

САВОСТИНА

Гузель Венеровна

**ОПТИМИЗАЦИЯ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ
ТЕХНОЛОГИЙ НА ОСНОВАНИИ СЕЛЕКТИВНОГО ПЕРЕНОСА
ЭУПЛОИДНОГО ЭМБРИОНА С УЧЕТОМ ПРОФИЛЯ ЭКСПРЕССИИ
МАЛЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РИБОНУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В
КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЕ ЭМБРИОНОВ**

3.1.4. Акушерство и гинекология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

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

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Перминова Светлана Григорьевна

Официальные оппоненты:

Краснопольская Ксения Владиславовна — член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии», руководитель отделения репродуктологии.

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

Ведущая организация:

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта» Минобрнауки России.

Защита диссертации состоится «20» февраля 2024г. на заседании диссертационного совета 21.1.022.01 на базе ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д.4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России

<https://science.ncagp.ru/upfiles/pdf/Savostina%20GV-disser.pdf?390573069>

Автореферат разослан «____» _____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Е.А. Калинина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Несмотря на непрерывное совершенствование вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), частота наступления беременности в программах экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) не превышает 30 – 40% (*Регистр ВРТ РАРЧ, 2021*). Выбор эмбриона с оптимальным имплантационным потенциалом является одной из главных нерешенных проблем в клинической практике ВРТ. Без сомнений, значительный вклад в этиологию неудач имплантации и ранних репродуктивных потерь вносят хромосомные аномалии эмбрионов (*Fragouli E. et al., 2017*). При этом, частота образования анеуплоидных бластоцист в программах ВРТ варьирует в широких пределах (26 – 88,2%) и имеет сильную корреляцию с возрастом женщины (*Cimadomo D. et al., 2017, Nair J. et al., 2022*). Единственный метод, позволяющий с высокой чувствительностью и специфичностью идентифицировать анеуплоидные эмбрионы – преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии (ПГТ-А) (*Greco E. et al., 2021*). Несмотря на то, что частота использования ПГТ-А с каждым годом увеличивается, около 50% эуплоидных эмбрионов не имплантируется (*Кулакова Е.В. и соавт., 2021, Treff N. et al., 2021, Cimadomo D. et al., 2023*). Все больше исследований демонстрируют противоречивые данные о влиянии ПГТ-А на исходы программ ВРТ в различных группах пациентов (*Tong J. et al., 2021, Bhatt S. et al., 2021, Pantou H. et al., 2022*). Так, если у женщин старшего репродуктивного возраста в значительном большинстве исследований демонстрируется улучшение результативности программ ВРТ при использовании ПГТ-А, то у пациенток с привычным невынашиванием беременности, повторными неудачными попытками имплантации и супружеских пар с тяжелой патозооспермией влияние ПГТ-А на исходы программ ВРТ неоднозначно (*R.Mazzilli et al., 2017, Xu R., 2021, Mehmet R.A., 2022, Lin X., 2022*). Неудачи имплантации могут быть ассоциированы и с ограничениями самого метода: необходимость инвазивного воздействия на

эмбрион, а также невозможность точной оценки процента анеуплоидных клеток в эмбрионе на основании анализа лишь нескольких клеток трофэктодермы (Gresco E. et al., 2021, Cimadomo D. et al., 2023).

Согласно данным последних исследований, имплантационный потенциал эмбриона определяется не только нормальным кариотипом и генами, кодирующими белок, но и сложнейшей эпигенетической системой, большую часть которой составляют длинные и малые некодирующие РНК (Fu X., 2020, Gao L., 2023). Представителями последних являются микроРНК и пивиРНК, которые посредством ингибирования трансляции или деградации РНК-мишени в составе RISC-комплекса регулируют сигнальные пути, отвечающие за ранний эмбриогенез, в том числе за запуск эмбриональной программы в процессе материнско-зиготического перехода (Lim, H. et al., 2021). Уникальную функцию выполняет один из самых многочисленных представителей мнкРНК, а именно пивиРНК, которая заключается в поддержании стабильности генома за счет подавления активности транспозонов (Gao L. et al., 2023). Принимая во внимание важнейшую роль пивиРНК в поддержании стабильности генома, а также их широкую распространенность в геноме человека, изучение данных молекул в качестве потенциальных маркеров плоидности и имплантационного потенциала эмбрионов представляется наиболее актуальным.

Цель исследования

Прогнозирование результатов программ ВРТ на основании селективного переноса эмбриона по результатам ПГТ-А и профиля экспрессии малых некодирующих РНК в культуральной среде эмбрионов.

Задачи исследования

1. Провести анализ клинико-anamнестических и лабораторных параметров супружеских пар, обратившихся для проведения программ ЭКО/ICSI+ПГТ-А.
2. Оценить параметры стимулированных циклов, оогенеза, раннего эмбриогенеза, результатов ПГТ-А и исходов криоциклов супружеских пар, обратившихся для проведения программ ЭКО/ICSI+ПГТ-А.

3. Изучить профиль мнкРНК в культуральной среде эмбрионов и проанализировать его в зависимости от хромосомного статуса (плоидности) в программе ЭКО/ICSI+ПГТ-А.
4. Оценить результаты криоциклов с переносом эуплоидных эмбрионов по результатам ПГТ-А с учетом профиля экспрессии мнкРНК, ответственных за имплантационный потенциал эмбриона.
5. Разработать персонализированный алгоритм селекции эуплоидного эмбриона на основании интегральной оценки его хромосомного статуса и профиля экспрессии мнкРНК.

Научная новизна

Представлены и научно обоснованы актуальные данные о частоте и структуре анеуплоидий, влиянии ПГТ-А на исходы программ ВРТ у женщин старшего репродуктивного возраста, супружеских пар с привычным невынашиванием беременности, повторными неудачными попытками имплантации и тяжелой патозооспермией. Впервые идентифицированы ключевые маркеры плоидности и имплантационного потенциала эмбрионов по уровню экспрессии пивиРНК в культуральной среде эмбрионов. Разработаны модели логистической регрессии, позволяющие с высокой чувствительностью и специфичностью (93 – 100%) идентифицировать эуплоидные эмбрионы с высоким имплантационным потенциалом по уровню экспрессии определенных комбинаций пивиРНК в среде культивирования бластоцист.

Практическая значимость

Обоснована целесообразность использования ПГТ-А у женщин старшего репродуктивного возраста, пациенток с привычным невынашиванием беременности и повторными неудачными попытками имплантации, тогда как у супружеских пар с тяжелой патозооспермией продемонстрировано отсутствие положительного влияния ПГТ-А на исходы программ ВРТ. Разработан неинвазивный метод оценки плоидности и имплантационного потенциала эмбрионов по уровню экспрессии

определенных комбинаций пивиРНК в культуральной среде бластоцист. Предложен алгоритм выбора эуплоидного эмбриона с оптимальным имплантационным потенциалом на основании интегральной оценки результатов ПГТ-А и профиля экспрессии мнкРНК в культуральной среде эмбрионов.

Положения, выносимые на защиту

1. В структуре хромосомной патологии у женщин старшего репродуктивного возраста преобладают множественные анеуплоидии по 3-м и более хромосомам (39,73%), тогда как у супружеских пар с привычным невынашиванием беременности (51,79%), повторными неудачными попытками имплантации (58,12%) и тяжелой патозооспермией (61,60%) чаще встречаются анеуплоидии по одной хромосоме, что указывает на более значимые нарушения сегрегации хромосом в анафазе клеточного деления у женщин старше 35 лет по сравнению с пациентами остальных групп.

2. Применение ПГТ-А увеличивает вероятность клинической беременности у женщин старшего репродуктивного возраста в 3 раза, у пациенток с повторными неудачными попытками имплантации – в 2 раза. У женщин с привычным невынашиванием беременности ПГТ-А не влияет на частоту клинической беременности, но снижает риск ранних репродуктивных потерь в 2,5 раза и повышает вероятность живорождения в 1,5 раза. У супружеских пар с тяжелой патозооспермией применение ПГТ-А не оказывает положительного влияния на исходы программ ВРТ.

3. По результатам глубокого секвенирования и кПЦР идентифицировано 5 пивиРНК (piR_020497, piR_015462, piR_016677, piR_020829, piR_017716), по уровню экспрессии которых в среде культивирования бластоцист построены 3 модели логистической регрессии, позволяющие статистически значимо с высокой специфичностью (81 – 85%) дифференцировать эмбрионы в зависимости от плоидности.

4. Выявленные малые некодирующие РНК (hsa_piR_020497, hsa_piR_016677, hsa_piR_015462, hsa_piR_017716, hsa_piR_020829,

hsa_piR_020326) участвуют в регуляции формирования веретена деления, от нормального функционирования которого зависит правильная сегрегация хромосом в анафазе клеточного деления. Профиль экспрессии малых некодирующих РНК (piR_020497, piR_020829, piR_016677, piR_020326, piR_017716) в средах культивирования бластоцист позволяет прогнозировать имплантационный потенциал зуплоидного эмбриона с высокой специфичностью (93 – 100%).

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в выборе темы исследования, разработке цели и задач научной работы. Автором проведена систематизация литературных данных по теме диссертации, собраны образцы сред культивирования для последующей обработки материала и интерпретации молекулярно-биологических данных, сформирована база клиничко-анамнестических и лабораторных параметров супружеских пар, проведен анализ полученного материала, статистическая обработка данных, научная интерпретация полученных результатов и разработка практических рекомендаций. Автор принимал непосредственное участие в обследовании пациенток и проведении всех этапов программ ВРТ.

Соответствие диссертации паспорту полученной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 3.1.4. Акушерство и гинекология. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 4 и 5 паспорта специальности 3.1.4. Акушерство и гинекология.

Апробация материалов диссертации

Работа обсуждена на межклинической конференции научно-клинического отделения вспомогательных репродуктивных технологий им. Ф. Паулсена (06.07.2023) и заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (30.10.2023).

Внедрение результатов исследования в клиническую практику

Результаты исследования внедрены и используются в практической деятельности научно-клинического отделения вспомогательных репродуктивных технологий им. Ф. Паулсена ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России и лаборатории прикладной транскриптомики отдела системной биологии в репродукции ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. По теме научно-клинической работы опубликовано 5 печатных работ, в том числе 4 – в ведущих рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 171 страницах машинописного текста. Включает введение, обзор литературы, описание материала и методов, результаты собственного исследования, обсуждение, заключение, выводы и практические рекомендации. Работа иллюстрирована 10 рисунками и 17 таблицами. Библиографический указатель включает 264 источника, из которых 23 работы отечественных авторов и 241 зарубежное исследование.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материал и методы исследования

На ретроспективном этапе исследования проанализированы данные 671 супружеской пары, которым был проведен 801 стимулированный цикл и 666 криоциклов, проведенных на базе НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова в период с 2018 по 2021 гг. Группу наблюдения составили 323 супружеских пары, обратившиеся для проведения программы ЭКО/ICSI с ПГТ-А, которые были разделены на 4 подгруппы в зависимости от показаний к ПГТ-А: старший репродуктивный возраст женщины (старше 35 лет), привычное невынашивание беременности (2 и более самопроизвольных прерываний беременности на сроке до 22 недель), повторные неудачные попытки имплантации (3 и более неудачных попыток переноса «свежих» или размороженных эмбрионов), тяжелая патозооспермия (концентрация

сперматозоидов ≤ 5 млн/мл, процент прогрессивно-подвижных форм сперматозоидов $\leq 19\%$, патологических форм сперматозоидов $\geq 99\%$). К каждой из четырех подгрупп были подобраны соответствующие подгруппы сравнения, которым проводились программы ЭКО/ICSI без ПГТ-А и перенос эмбриона в рамках криоцикла:

Ia-подгруппа включала 86 женщин старшего репродуктивного возраста, 97 программ ЭКО/ICSI + ПГТ-А и 52 криоцикла, Ib-подгруппа – 79 женщин старшего репродуктивного возраста, 104 программы ЭКО/ICSI без ПГТ-А и 61 криоцикл;

II-a подгруппа включала 90 женщин с привычным невынашиванием беременности, 119 программ ЭКО/ICSI + ПГТ-А и 90 криоциклов, IIb подгруппа – 84 женщины с привычным невынашиванием беременности, 102 программы ЭКО/ICSI без ПГТ-А и 84 криоцикла;

IIIa-подгруппа включала 72 женщины с повторными неудачными попытками имплантации, 106 программ ЭКО/ICSI + ПГТ-А и 88 криоциклов, IIIb-подгруппа – 96 женщин с повторными неудачными попытками имплантации, 91 программа ЭКО/ICSI без ПГТ-А и 114 криоциклов.

IVa-подгруппа включала 75 супружеских пар с тяжелой патозооспермией, 89 программ ЭКО/ICSI + ПГТ-А и 79 криоциклов, IVb-подгруппа – 89 супружеских пар с тяжелой патозооспермией, 93 программы ЭКО/ICSI без ПГТ-А и 98 криоциклов. На данном этапе был проведен анализ клинико-anamnestических данных и лабораторных параметров пациенток, включенных в исследование, а также показателей стимулированных циклов, оогенеза, раннего эмбриогенеза, результатов ПГТ-А и исходов криоциклов.

На проспективном этапе исследования в зависимости от результатов ПГТ-А и исходов программ ВРТ было отобрано 93 образца культуральных сред эмбрионов, полученных от 73 супружеских пар, для анализа профиля мнкРНК, которые были распределены на группы: 1 группу составили 53 эуплоидных эмбриона, 2 группу – 40 анеуплоидных эмбрионов. Группа эуплоидных эмбрионов была распределена на 2 подгруппы: 1a-подгруппу

составили 27 эмбрионов, перенос которых привел к беременности, 1b-подгруппу – 26 эмбрионов, перенос которых не привел к беременности. Под руководством А.В. Тимофеевой в лаборатории прикладной транскриптомики отдела системной биологии в репродукции ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России был проведен анализ профиля экспрессии мнкРНК в культуральной среде эмбрионов в зависимости от ploидности бластоцист и исходов криоциклов.

Критериями включения в исследование послужили:

1. Супружеские пары с бесплодием различного генеза, обратившиеся для проведения программы ЭКО/ICSI+ПГТ-А.
2. Наличие одного из показаний для ПГТ-А:
 - старший репродуктивный возраст женщины (≥ 35 лет);
 - привычное невынашивание беременности (≥ 2 -х самопроизвольных прерываний беременности до 22 недель);
 - повторные неудачные попытки имплантации (≥ 3 -х неудачных попыток переноса эмбриона);
 - тяжелые нарушения сперматогенеза (конц. ≤ 5 млн/мл, $a+b \leq 19\%$, пат. ф. $\geq 99\%$).
3. Нормальный кариотип супружеской пары.
4. Информированное согласие на участие в исследовании.

Критериями невключения послужили все состояния, являющиеся противопоказаниями к проведению ВРТ и беременности, в соответствии с Приказом МЗ РФ от 31 июля 2020 г. № 803н "О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению».

Овариальную стимуляцию проводили в протоколе с антагонистом гонадотропин-рилизинг гормона (ант-ГнРГ) с использованием препаратов рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона (р-ФСГ) и/или менотропина. Выбор препарата и стартовой дозы гонадотропинов определяли в зависимости от параметров овариального резерва. Коррекцию дозы

гонадотропинов, начало введения анТГнРГ, триггера овуляции и длительность стимуляции проводили на основании индивидуального ответа яичников. Перенос эмбриона в рамках криоцикла проводили на фоне циклической гормональной терапии с использованием эстрадиола валерата и микронизированного прогестерона или в естественном цикле под контролем УЗИ-мониторинга. Перенос эмбриона, размороженного после криоконсервации, проводили при достижении эндометрием удовлетворительной структуры и толщины > 8 мм.

ПГТ-А эмбрионов проводили методом NGS с использованием наборов ReproSeq (Thermo Fisher Scientific, США). Забор сред культивирования для анализа профиля мнкРНК проводился на 5-6-е сутки эмбрионального развития. Выделение РНК из собранных образцов культуральных сред эмбрионов осуществлялось колоночным способом с использованием набора «miRNeasy Serum/Plasma Kit» (Qiagen). Идентификация всех имеющихся пивиРНК в образцах культуральных сред эмбрионов проводилась методом глубокого секвенирования, валидация данных секвенирования – методом количественной ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией.

Статистическая обработка данных выполнена с использованием скриптов, написанных на языке R, и программы RStudio. Статистический анализ количественных признаков проводили с помощью теста Манна-Уитни при парном сравнении в случае, когда распределение не соответствовало закону нормального распределения. Сравнение качественных признаков проводили с помощью критерия χ^2 Пирсона. Величину порогового уровня значимости p принимали равной 0,05. Модели логистической регрессии разрабатывали с использованием программы RStudio путем поэтапного включения и исключения мнкРНК-предикторов качества эмбриона в соответствии с их вкладом в модель. Прогностическую способность модели оценивали методом ROC анализа (Receiver operating characteristic) по величине AUC (Area Under Curve), статистической значимости, уровню специфичности и чувствительности.

Результаты собственных исследований и их обсуждение

По результатам сравнительного анализа клинико-анамнестических данных супружеских пар на ретроспективном этапе исследования все подгруппы с ПГТ-А и соответствующие им подгруппы без ПГТ-А были сопоставимы по возрасту женщины, длительности, типу, факторам бесплодия, количеству самопроизвольных прерываний беременности и неудачных попыток имплантации в анамнезе.

Медиана возраста в группе женщин старшего репродуктивного возраста составила 41 [40; 43] год, в группе с привычным невынашиванием беременности – 32 [30; 34] года, в группе с повторными неудачными попытками имплантации – 31 [29,75; 33] год, в группе тяжелой патозооспермии – 31 [30; 33] год.

Длительность бесплодия у женщин старшего репродуктивного значительно превышала показатели остальных групп и составила 8 [5; 13] лет, тогда как у пациенток с привычным невынашиванием беременности – 1 [1; 2] год, у женщин с повторными неудачными попытками имплантации – 3 [2; 4,25] года, у супружеских пар с тяжелой патозооспермией – 4 [2; 6] года. При анализе причин бесплодия у женщин старшей возрастной группы в половине случаев диагностировалось бесплодие неясного генеза (53,94%). У пациенток с привычным невынашиванием беременности наиболее частой причиной бесплодия установлен трубно-перитонеальный фактор (40,80%). У женщин с повторными неудачными попытками имплантации различные факторы бесплодия представлены примерно в равной степени, однако трубно-перитонеальный фактор диагностировался несколько чаще (32,14%). У супружеских пар с тяжелой патозооспермией в большинстве случаев была диагностирована олигоастенотератозооспермия (92,07%), в остальных случаях олиготератозооспермия (7,93%).

Анализ параметров овариальной стимуляции показал, что стартовые и суммарные дозы гонадотропинов были сопоставимы между подгруппами с

ПГТ-А и соответствующими подгруппами без ПГТ-А. Однако у женщин старшего репродуктивного возраста средние значения стартовых и суммарных доз гонадотропинов значительно превышали показатели остальных групп и составили: 300 [225; 325] МЕ и 2645 [1500; 3150] МЕ, соответственно; тогда как, у женщин с привычным невынашиванием беременности стартовая и суммарная дозы гонадотропинов составили 150 [150; 225] МЕ и 1500 [1425; 2250] МЕ, соответственно; у пациенток с повторными неудачными попытками имплантации – 225 [225; 300] МЕ и 1650 [1425; 2400] МЕ, у супружеских пар с тяжелой патозооспермией – 150 [150; 300] МЕ и 1275 [1050; 1800] МЕ. Полученные результаты являются закономерными, учитывая снижение овариального резерва по мере увеличения возраста женщин. По результатам анализа эмбриологического этапа также не было выявлено статистически значимых различий между подгруппами с ПГТ-А и соответствующими подгруппами без ПГТ-А в количестве ОКК, зрелых ооцитов, зигот, бластоцист и бластоцист хорошего и отличного качества. Однако у женщин старшего репродуктивного возраста вышеперечисленные показатели были значительно ниже по сравнению с показателями остальных групп, что также объясняется более низким овариальным резервом у женщин старшей возрастной группы.

По результатам ПГТ-А у женщин старшего репродуктивного возраста из 205 эмбрионов хорошего и отличного качества 25,37% были эуплоидными, 71,22% – анеуплоидными, 3,41% – мозаичными (Рис.1). При этом 33,56% эмбрионов включали хромосомные аномалии по 1-й хромосоме, 26,71% – по 2-м хромосомам, 39,73% – по 3-м хромосомам и более.

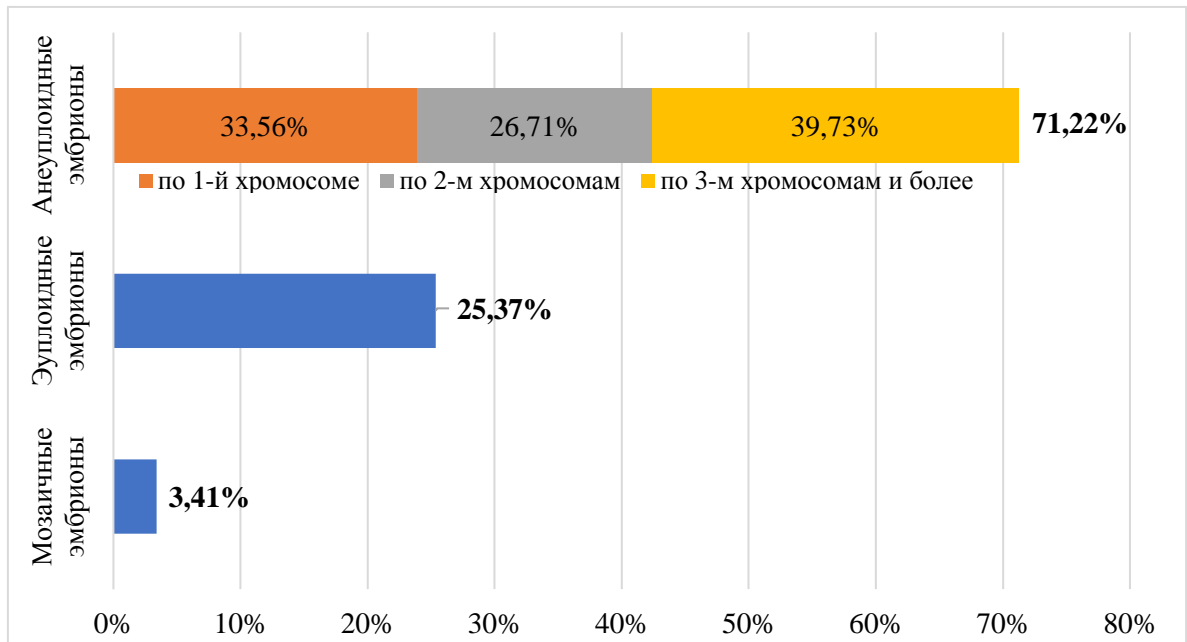


Рис 1. Результаты ПГТ-А у женщин старшего репродуктивного возраста

У женщин с привычным невынашиванием беременности из 341 эмбриона хорошего и отличного качества 48,09% были эуплоидными, 49,27% – анеуплоидными, 2,64% – мозаичными (Рис.2). По результатам ПГТ-А 51,79% включали хромосомные аномалии по 1-й хромосоме, 18,45% – по 2-м хромосомам, 29,76% – по 3-м хромосомам и более.

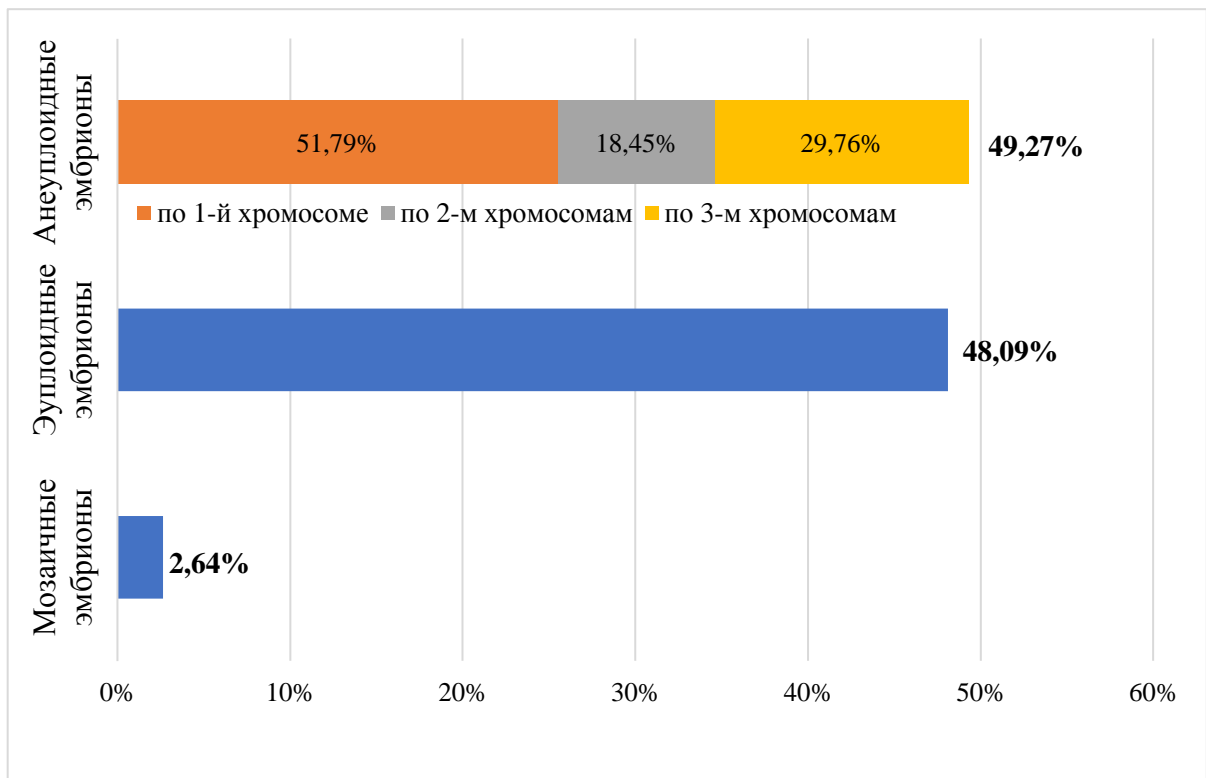


Рис. 2. Результаты ПГТ-А у супружеских пар с привычным невынашиванием

У женщин с повторными неудачными попытками имплантации из 276 эмбрионов хорошего и отличного качества 51,45% были эуплоидными, 42,39% – анеуплоидными, 6,16% – мозаичными (Рис. 3). Анеуплоидные эмбрионы с хромосомными аномалиями по 1-й хромосоме составили 58,12%, по 2-м хромосомам – 17,95%, по 3-м хромосомам и более – 23,92%.

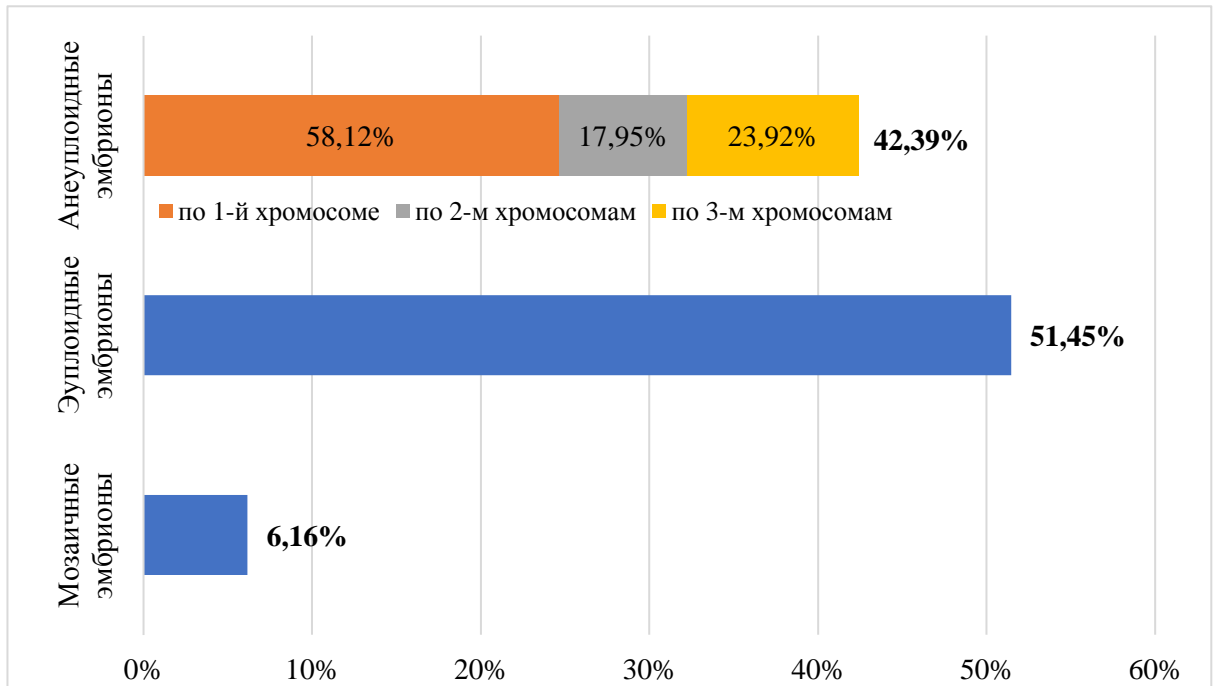


Рис. 3. Результаты ПГТ-А у супружеских пар с повторными неудачными попытками имплантации

У супружеских пар с тяжелой патозооспермией из 286 эмбрионов хорошего и отличного качества 52,10% были эуплоидными, 43,71% анеуплоидными, 4,20% – мозаичными (Рис. 4). При этом 61,60% анеуплоидных эмбрионов включали хромосомные аномалии по 1-й хромосоме, 21,60% – по 2-м хромосомам, 16,80% – по 3-м хромосомам и более.

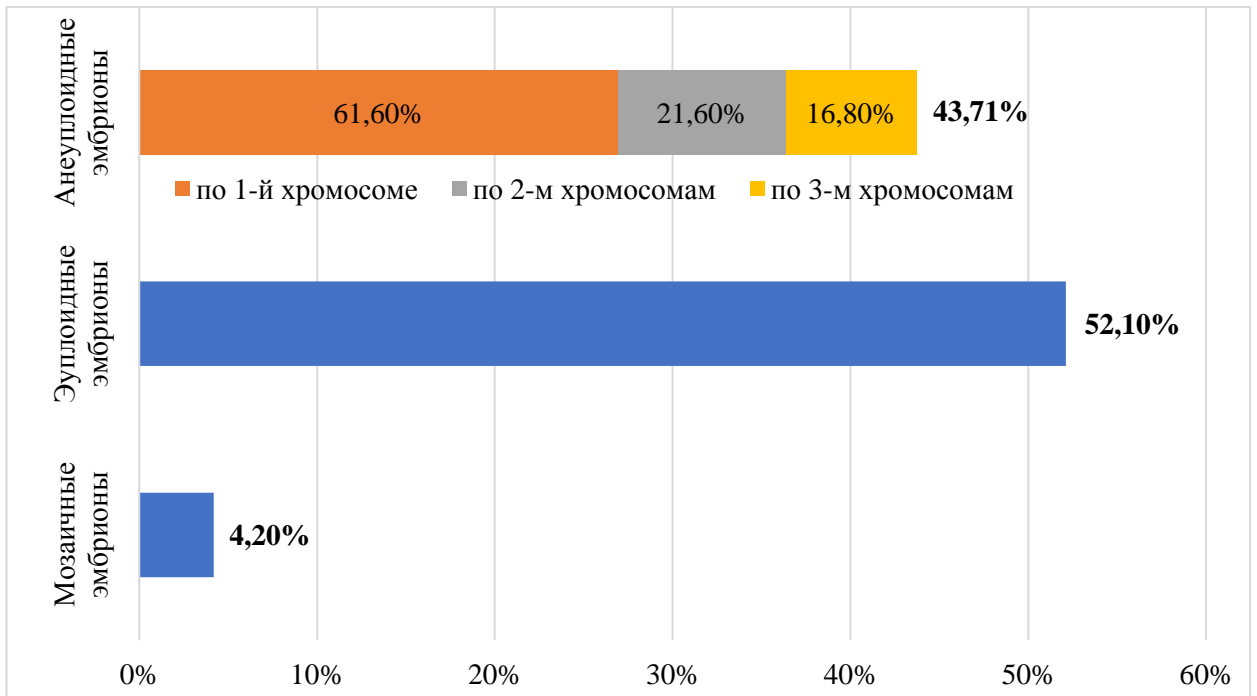


Рис. 4. Результаты ПГТ-А у супружеских пар с тяжелой патозооспермией

Процент анеуплоидных эмбрионов во всех группах был высоким, но у женщин старшего репродуктивного возраста – максимальным. Кроме того, в группе старшего репродуктивного возраста большая часть анеуплоидных эмбрионов включала множественные аномалии по 3-м и более хромосомам, тогда как в остальных группах пациентов большинство анеуплоидных эмбрионов характеризовалось наличием аномалий по 1 хромосоме, что может свидетельствовать о более значимых нарушениях мейотического деления клеток по мере увеличения возраста женщины.

Анализ исходов криоциклов у женщин старшего репродуктивного возраста показал, что частота клинической беременности была статистически значимо выше в подгруппе с ПГТ-А по сравнению с подгруппой без ПГТ-А (36,5% и 11,5%, соответственно, $p = 0,002$), частота ранних репродуктивных потерь не имела статистически значимых различий между подгруппами (15,8% и 14,3%, соответственно, $p = 0,962$), при этом частота живорождения хоть и имела тенденцию к увеличению в подгруппе с ПГТ-А, но различия были статистически незначимы (84,2% и 71,4%, соответственно, $p = 0,472$) (Табл. 1). Полученные данные сопоставимы с результатами других исследований, в которых также демонстрируется увеличение частоты клинической

беременности у женщин старшего репродуктивного возраста при использовании ПГТ-А (Sacchi, L et al., 2019, M. Siemann et al., 2022, Pantou A. et al., 2022).

Таблица 1. **Исходы криоциклов у женщин старшего репродуктивного возраста**

Исследуемые параметры	Ia подгруппа (n=52)	Ib подгруппа (n=61)	ОР (95% ДИ)	p
Биохимическая беременность	0	1 (1,6%)	0,39 (0,02; 6,94)	0,356
Клиническая беременность	19 (36,5%)	7 (11,5%)	3,18 (1,45; 6,97)	0,002
Ранние репродуктивные потери*	3 (15,8%)	1 (14,3%)	1,11 (0,14; 8,94)	0,926
Живорождение*	16 (84,2%)	5 (71,4%)	1,18 (0,71; 1,96)	0,472

Примечание. *процент указан в расчете на число клинических беременностей.

У женщин с привычным невынашиванием беременности не было выявлено статистически значимых различий в частоте клинической беременности между подгруппами с ПГТ-А и без ПГТ-А (31,1% и 28,6%, соответственно, $p = 0,602$), однако частота ранних репродуктивных потерь в подгруппе с ПГТ-А была статистически значимо ниже, чем в подгруппе сравнения (17,9% и 45,8%, соответственно, $p = 0,031$), тогда как частота живорождения – значимо выше (82,1% и 50,0%, соответственно, $p = 0,015$) (Табл. 2). Данные о снижении частоты ранних репродуктивных потерь и повышении частоты живорождения при использовании ПГТ-А также были получены в исследованиях Коротченко О.Е. и соавт., 2018, Pantou A. et al., 2022, Liang Z, 2023.

Таблица 2. Исходы криоциклов у пациенток с привычным невынашиванием беременности

Исследуемые параметры	IIa подгруппа (n=90)	IIb подгруппа (n=84)	ОР (95% ДИ)	p
Биохимическая беременность	2 (2,2%)	1 (1,2%)	1,87 (0,17; 20,21)	0,602
Клиническая беременность	28 (31,1%)	24 (28,6%)	1,09 (0,69; 1,72)	0,715
Ранние репродуктивные потери*	5 (17,9%)	11 (45,8%)	0,39 (0,16; 0,96)	0,031
Живорождение*	23 (82,1%)	12 (50,0%)	1,64 (1,06; 2,54)	0,015

Примечание. *процент указан в расчете на число клинических беременностей.

У пациенток с повторными неудачными попытками имплантации частота клинической беременности была статистически значимо выше в подгруппе с ПГТ-А по сравнению с подгруппой без ПГТ-А (33,0% и 16,7%, соответственно, $p = 0,007$), однако частота ранних репродуктивных потерь (6,9% и 10,5%, соответственно, $p = 0,660$) и живорождения (93,1% и 89,5%, соответственно, $p = 0,660$) не различались между подгруппами (Табл. 3). Повышение частоты клинической беременности при использовании ПГТ-А у женщин с повторными неудачными попытками имплантации также отмечено в исследованиях Sato T. et al., 2020, Tong J. et. al., 2021, Pantou A. et al., 2022.

Таблица 3. Исходы криоциклов у пациенток с повторными неудачными попытками имплантации

Исследуемые параметры	IIIa подгруппа (n=88)	IIIb подгруппа (n=114)	ОР (95% ДИ)	p
Биохимическая беременность	0	4 (3,5%)	0,14 (0,01; 2,32)	0,077
Клиническая беременность	29 (33,0%)	19 (16,7%)	1,98 (1,19; 3,28)	0,007
Ранние репродуктивные потери*	2 (6,9%)	2 (10,5%)	0,66 (0,10; 4,26)	0,660

Живорождение*	27 (93,1%)	17 (89,5%)	1,04 (0,87; 1,25)	0,660
---------------	------------	------------	----------------------	-------

Примечание. *процент указан в расчете на число клинических беременностей.

У супружеских пар с тяжелой патозооспермией не было выявлено статистически значимых различий между подгруппами с ПГТ-А и без ПГТ-А в частоте клинической беременности (37,97% и 36,73%, соответственно, $p = 0,866$), в частоте ранних репродуктивных потерь (10,0% и 13,9%, соответственно, $p = 0,630$) и в частоте живорождения (90,0% и 83,3%, соответственно, $p = 0,432$) (Табл. 4). Полученные данные согласуются с результатами других исследований (R.Mazzilli et al., 2017, Xu R. et al., 2021, Mehmet R.A. et al., 2022).

Таблица 4. Исходы криоциклов у супружеских пар с тяжелой патозооспермией

Исследуемые параметры	IVa подгруппа (n=79)	IVb подгруппа (n=98)	ОР (95% ДИ)	p
Биохимическая беременность	2 (2,5%)	0	6,19 (0,37; 103,16)	0,114
Клиническая беременность	30 (37,97%)	36 (36,73%)	1,03 (0,71; 1,52)	0,866
Ранние репродуктивные потери*	3 (10,0%)	5 (13,9%)	0,72 (0,19; 2,77)	0,630
Живорождение*	27 (90,0%)	30 (83,3%)	1,08 (0,89; 1,30)	0,432

Примечание. *процент указан в расчете на число клинических беременностей.

Таким образом, применение ПГТ-А увеличивает вероятность клинической беременности у женщин старшего репродуктивного возраста в 3 раза (ОР = 3,18, 95% ДИ 1,45 – 6,97), у пациенток с повторными неудачными попытками имплантации – в 2 раза (ОР = 1,98, 95% ДИ 1,19 – 3,28). У женщин с привычным невынашиванием беременности ПГТ-А не влияет на частоту

клинической беременности, но снижает риск ранних репродуктивных потерь в 2,5 раза ($OR = 0,39$, 95% ДИ 0,16 – 0,96) и повышает вероятность живорождения в 1,5 раза ($OR = 1,64$, 95% ДИ 1,06 – 2,54). У супружеских пар с тяжелой патозооспермией применение ПГТ-А не оказывает положительного влияния на исходы программ ВРТ.

На проспективном этапе исследования по результатам ПГТ-А и исходов криоциклов было отобрано 93 образца культуральных сред эмбрионов, полученных от 73 супружеских пар. Данные образцы были распределены на две группы: I группа включала 53 эуплоидных эмбриона, II группа – 40 анеуплоидных эмбрионов. Группа эуплоидных эмбрионов была разделена на две подгруппы: Ia-подгруппу составили 27 эмбрионов, перенос которых привел к наступлению беременности, Ib-подгруппу – 26 эмбрионов, перенос которых не привел к беременности. Оценка клинико-лабораторных данных 73-х супружеских пар в исследуемых группах не выявила статистически значимых различий в возрасте, длительности, типе бесплодия, а также количестве ранних репродуктивных потерь и неудачных попыток имплантации в анамнезе. Исследуемые группы были сопоставимы по показателям менструального цикла, овариального резерва и гинекологического анамнеза.

По результатам глубокого секвенирования образцов культуральных сред эмбрионов было идентифицировано 133 вида пивиРНК с числами прочтения не менее 10. В программе RStudio путем поэтапного включения и исключения каждой идентифицированной молекулы пивиРНК были найдены оптимальные комбинации РНК-маркеров анеуплоидного эмбриона в соответствии с их вкладом в построение моделей логистической регрессии (Рис. 5), где в качестве зависимой переменной (переменной отклика) выступала плоидность эмбриона (0 – эуплоидный эмбрион, перенос которого привел к беременности и родам; 1 – анеуплоидный эмбрион). Все модели, построенные по содержанию пивиРНК в среде культивирования бластоцисты, были статистически значимы ($p < 0,001$) и обладали высокой

чувствительностью (83 – 100%) и специфичностью (78 – 100%), а значит высокой диагностической ценностью.

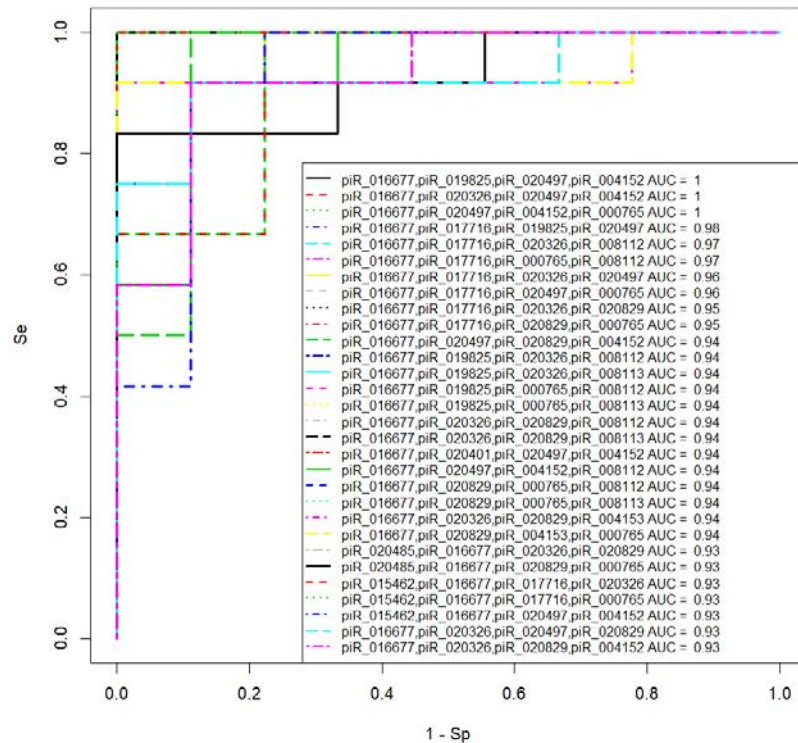


Рис. 5. Модели логистической регрессии выявления анеуплоидий в клетках эмбриона по данным глубокого секвенирования пивиРНК в среде культивирования бластоцисты при сопоставлении группы II с группой Ia. Se – чувствительность, Sp – специфичность.

Данные секвенирования были валидированы методом количественной ПЦР в реальном времени. Были построены модели логистической регрессии при сопоставлении группы эуплоидных эмбрионов, перенос которых привел к беременности и группы анеуплоидных эмбрионов. На рисунке 6А представлены все возможные комбинации пивиРНК, участвующие в идентификации эуплоидного эмбриона, из которых были отобраны модели, представленные на Рисунке 6Б, где все независимые переменные были статистически значимы. Специфичность данных моделей варьировала в пределах 81 – 85%, что говорит об их высокой диагностической ценности.

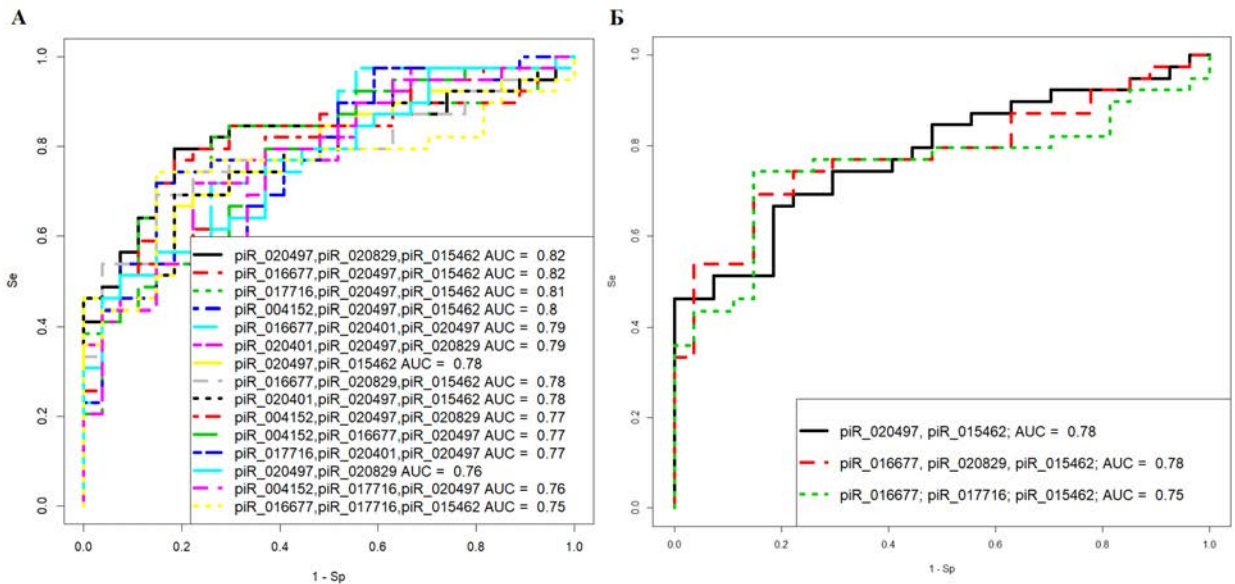


Рис. 6. Модели логистической регрессии по уровню экспрессии пивиРНК для определения ploидности бластоцисты. Se – чувствительность, Sp – специфичность.

Формула модели, обладающей наибольшей диагностической значимостью, специфичность которой составила 85%:

$$\frac{1}{1 + e^{5.78 - 1.85 \cdot x_1 + 1.38 \cdot x_2 - 0.38 \cdot x_3}}$$

где x_1 – значение «- $\Delta\Delta Ct$ » для piR_016677, x_2 – значение «- $\Delta\Delta Ct$ » для piR_017716, x_3 – значение «- $\Delta\Delta Ct$ » для piR_015462.

Поскольку не всегда эуплоидный эмбрион обладает высоким имплантационным потенциалом, на следующем этапе были построены модели логистической регрессии при сопоставлении группы Ia с объединенными группами «Ib + II». На рисунке 7А представлены все возможные комбинации пивиРНК, участвующие в выявлении эуплоидной бластоцисты с высоким имплантационным потенциалом. Далее были отобраны модели,

представленные на Рисунке 7Б, у которых все независимые переменные были статистически значимы.

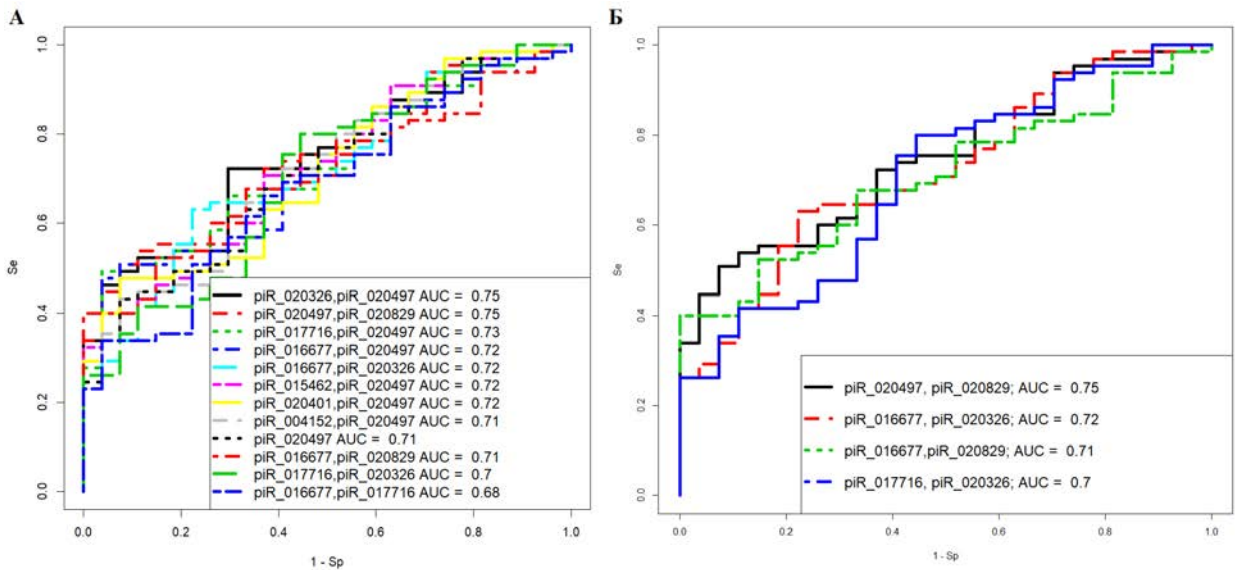


Рис. 7. Модели логистической регрессии по уровню экспрессии пивиРНК для определения имплантационного потенциала эуплоидной бластоцисты. Se – чувствительность, Sp – специфичность.

Формула модели, обладающей наибольшей диагностической ценностью, специфичность которой составила 100%:

$$\frac{1}{1 + e^{5.32 - 0.93 \cdot x_1 + 0.62 \cdot x_2}}$$

где x_1 – значение «-ΔΔCt» для piR_016677, x_2 – значение «-ΔΔCt» для piR_020829;

В ходе настоящего исследования проведен анализ частоты и структуры анеуплоидий в различных группах пациентов. Доказана целесообразность проведения ПГТ-А у женщин старшего репродуктивного возраста, пациенток с привычным невынашиванием беременности и повторными неудачными попытками имплантации, тогда как у супружеских пар с тяжелой патозооспермией показано отсутствие положительного влияния ПГТ-А на исходы программ ВРТ. Предложен неинвазивный метод оценки качества эмбрионов по уровню экспрессии пивиРНК в среде культивирования, позволяющий с высокой чувствительностью и специфичностью (93 – 100%) идентифицировать эуплоидные бластоцисты с высоким имплантационным

потенциалом. По результатам проведенного исследования разработан алгоритм выбора эуплоидного эмбриона с оптимальным имплантационным потенциалом на основании интегральной оценки результатов ПГТ-А и профиля экспрессии мнкРНК в культуральной среде эмбрионов.

ВЫВОДЫ

1. Частота образования анеуплоидных эмбрионов у женщин старшего репродуктивного возраста составила 71,22%, у пациенток с привычным невынашиванием беременности – 49,27%, у женщин повторными неудачными попытками имплантации – 42,39%, у супружеских пар с тяжелой патозооспермией – 43,71%.
2. В структуре хромосомной патологии у женщин старшего репродуктивного возраста преобладали множественные анеуплоидии по 3-м и более хромосомам (39,73%), тогда как у супружеских пар с привычным невынашиванием беременности (51,79%), повторными неудачными попытками имплантации (58,12%) и тяжелой патозооспермией (61,60%) преобладали анеуплоидии только по одной хромосоме.
3. У женщин старшего репродуктивного возраста частота клинической беременности при использовании ПГТ-А была в 3 раза выше по сравнению с подгруппой без ПГТ-А (36,5% и 11,5%, соответственно) (ОР = 3,18, 95% ДИ 1,45 – 6,97; $p = 0,002$), тогда как частота ранних репродуктивных потерь и живорождения не имели статистически значимых различий между подгруппами.
4. У женщин с привычным невынашиванием беременности частота ранних репродуктивных потерь при использовании ПГТ-А была в 2,5 раза ниже по сравнению с подгруппой без ПГТ-А (17,9% и 45,8%, соответственно) (ОР = 0,39, 95% ДИ 0,16 – 0,96; $p = 0,031$). Частота живорождения при использовании ПГТ-А была в 1,5 раза выше таковой в подгруппе сравнения (82,1% и 50,0%, соответственно) (ОР = 1,64, 95% ДИ 1,06 – 2,54,

$p = 0,015$), тогда как частота клинической беременности не имела статистически значимых различий между подгруппами.

5. У женщин с повторными неудачными попытками имплантации частота клинической беременности при использовании ПГТ-А была в 2 раза выше по сравнению с подгруппой без ПГТ-А (33,0% и 16,7%, соответственно) (OR = 1,98, 95% ДИ 1,19 – 3,28; $p = 0,007$), тогда как частота ранних репродуктивных потерь и живорождения не имели статистически значимых различий между подгруппами.
6. У супружеских пар с тяжелой патозооспермией не было выявлено статистически значимых различий между подгруппами с ПГТ-А и без ПГТ-А в частоте клинической беременности (OR = 1,03, 95% ДИ 0,71 – 1,52, $p = 0,866$), ранних репродуктивных потерь (OR = 0,72, 95% ДИ 0,19 – 2,77, $p = 0,630$) и живорождения (OR = 1,08, 95% ДИ 0,89 – 1,30, $p = 0,432$).
7. Оценка профиля экспрессии пивирНК (piR_020497, piR_015462, piR_016677, piR_020829, piR_017716) в определенных комбинациях в средах культивирования бластоцист позволяет статистически значимо с высокой специфичностью (81 - 85%) дифференцировать эмбрионы в зависимости от ploидности.
8. Оценка профиля экспрессии пивирНК (piR_020497, piR_020829, piR_016677, piR_020326, piR_017716) в определенных комбинациях в средах культивирования бластоцист позволяет статистически значимо с высокой специфичностью (93 – 100%) определять имплантационный потенциал эуплоидных эмбрионов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Применение ПГТ-А в программах ВРТ рекомендуется женщинам старшего репродуктивного возраста, пациенткам с привычным невынашиванием беременности, а также с повторными неудачными попытками имплантации.

2. В качестве вспомогательного метода оценки ploидности эмбрионов рекомендуется проводить анализ профиля экспрессии пивирНК (piR_020497, piR_015462, piR_016677, piR_020829, piR_017716) в культуральных средах бластоцист. Плоидность бластоцисты определяется по формуле, полученной на основании модели логистической регрессии, обладающей специфичностью – 85%:

$$\frac{1}{1 + e^{5.78 - 1.85*x_1 + 1.38*x_2 - 0.38*x_3}}$$

где x_1 – значение «-ΔΔCt» для piR_016677, x_2 – значение «-ΔΔCt» для piR_017716, x_3 – значение «-ΔΔCt» для piR_015462

При получении значения $> 0,74$ исследуемый эмбрион – анеуплоидный.

3. Для прогнозирования имплантационного потенциала эуплоидных эмбрионов в программах ЭКО/ICSI+ПГТ-А рекомендуется проводить анализ профиля экспрессии пивирНК (piR_020497, piR_020829, piR_016677, piR_020326, piR_017716) в культуральных средах эмбрионов на 5-е сутки после оплодотворения. Имплантационный потенциал эуплоидной бластоцисты определяется по формуле, полученной на основании модели логистической регрессии, обладающей специфичностью – 100%:

$$\frac{1}{1 + e^{5.32 - 0.93*x_1 + 0.62*x_2}}$$

где x_1 – значение «-ΔΔCt» для piR_016677, x_2 – значение «-ΔΔCt» для piR_020829

При получении значения $< 0,8$ исследуемый эмбрион является эуплоидным и обладает высоким имплантационным потенциалом.

4. При получении бластоцист, непригодных для ПГТ-А, рекомендуется проведение неинвазивного метода оценки ploидности и имплантационного потенциала эмбрионов на основании анализа профиля экспрессии пивирНК в культуральных средах бластоцист для решения вопроса о переносе.
5. При получении большого количества бластоцист, пригодных для ПГТ-А, с целью оптимизации финансово-экономических затрат супружеским парам

рекомендуется на первом этапе проведение анализа профиля экспрессии пивиРНК, на втором этапе – ПГТ-А эмбрионов, профиль пивиРНК которых указывает на эуплоидность и высокий имплантационный потенциал.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Современные методы оценки имплантационного потенциала эмбрионов в программах вспомогательных репродуктивных технологий. /Савостина Г.В., Перминова С.Г., Тимофеева А.В., Веюкова М.А.// **Доктор.Ру**. 2021 №8.
2. Преимплантационное генетическое тестирование эмбрионов на анеуплоидии: возможности проблемы и перспективы. /Савостина Г.В., Перминова С.Г., Екимов А.Н., Веюкова М.А. // **Акушерство и гинекология**, 2021 № 11.
3. Количественный анализ малых некодирующих РНК в среде культивирования эуплоидных бластоцист как вспомогательный способ отбора качественного эмбриона для переноса в полость матки в программах ВРТ. /А.В.Тимофеева, И.С.Федоров, Г.В. Савостина, А.Н.Екимов, С.Г.Перминова. // **Акушерство и гинекология**, 2023 № 11.
4. Роль преимплантационного генетического тестирования эмбрионов на анеуплоидии в исходах программ вспомогательных репродуктивных технологий у различных групп пациентов. /Перминова С.Г., Савостина Г.В., Екимов А.Н., Белова И.С. // **Акушерство и гинекология**, 2023 №3.
5. Количественный анализ малых некодирующих РНК в культуральной среде эмбрионов как вспомогательный метод оценки ploидности и имплантационного потенциала эмбрионов в программах ВРТ. /Савостина Г.В., Тимофеева А.В., Перминова С.Г. //Сборник проектов «Всероссийская научная школа «Медицина молодая», 2023.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Алгоритм выбора эуплоидного эмбриона с высоким имплантационным потенциалом на основании интегральной оценки результатов ПГТ-А и профиля экспрессии мнкРНК в культуральной среде эмбрионов

