг микро- и малых интерферирующих РНК, то это приведет к остановке развития эмбриона на доимплантационном этапе [114].

Определение качества эмбриона по профилю экспрессии мнкРНК в культуральной среде позволяет оптимизировать и дополнить имеющуюся систему оценки качества, основанную на морфологических критериях. Возможность прогнозировать имплантационный потенциал эмбриона в зависимости от профиля микроРНК и пивиРНК в культуральной среде является еще более перспективной и многообещающей задачей. Данные PLS-DA показали, что микроРНК *let-7i-5p* (VIP = 1.6262), *piR020401* (VIP = 1.45281) и *piR20497* (VIP = 1.42765) вносят наибольший вклад в определение имплантационной способности эмбриона. Тем не менее стоит отметить, что несмотря на одинаковый профиль экспрессии мнкРНК в культуральной среде, часть эмбрионов привели к наступлению беременности, а часть - не имплантировались. Это подтверждает тот факт, что имплантационный потенциал эмбриона зависит как от качества гамет, так и от ряда «материнских» факторов [5]. Согласно данным некоторых исследований пациентки с трубно-перитонеальным фактором бесплодия могут иметь не только нарушения овариального резерва, но и сниженное количество и меньшую чувствительность рецепторов эстрогенов и прогестерона в эндометрии [172], что отражается на рецептивности эндометрия, а значит может выступать причиной неудач циклов ВРТ.

Рецептивность эндометрия зависит от целого каскада молекулярно-биологических реакций. Такие медиаторы как факторы роста, цитокины, хемокины, липиды, матриксные металлопротеиназы и интегрины оказывают важное влияние на восприимчивость эмбриона эндометрием. Экспрессия данных факторов регулируется эстрогеном и прогестероном. МикроРНК, обнаруженные в биопсированном эндометрии, а также в жидкости, аспирированной из матки, также отражают рецептивность эндометрия [118]. Было обнаружено, что уровень экспрессии *miR-30b* и *miR-30d* значительно повышен, а *miR-494* понижен в рецептивном эндометрии [123]. Данные микроРНК активно участвуют в циклическом ремоделировании эндометрия, включая созревание эндометрия до наиболее рецептивной фазы. Кроме того, эстрогены и прогестерон вызывают изменения в экспрессии микроРНК в эндометрии, например, прогестерон индуцирует экспрессию *miR-125b* в клетках эпителия эндометрия человека. Несмотря на то, что *miR-125b* необходима для формирования рецептивного эндометрия, избыточная экспрессия данной микроРНК ингибирует

миграцию клеток и предотвращает имплантацию за счет подавления активности матриксной металлопептидазы 26 (ММП26), которая участвует в деградации внеклеточного матрикса [127]. В жидкости, аспирированной из полости матки, были обнаружены 27 микроРНК, дифференциально экспрессируемые во время окна имплантации, среди которых наиболее выраженные изменения были описаны у miR-30d. Авторы также продемонстрировали, что эмбрионы, к которым была добавлена miR-30d, имели повышенную экспрессию 10 генов, включая гены, кодирующие молекулы адгезии (субъединица интегрин бета 3 - ITGB3, субъединица интегрин альфа 7- ITGA7 и кадгерин 5 -CDH5) [123]. Таким образом, успешная имплантация эмбриона зависит не только от профиля экспрессии мнкРНК самой бластоцисты, но и от степени восприимчивости эндометрия, обусловленной также определенным профилем мнкРНК.

Кроме этого, согласно данным Американского общества по репродуктивной медицине у пациенток в криопротоколе отмечена более высокая частота имплантации, наступления беременности и рождения живого ребенка [173]. Поэтому обращает на себя внимание тот факт, что в данном исследовании у 4 пациенток беременность наступила не в стимулированном цикле, а в последующем криопротоколе. Успехи, достигнутые в технологии криоконсервации эмбрионов, позволяют сохранять качество витрифицированных эмбрионов, а их потенциал для имплантации остается аналогичным нативным эмбрионам [174]. С каждым годом появляется все больше данных в пользу криоконсервации эмбрионов и их переноса в следующем цикле без гормональной стимуляции и воздействия на эндометрий. Эта стратегия может быть оправдана, так как сегментация цикла позволяет проводить профилактику СГЯ и переносить эмбрионы в более физиологичную внутриматочную среду, без возможного отрицательного влияния гормональной стимуляции на рецептивность эндометрия [175]. Показано, что преждевременный подъем уровня прогестерона на фоне мультифолликулярного роста при гонадотропной стимуляции сопровождается не только преждевременной секреторной трансформацией эндометрия, но и нарушением экспрессии генов, ответственных за имплантацию (НОХА 10, рецептора лейкемия- ингибирующего фактора и др.) [176]. Это согласуется с данными корреляционной матрицы о положительной корреляции между дозой ГТ и продолжительностью стимуляции, что могло негативным образом сказаться на рецептивности эндометрия, а, следовательно, на имплантации эмбриона.

Вероятно, именно в связи с вышеописанными факторами эмбрионы хорошего и отличного качества не всегда успешно имплантируются, но учитывая описанные статистически значимые корреляции уровня экспрессии piR16735, piR020401, let-7b-5p, let-7i-5p, piR20497 и piR19675 с параметрами

гаметогенеза, let-7b-5p - с качеством бластоцисты, let-7i-5p - с имплантационным потенциалом эмбриона, наравне с обнаруженным вкладом let-7b-5p, let-7i-5p, piR020401 в потенциал развития эмбриона и его способность к качественной бластуляции позволяет сделать вывод о значимости этих молекул в период раннего эмбриогенеза. 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 с 87 %-ной специфичностью и 60 %-ной чувствительностью в программах ВРТ.

Глава 5 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С момента внедрения ЭКО частота наступления беременности у пациентов, страдающих бесплодием, значительно возросла. Эффективность программ ВРТ зависит от совокупности многих факторов, тем не менее, в конечном итоге успешная имплантация и дальнейшее развитие физиологической беременности возможно при идеальном взаимодействии генетически здорового эмбриона с максимальным имплантационным потенциалом и рецептивного эндометрия.

За последние годы было изучено значительное число потенциальных биомаркеров качества эмбрионов и их имплантационной способности. В настоящий момент внимание ученых обращено к изучению роли мнкРНК, в частности к микроРНК и пивиРНК, выделенных из культуральной среды эмбрионов на разных стадиях развития. Данные молекулы принимают активное участие в транскрипционной и посттранскрипционной регуляции уровня экспрессии генов путем РНК-интерференции. Было показано, что среди всех представителей мнкРНК именно микроРНК и пивиРНК вносят наибольший вклад в формирование фенотипа клетки за счет регуляции основных сигнальных путей, участвующих в пролиферации, дифференцировке, миграции и апоптозе клеток. Кроме того, было доказано, что микроРНК и пивиРНК принимают активное участие в МЗП, заключающемся в уничтожении материнских мРНК и запуске транскрипции генов эмбриона. При этом на успешную имплантацию в программе ЭКО влияет не только своевременность прохождения эмбрионом той или иной стадии развития, но и сам потенциал реализации эмбриональной программы, определяемый своевременным и координированным МЗП.

На сегодняшний день выбор наиболее перспективных эмбрионов для переноса в полость матки осуществляется на основании оценки их морфологических свойств. Однако морфологические критерии качества, принятые Стамбульским консенсусом по оценке качества эмбрионов, являются субъективными, а точность такого метода отбора эмбрионов остается недостаточно высокой. Более того, не все эмбрионы «хорошего» и «отличного» качества, с точки зрения морфологических критериев, при переносе в полость матки приводят к беременности, даже при наличии рецептивного эндометрия. Еще одним способом оценки качества эмбриона с помощью анализа его хромосомного набора служит ПГТ. Благодаря данному методу диагностики выполняется селекция эуплоидных эмбрионов, что, в свою очередь, ведет к увеличению частоты наступления беременности, уменьшению репродуктивных потерь и снижению риска рождения детей с генетическими нарушениями. Тем не менее данный метод не лишен недостатков, среди которых следует выделить высокую стоимость, необходимость проведения инвазивного вмешательства на эмбрионе, а также вероятность наличия мозаицизма, сбалансированных хромосомных аббераций и точечных мутаций генов. Данные, полученные в ходе проведения настоящего исследования, свидетельствуют о том, что изучение профиля экспрессии мнкРНК в культуральной среде позволяет без инвазивных манипуляций прогнозировать не только качество, но и имплантационный потенциал эмбриона при переносе его в полость матки. Анализ профиля экспрессии мнкРНК в культуральной среде дополняет общепринятую оценку качества эмбриона, согласно морфологической классификации, принятой Стамбульским консенсусом по оценке качества эмбрионов, и позволяет оптимизировать выбор эмбриона при селективном переносе в полость матки. Эмбрионы разной скорости развития могут быть дифференцированы по уровню экспрессии *let-7b-5p*, *let-7i-5p*, *piR020401*, *piR16735*, *piR19675*, *piR20326*, *piR17716*, а в формировании имплантационного потенциала эмбриона наиболее важную роль играют *piR020401*, *let-7b-5p*, *let-7i-5p*, *piR20497* и *piR19675*. Более того, оценка уровня экспрессии *let-7b-5p*, *let-7i-5p* и *piR020401* в культуральной среде дает информацию о качестве бластуляции эмбриона и прогнозирует исход его развития, что позволяет оптимизировать алгоритм наблюдения за эмбрионами разных стадий. Результаты, полученные в данной исследовательской работе, также показывают, что уровень экспрессии мнкРНК в среде культивирования эмбрионов коррелирует с параметрами гаметогенеза (*piR16735* и *piR020401* - с количеством ОКК, *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 процентом прогрессивно подвижных сперматозоидов).

Полученные результаты могут быть использованы не только в научных целях, но и в клинической практике для индивидуализации и оптимизации лечения бесплодия у различных пациентов, проходящих лечение бесплодия в программах ВРТ. Метод РНК-диагностики сочетает в себе все основные критерии, предъявляемые к наиболее перспективным способам современной диагностики и на сегодняшний день служит доступной и отработанной технологией.

Выводы:

1. У пациентов в исследуемых группах имплантационный потенциал получаемого эмбриона различен несмотря на аналогичные клиничко-анамнестические данные, характеристики гаметогенеза и параметры стимулированного цикла.
2. Качество эмбриона на 5-е сутки развития, влияющее на результат программы вспомогательных репродуктивных технологий, положительно коррелирует с количеством попыток ЭКО в анамнезе. Выявлена прямая корреляция продолжительности бесплодия супружеской пары с процентом 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 процентом 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 максимальным 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 (стадии 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.

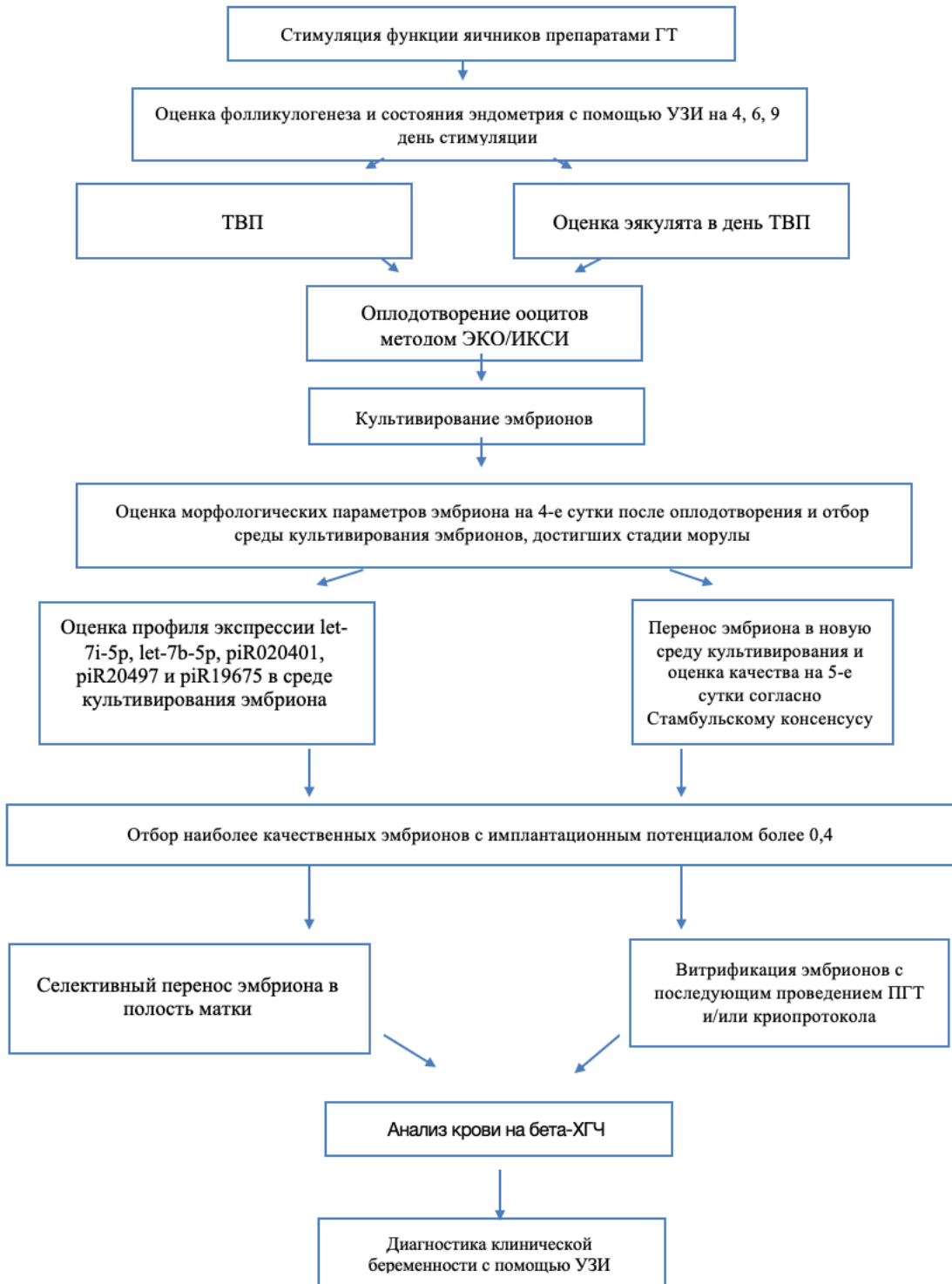
3. Неудачные попытки вспомогательных репродуктивных технологий с неоднократным получением эмбриона с имплантационным потенциалом < 0,4 свидетельствуют об отсутствии влияния дополнительных эмбриологических мероприятий (хетчинг, различная среда культивирования и др.) на качество получаемого эмбриона и 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 быть использован 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.

Алгоритм выбора эмбриона с высоким имплантационным потенциалом на основании экспрессии мнкРНК в культуральной среде эмбриона



СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

- Apo A-I - Apolipoprotein A-I- аполипопротеин А-I;
 CDH5 -Cadherin 5-кадгерин 5;
 CSCM - Continuous Single Culture- среда культивирования;
 IGF1R - Insulin-like growth factor 1 receptor - рецептор инсулиноподобного фактора роста 1;
 ITGA7- Alpha-7 integrin- интегрин альфа-7;
 ITGB3- Integrin alpha-V/beta-3- интегрин бета-3;
 MMP26- Matrix metalloproteinase-26- матриксная металлопротеиназа 26;
 Muc1- Mucin 1 -Муцин 1;
 NGS - Next generation sequencing- высокопроизводительного секвенирования;
 RISC- RNA-induced silencing complex- РНК-ингибирующий комплекс;
 TGF – Transforming growth factor -члены суперсемейства трансформирующего фактора роста;
 TLR4 - Toll-like receptor 4-толл-подобного рецептора 4;
 TRBP- Transactivation response element RNA-binding protein-Tar РНК-связывающий белок;
 UBC- Ubiquitin C- убиквитин-конъюгирующий фермент;
 UCHL1- Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L1-С-концевая убиквитин-гидролаза;
 VIP - Variable importance in projection - важность переменной в проекции;
 Endo-siRNAs -Endogenous short interfering RNAs-эндогенные малые интерферирующие РНК;
 β-ХГЧ - бета-субъединицы хорионического гонадотропина человека;
 β-ХГЧ – бета-субъединица хорионического гонадотропина человека;
 АМГ – антимюллеров гормон;
 Ант-ГнРГ- антагонистов гонадотропин-рилизинг гормона;
 ВОЗ – Всемирная ещцьюорганизация здравоохранения;
 ВРТ - вспомогательные репродуктивные технологии
 ДГЭАС – дегидроэпиандростерон-сульфат;
 ДИ – доверительный интервал;
 ДнРНК- длинные некодирующие РНК;
 ИМТ- индекса массы тела;
 ИКСИ – от англ. ICSI – intracytoplasmic sperm injection – интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида;
 ИМТ – индекс массы тела;
 ИП - имплантационный потенциал эмбриона;
 КИ - кратность изменения;
 ЛГ – лютеинизирующий гормон;
 ЛИФ- фактор, ингибирующий лейкемию;
 МиРНК- малые интерферирующие РНК;
 МнкРНК- малые некодирующие РНК;
 МРНК – матричная рибонуклеиновая кислота;
 МС - масс-спектрометрический анализ;
 НЦАГиП – Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии;

ОКК - ооцит-кумулюсный комплекс;
ОТ-ПЦР - обратная транскрипция полимеразная цепная реакция;
ПГТ - предимплантационное генетическое тестирование ;
ПивиРНК - пиви-взаимодействующих РНК;
ПРЛ – пролактин;
ПЭ – перенос эмбриона;
р-ФСГ- рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона;
СПКЯ – синдром поликистозных яичников;
Т – тестостерон;
Т3 – трийодтиронин;
Т4св – свободный тироксин;
ТВП- трансвагинальной пункции яичников;
ТТГ – тиреотропный гормон;
УЗИ- Ультразвуковое исследование
ФСГ – фолликулостимулирующий гормон;
ХГ – хорионический гонадотропин;
чХГ- человеческий хорионический гонадотропин
ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение;
ЭМП - эпителиально-мезенхимальный переход;

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Vander B.M., Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin Biochem.* 2018 Dec; 62:2-10. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012. Epub 2018 Mar 16.
2. Gleicher N., Kushnir V.A, Barad D.H. Worldwide decline of IVF birth rates and its probable causes. *Hum Reprod Open.* 2019; 2019(3):hoz017. Published 2019 Aug 8. doi:10.1093/hropen/hoz017
3. Zhang S, Lin H, Kong S, et al. Physiological and molecular determinants of embryo implantation. *Mol Aspects Med.* 2013;34(5):939–980. doi:10.1016/j.mam.2012.12.011
4. Tahmasbpour E, Balasubramanian D, Agarwal A. A multi-faceted approach to understanding male infertility: gene mutations, molecular defects and assisted reproductive techniques (ART). *J Assist Reprod Genet.* 2014; 31(9):1115–1137. doi:10.1007/s10815-014-0280-6
5. Tarin J. Infertility etiologies are genetically and clinically linked with other diseases in single meta-diseases. *Reprod Biol Endocrinol.* 2015. 13(31).
6. S.H. Lee, H.J. Oh, M.J. Kim, G.A. Kim, Y.B. Choi, Y.K. Jo, et al. Oocyte maturation-related gene expression in the canine oviduct, cumulus cells, and oocytes and effect of co-culture with oviduct cells on in vitro maturation of oocytes. *J Assist Reprod Genet* (2017)
7. Смольникова В.Ю., Калинина Е.А., Краснощока О.Е, Донников А.Е., Бурменская О.В., Трофимов Д.Ю., Сухих Г.Т. Возможности неинвазивной оценки состояния ооцита и эмбриона при проведении программ ВРТ по профилю экспрессии мРНК факторов роста в фолликулярной жидкости. *Акушерство и гинекология.* 2014; 9: 36-43
8. Кулакова Е.В., Калинина Е.А., Трофимов Д.Ю., Макарова Н.П., Хечумян Л.Р., Дударова А.Х. Вспомогательные репродуктивные технологии у супружеских пар с высоким риском генетических нарушений. Преимплантационный генетический скрининг. *Акушерство и Гинекология,* 2017, №8. DOI <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2017.8.21-7>
9. Драпкина Ю.С., Тимофеева А.В., Чаговец В.В., Кононихин А.С., Франкевич В.Е., Калинина Е.А. Применение омиксных технологий в решении проблем репродуктивной медицины. *Акушерство и Гинекология,* 2018, №9. DOI <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2018.9.24-32>
10. Perkel KJ, Tscherner A, Merrill C, Lamarre J, Madan P. The ART of selecting the best embryo: A review of early embryonic mortality and bovine embryo viability assessment methods. *Mol Reprod Dev.* 2015 Nov; 82(11):822-38. doi: 10.1002/mrd.22525. Epub 2015 Aug 20.

11. Rosenbluth EM, Shelton DN, Wells LM, Sparks AE, Van Voorhis BJ. Human embryos secrete microRNAs into culture media--a potential biomarker for implantation. *Fertil Steril*. 2014 May;101(5):1493-500. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.01.058.
12. Bratkovič T, Božič J, Rogelj B. Functional diversity of small nucleolar RNAs. *Nucleic Acids Res*. 2019 Dec 12. pii: gkz1140. doi: 10.1093/nar/gkz1140.
13. Timofeeva AV, Chagovets VV, Drapkina YS, Makarova NP, Kalinina EA, Sukhikh GT. Cell-Free, Embryo-Specific sncRNA as a Molecular Biological Bridge between Patient Fertility and IVF Efficiency. *Int J Mol Sci*. 2019 Jun 14;20(12). pii: E2912. doi: 10.3390/ijms20122912.
14. Simonson B, Das S. MicroRNA Therapeutics: the Next Magic Bullet? *Mini Rev Med Chem*. 2015;15(6):467-74.
15. Li L, Lu X, Dean J. The maternal to zygotic transition in mammals. *Mol Aspects Med*. 2013 Oct;34(5):919-38. doi: 10.1016/j.mam.2013.01.003. Epub 2013 Jan 23.
16. Kropp J, Khatib H. Characterization of microRNA in bovine in vitro culture media associated with embryo quality and development. *J Dairy Sci*. 2015 Sep;98(9):6552-63. doi: 10.3168/jds.2015-9510.
17. Egea R., Puchalt N., Escrivá M., Varghese A. OMICS: Current and future perspectives in reproductive medicine and technology. *Journal of Human Reproductive Sciences* 2014;7:73–92.
18. Gardner DK, Harvey AJ. Blastocyst metabolism. *Reprod Fertil Dev*. 2015 May;27(4):638-54. doi: 10.1071/RD14421.
19. Katz-Jaffe M, Linck D, Schoolcraft W, Gardner D. A proteomic analysis of mammalian preimplantation embryonic development. *Reproduction*. 2005; 130(6):899–905. doi:10.1530/rep.1.00854
20. Poli M, Ori A, Child T, Jaroudi S, Spath K, Beck M, Wells D. Characterization and quantification of proteins secreted by single human embryos prior to implantation. *EMBO Mol Med*. 2015 Nov;7(11):1465-79
21. Yang JX, Rastetter RH, Wilhelm D. Non-coding RNAs: An Introduction. *Adv Exp Med Biol*. 2016;886:13-32. doi 10.1007/978-94-017-7417-8_2.
22. Heidari F, Hosseini S, Yeganeh SM, Salehi M. Expression of miR-Let-7a, miR-15a, miR-16-1, and their target genes in fresh and vitrified embryos and its surrounding culture media for noninvasive embryo assessment. *J Cell Biochem*. 2019 Dec;120(12):19691-19698. doi: 10.1002/jcb.29275
23. Teh WT, McBain J, Rogers P. What is the contribution of embryo-endometrial asynchrony to implantation failure? *J Assist Reprod Genet*. 2016 Nov;33(11):1419-1430.

24. Liang J, Wang S, Wang Z. Role of microRNAs in embryo implantation. *Reprod Biol Endocrinol*. 2017 Nov 21;15(1):90. doi: 10.1186/s12958-017-0309-7
25. Cuman C, Van Sinderen M, Gantier MP, Rainczuk K, Sorby K, Rombauts L, Osianlis T, Dimitriadis E. Human Blastocyst Secreted microRNA Regulate Endometrial Epithelial Cell Adhesion. *EBioMedicine*. 2015 Sep 11;2(10):1528-35. doi: 10.1016/j.ebiom.2015.09.003.
26. Borges E Jr, Setti AS, Braga DP, Geraldo MV, Figueira RC, Iaconelli A Jr. miR-142-3p as a biomarker of blastocyst implantation failure - A pilot study. *JBRA Assist Reprod*. 2016 Dec 1;20(4):200-205. doi: 10.5935/1518-0557.20160039.
27. Capalbo A, Ubaldi FM, Cimadomo D, Noli L, Khalaf Y, Farcomeni A, Ilic D, Rienzi L. MicroRNAs in spent blastocyst culture medium are derived from trophectoderm cells and can be explored for human embryo reproductive competence assessment. *Fertil Steril*. 2016 Jan;105(1):225-35.e1-3. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.09.014
28. Abu-Halima M, Häusler S, Backes C, Fehlmann T, Staib C, Nestel S, Nazarenko I, Meese E, Keller A. Micro-ribonucleic acids and extracellular vesicles repertoire in the spent culture media is altered in women undergoing In Vitro Fertilization. *Sci Rep*. 2017 Oct 19;7(1):13525. doi: 10.1038/s41598-017-13683-8.
29. Cimadomo D, Rienzi L, Giancani A, Alviggi E, Dusi L, Canipari R, Noli L, Ilic D, Khalaf Y, Ubaldi FM, Capalbo A. Definition and validation of a custom protocol to detect miRNAs in the spent media after blastocyst culture: searching for biomarkers of implantation. *Hum Reprod*. 2019 Sep 29;34(9):1746-1761. doi: 10.1093/humrep/dez119
30. Li Y, Chen S, Shan Z, Bi L, Yu S, Li Y, Xu S. miR-182-5p improves the viability, mitosis, migration, and invasion ability of human gastric cancer cells by down-regulating RAB27A. *Biosci Rep*. 2017 Jun 27;37(3). pii: BSR20170136. doi: 10.1042/BSR20170136
31. Dumont TM, Mouillet JF, Bayer A, Gardner CL, Klimstra WB, Wolf DG, Yagel S, Balmir F, Binstock A, Sanfilippo JS et al. The expression level of C19MC miRNAs in early pregnancy and in response to viral infection. *Placenta* 2017;53:23–29.
32. Qu LL, He L, Zhao X, Xu W. Downregulation of miR-518a-3p activates the NIK-dependent NF-kappaB pathway in colorectal cancer. *Int J Mol Med* 2015;35:1266–1272.
33. Murray MJ, Huddart RA, Coleman N. The present and future of serum diagnostic tests for testicular germ cell tumours. *Nat Rev Urol* 2016b;13:715–725.

34. Mei Y., et al. A piRNA-like small RNA interacts with and modulates p-ERM proteins in human somatic cells. *Nat. Commun.* 6:7316 doi: 10.1038/ncomms8316 (2015).
35. Franasiak J, Forman E, Hong K, Werner M, Upham K, Treff N, Scott R. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophoctoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. *Fertil Steril.*, 2014 Mar;101(3):656-663.e1. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.11.004. Epub 2013 Dec 17.
36. Revelli A, Biasoni V, Gennarelli G, Canosa S, Dalmasso P, Benedetto C. IVF results in patients with very low serum AMH are significantly affected by chronological age. *J Assist Reprod Genet.* 2016; 33(5):603–609. doi:10.1007/s10815-016-0675-7
37. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod.* 2011 Jun;26(6):1270-83. doi: 10.1093/humrep/der037.
38. Lee MT, Bonneau AR, Giraldez AJ. Zygotic genome activation during the maternal-to-zygotic transition. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014;30:581-613. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100913-013027.
39. Daher RK, Stewart G, Boissinot M, Bergeron MG. Recombinase Polymerase Amplification for Diagnostic Applications. *Clin Chem.* 2016 Jul;62(7):947-58. doi: 10.1373/clinchem.2015.245829.
40. Андреева М.Г., Калинина Е.А., Дьяконов С.А. Критерии успеха в программах вспомогательных репродуктивных технологий. *Акушерство и гинекология.* 2016; 3: 12-15.
41. Вартанян Э.В., Цатурова К.А., Девятов Е.А., Михайлюкова А.С., Левин В.А., Сагамонова К.Ю., Громенко Д.С., Овсянникова Т.В., Эрлихман Н.М., Колосова Е.А., Сафронова Е.В., Фотина О.В., Красновская Е.В., Пожарищенская Т.Г., Аутлева С.Р., Гзгзян А.М., Нуриев И.Р., Воропаева Е.Е., Пестова Т.И., Здановский В.М., Ким Н.А., Котельников А.Н., Сафронов О.В., Назаренко Т.А., Ионова Р.М. Подготовка к лечению бесплодия методом экстракорпорального оплодотворения при сниженном овариальном резерве. *Акушерство и гинекология.* 2019; 8: 134-42. <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2019.8.134-142>
42. Бесплодный брак: версии и контраверсии / под редакцией Радзинского В.Е. М.: ГЭОТАР- Медиа, 20187 стр. 404
43. Сыркашева А.Г., Ильина Е.О., Долгушина Н.В. Бесплодие у женщин старшего репродуктивного возраста: причины, тактика ведения, перспективы

использования преимплантационного генетического скрининга (обзор литературы). Гинекология. 2016; 03: 40-43

44. Шнейдерман М.Г., Аполихина И.А., Калинина Е.А., Абубакиров А.Н., Мишиева Н.Г., Алиева К.У., Бурдули А.Г., Аксененко А.А., Замятникова В.А., Веюкова М.А., Ушакова И.В. Новое об имплантации эмбриона в эндометрий матки. Акушерство и гинекология. 2013; 11: 75-78.

45. Elder K, Dale B, editors. In vitro fertilization; Implantation and early stages of fetal development; New York: Cambridge University Press; 2011.

46. Бурменская О.В., Боженко В.К., Смольникова В.Ю., Калинина Е.А., Корнеева И.Е., Межевитинова Е.А., Донников А.Е., Бейк Е.П., Набиева К.Р., Наумов В.А., Боровиков П.И. Поиск маркеров персонального «окна имплантации» у женщин в программе экстракорпорального оплодотворения с помощью определения транскрипционного профиля генов. Акушерство и гинекология. 2017; 5: 72-80. <http://dx.doi.org/10.18565/aig.2017.5.72-80>

47. Эфендиева З.Н., Аполихина И.А., Калинина Е.А. «Тонкий» эндометрий в аспекте репродуктивных неудач: современная проблема или гипердиагностика? Акушерство и гинекология. 2019; 9:32-9. <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2019.9.32-39>

48. Маслова М.А., Смольникова В.Ю., Донников А.Е., Бурменская О.В., Демура Т.А., Таболова В.К., Корнеева И.Е. Оценка значимости молекулярно-генетических маркеров в эндометрии в прогнозировании исхода беременности в программе экстракорпорального оплодотворения. Акушерство и гинекология. 2015; 3:26-32.

49. Timeva T, Shterev A, Kyurkchiev S. Recurrent implantation failure: the role of the endometrium. J Reprod Infertil. 2014;15(4):173–183.

50. Половнева М.И., Корнеева И.Е., Бурменская О.В. Современные методы оценки «окна имплантации» у пациенток, проходящих лечение в программе экстракорпорального оплодотворения. Акушерство и гинекология. 2018; 7: 26-30. <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2018.7.26-30>

51. Аполихина И.А., Эфендиева З.Н. Хронический эндометрит. Акушерство и гинекология. 2019; 3: 26-28

52. Унанян А.Л., Косовиц Ю.М., Демура Т.А., Бабурин Д.В., Сидорова И.С., Ищенко А.И. Клинико-морфологические особенности хронического эндометрита у женщин с бесплодием. Архив акушерства и гинекологии им В.Ф. Снегирева. 2017; 4(4): 208-213.

53. Зиганшина М.М., Абдурахманова Н.Ф., Павлович С.В., Гвоздева А.Д., Бовин Н.В., Сухих Г.Т. Гликом эндометрия в менструальном цикле и рецептивность эндометрия. Акушерство и гинекология. 2017; 12: 17-24. <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2017.12.17-24>

54. Gardner DK, Balaban B. Assessment of human embryo development using morphological criteria in an era of time-lapse, algorithms and 'OMICS': is looking good still important? *Mol Hum Reprod.* 2016 Oct;22(10):704-718. Epub 2016 Aug 30. DOI: 10.1093/molehr/gaw057
55. Jukam D, Shariati SAM, Skotheim JM. Zygotic Genome Activation in Vertebrates. *Dev Cell.* 2017 Aug 21;42(4):316-332. doi: 10.1016/j.devcel.2017.07.026.
56. Rocha J, Passalia F, Matos FD, Maserati MP Jr, Alves MF, Almeida TG, Cardoso BL, Basso AC, Nogueira MF. Methods for assessing the quality of mammalian embryos: How far we are from the gold standard? *JBRA Assist Reprod.* 2016 Aug 1;20(3):150-8. doi:10.5935/1518-0557.20160033.
57. Brezina PR, Anchan R, Kearns WG. Preimplantation genetic testing for aneuploidy: what technology should you use and what are the differences? *J Assist Reprod Genet.* 2016 Jul;33(7):823-32. doi: 10.1007/s10815-016-0740-2
58. Varghese A., Goldberg E., Bhattacharyya A., Agarwal A. Emerging technologies for the molecular study of infertility, and potential clinical applications. *Reproductive BioMedicine Online* 2007;15:451–6.
59. Gardner D., Lane M., Stevens J., Schoolcraft W. Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential, *Fertil. Steril.* 76, 2001, 1175–1180.
60. Renard J., Philippon A., Menezes Y., In-vitro uptake of glucose by bovine blasto- cysts, *J. Reprod. Fertil.* 58, 1980, 161–164.
61. Gardner D., Wale P., Collins R., Lane M. Glucose consumption of single post- compaction human embryos is predictive of embryo sex and live birth outcome, *Hum. Reprod.* 26, 2011, 1981–1986.
62. Crosby I., Gandolfi F., Moor R. Control of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos, *J. Reprod. Fertil.* 82, 1988, 769–775.
63. Edwards L., Williams D., Gardner D. Intracellular pH of the mouse pre-implantation embryo: amino acids act as buffers of intracellular pH, *Hum. Reprod.* 13, 1998, 3441–3448.
64. Liu Z., Foote R., Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O₂, *Biol. Reprod.* 53, 1995, 786–790.
65. Devreker F., Hardy K., Van den Bergh M., Vannin A., Emiliani S., Englert Y. Amino acids promote human blastocyst development in vitro, *Hum. Reprod.* 16, 2001, 749–756.

66. Lane M., Gardner D. Nonessential amino acids and glutamine decrease the time of the first three cleavage divisions and increase compaction of mouse zygotes in vitro, *J. Assist. Reprod. Genet.* 14, 1997, 398–403.
67. Houghton F., Hawkhead J., Humpherson P., Hogg J., Balen A., Rutherford A., et al. Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity, *Hum. Reprod.* 17, 2002, 999–1005.
68. Poli M, Ori A, Child T, Jaroudi S, Spath K, Beck M, Wells D. Characterization and quantification of proteins secreted by single human embryos prior to implantation. *EMBO Mol Med.* 2015 Nov;7(11):1465-79
69. Tedeschi G., Albani E., Borroni M., Parini V., Brucculeri A., Maffioli E. Proteomic profile of maternal-aged blastocoel fluid suggests a novel role for ubiquitin system in blastocyst quality. *J Assist Reprod Genet*, 2017, 34:225–238
70. Jensen P, Beck H, Petersen J, Hreinsson J, Wanggren K, Laursen S, et al. Proteomic analysis of human blastocoel fluid and blastocyst cells. *Stem Cells Dev.* 2013;22(7):1126– 35. doi:10.1089/scd.2012.0239
71. Dominguez F, Pellicer A, Simón C. The human embryo proteome. *Reprod Sci.* 2009 Feb;16(2):188-90. doi: 10.1177/1933719108328612. Epub 2008 Dec 15.
72. Sturmey R, Bermejo-Alvarez P, Gutierrez-Adan A, Rizos D, Leese H, Lonergan P. Amino acid metabolism of bovine blastocysts: a biomarker of sex and viability. *Mol Reprod Dev* 2010;77:285–96.
73. Seidler E, Gemani D, Ocalii O, Sakkas D. Utilization of a novel ultrasensitive digital immunoassay platform to measure interleukin-6 in blastocyst culture media. *Fertil Steril* 2017;107:e16
74. Hombach S, Kretz M. Non-coding RNAs: Classification, Biology and Functioning. *Adv Exp Med Biol.* 2016;937:3-17. doi: 10.1007/978-3-319-42059-2_1. Review
75. Moraes F, Góes A. A decade of human genome project conclusion: Scientific diffusion about our genome knowledge. *Biochem Mol Biol Educ.* 2016 May 6;44(3):215-23. doi: 10.1002/bmb.20952. Epub 2016 Mar 7
76. Jia H, Osak M, Bogu GK, Stanton LW, Johnson R, Lipovich L. Genome-wide computational identification and manual annotation of human long noncoding RNA genes. *RNA.* 2010 Aug;16(8):1478-87. doi: 10.1261/rna.1951310
77. Donlic A, Hargrove AE. Targeting RNA in mammalian systems with small molecules. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2018;9(4):e1477. doi:10.1002/wrna.1477
78. McCall MN, Kim MS, Adil M, et al. Toward the human cellular microRNAome. *Genome Res.* 2017;27(10):1769–1781. doi:10.1101/gr.222067.117.
79. Chua J, Armugam A, Jeyaseelan K. MicroRNAs: biogenesis, function and applications. *Curr Opin Mol Ther.* 2009; 11:189–199.

80. Song R, Hennig G, Wu Q, Jose C, Zheng H, Yan W. Male germ cells express abundant endogenous siRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(32):13159-13164. doi:10.1073/pnas.1108567108
81. Houwing S, Kamminga L, Berezikov E, Cronembold D, Girard A, Elst H, Philippov D, Blaser H, Raz E, Moens C, Plasterk R, Hannon G, Draper B, Ketting R. A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in Zebrafish. *Cell*. 2007 Apr 6;129(1):69-82.
82. Girard A, Sachidanandam R, Hannon G, Carmell M. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature*. 2006 Jul 13;442(7099):199-202. Epub 2006 Jun 4.
83. Hirakata S, Siomi M. piRNA biogenesis in the germline: From transcription of piRNA genomic sources to piRNA maturation. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Jan;1859(1):82-92. doi: 10.1016/j.bbagr.2015.09.002. Epub 2015 Sep 5. Review
84. Abd E, Naby W, Hagos T. Expression analysis of regulatory microRNAs in bovine cumulus oocyte complex and preimplantation embryos. *Zygote*. 2013 Feb;21(1):31-51
85. Wright E, Hale B, Yang C, Njoka J, Ross J. MicroRNA-21 and PDCD4 expression during in vitro oocyte maturation in pigs. *Reprod Biol Endocrinol*. 2016 Apr 16;14:21
86. Suh N, Baehner L, Moltzahn F, Melton C, Shenoy A, Chen J, Blelloch R. MicroRNA function is globally suppressed in mouse oocytes and early embryos. *Curr Biol*. 2010 Feb 9;20(3):271-7. doi: 10.1016/j.cub.2009.12.044. Epub 2010 Jan 28
87. Watanabe, T., Totoki, Y. et al. Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature* 453, 539–543, 2008
88. Tang, F. et al. Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. *Genes Dev*. 21, 644–648, 2007
89. Roovers E, Rosenkranz D et al. Piwi proteins and piRNAs in mammalian oocytes and early embryos. *Cell Rep*. 2015 Mar 31;10(12):2069-82
90. Ketting R. The many faces of RNAi. *Dev Cell*. 2011 Feb 15;20(2):148-61
91. Machtinger, R.; Rodosthenous, R.S.; Adir, M.; Mansour, A.; Racowsky, C.; Baccarelli, A.A.; Hauser, R. Extracellular microRNAs in follicular fluid and their potential association with oocyte fertilization and embryo quality: An exploratory study. *J. Assist. Reprod. Genet*. 2017, 34, 525–533
92. Sang, Q.; Yao, Z.; Wang, H.; Feng, R.; Wang, H.; Zhao, X.; Xing, Q.; Jin, L.; He, L.; Wu, L.; et al. Identification of MicroRNAs in Human Follicular Fluid:

Characterization of MicroRNAs That Govern Steroidogenesis in Vitro and Are Associated With Polycystic Ovary Syndrome in Vivo. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2013, 98, 3068–3079

93. Battaglia, R.; Vento, M.E.; Ragusa, M.; Barbagallo, D.; La Ferlita, A.; Di Emidio, G.; Borzi, P.; Artini, P.G.; Scollo, P.; Tatone, C.; et al. MicroRNAs Are Stored in Human MII Oocyte and Their Expression Profile Changes in Reproductive Aging. *Biol. Reprod.* 2016, 95, 131

94. Karakaya C, Guzeloglu-Kayisli O, Uyar A, Kallen AN, Babayev E, Bozkurt N, Unsal E, Karabacak O, Seli E. Poor ovarian response in women undergoing in vitro fertilization is associated with altered microRNA expression in cumulus cells. *Fertil Steril.* 2015 Jun;103(6):1469-76.e1-3. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.02.035. Epub 2015 Apr 22. PMID: 25910568; PMCID: PMC5648585.

95. De Mateo S, Sassone-Corsi P. Regulation of spermatogenesis by small non-coding RNAs: role of the germ granule. *Semin Cell Dev Biol.* 2014 May; 29:84-92

96. Tong M, Mitchell D, Evanoff R, Griswold M. Expression of Mirlet7 family microRNAs in response to retinoic acid-induced spermatogonial differentiation in mice. *Biol Reprod.* 2011 Jul;85(1):189-97

97. Marcon E, Babak T, Chua G, Hughes T, Moens P. miRNA and piRNA localization in the male mammalian meiotic nucleus. *Chromosome Res.* 2008;16(2):243-60

98. Liang X, Zhou D, Wei C, Luo H, Liu J, Fu R, Cui S. MicroRNA-34c enhances murine male germ cell apoptosis through targeting ATF1. *PLoS One.* 2012;7(3):e33861

99. Yu Z, Raabe T, Hecht N. MicroRNA MiR-122a reduces expression of the posttranscriptionally regulated germ cell transition protein 2 (Tnp2) messenger RNA (mRNA) by mRNA cleavage. *Biol Reprod.* 2005 Sep;73(3):427-33;

100. Dai L, Tsai-Morris C, Sato H, Villar J, Kang J, Zhang J, Dufau M. Testis-specific miRNA-469 up-regulated in gonadotropin-regulated testicular RNA helicase (GRTH/DDX25)-null mice silences transition protein 2 and protamine 2 messages at sites within coding region: implications of its role in germ cell development. *J Biol Chem.* 2011 Dec 30;286(52):44306-18

101. Beyret E., Liu N., Lin H. piRNA biogenesis during adult spermatogenesis in mice is independent of the ping-pong mechanism *Cell Res.* 2012 Oct; 22(10): 1429–1439

102. Vourekas A., Zheng Q., Alexiou P., et al. Mili and Miwi target RNA repertoire reveals piRNA biogenesis and function of Miwi in spermiogenesis. *Nature structural & molecular biology.* 2012; 19(8):773-781

103. Luo L, Hou C, Yang W. Small non-coding RNAs and their associated proteins in spermatogenesis. *Gene*. 2016 Mar 10;578(2):141-57
104. Kiani M et al. (2019) MicroRNA expression in infertile men: its alterations and effects. *Zygote* 27: 263–271. doi: 10.1017/S0967199419000340
105. Kishlay Kumara, Dorota Trzybulskaa, Christos Tsatsanisa, Aleksander Giwercmana, Kristian Almstrup. Identification of circulating small non-coding RNAs in relation to male subfertility and reproductive hormones. *Molecular and Cellular Endocrinology*. Volume 492, 15 July 2019, 110443
106. Jodar M. Sperm and seminal plasma RNAs: What roles do they play beyond fertilization? *Reproduction*. 2019 May 1. pii: REP-18-0639.R2. doi: 10.1530/REP-18-0639.
107. Carrell D.T., Aston K.I., Oliva R., EmeryBR, De Jonge C.J. 2016. The ‘omics’ of human male infertility: integrating big data in a systems biology approach. *Cell and Tissue Research* 363. <https://doi.org/10.1007/s00441-015-2320-7>
108. Reilly JN, McLaughlin EA, Stanger SJ, Anderson AL, Hutcheon K, Church K, Mihalas BP, Tyagi S, Holt JE, Eamens AL and Nixon B. Characterisation of mouse epididymosomes reveals a complex profile of microRNAs and a potential mechanism for modification of the sperm epigenome. 2016. *Sci Rep* 6, 31794. 2016 Aug 23;6:31794. doi: 10.1038/srep31794.
109. Kotaja N. MicroRNAs and spermatogenesis. 2014. *Fertil Steril Jun*;101(6):1552-62. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.04.025.
110. Belleannée C., Calvo É., Caballero J., Sullivan R. 2013. Epididymosomes convey different repertoires of microRNAs throughout the bovine epididymis. *Biology of Reproduction* 89 30. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.110486>
111. Castillo J., Jodar M., Oliva R. 2018. The contribution of human sperm proteins to the development and epigenome of the preimplantation embryo. *Human Reproduction Update* 24 . <https://doi.org/10.1093/humupd/dmy017>
112. Chen Q., Yan W., Duan E. 2016 Epigenetic inheritance of acquired traits through sperm RNAs and sperm RNA modifications. *Nature Reviews: Genetics* 17. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.106>
113. Fang P, Zeng P., Wang Z., Liu M.Xu., Dai J., Zhao X., Zhang D., Liang D.,Chen X. 2014 Estimated diversity of messenger RNAs in each murine spermatozoa and their potential function During early zygotic development. *Biology of Reproduction* 90 94. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.117788>
114. Shuiqiao Y, Schuster A, Chong T, Tian Y, Ortogero N, Bao J, Zheng H, Yan W. Sperm-borne miRNAs and endo-siRNAs are important for fertilization and preimplantation embryonic development. *Development Advance Online Articles*. First posted online on 30 December 2015 as 10.1242/dev.131755

115. Capalbo A., Maria U. et al. Detecting mosaicism in trophectoderm biopsies: current challenges and future possibilities, *Human Reproduction*, Volume 32, Issue 3, 1 March 2017, Pages 492–498
116. Noli L, Capalbo A. et al. Human Embryos Created by Embryo Splitting Secrete Significantly Lower Levels of miRNA-30c. *Stem Cells Dev*, 2016 Dec 15; 25(24): 1853–1862.
117. Viswanathan S. et al. microRNA expression during trophectoderm specification. *PLoS One*, 2009 Jul 3;4(7):e6143. doi: 10.1371/journal.pone.0006143.
118. La Ferlita, A.; Battaglia, R.; Andronico, F.; Caruso, S.; Cianci, A.; Purrello, M.; Di Pietro, C. Non-Coding RNAs in Endometrial Physiopathology. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 2120.
119. Von Grothusen, C.; Lalitkumar, S.; Boggavarapu, N.R.; Gemzell-Danielsson, K.; Lalitkumar, P.G. Recent advances in understanding endometrial receptivity: Molecular basis and clinical applications. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2014, 72, 148–157.
120. Altmäe, S.; Martinez-Conejero, J.A.; Esteban, F.J.; Ruiz-Alonso, M.; Stavreus-Evers, A.; Horcajadas, J.A.; Salumets, A. MicroRNAs miR-30b, miR-30d and miR-494 regulate human endometrial receptivity. *Reprod. Sci.* 2013, 20, 308–317
121. Inyawilert W., Lin C.T., Tang, P.C. MicroRNA-199a mediates mucin 1 expression in mouse uterus during implantation. *Reprod. Fertil. Dev.* 2014, 26, 653–664
122. Kang Y.J., Lees M., Matthews L.C., Kimber S.J.; Forbes K., Aplin J.D. MiR-145 suppresses embryo-epithelial juxtacrine communication at implantation by modulating maternal IGF1R. *J. Cell Sci.* 2015, 128, 804–814
123. Vilella F., Moreno-Moya J.M., Balaguer N., Grasso A., Herrero M., Martínez S., Marcilla A., Simón C. Hsa-miR-30d, secreted by the human endometrium, is taken up by the pre-implantation embryo and might modify its transcriptome. *Development* 2015, 142, 3210–3221
124. Li, Z.; Gou, J.; Jia, J.; Zhao, X. MicroRNA-429 functions as a regulator of epithelial-mesenchymal transition by targeting Pcdh8 during murine embryo implantation. *Hum. Reprod.* 2015, 30, 507–518
125. Zhao, Y.; Yang, Y.; Trovik, J.; Sun, K.; Zhou, L.; Jiang, P.; Lau, T.S.; Hoivik, E.A.; Salvesen, H.B.; Sun, H.; et al. A novel wnt regulatory axis in endometrioid endometrial cancer. *Cancer Res.* 2014, 74, 5103–5117
126. Li, Z.; Jia, J.; Gou, J.; Tong, A.; Liu, X.; Zhao, X.; Yi, T. Mmu-miR-126a-3p plays a role in murine embryo implantation by regulating Itga11. *Reprod. Biomed. Online* 2015, 31, 384–393.

127. Chen, C.; Zhao, Y.; Yu, Y.; Li, R.; Qiao, J. MiR-125b regulates endometrial receptivity by targeting MMP26 in women undergoing IVF-ET with elevated progesterone on HCG priming day. *Sci. Rep.* 2016, 6, 25302

128. Tadros W, Goldman A et al. SMAUG is a major regulator of maternal mRNA destabilization in *Drosophila* and its translation is activated by the PAN GU kinase. *Dev Cell.* 2007 Jan;12(1):143-55

129. Svoboda P., Flemr M. The role of miRNAs and endogenous siRNAs in maternal-to-zygotic reprogramming and the establishment of pluripotency. *EMBO Rep.* 2010;11(8):590-7. doi:10.1038/embor.2010.102

130. Han B., Wang W., Li C., Weng Z., Zamore P. PiRNA-guided transposon cleavage initiates Zucchini-dependent, phased piRNA production. *Science.* 2015;(6236): 817–821. doi: 10.1126/science.aaa1264

131. Liying Y., Mingyu Y., Hongshan G., Lu Y., Jun W., Rong L., Ping L., Ying L., Xiaoying Z., Jie Y., Jin H., Ming L., Xinglong W., Lu W., Kaiqin L., Ruiqi-ang L., Jie Q., Fuchou T. Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2013;20(9):1131-9. doi: 10.1038/nsmb.2660.

132. R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2018. Available at: <https://www.R-project.org/> и программы RStudio

133. RStudio Team. RStudio: Integrated development for R. RStudio. Boston, MA: RStudio Inc.; 2016. Available at: <http://www.rstudio.com/>

134. Тимофеева А.В., Калинина Е.А., Драпкина Ю.С., Чаговец В.В., Макарова Н.П., Сухих Г.Т. Оценка качества эмбриона по профилю экспрессии малых некодирующих РНК в культуральной среде эмбриона в программах ВРТ. *Акушерство и Гинекология*, 2019, № 6 DOI <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2019.6.79-86>

135. Vaiarelli A, Cimadomo D, Ubaldi N, Rienzi L, Ubaldi FM. What is new in the management of poor ovarian response in IVF? *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2018 Jun;30(3):155-162. doi: 10.1097/GCO.0000000000000452.

136. Von Hofe J., Bates GW. Ovulation induction. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2015 Mar;42(1):27-37. doi: 10.1016/j.ogc.2014.09.007.

137. Roman R, Mussarat N, Detti L. Ovarian Stimulation in Poor Responders: Have We Made Progress?. *Current pharmaceutical biotechnology.* 2017 Jul 1;18(8):614-8. doi: 10.2174/1389201018666171002132853.

138. Mo J.S., Park H.W., Guan K.L. The Hippo signaling pathway in stem cell biology and cancer. *EMBO Rep.* 2014;15:642–656. doi: 10.15252/embr.201438638.

139. Hers I., Vincent E.E., Tavaré J.M. Akt signalling in health and disease. *Cell. Signal.* 2011;23:1515–1527. doi: 10.1016/j.cellsig.2011.05.004.
140. Varelas X., Sakuma R., Samavarchi-Tehrani P., Peerani R., Rao B.M., Dembowy J., Yaffe M.B., Zandstra P.W., Wrana J.L. TAZ controls Smad nucleo-cytoplasmic shuttling and regulates human embryonic stem-cell self-renewal. *Nat. Cell Biol.* 2008;10:837–848. doi: 10.1038/ncb1748
141. Kim S.Y., Baek K.H. TGF- β signaling pathway mediated by deubiquitinating enzymes. *Cell. Mol. Life Sci.* 2019;76:653–665. doi: 10.1007/s00018-018-2949-y.
142. Song J.L., Nigam P., Tektas S.S., Selva E. microRNA regulation of Wnt signaling pathways in development and disease. *Cell. Signal.* 2015;27:1380–1391. doi: 10.1016/j.cellsig.2015.03.018.
143. Kuscu N., Celik-Ozenci C. FOXO1, FOXO3, AND FOXO4 are differently expressed during mouse oocyte maturation and preimplantation embryo development. *Gene Expr. Patterns.* 2015;18:16–20. doi: 10.1016/j.gep.2015.04.003.
144. Perkel K.J., Madan P. Spent culture medium analysis from individually cultured bovine embryos demonstrates metabolomic differences. *Zygote.* 2017;25:662–674. doi: 10.1017/S0967199417000417.
145. Brison D.R., Houghton F.D., Falconer D., Roberts S.A., Hawkhead J., Humpherson P.G., Lieberman B.A., Leese H.J. Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover. *Hum. Reprod.* 2004;19:2319–2324. doi: 10.1093/humrep/deh409.
146. Linwei Wu, Liem H Nguyen. Precise let-7 expression levels balance organ regeneration against tumor suppression. *eLife.* 2015; 4: e09431. Published online 2015 Oct 7. doi: 10.7554/eLife.09431
147. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ (2005). "RAS is regulated by the let-7 microRNA family". *Cell.* 120 (5): 635–47
148. Stephen, A.G.; Esposito, D.; Bagni, R.K.; McCormick, F. Dragging Ras Back in the Ring. *Cancer Cell* 2014, 25, 272–281
149. Young S. L., Lyddon T. D., Jorgenson R. L., Misfeldt M. L. Expression of Toll-like receptors in human endometrial epithelial cells and cell lines // *Am. J. Reprod. Immunol.* 2004; 52: 67–73
150. Vijay, K. Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future. *Int. Immunopharmacol.* 2018, 59, 391–412
151. Kim J., Lee J., Jun J.H. Identification of differentially expressed microRNAs in outgrowth embryos compared with blastocysts and non-outgrowth embryos in mice. *Reprod. Fertil. Dev.* 2019;31:645. doi: 10.1071/RD18161.

152. Hirose M, Ogura A. The golden (Syrian) hamster as a model for the study of reproductive biology: Past, present, and future. *Reprod Med Biol.* 2018;18(1):34–39. Published 2018 Oct 7. doi:10.1002/rmb2.12241

153. Roush S, Slack FJ. The let-7 family of microRNAs. *Trends Cell Biol.* 2008 Oct;18(10):505-16. doi: 10.1016/j.tcb.2008.07.007.

154. Liu W, Niu Z1, Li Q1, Pang RT1, Chiu PC1,3, Yeung WS. MicroRNA and Embryo Implantation. *Am J Reprod Immunol.* 2016 Mar;75(3):263-71. doi: 10.1111/aji.12470.

155. Koivisto L1, Bi J2, Häkkinen L3, Larjava H. Integrin $\alpha\beta6$: Structure, function and role in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2018 Jun;99:186-196. doi: 10.1016/j.biocel.2018.04.013

156. Linwei Wu, Liem H Nguyen. Precise let-7 expression levels balance organ regeneration against tumor suppression. *eLife.* 2015; 4: e09431. Published online 2015 Oct 7. doi: 10.7554/eLife.09431

157. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ (2005). "RAS is regulated by the let-7 microRNA family". *Cell.* 120 (5): 635–47

158. Zhang P., Kang J.-Y., Gou L.-T., Wang J., Xue Y., Skogerboe G., Dai P., Huang D.-W., Chen R., Fu X.-D., et al. MIWI and piRNA-mediated cleavage of messenger RNAs in mouse testes. *Cell Res.* 2015;25:193–207. doi: 10.1038/cr.2015.4.

159. Gou L.-T., Dai P., Yang J.-H., Xue Y., Hu Y.-P., Zhou Y., Kang J.-Y., Wang X., Li H., Hua M.-M., et al. Pachytene piRNAs instruct massive mRNA elimination during late spermiogenesis. *Cell Res.* 2014;24:680–700. doi: 10.1038/cr.2014.41.

160. Rouget C., Papin C., Boureux A., Meunier A.-C., Franco B., Robine N., Lai E.C., Pelisson A., Simonelig M. Maternal mRNA deadenylation and decay by the piRNA pathway in the early *Drosophila* embryo. *Nature.* 2010;467:1128–1132. doi: 10.1038/nature09465.

161. Russell S., Patel M., Gilchrist G., Stalker L., Gillis D., Rosenkranz D., LaMarre J. Bovine piRNA-like RNAs are associated with both transposable elements and mRNAs. *Reproduction.* 2017;153:305–318. doi: 10.1530/REP-16-0620.

162. Roth L.M., Michal M., Michal M., Cheng L. Protein expression of the transcription factors DMRT1, TCLF5, and OCT4 in selected germ cell neoplasms of the testis. *Hum. Pathol.* 2018;82:68–75. doi: 10.1016/j.humpath.2018.07.019.

163. Duquette P.M., Lamarche-Vane N. Rho GTPases in embryonic development. *Small GTPases.* 2014;5:e972857. doi: 10.4161/sgtp.29716.

164. Van der Vlag J., Otte A.P. Transcriptional repression mediated by the human polycomb-group protein EED involves histone deacetylation. *Nat. Genet.* 1999;23:474–478. doi: 10.1038/70602.
165. Shao Z., Raible F., Mollaaghababa R., Guyon J.R., Wu C., Bender W., Kingston R.E. Stabilization of Chromatin Structure by PRC1, a Polycomb Complex. *Cell.* 1999;98:37–46. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80604-2
166. Deshpande A.M., Akunowicz J.D., Reveles X.T., Patel B.B., Saria E.A., Gorlick R.G., Naylor S.L., Leach R.J., Hansen M.F. PHC3, a component of the hPRC-H complex, associates with 2A7E during G0 and is lost in osteosarcoma tumors. *Oncogene.* 2007;26:1714–1722. doi: 10.1038/sj.onc.1209988.
167. Ohkumo T., Masutani C., Eki T., Hanaoka F. Deficiency of the *Caenorhabditis elegans* DNA polymerase eta homologue increases sensitivity to UV radiation during germ-line development. *Cell Struct. Funct.* 2006;31:29–37. doi: 10.1247/csf.31.29
168. Bürglin T.R. Homeodomain Subtypes and Functional Diversity. Springer; Dordrecht, The Netherlands: 2011. pp. 95–122
169. Jingjuan Ji, Yusheng Liu, Xian Hong Tong, Lihua Luo, Jinlong Ma, Zi-jiang Chen. The optimum number of oocytes in IVF treatment: an analysis of 2455 cycles in China. *Human Reproduction*, Volume 28, Issue 10, October 2013, Pages 2728–2734, <https://doi.org/10.1093/humrep/det303>
170. No, J.; Zhao, M.; Lee, S.; Ock, S.A.; Nam, Y.; Hur, T.-Y. Enhanced in vitro maturation of canine oocytes by oviduct epithelial cell co-culture. *Theriogenology* 2018, 105, 66–74
171. Schier A. The Maternal-Zygotic Transition: Death and Birth of RNAs. *Science.* 2007;316(5823):406-7. doi: 10.1126/science.1140693
172. Altmäe S, Koel M, Võsa U, et al. Meta-signature of human endometrial receptivity: a meta-analysis and validation study of transcriptomic biomarkers. *Sci Rep.* 2017
173. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Performing the embryo transfer: a guideline, 2013
174. Наими З.М.С., Калинина Е.А., Донников А.Е., Алиева К.У., Дударова А.Х., Тухватуллина Я.А. Эффективность программ вспомогательных репродуктивных технологий при переносе эмбрионов в стимулированном цикле по сравнению с переносом криоконсервированных/размороженных эмбрионов. *Акушерство и гинекология.* 2016; 6: 11-17. <http://dx.doi.org/10.18565/aig.2016.6.11-17>
175. Roque M., Valle M., Guimarães F., Sampaio M., Geber S. Freeze-All Policy: Fresh vs Frozen-Thawed Embryo Transfer. *Fertil Steril.* 2015

176. Bashiri A, Halper KI, Orvieto R. Recurrent Implantation Failure-update overview on etiology, diagnosis, treatment and future directions. *Reprod Biol Endocrinol*, 2018