

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
АКУШЕРСТВА, ГИНЕКОЛОГИИ И ПЕРИНАТОЛОГИИ ИМЕНИ  
АКАДЕМИКА В.И. КУЛАКОВА»

*На правах рукописи*

**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

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

**Научный руководитель:**  
**доктор медицинских наук**  
**Перминова Светлана Григорьевна**

МОСКВА – 2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
Глава 1. СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ИМПЛАНТАЦИОННОГО ПОТЕНЦИАЛА ЭМБРИОНОВ В ПРОГРАММАХ ВРТ (обзор литературы) 15	
1.1 Причины отсутствия наступления беременности и ранних репродуктивных потерь в программах ВРТ .....	18
1.1.2 Анеуплоидии эмбрионов человека: причины и механизмы образования.....	23
1.1.3 Хромосомный мозаицизм.....	25
1.2. Преимплантационное генетическое тестирование эмбрионов на анеуплоидии .....	27
1.2.1 Показания для проведения ПГТ-А.....	30
1.3 Перспективные методы оценки имплантационного потенциала эмбрионов в программах ВРТ .....	34
1.3.1. Анализ внеклеточной ДНК.....	35
1.3.2 Анализ метаболомного профиля эмбрионов.....	37
1.3.3 Анализ протеомного профиля эмбрионов .....	38
1.4 Анализ профиля экспрессии мнкРНК в качестве биомаркеров имплантационного потенциала эмбрионов .....	40
1.4.1 Образование и механизм действия мнкРНК .....	41
1.4.2 Роль мнкРНК в оогенезе.....	46
1.4.3. Роль мнкРНК в сперматогенезе .....	49
1.4.4. Роль мнкРНК в эмбриогенезе и имплантации эмбриона.....	52
Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	57
2.1 Материал исследования .....	57
2.2 Дизайн исследования .....	60
2.3 Методы исследования.....	63
2.3.1. Общеклинические методы исследования .....	63
2.3.2 Гормональное обследование .....	64
2.3.3 Ультразвуковое исследование органов малого таза .....	65
2.3.4 Спермиологическое исследование эякулята .....	65
2.3.5 Программа ЭКО с сегментацией цикла.....	65
2.3.4 Кривоцикл.....	67
2.4 Специальные методы исследования .....	68
2.4.1 Преимплантационное генетическое тестирование эмбрионов на анеуплоидии.....	68
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	71
3.1 Клинико-anamнестические данные и лабораторные параметры женщин, обратившихся для проведения программ ЭКО/ICSI+ПГТ-А и групп сравнения.....	71
3.2 Анализ параметров стимулированных циклов, гаметогенеза, раннего эмбриогенеза и исходов кривоциклов в программах.....	85

ЭКО/ICSI с ПГТ-А и без ПГТ-А .....	85
3.2.1 Анализ параметров стимулированных циклов, гаметогенеза и раннего эмбриогенеза в основных группах и группах сравнения .....	85
3.2.2 Анализ результатов ПГТ-А в подгруппах наблюдения.....	89
3.2.3 Клинические исходы криоциклов в группах с ПГТ-А и без ПГТ-А	92
3.3 Анализ профиля экспрессии мнкРНК в культуральной среде эмбрионов в зависимости от плоидности и имплантационного потенциала эмбрионов в программах ЭКО/ICSI+ПГТ-А.....	97
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	110
Глава 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	126
ВЫВОДЫ.....	128
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	129
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	133
ПРИЛОЖЕНИЕ 1 .....	171

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Без сомнений наиболее эффективным методом достижения беременности при лечении бесплодия являются вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ). Тем не менее, несмотря на колоссальное непрерывное развитие данной области медицины, частота наступления беременности в программах экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) не превышает 30-40% без тенденции к увеличению. При этом около 25% беременностей, наступивших в программах ВРТ, заканчиваются ранними репродуктивными потерями [2].

На положительный исход программ ВРТ влияет множество факторов, но ключевыми звеньями являются эмбрион хорошего качества, рецептивный эндометрий и установление «диалога» между ними [3]. Однако далеко не во всех случаях перенос эмбриона хорошего качества в структурно и функционально полноценный эндометрий приводит к наступлению беременности [4]. Значительный вклад в этиологию неудач имплантации и ранних репродуктивных потерь беременности вносят хромосомные аномалии эмбрионов. Известно, что более половины случаев ранних репродуктивных потерь беременности ассоциированы с анеуплоидными эмбрионами, а частота образования эмбрионов с хромосомными аномалиями имеет устойчивую корреляцию с возрастом женщины [5]. Так, если у женщин в возрасте 26-30 лет доля анеуплоидных эмбрионов составляет 20-27%, то в возрасте 45 лет 95,5% эмбрионов имеют хромосомные аномалии [6]. Учитывая современную тенденцию к более позднему деторождению, образование анеуплоидных эмбрионов имеет критически важное значение, а возможность выявления эмбрионов с хромосомными аномалиями на доимплантационном этапе особенно актуальна.

Используемые в клинической практике визуальные методы оценки качества эмбрионов не отражают хромосомный статус и не исключают переноса анеуплоидного эмбриона в полость матки [7]. Около 44,5%

анеуплоидных бластоцист имеет нормальное морфологическое строение [8]. Единственным, на сегодняшний день, методом оценки ploидности эмбрионов в клинической практике является преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии (ПГТ-А). Внедрение ПГТ-А позволило снизить вероятность переноса анеуплоидного эмбриона в полость матки и улучшить исходы программ ВРТ в определенных группах пациентов. Однако несмотря на полученные в целом оптимистичные результаты, влияние ПГТ-А на исходы программ ВРТ в различных группах пациентов не столь однозначно. Помимо неоспоримых преимуществ, ПГТ-А обладает и рядом недостатков, среди которых: инвазивность, высокая стоимость и трудоемкость, а также наличие ложноположительных/ложноотрицательных результатов [9]. Ложные результаты объясняются невозможностью точного определения процента мозаичных клеток в эмбрионе на основании анализа лишь нескольких клеток трофэктодермы, а также способностью бластоцисты к самокоррекции, т.е. запуску апоптоза анеуплоидных клеток. ПГТ-А также не предназначено для выявления сбалансированных хромосомных aberrаций и точечных мутаций генов, которые также могут послужить причиной неудачи имплантации, выкидыша или рождения больного ребенка. Кроме того, биопсия чувствительного к любым механическим воздействиям эмбриона может негативно сказаться на его имплантационном потенциале (ИП). Поэтому разработка дополнительных неинвазивных прогностических маркеров успешной имплантации наиболее актуальна [10].

Разработка нового неинвазивного метода ПГТ-А на основе анализа жидкостей бластоцелей и культуральных сред эмбрионов открывает новые перспективы для оценки хромосомного статуса эмбрионов. Однако объем жидкости бластоцели чрезвычайно мал, при этом концентрации внеклеточной ДНК в ней минимальна, что значительно ограничивает возможности метода. При этом исследования, в которых проводилось сравнение результатов ПГТ-А при биопсии трофэктодермы и аспирации жидкости бластоцели, демонстрируют низкий процент совпадений результатов [11].

Одним из наиболее перспективных направлений является изучение роли постраскрипционных регуляторов в эмбриогенезе и возможности использования их в качестве биомаркеров ИП эмбрионов, в частности, малых некодирующих рибонуклеиновых кислот (мнкРНК), секретируемых в культуральные среды эмбрионов в процессе эмбриогенеза. Среди мнкРНК выделяют микроРНК, пивиРНК (пивиРНК), малые интерферирующие РНК (миРНК), рибосомальные РНК, транспортные РНК, а также ядерные и малые ядрышковые РНК [12]. МнкРНК – главные регуляторы клеточного метаболизма, и любые изменения уровня их экспрессии отражаются на метаболическом статусе эмбриона, а значит на его качестве и жизнеспособности [13]. Уникальную функцию выполняет один из самых многочисленных представителей мнкРНК, а именно пивиРНК, которая заключается в поддержании стабильности генома за счет подавления активности транспозонов [14]. МикроРНК также участвуют в сайленсинге генов за счет РНК-интерференции [15].

Изучение особенностей экспрессии данных видов мнкРНК в культуральных средах эмбрионов на доимплантационном этапе в программах ВРТ представляет особый интерес [13]. На сегодняшний день выявлены статистически значимые различия в уровне экспрессии определенных внеклеточных мнкРНК в зависимости от стадии эмбрионального развития, хромосомного статуса эмбрионов, их способности к имплантации и исходов программ ВРТ [16] [17] [18] [19]. Учитывая вышеизложенное, анализ профиля мнкРНК в культуральных средах эмбрионов может быть использована в качестве вспомогательного неинвазивного метода определения плоидности и ИП бластоцисты. Комплексное исследование эмбриона на хромосомном и постраскрипционном уровнях позволит оптимизировать селективный выбор эмбриона с оптимальным ИП и улучшить исходы программ ВРТ с ПГТ-А.

### Степень разработанности темы исследования

В последние годы наибольшую актуальность приобретают исследования, направленные на поиск новых неинвазивных методов оценки качества эмбриона и его ИП. Благодаря стремительному развитию «омиксных» технологий стало возможным проанализировать протеомный, метаболомный и транскриптомный профили различных сред организма, в т.ч. фолликулярной и семенной жидкостей, жидкости бластоцели и культуральных сред эмбрионов, что позволяет изучить особенности функционирования биологических систем с разных сторон [20].

Несмотря на то, что большая часть исследований протеомного профиля эмбрионов в настоящее время проводится на животных, в мировой литературе опубликовано несколько исследований протеомного анализа жидкости бластоцелей и культуральных сред эмбрионов человека [21] [22] [23] [24] [25]. В исследовании Tedeschi G. и соавт. (2016) были определены возможные биомаркеры ИП эмбрионов в зависимости от возраста женщины [23]. У женщин старшего репродуктивного возраста в жидкости бластоцели была выявлена повышенная концентрация убиквитина-2, ответственного за деградацию белка и неапоптическую гибель клеток, в связи с остановкой клеточного цикла. На основании этого, предполагается, что у женщин старшего репродуктивного возраста, неудачи имплантации также могут объясняться высокой концентрацией проапоптических белков в жидкости бластоцели. В исследовании Abreu C. и коллег (2020) была выявлена корреляция между концентрацией ФНО $\alpha$  и ИЛ-8 в культуральной среде бластоцист и качеством эмбрионов [26]. Уровень провосполительных цитокинов также в целом был ниже в культуральных средах бластоцист низкого качества, однако концентрации ФНО $\alpha$  и ИЛ-8 значительно различались между собой. Высокий уровень ФНО $\alpha$  в культуральной среде, по-видимому, связан с активацией апоптоза дегенеративных клеток в эмбрионе с большим количеством неравномерно дробящихся, аномальных бластомеров. При этом в культуральных средах эмбрионов с меньшим количеством

аномально делящихся клеток, концентрация ФНО $\alpha$  была ниже, а уровень ИЛ-8 выше, что может объясняться развитием воспалительной реакции на фоне стойкого повреждения ДНК.

Несмотря на многообещающие результаты исследований, анализ протеомного профиля культуральных сред и бластоцелей эмбрионов сопряжен с некоторыми сложностями. Высокая концентрация альбумина, трансферрина, пептидов и других веществ, искусственно добавляемых в коммерческие культуральные среды, значительно затрудняет поиск потенциальных биомаркеров, которые в большинстве своем секретируются в чрезвычайно низких концентрациях, в то время, как жидкость бластоцели отличается ограниченной биодоступностью, ее объема (1-8 нл) в большинстве случаев недостаточно для проведения протеомного анализа [27].

Анализ метаболомного профиля эмбрионов позволяет изучить особенности различных биологических процессов в развивающемся эмбрионе и выявить потенциальные биомаркеры нормального эмбриогенеза. Даже незначительные нарушения в экспрессии генов или биосинтезе белков в развивающемся эмбрионе отражаются на его метаболомном профиле [28]. Однако анализ метаболомного статуса в качестве рутинного метода оценки ИП также затруднителен. Состав коммерческой культуральной среды, в т.ч. уровень кислорода в ней оказывают значительное влияние на скорость метаболомных процессов в эмбрионе, и может сильно исказить результаты метаболомного анализа. Кроме того, необходимость определения метаболитов в чрезвычайно низких концентрациях требует использования высокочувствительных аналитических инструментов, что значительно повышает трудоемкость процесса [29].

Все больше исследований направлено на изучение роли посттранскрипционных регуляторов в оо-, фолликуло- и эмбриогенезе, а также возможности применения их в качестве биомаркеров ИП [30] [31]. Из них наибольший интерес вызывают пивиРНК и микроРНК. Дифференциальная экспрессия эмбрионами внеклеточных мнкРНК в



культуральные среды позволяет глубже изучить особенности развития эмбрионов на доимплантационном этапе в программах ВРТ. В настоящее время изучается возможность использования пивиРНК и микроРНК в качестве биомаркеров имплантационного потенциала эмбрионов. Известно, что пивиРНК принимают участие в стабилизации генома посредством сайленсинга транспозонов, микроРНК также ответственны за регуляцию экспрессии генов.

В нескольких исследованиях показаны дифференциальные различия в профилях мнкРНК в фолликулярной жидкости в зависимости от зрелости ооцитов. В работе Zhang Q et al (2021) продемонстрировано отрицательное влияние miR-103a-3p или miR-10a-5p на созревание ооцитов посредством регуляции нейротрофического фактора мозга, который играет важнейшую роль в процессе созревания ооцитов [32]. В то время как ингибирование определенных мнкРНК в фолликулярной жидкости приводит к нарушению созревания ооцитов [33], [138], [34], [35], [36], [37].

Также выявлены особенности секреции мнкРНК в фолликулярной жидкости ооцитов в зависимости от фактора бесплодия [38]. В исследовании Khan H. et al (2021) выявлены статистически значимые различия в уровнях экспрессии микроРНК в фолликулярной жидкости пациенток с СПКЯ и в контрольной группе без СПКЯ [39]. У пациенток с СПКЯ и с нормальными уровнями андрогенов в крови выявлена повышенная экспрессия miR-7-5p, miR-378-3p, miR-224, miR-212-3p по сравнению с таковыми у пациенток с СПКЯ и гиперандрогенией. Схожие данные получены и в других исследованиях. [40] [41].

Профиль мнкРНК в семенной плазме также претерпевает определенные изменения в зависимости от морфофункциональных характеристик сперматозоидов [42]. В исследовании Al-Mawlah Y. et al (2022) проведен сравнительный анализ профиля экспрессии мнкРНК в экзосомах спермы у фертильных и бесплодных мужчин [43]. Выявлена статистически значимая корреляция между уровнем экспрессии определенных микроРНК и такими показателями спермограммы, как количество морфологически нормальных

сперматозоидов, подвижность сперматозоидов и концентрация спермы. Авторы предполагают, что использование miR-10a, miR-10b, miR-135a and miR-135b в качестве потенциальных биомаркеров качества спермы поможет получить дополнительную информацию о качестве спермы у субфертильных мужчин.

Любопытные результаты получены в исследовании, проведенном на мышах, где наблюдалось снижение частоты бластуляции и живорождения, если оплодотворение было достигнуто путем инъекции в ооциты сперматозоида со сниженным на 90% количеством мнкРНК, чем в контрольной группе [44]. Полученные данные указывают на наличие эпигенетического наследования по отцовской линии и возможное участие мнкРНК сперматозоидов в раннем эмбриональном развитии, хотя исследований проведенных с использованием человеческих образцов пока нет.

Выявлены различия в уровнях экспрессии внеклеточных мнкРНК клетками эмбрионов в их культуральные среды в зависимости от качества эмбриона, хромосомного статуса, ИП и исходов программ ВРТ [46] [47] [48] [45]. В работе Тимофеевой А.В. и соавт. (2020) [49] продемонстрировано наличие связи между уровнем секреции и обратного захвата определенного спектра мнкРНК в зависимости от стадии развития эмбриона и его ИП. Так повышенная экспрессия hsa\_piR\_015462, hsa\_piR\_019675, hsa\_piR\_020381 и hsa\_piR\_004880 эмбрионом на стадии морулы является отражением активации процесса материнско-зиготического перехода, который необходим для раннего эмбриогенеза, успешной имплантации и дальнейшего развития беременности. Разработана прогностическая модель, которая на основании анализа уровня экспрессии let-7b-5a, let-7i-5p, piR-016735 и piR-020381 в культуральных средах эмбрионов позволяет спрогнозировать исход программ ВРТ [46] Cuman C. и соавт. (2015) определили уровни микроРНК в среде культивирования бластоцисты и продемонстрировали, что miR-661 высоко экспрессируется в эмбрионах, не способных имплантироваться. По-видимому,

miR-661, секретлируемая бластоцистой, негативным образом влияет на адгезию клеток трофобласта, что приводит к нарушению имплантации эмбриона [229].

Несмотря на то, что ПГТ-А эмбрионов, на сегодняшний день, самый сильный прогностический метод оценки ИП, около 50% эуплоидных эмбрионов не имплантируются в полость матки. В работе Rozenbluth et al (2014) впервые обнаружена корреляция между повышенной концентрацией miR-191 в культуральной среде эмбрионов и эмбриональными анеуплоидиями [47]. Другое исследование показало, что эуплоидные бластоцисты имеют значительно более высокую экспрессию miR-141, miR-27b, miR-339-3p и miR-345 в культуральных средах эмбрионов по сравнению с анеуплоидными бластоцистами [48]. В работе Esmaeilvand M. et al (2022) изучали экспрессию микроРНК в бластоцели эмбрионов в зависимости от плоидности. Показан значительно более высокий уровень экспрессии miR-20a и miR-661 в бластоцели анеуплоидных эмбрионов [49]. В мировой литературе до настоящего времени опубликовано лишь три работы, демонстрирующие дифференциальную экспрессию внеклеточных мнкРНК в зависимости от хромосомного статуса эмбрионов человека [47] [48] [49]. Полученные многообещающие результаты исследований, направленных на анализ внеклеточных мнкРНК, свидетельствуют об актуальности и перспективности применения мнкРНК в качестве предикторов ИП эмбрионов.

### **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 их 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 ploидности 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 ploидности.

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 акушерства и гинекологии.

#### **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 (заведующая д.м.н., проф. Назаренко Т.А.) и лаборатории прикладной транскриптомики отдела системной биологии в репродукции (заведующая к.б.н. Тимофеева А.В.) ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (директор академик РАН, д.м.н., проф. Сухих Г.Т.). 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.

## **Глава 1. СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ИМПЛАНТАЦИОННОГО ПОТЕНЦИАЛА ЭМБРИОНОВ В ПРОГРАММАХ ВРТ (обзор литературы)**

На сегодняшний день самым эффективным методом достижения беременности в бесплодном браке являются вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ). Однако, несмотря на колоссальный прогресс в лечении бесплодия и непрерывное совершенствование методов ВРТ, частота имплантации не превышает 30-40%. При этом около 25%

беременностей в программах ВРТ прекращает свое развитие в I триместре [2]. Известно, что для успешной имплантации и родов живым здоровым плодом необходимо наличие как минимум трех условий: генетически здоровый эмбрион с высоким ИП, рецептивный эндометрий и синхронизация процессов эмбриогенеза и созревания эндометрия [3]. Однако перенос blastocyst хорошего или отличного качества по классификации Гарднера («модифицированная» классификация D. Gardner) в эндометрий, структурно соответствующий фазе менструального цикла, не гарантирует наступления беременности и родов [50]. И хотя состояние эндометрия безусловно имеет важнейшее значение в процессе имплантации и дальнейшего течения беременности, хромосомные аномалии эмбрионов играют решающую роль в этиологии неудач имплантации и ранних репродуктивных потерь [51]. Именно выбор эмбриона с оптимальным ИП на сегодняшний день – одна из главных нерешенных проблем в клинической практике ВРТ [52]. Распространенность хромосомных аномалий в эмбрионах человека достаточно высока и варьируется в пределах 26 – 84% в зависимости от возраста и анамнеза супружеской пары [53]. Современные рутинные неинвазивные методы оценки качества эмбрионов не позволяют достоверно определить наличие анеуплоидий [52]. Значительная часть анеуплоидных эмбрионов обладают морфологическими критериями blastocyst хорошего и отличного качества, т.е. корреляция между морфологическими характеристиками и хромосомным статусом эмбрионов очень слабая [53].

Единственный метод способный с высокой долей вероятности выявить хромосомные аномалии в эмбрионах на доимплантационном этапе – преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии (ПГТ-А). Применение ПГТ-А в программах ВРТ согласно утвержденным рекомендациям по диагностике и лечению бесплодия, утвержденным в 2019 году, показано нескольким группам пациентов:

- старший репродуктивный возраст женщины,
- привычное невынашивание беременности,



- повторные неудачные попытки имплантации,
- тяжелая патозооспермия.

Согласно данным мировой литературы использование ПГТ-А в данных группах пациентов оказывает благоприятное влияние на исходы программ ВРТ. Выявлено увеличение частоты наступления беременности у женщин старшего репродуктивного возраста и в группе пациентов с повторными неудачными попытками имплантации, отмечено снижение частоты ранних репродуктивных потерь у женщин с привычным невынашиванием беременности в анамнезе [104] [105].

Однако, в целом влияние ПГТ-А на результаты программ ВРТ не столь однозначно. Все больше исследований демонстрируют спорные данные об исходах программ ВРТ с ПГТ-А. В крупнейшем исследовании Bhatt SJ et al (2021), при сравнении исходов программ ВРТ с ПГТ-А и без ПГТ-А у женщин с привычным невынашиванием отсутствует статистически значимое снижение частоты ранних репродуктивных потерь при использовании ПГТ-А [54]. В недавнем исследовании Lin XH et al (2022) у супружеских пар с тяжелыми нарушениями сперматогенеза также продемонстрировано отсутствие положительного влияния ПГТ-А на исходы программ ВРТ: при использовании ПГТ-А не наблюдалось как повышения частоты наступления беременности, так и живорождения [55]. Около половины эуплоидных эмбрионов при переносе в эндометрий удовлетворительной структуры и толщины не имплантируются [56].

Несмотря на то, что разрешающая способность современных методов ПГТ-А, таких, как сравнительная геномная гибридизация (aCGH – array Comparative genomic hybridization), высокопроизводительное секвенирование нового поколения (NGS – next generation sequencing) достаточно высока, не исключено получение ложноположительных и ложноотрицательных результатов. На результаты исследования могут повлиять случайные ошибки полногеномной амплификации, травматизация клеток во время биопсии эмбриона, а также контаминация биопсированного материала чужеродной

ДНК [57] [58]. Однако основная причина ложноположительных/ложноотрицательных результатов, по-видимому, связана с высокой частотой мозаицизма в эмбрионах человека, а также со способностью бластоцисты к активации апоптоза анеуплоидных клеток в процессе дальнейшего эмбриогенеза [59] [58]. В связи с описанными выше ограничениями, а также высокой стоимостью и трудоемкостью данного метода, представляется актуальным поиск дополнительных неинвазивных методов оценки ИП эмбриона.

В последние годы особое внимание уделяется роли мнкРНК в раннем эмбриогенезе, имплантации эмбриона и дальнейшем течении беременности [47]. Известно, что мнкРНК контролируют процесс, известный как переход от материнского типа экспрессии генов к зиготическому (МЗП), который представляет собой активацию зиготического генома и постепенную деградацию продуктов материнского происхождения. От правильно скоординированного МЗП зависит способность эмбриона к имплантации и дальнейшее течение беременности [60]. Кроме того, мнкРНК, регулируя активность мобильных генетических элементов, участвуют в стабилизации генома эмбриона. На сегодняшний день выявлены различия в профиле экспрессии мнкРНК в зависимости от качества эмбрионов, их хромосомного статуса и исходов программ ВРТ.

Синтез эмбрионами мнкРНК непосредственно в культуральную среду без необходимости инвазивного воздействия на организм, наличие широкого спектра аппаратной и реагентной базы для анализа мнкРНК, объективность и автоматизированность делают мнкРНК-диагностику перспективным и современным методом оценки ИП эмбриона.

### **1.1 Причины отсутствия наступления беременности и ранних репродуктивных потерь в программах ВРТ**

Эффективность программ ВРТ в целом зависит от соблюдения трех условий: наличия здорового эмбриона с высоким ИП, рецептивного

эндометрия и синхронизации процессов эмбриогенеза и созревания эндометрия. Однако существует огромное множество факторов, оказывающих негативное влияние на исход программ ВРТ как со стороны женской репродуктивной системы, так и со стороны мужской: плохое качество гамет, эмбрионов, патологии матки и эндометрия. Обсуждается роль врожденных тромбофилий, антифосфолипидного синдрома, эндометриоза, синдрома поликистозных яичников (СПКЯ), иммунологических факторов, воспалительных заболеваний маточных труб, миомы матки, индекса массы тела женщины (ИМТ).

Частота привычного невынашивания в популяции составляет около 5% [61]. Невынашивание беременности может быть обусловлено генетическими, анатомическими, эндокринными, иммунологическими, инфекционными, и тромбофилическими факторами; однако более чем в половине случаев причину привычного невынашивания установить не удастся [62] [52]. Исследование кариотипов абортусов у женщин с привычным невынашиванием беременности в анамнезе показало значительное увеличение частоты анеуплоидий, по сравнению с таковой у женщин без самопроизвольного прерывания беременности в анамнезе [63]. По данным последних исследований около 67% рецидивирующих самопроизвольных выкидышей ассоциированы с хромосомными аномалиями эмбрионов [63, 52].

Особое влияние на успешное зачатие и вынашивание беременности оказывает возраст женщины.

Известно, что в последние годы тенденция к отложенному деторождению становится все более популярной. Так в 2011 году средний возраст первородящей в РФ составлял 24,9 лет, а в 2022 году – уже 28 лет. При этом с возрастом вероятность наступления беременности в программах ВРТ стремительно снижается: если до 35 лет она составляет примерно 40%, то в 37 лет – 15%, а в 43 года и вовсе стремится к нулю. В то же время частота выкидышей неуклонно растет и к 43 годам достигает 50%, а к 48 – 80%. Значительно возрастает и риск рождения детей с хромосомной патологией.

[64]. Неудачные исходы программ ВРТ в старшем репродуктивном возрасте женщины связаны не только с уменьшением овариального резерва, присоединением сопутствующей гинекологической и соматической патологии, но и с ухудшением качества ооцитов, увеличением числа хромосомных аномалий в яйцеклетках и эмбрионах [64]. У женщин до 38 лет доля анеуплоидных эмбрионов на стадии дробления составляет 67,2%, а после 38 лет – 86,3%, при этом у пациенток старше 45 лет эуплоидных эмбрионов не выявлено вовсе [65].

На основании результатов исследований с использованием донорских ооцитов выявлено, что имплантация эмбриона возможна только в период максимальной восприимчивости эндометрия – «окна имплантации» [67]. Длится оно в среднем от 4 до 5 дней и приходится на 20 – 24 день нормального менструального цикла или на 6 – 10 день после пика лютеинизирующего гормона (ЛГ) [67]. В этот отрезок времени эндометрий претерпевает генетические и фенотипические изменения, в результате которых становится возможным осуществление последовательных процессов: ориентации бластоцисты, адгезии и инвазии ее в эндометрий. В течение последних 20-ти лет проводится активный поиск маркеров для определения точного персонального «окна имплантации». На сегодняшний день выделяют морфологические и молекулярные критерии рецептивности эндометрия. Среди морфологических маркеров выделяют состояние стромы и желез эндометрия, количество и качество пиноподий. В качестве молекулярных биомаркеров изучается роль цитокинов и хемокинов, молекул клеточной адгезии, экспрессия некоторых генов, белков, а также состояние рецепторов эндометрия к половым гормонам [66]. В клинической практике применяется молекулярно-генетический метод анализа восприимчивости эндометрия, основанный на определении активности 238 генов (ERA-тест) [67]. Несмотря на большое количество публикаций на сегодняшний день не существует четкого и единого подхода к оценке рецептивности эндометрия [66].

В основе ухудшения рецептивности эндометрия лежат морфо-функциональные нарушения, которые могут быть связаны с хроническим воспалительным процессом – хроническим эндометритом (ХЭ), гиперплазией, полипами эндометрия [66] [52]. При этом вклад ХЭ в этиологию неудач имплантации до конца неясен, что объясняется отсутствием четких диагностических критериев и необходимостью подтверждения диагноза с помощью гистологического исследования биоптата эндометрия [67] [52].

Учитывая важное значение состояния эндометрия в этиопатогенезе бесплодия большое внимание уделяется созданию методов, направленных на восстановление рецептивности эндометрия [53]. Однако несмотря на многообещающие результаты, на сегодняшний день ни один из описанных методов не продемонстрировал значимого улучшения исходов программ ВРТ, что указывает на необходимость проведения дальнейших исследований.

Согласно данным мировой литературы количество и качество ооцитов имеет большее влияние на результативность ЭКО по сравнению с качеством спермы, что объясняется различиями в гаметогенезе женских и мужских половых клеток. Качество ооцитов зависит не только от ядерного и митохондриального геномов, но и от микроокружения, создаваемого преовуляторным фолликулом и яичником, которые посредством регуляции процессов транскрипции генов и трансляции белков, оказывают влияние на зрелость ооцита. При этом в клинической практике качество ооцитов определяется только на основании морфологических критериев. Дисморфизмы ооцитов могут быть связаны со старшим репродуктивным возрастом женщины, хромосомными аномалиями, заболеваниями женской репродуктивной системы (СПКЯ, эндометриоз и др.). Обсуждается роль стимуляции суперовуляции в снижении качества ооцитов. Гиперответ на стимуляцию, высокие дозы гонадотропинов, по-видимому, связаны с высокой частотой дефектов ооцитов и неудачными исходами программ ЭКО [68].

Целостность генетического материала сперматозоидов – имеет важнейшее значение для успешного оплодотворения, имплантации и

дальнейшего течения беременности. По данным мировой литературы фрагментация ДНК сперматозоидов ассоциирована с нарушениями оплодотворения, снижением частоты имплантации и увеличением частоты самопроизвольных прерываний беременности [69]. Однако влияние высокого уровня фрагментации ДНК сперматозоидов на исходы программ ВРТ противоречивы. В метаанализе Osman A. et al (2015) продемонстрировано значительное снижение частоты живорождения у супружеских пар с высоким уровнем ДНК-фрагментации [69]. По-видимому, применение интрацитоплазматической инъекции сперматозоида (ICSI) способно нивелировать негативное влияние фрагментации ДНК сперматозоидов на исходы программ ВРТ. Тем не менее не было выявлено различий между частотой имплантации в программах ЭКО и ICSI у пациентов с высоким и низким уровнем ДНК-фрагментации. [70]. Хотя стандартные показатели спермограммы: концентрация, подвижность и количество патологических форм сперматозоидов не могут быть использованы в качестве предикторов высокой ДНК-фрагментации сперматозоидов. По-видимому, существует положительная корреляция между уровнем фрагментации ДНК и показателями спермограммы. У мужчин с олигоастенотератозооспермией отмечен более высокий процент повреждения ДНК сперматозоидов. Спорные данные получены о частоте образования анеуплоидных эмбрионов при различных уровнях ДНК-фрагментации. В исследовании Киселевой Ю.Ю. и соавт. (2017) отмечается более низкий процент образования эуплоидных эмбрионов при повышенном уровне ДНК-фрагментации сперматозоидов [71]. В работе Tarozzi N.et al. (2018) отсутствует связь между показателями спермограммы и ploидностью эмбрионов. Однако отмечается повышенная частота образования мозаичных эмбрионов у супружеских пар с мужским фактором бесплодия [72].

### **1.1.2 Анеуплоидии эмбрионов человека: причины и механизмы образования.**

По результатам крупного исследования, включавшего анализ 2021 образцов абортивного материала, почти в половине случаев (49,57%) случаев были выявлены хромосомные нарушения, из них большую часть (79,65%) составили анеуплоидии одной или нескольких хромосом [73].

Механизм образования анеуплоидий (трисомий или моносомий) связан с нарушением деления хроматид или гомологичных хромосом на этапе мейотического или митотического деления клеток [74]. Условно выделяют выделяют: истинное нерасхождение хромосом, предделение и запаздывание хромосом. При истинном нерасхождении хромосом в анафазе клеточного деления сегрегация обеих гомологичных хромосом или сестринских хроматид происходит к одному полюсу. Предделение возникает в результате разрыхления центромерных участков хромосом и как следствие расхождение унивалентов к одному полюсу. Запаздывание хромосом или анафазное отставание характеризуется более медленным движением отдельных хромосом (хроматид) в анафазе клеточного деления. Как правило это связано с нарушением образования и неправильным функционированием кинетохора – участком центромеры к которому крепятся волокна веретена деления во время деления клетки. Нерасхождение хромосом (хроматид) в процессе клеточного деления приводит к образованию нуллисомных и дисомных гамет. В то время как при анафазном отставании образуются только нуллисомные клетки.

Природа оогенеза такова, что женские гаметы в большей степени подвержены хромосомным аномалиям на этапе мейотического деления клетки, чем мужские, особенно по мере увеличения возраста женщины. Считается, что ведущий механизм образования анеуплоидий у женщин старшего возраста связан с ухудшением сцепления хроматид, а также нарушения образования веретена деления, ошибки гомологичной рекомбинации и кроссинговера [75] [76] [58]. Возможно, вклад в образование

анеуплоидий также вносит длительный временной промежуток между остановкой мейотического деления в процессе внутриутробного развития и его возобновлением во время овуляции [75].

Несмотря на то, что основной вклад в возникновение анеуплоидий эмбрионов вносят ошибки расхождения хромосом в мейозе у женщин, некоторые анеуплоидии могут иметь отцовское происхождение. В целом частота хромосомных аномалий сперматозоидов увеличивается по мере увеличения тяжести мужского фактора бесплодия [77]. Правильное расположение и рекомбинация гомологичных хромосом во время первого мейотического деления в процессе сперматогенеза обеспечивается присутствием как минимум одной хиазмы в биваленте. В недавнем исследовании показано, что нарушения расхождения хромосом в мейозе I в процессе сперматогенеза связаны с уменьшением количества или полным отсутствием хиазм на бивалентах, особенно это характерно для самой маленькой в кариотипе хромосомы 21 и половых хромосом [78]. Более того, наличие унивалентов в мейозе I может вызывать преждевременную биоориентацию центромер сестринских хроматид и как следствие преждевременное расхождение сестринских хроматид [78].

Стоит подчеркнуть, что мужские и женские гаметы имеют свои уникальные эпигенетические сигнатуры, состоящие из специфического профиля метилирования, химической модификации гистонов и сложной популяции нкРНК. Недавние данные свидетельствуют о том, что эти эпигенетические факторы могут влиять на регуляцию транскрипции во время эмбриогенеза и вносить внегеномный вклад в раннее эмбриональное развитие [77] [72]. Под эпигенетической наследуемостью подразумевается митотически или мейотически наследуемые особенности функционирования генов без нарушения числа и структуры хромосом. Таким образом хромосомный статус эмбриона определяется не только гаплоидным набором женских и мужских половых гамет, но и их эпигенетическими сигнатурами [72] [77].



### 1.1.3 Хромосомный мозаицизм

Мозаичные эмбрионы содержат две или более клеточных линий, одна из которых имеет нормальный хромосомный набор, а другая (-ие) несет в себе хромосомные aberrации. Согласно данным последних исследований большинство эмбрионов человека на доимплантационном этапе в различной степени мозаичны [79] [80] [81]. Однако по мере эмбрионального развития посредством избирательной элиминации aberrантных клеток и/их вытеснения эуплоидными клетками степень мозаицизма в эмбрионах снижается. И если на ранних стадиях эмбриогенеза хромосомный мозаицизм является, по-видимому, вариантом нормального развития, то на более поздних этапах результаты исследований не столь однозначны. Истинный фетальный мозаицизм встречается лишь у 0,4% плодов, а у живорожденных составляет менее 0,2% [81].

Для эмбрионов на стадии бластоцисты отдельно для ВКМ и трофэктодермы условно выделяют три типа хромосомного мозаицизма: диплоидно-анеуплоидный, диплоидно-полиплоидный и хаотический мозаицизм. При диплоидно-анеуплоидном мозаицизме в эмбрионе присутствуют клеточные линии с нормальным хромосомным набором и с анеуплоидиями. Диплоидно-полиплоидный мозаицизм характеризуется наличием нормальной клеточной линии и клеточной линии с полиплоидией. Под хаотическим мозаицизмом подразумевают наличие множества различных хромосомных aberrаций нескольких хромосом помимо клеток с нормальным хромосомным набором. При этом сочетание данных видов мозаицизма в пределах одной бластоцисты позволяет выделить 15 потенциально возможных вариантов распределения анеуплоидных, полиплоидных, диплоидных клеток в эмбриобласте и трофэктодерме.

Хромосомный мозаицизм развивается в результате нарушения процесса деления клеток или дефектов генетического фона родителей, вызывающих хромосомную нестабильность на этапе митотических делений клеток.

Очевидно, что размеры аберрантной клеточной линии зависят от стадии возникновения хромосомных нарушений. Ошибки в митозе на этапе первых делений приводят к большому количеству анеуплоидных клеток в эмбрионе.

Однако по мере своего развития эмбрион может подвергаться самокоррекции анеуплоидий посредством ареста анеуплоидных клеток, преимущественного деления клеток с нормальным хромосомным набором и уменьшения дальнейшего деления анеуплоидных бластомеров. Так клетки имеющие трисомии могут быть скорректированы за счет «механизма анафазного отставания» [79].

В недавнем исследовании на основании построенной прогностической модели было показано, что 25,9% эмбрионов на стадии восьми клеток, потенциально, должны иметь нормальный хромосомный набор, тогда как 14,3% эмбрионов – аберрантный, а 59,8 % эмбрионов – потенциально мозаичные [82]. Согласно результатам данного исследования частота мозаичных эмбрионов резко возрастает на стадии 8-ми клеточного эмбриона. Возможно, это связано с началом работы контрольных точек клеточного цикла, в результате чего происходит полная или частичная коррекция кариотипа. При этом в мозаичных, по результатам ПГТ-А, эмбрионах доля анеуплоидных клеток в биопсийном материале не всегда отражает истинный хромосомный статус всего эмбриона [52].

Некоторые эмбрионы с уровнем мозаицизма менее 40% способны имплантироваться, о чем свидетельствуют результаты многих исследований [83] [84] [85] [86] [87]. Но в целом перенос мозаичных эмбрионов в полость матки ассоциирован с отрицательными исходами программ ВРТ [88].

Так в недавней работе Saifitdinova, A. F. et al. (2020) показано, что в различных участках трофэктодермы и клетках внутренней клеточной массы мозаичного эмбриона доля и вид мозаицизма могут различаться [89]. Согласно предварительным результатам исследования, если в бластоцисте методом ПГТ-А выявлен мозаичный набор хромосом, то вероятность эуплоидного хромосомного набора в других частях эмбриона мала. Следовательно, к

переносу мозаичных эмбрионов в полость матки также следует относиться с осторожностью и только при согласовании переноса с генетиком [52].

### **Методы оценки имплантационного потенциала эмбрионов в клинической практике программ ВРТ**

В рутинной клинической практике выбор эмбриона с оптимальным ИП проводится на основании морфологических особенностей эмбрионов. На стадии дробления оценивается количество и симметричность бластомеров, уровень фрагментации, наличие многоядерных клеток и компактизация морулы. На стадии бластоцисты оценивается степень ее экспансии и внешний вид ВКМ и трофэктодермы [90]. Однако метод морфологической оценки эмбрионов субъективен, а морфологические характеристики эмбрионов слабо коррелируют с исходами программ ВРТ [91] [92] [93].

Другой неинвазивный метод оценки качества эмбрионов включает анализ морфокинетических особенностей, оцениваемых с помощью технологии покадровой съемки «Time Lapse», который обеспечивает непрерывное наблюдение за развитием эмбрионов без необходимости извлечения их из инкубаторов для оценки под микроскопом. И несмотря на то, что технология «Time Lapse» оптимизирует выбор эмбриона с оптимальным ИП [94] [95], недавний метаанализ показал, что использование систем покадровой съемки не дает значительного улучшения исходов программ ВРТ по сравнению с традиционной оценкой качества эмбрионов [96].

### **1.2. Преимплантационное генетическое тестирование эмбрионов на анеуплоидии**

ПГТ-А является единственным на сегодняшний день методом оценки хромосомного статуса эмбрионов на доимплантационном этапе в рутинной практике ВРТ.

Разработка и дальнейшее совершенствование методов ПГТ-А позволило значительно улучшить исходы программ ВРТ в различных группах пациентов, увеличить частоту наступления беременности, снизить риск ранних репродуктивных потерь [97].

Первоначально ПГТ-А проводилось на основании метода флюоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с биопсией эмбриона на стадии морулы и включало анализ только пяти хромосом, трисомии по которым не препятствовали наступлению беременности (X, Y, 18, 13 и 21). Невозможность анализа всего кариотипа эмбриона, а также высокая частота хромосомного мозаицизма на стадии морулы значительно снижали разрешающую способность ПГТ-А. На сегодняшний день ПГТ-А методом FISH с биопсией на стадии морулы считается недостаточно эффективным. В настоящее время доказана низкая эффективность ПГТ-А при использовании FISH с биопсией эмбриона на стадии морулы [98]. Необходимость исследования всего кариотипа привела к разработке новых молекулярно-генетических методов диагностики. В настоящее время полнохромосомный анализ эмбрионов проводится благодаря разработке методов сравнительной геномной гибридизации (aCGH – array Comparative genomic hybridization), высокопроизводительного секвенирование нового поколения (NGS – next generation sequencing), микроматричного анализа с помощью однонуклеотидных полиморфизмов (SNP array - single nucleotide polymorphism) [99] [58].

Метод aCGH основан на гибридизации исследуемой и референсной ДНК на ДНК-зондах, которые представляют собой относительно короткие участки исследуемого генома [102]. В отличие от FISH метод aCGH позволяет выявить не только микроскопические хромосомные аномалии (несбалансированные хромосомные перестройки, аномальное количество хромосом), но и субмикроскопические (микроделеции, микродупликации, несбалансированные субтеломерные перестройки) в исследуемых клетках. Однако aCGH не предназначен для выявления сбалансированных хромосомных перестроек [102]. Метод aCGH обладает высокой разрешающей способностью и широко используется в рутинной клинической практике [100], [101].

Метод SNP array также позволяет провести анализ всего генома. Но его главное преимущество перед aCGH – возможность определения происхождения хромосомных нарушений – материнское или отцовское. Использование данного метода наиболее актуально у супружеских пар – носителей хромосомных транслокаций. актуальным материнское или отцовское происхождение хромосомных аномалий. Однако данная технология является более трудоемкой и дорогостоящей, поэтому реже используется в рутинной клинической практике.

Несмотря на то, что aCGH является высокоинформативным и надежным методом оценки хромосомного статуса эмбрионов, его стоимость достаточно высока. В 2010 году был разработан новый метод ПГТ-А – NGS. Высокая разрешающая способность и скорость обработки материала, возможность одновременного исследования нескольких десятков образцов, а также меньшая стоимость анализа по сравнению с aCGH определяют высокую распространенность данного метода в клинической практике [102].

В исследовании Малышевой О.В. и соавт. (2020) продемонстрировано полное соответствие результатов ПГТ-А методом aCGH и NGS [103]. В работе Munné S. et al. (2020) показана более высокая частота наступления беременности в расчете на перенос при проведении ПГТ-А методом NGS по сравнению с ПГТ-А методом aCGH, однако частота наступления беременности в расчете на цикл стимуляции была сопоставима в обеих группах. Аналогичные результаты были получены и в других исследованиях [104] [105]. Способны ли технологические особенности NGS обеспечить большую точность и чувствительность анализа, по сравнению с aCGH в настоящее время является предметом острых дискуссий [58].

Биологический материал для проведения ПГТ-А может быть представлен полярными тельцами ооцитов, бластомерами эмбриона на стадии морулы или клетками трофэктодермы бластоцисты [106]. Биопсия полярных телец хоть и имеет весомое преимущество – отсутствие инвазивного воздействия на эмбрион, в рутинной практике применяется редко. Это связано

с более низкой информативностью полученных результатов по сравнению с анализом клеток эмбриона. Так как анализ полярных телец не исключает хромосомные аномалии отцовского происхождения, а также анеуплоидии, образующиеся на этапе митотических делений клеток эмбриона [107]. Биопсия полярных телец в настоящее время используется в странах, где криоконсервация и генетическая диагностика эмбрионов имеют юридические ограничения [58].

Биопсия единичных бластомеров проводится на 3-е сутки культивирования *in vitro*, когда эмбрион в результате нескольких митотических делений достигает стадии 8 бластомеров [108] [109]. При этом известно, что биопсия двух и более клеток может отразиться на дальнейшем эмбриональном развитии [110]. В то время как анализ одного бластомера хоть и более информативен, по сравнению с исследованием полярных телец ооцита, однако и он имеет ограничение. На стадии дробления эмбриона отмечается высокая частота хромосомного мозаицизма – до 45% [108] [109]. Мозаицизм по мере развития эмбриона может подвергаться самокоррекции посредством активации апоптоза анеуплоидных клеток или прекращения их делений [111].

Наиболее оптимальным материалом для ПГТ-А являются клетки трофэктодермы. Биопсия клеток трофэктодермы проводится на 5-6 сутки культивирования при достижении эмбриона стадии бластоцисты хорошего и отличного качества по классификации Гарднера [112]. Биопсия клеток трофэктодермы позволяет исследовать большее количество материала, не затрагивая при этом клеток внутренней клеточной массы, из которых в дальнейшем будет развиваться плод, что увеличивает надежность и безопасность метода [108] [109] [110].

### **1.2.1 Показания для проведения ПГТ-А**

В последние годы частота использования ПГТ-А в программах ВРТ стремительно возрастает. Если в 2018 году доля программ ЭКО/ICSI+ПГТ-А составила 8%, то в 2019 году уже 19% [113]. Применение ПГТ-А у пациентов

с высоким риском образования анеуплоидных эмбрионов, по-видимому, должно значительно снижать частоту неудач имплантации и ранних репродуктивных потерь, однако данные мировой литературы не столь однозначны [114].

Согласно утвержденным клиническим рекомендациям по диагностике и лечению бесплодия от 2019 г. [115], проведение ПГТ-А может быть рекомендовано в следующих клинических случаях:

- старший репродуктивный возраст женщины;
- привычное невынашивание;
- повторные неудачные попытки имплантации;
- тяжелые нарушения сперматогенеза у мужчин.

Наличие сильной прямой корреляции между возрастом женщины и частотой хромосомных аномалий эмбрионов подтверждена большим количеством исследований и не вызывает сомнений [116]. Согласно данным мировой литературы применение ПГТ-А в данной группе пациентов в целом оказывает положительное влияние на исходы программ ВРТ [114].

По данным опубликованного в 2021 году мета-анализа, включавшем женщин старше 35 лет, было показано положительное влияние ПГТ-А методом aCGH и NGS с биопсией клеток трофэктодермы на результативность программ ВРТ [117]. При этом ПГТ-А методом FISH с биопсией бластомеров на 3 сутки культивирования не оказал положительного влияния на частоту имплантации и ранних репродуктивных потерь.

В других исследованиях также было продемонстрировано увеличение частоты имплантации, живорождения, снижения частоты самопроизвольных прерываний беременности и многоплодных беременностей при использовании ПГТ-А в программах ВРТ у женщин старшего репродуктивного возраста [118] [119] [120] [121] [122]. Полученные данные подтверждают, что именно образование анеуплоидных эмбрионов у пациенток старшего репродуктивного возраста играет основную роль в неудачах ВРТ. Применение ПГТ-А в данной группе пациенток может

нивелировать негативное влияние возраста на исход программы ВРТ при переносе зуплоидного эмбриона.

Частота ранних репродуктивных потерь в программах ВРТ составляет примерно 10-15% [123]. Одной из ведущих причин привычного выкидыша принято считать генетический фактор, при этом чем меньше срок гестации, тем выше вероятность хромосомной анеуплоидии эмбриона [124]. Так, по результатам молекулярного кариотипирования в 65-70% случаев спонтанного самопроизвольного прерывания беременности до 10-й недели гестации диагностируются хромосомные аномалии abortивного материала [125]. Согласно опубликованным данным проведение ПГТ-А может снизить риск спонтанного прерывания беременности в программах ВРТ [114].

В исследовании Bhatt S. et al. (2021) были проанализированы исходы программ ВРТ у женщин с идиопатическим привычным выкидышем разных возрастных групп. При использовании ПГТ-А не было выявлено уменьшения частоты самопроизвольных прерываний беременности, тем не менее показано увеличение частоты наступления имплантации и живорождения у женщин всех возрастных групп, включая женщин младше 35 лет [126]. Полученные данные противоречат результатам другого рандомизированного клинического исследования (РКИ), в котором частота имплантации у женщин с идиопатическим привычным выкидышем была выше после ПГТ-А только в возрасте от 35 до 40 лет [127]. Вместе с этим ни в одной из возрастных групп после ПГТ-А не было продемонстрировано снижения частоты ранних репродуктивных потерь и увеличения частоты живорождения. По мнению авторов на результат исследования повлиял ретроспективный характер анализа данных, недостаточное обследование пар, наличие других, не связанных с анеуплоидиями эмбрионов, причин невынашивания.

Несмотря на значительный прогресс в области ВРТ, около 60% женщин не способны забеременеть после первой программы экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), а 20% пациенток – после третьей программы ЭКО [128]. Повторные неудачные попытки имплантации диагностируются



примерно у каждой третьей женщины, использующей методы ВРТ для лечения бесплодия, их причины могут быть ассоциированы с эмбриональным, маточным, ооцитарным, иммунологическими факторами, тромбофилическими состояниями, генетическими нарушениями у родителей, а также с тяжелой патозооспермией партнера [129], [130]. Считается, что роль эмбриона в повторных неудачных попытках имплантации составляет около 30-50%. Весомый вклад, по-видимому, вносят хромосомные аномалии эмбриона [131]. Существуют данные, свидетельствующие о двукратном увеличении частоты образования анеуплоидных эмбрионов с вовлечением 13,16,18,21,22, X или Y хромосомы у женщин с повторными неудачными попытками имплантации в анамнезе по сравнению с группой контроля [132].

У женщин с повторными неудачными попытками имплантации по результатам исследования Sato et al. (2019) было выявлено увеличение частоты клинической беременности при использовании ПГТ-А [133]. Однако в частоте живорождения и самопроизвольных прерываний статистически значимых различий выявлено не было. Схожие данные получены и в других работах [134] [135]. По результатам исследования Amelia Pantou et al. (2022) у пациенток с повторными неудачами имплантации было показано увеличение частоты и клинической беременности, и живорождения [136]. К настоящему времени опубликовано небольшое количество данных о влиянии ПГТ-А на исходы программ ВРТ. И несмотря на то, что все они демонстрируют положительное влияние ПГТ-А на результативность программ ВРТ необходимо проведение многоцентровых РКИ с большим количеством пациентов и более персонализированным подходом к выбору кандидатов для включения в исследование.

Целесообразность проведения ПГТ-А при тяжелых нарушениях сперматогенеза у мужчин является спорной. Известно, что у пациентов с тяжелой олигоастенотератозооспермией отмечается высокая частота хромосомных aberrаций, включая количественные и структурные аномалии кариотипа, которые могут приводить к сбоям в течении ключевых этапов

первого мейотического деления и как следствие образованию сперматозоидов и эмбрионов с несбалансированными хромосомными перестройками [137]. [138]. В исследовании Кулаковой Е.В. и соавт. была продемонстрирована положительная корреляция между уровнем анеуплоидий и тяжестью патозооспермии [112]. Также было показано, что частота эуплоидных эмбрионов снижается как у мужчин с низким содержанием морфологически нормальных сперматозоидов, так и с повышенной фрагментацией ДНК сперматозоидов [139] [140] [141] Однако несколько недавно опубликованных исследований продемонстрировало отсутствие положительного влияния ПГТ-А на исходы программ ВРТ в данной группе пациентов [142] [102].

В недавнем исследовании было продемонстрировано отсутствие положительного влияния ПГТ-А на исходы программ ВРТ: не было статистически значимых различий ни в частоте клинической беременности, ни в частоте живорождения [143]. Это может быть связано с репаративной способностью ооцитов восстанавливать кариотип до момента активации зиготического генома или с тем фактом, что анеуплоидии отцовского генеза могут приводить к остановке в эмбриональном развитии на более ранних этапах [114]. Однако необходимы дальнейшие исследования для оценки влияния ПГТ-А на результативность программ ВРТ в данной группе пациентов.

### **1.3 Перспективные методы оценки имплантационного потенциала эмбрионов в программах ВРТ**

Недавнее обнаружение внеклеточной ДНК в жидкости бластоцели и культуральной среде эмбрионов послужило поводом для создания новых вариантов ПГТ-А, основанных на анализе внеклеточной ДНК из жидкости бластоцели и культуральной среды эмбрионов. Использование данных методов позволяет снизить механическое воздействие на эмбрион, по сравнению со стандартным ПГТ-А с биопсией бластоцисты. Однако способна ли внеклеточная ДНК достоверно отражать кариотип эмбриона? По данным

различных авторов соответствие результатов бластоцентеза и биопсии клеток трофэктодермы не превышает 40% [144].

Стремительное развитие «омиксных» технологий позволило расширить и углубить знания о биологических процессах, связанных с эмбриогенезом и имплантацией эмбрионов в полость матки, исследовать функционирование гамет и эмбрионов на геномном, транскриптомном, протеомном, метаболомном и других уровнях, изучить особенности экспрессии мнкРНК и эпигенетического наследования. Благодаря полученным данным стало возможным разработать потенциальные неинвазивные биомаркеры качества эмбрионов и предикторов успешной имплантации.

### **1.3.1. Анализ внеклеточной ДНК**

#### **1.3.1.1. Внеклеточная ДНК в культуральной среде эмбрионов**

Впервые внеклеточная ДНК (вкДНК) в культуральной среде эмбрионов была обнаружена в 2013 г. [145]. Однако с тех пор стало ясно, что не вся вкДНК имеют эмбриональное происхождение [145] [146]. В 2018 году Vera-Rodriguez M. et al в своем исследовании пытались определить происхождение вкДНК, а также уровень ее «загрязнения» материнским генетическим материалом [147]. Авторы пришли к выводу, что вкДНК не имеет корреляции с плоидностью эмбриона. При этом степень «загрязнения» ее материнским генетическим материалом составляет в среднем 86 – 94%. Аналогичные данные о значительном «загрязнении» вкДНК материнским геномом продемонстрированы и в других исследованиях, на сегодняшний день оно остается одним из важнейших ограничений при анализе вкДНК в культуральной среде эмбрионов [11] [148]. Использование метода SNP позволило более подробно изучить степень контаминации вкДНК материнским генетическим материалом и показало, что процент эмбриональной ДНК в культуральной среде эмбрионов варьирует от 0% до 100%. Полученные данные указывают на то, что эмбриональный геном по всей видимости не может быть единообразно представлен во всех эмбрионах [147].

### 1.3.1.2. Внеклеточная ДНК в жидкости бластоцели

На четвертые сутки культивирования клетки эмбриона начинают дифференцироваться в клетки внутренней клеточной массы и трофэктодермы [149]. А к концу 4-х суток развития внутри бластоцисты образуется полость, заполненная жидкостью – бластоцель [150]. В 2013 году в жидкости бластоцели была впервые обнаружена вкДНК [151].

Аспирация жидкости бластоцели из бластоцисты (бластоцентез) гораздо менее трудоемкий процесс и может рассматриваться в качестве альтернативы биопсии клеток трофэктодерм [152] [153] [154]. Также получить жидкость бластоцели можно во время биопсии эмбриона для ПГТ-А или в процессе криоконсервации эмбрионов [155].

Как правило, объем жидкости бластоцели очень небольшой, около 0,01 мкл [156]. При этом концентрация вкДНК в жидкости бластоцели минимальна, тем не менее в большинстве случаев ее бывает достаточно для амплификации [157]. В исследовании Caralbo et al. (2018) показано, что лишь треть образцов жидкостей бластоцели пригодна для кариотипирования эмбрионов [11].

При этом одной из самых больших трудностей, связанных с внедрением методов неинвазивного ПГТ-А, является низкий уровень соответствия между вкДНК жидкости бластоцели и результатами ПГТ-А с биопсией клеток трофэктодермы. В работе Caralbo et al. (2018) сообщается о частоте совпадения – 37,5% [11], в то время как в работе Tšuiiko et al. выявлено 40,0% совпадений результатов аспирации жидкости бластоцели и биопсии клеток трофэктодермы [144]. Авторы объясняют это наличием вкДНК неизвестного происхождения [11]. Полученный внеклеточный генетический материал может быть результатом клеточного апоптоза, нарушением процесса сегрегации хромосом или селективной дегенерацией аномальных клеток у мозаичных эмбрионов [11] [150] [158] [159]. В одном исследовании описана корреляция между статусом ploидности эмбриона и вкДНК в жидкости

бластоцеля, где показана более высокая концентрация вкДНК у эуплоидных эмбрионов, по сравнению с таковой у анеуплоидных эмбрионов [160].

### **1.3.2 Анализ метаболомного профиля эмбрионов**

Метаболомный профиль – это количественный и качественный анализ промежуточных и конечных продуктов обмена веществ в клетках, тканях, органах, эмбрионах и организмах. Метаболическое профилирование проводится на основании методов жидкостной и газовой хроматографии, оптической спектрометрии и масс-спектрометрии, капиллярного электрофореза [161]. Любые незначительные отклонения в экспрессии генов и биосинтезе белков в процессе эмбриогенеза приводят к ощутимым изменениям метаболомного профиля, что позволяет глубже изучить особенности биологических процессов и систем [107].

В исследовании Sui-Bing Miao et al. (2022) были изучены различия в концентрации глутамина в культуральных средах эмбрионов различного качества и плоидности [162]. Глутамин – условно незаменимая аминокислота, которая в период метаболомного стресса может синтезироваться клетками самостоятельно с помощью глутаминсинтетазы или транспортироваться извне. В процессе метаболизма глутамин превращается в глутамат, а затем в альфа-кетоглутарат, который окисляется в цикле Кребса с образованием аденозинтрифосфата (АТФ), играющего ключевую роль в энергетическом обмене клеток. Глутамин также участвует в синтезе глутатиона, который обладает антиоксидантными свойствами. В период метаболомного стресса транспорт глутамина извне и его внутриклеточный синтез увеличиваются. При этом добавление глутамина в коммерческие культуральные среды благоприятно сказывается на эмбриональном развитии и ИП эмбрионов. В данной работе выявлено повышенное потребление глутамина эмбрионами низкого качества, а также анеуплоидными эмбрионами. По-видимому, повышенное потребление эмбрионами глутамина из культуральной среды является компенсаторным механизмом, развивающимся в ответ на

окислительный стресс, также это может отражать повышенную потребность в АТФ, как источнике энергии и синтезе белка в анеуплоидных клетках.

В недавно опубликованном Кокрейновском обзоре было проанализировано 4 РКИ, направленных на оценку качества эмбрионов на основании анализа их метаболомного статуса [163]. По результатам анализа не было выявлено достоверных данных, указывающих на положительное влияние данного метода на исходы программ ВРТ такие как частота живорождений, ранних репродуктивных потерь или врожденных пороков развития плода. В настоящее время не существует исследований, достоверно подтверждающих или опровергающих целесообразность применения метаболомного анализа, в качестве метода оценки ИП эмбриона.

### **1.3.3 Анализ протеомного профиля эмбрионов**

Изучение протеомного статуса стало возможным благодаря современным высокопроизводительным технологиям, способным проводить качественный и количественный анализ белков эмбрионального происхождения, а также их посттрансляционных преобразований и взаимодействий. Особенности белкового состава культуральных сред эмбрионов могут стать потенциальными биомаркерами их жизнеспособности [30]. Анализ протеомного состава может быть проведен посредством двумерного электрофореза с последующей масс-спектрометрией, комбинации одномерного электрофореза в полиакриламидном геле с обращенно-фазовой жидкостной хроматографией и масс-спектрометрией, а также многомерного хроматографического разделения белков в сочетании с масс-спектрометрической детекцией [23] [30]. Несмотря на то, что преобладающее большинство работ по анализу протеомного профиля проводится с использованием эмбрионов лабораторных животных [164] [165], наблюдается увеличение количества исследований, направленных на изучение протеомного профиля жидкости бластоцелей и культуральных сред эмбрионов человека [25] [23] [166].

В исследовании Kaihola H. и соавт. (2019) был проведен сравнительный анализ концентраций гликопротеина, богатого гистидином и каспазы-3 в культуральных средах эмбрионов в зависимости от их качества и результатов программ ВРТ [166]. Был выявлен отрицательный коэффициент корреляции между уровнем каспазы-3 и морфологическими критериями эмбрионов, а также частотой имплантации. Также продемонстрирована отрицательная корреляция между уровнем гликопротеина, богатого гистидином гликопротеина и скоростью эмбриогенеза. Несмотря на многообещающие результаты исследования, авторы указывают на необходимость дальнейших исследований, направленных на изучение возможности практического применения данных биомаркеров.

В работе Abreu C. и коллег (2020) [26] были изучены особенности концентраций ФНО $\alpha$  и ИЛ-8 в культуральной среде эмбрионов с различными морфологическими характеристиками. Уровни ФНО $\alpha$  и ИЛ-8 значительно различались среди эмбрионов с неоптимальными морфологическими характеристиками, что может свидетельствовать о различных механизмах развития аномалий раннего эмбриогенеза. Концентрация ФНО $\alpha$  была выше в среде эмбриона с большим количеством неравномерно дробящихся, дегенеративных клеток, что, возможно, указывает на механизм активации апоптоза с целью уменьшения количества аномальных бластомеров. Повышенная концентрация ИЛ-8 и сниженная концентрация ФНО $\alpha$  в среде эмбриона низкого качества, но с меньшим количеством аномально делящихся клеток, возможно связана с развитием воспалительной реакции на фоне стойкого повреждения ДНК. Однако необходимы дальнейшие исследования на более многочисленной выборке.

На сегодняшний день анализ протеомного профиля с целью оптимизации программ ВРТ не нашел своего места в рутинной клинической практике. Одним из ограничений являются высокие уровни чужеродных белков, пептидов и других веществ в коммерческих культуральных средах, что

значительно усложняет поиск и анализ белков эмбрионального происхождения, как потенциальных биомаркеров качества эмбрионов [27].

#### **1.4 Анализ профиля экспрессии мнкРНК в качестве биомаркеров имплантационного потенциала эмбрионов**

К настоящему времени было предложено большое количество потенциальных биомаркеров неинвазивной оценки ИП эмбрионов. Представлены обнадеживающие результаты исследований с применением метаболомного и протеомного профилирования культуральной среды эмбрионов, однако данные методы требуют использования высокочувствительных и достаточно трудоемких технологий, что ограничивает их применение в рутинной клинической практике [167] [168] [169].

Одним из наиболее перспективных направлений является изучение роли регуляторов экспрессии генов в эмбриогенезе и возможности использования их в качестве биомаркеров имплантационного потенциала эмбрионов [170]. К ним относится огромное количество некодирующих РНК, которые посредством транскрипционной, посттранскрипционной и эпигенетической регуляции экспрессии генов, участвуют в важнейших онтогенетических и метаболических процессах организма [171]. Профиль мнкРНК широко представлен не только в клетках организма, но и во внеклеточных жидкостях: сыворотке крови, фолликулярной жидкости, семенной плазме, культуральной среде эмбрионов, маточном аспирате и др. Основные виды мнкРНК представлены микроРНК, пиви-взаимодействующими РНК (пивиРНК), малыми интерферирующими РНК (миРНК), кольцевыми РНК [172]. Известно, что пивиРНК, микроРНК и миРНК по средством активации и блокировки различных сигнальных путей участвуют в регуляции гаметогенеза, раннего эмбрионального развития и имплантации эмбриона в полость матки [173]. Инновационные методы диагностики в том числе глубокое секвенирование и количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в реальном времени (ОТ-ПЦР) позволили более подробно изучить особенности



и выявить закономерности экспрессии мнкРНК в культуральных средах эмбрионов, фолликулярной, семенной и других средах организма [174]. В отличие от других методов в том числе полногеномного секвенирования ДНК при неинвазивном ПГТ-А, используемая для анализа мнкРНК ОТ-ПЦР, является менее трудоемким, но высокоточным методом. Неинвазивность, высокая точность, небольшая трудоемкость анализа, а также высокая стабильность внеклеточных мнкРНК в изменяющихся условиях окружающей среды делает возможным использование анализа профиля мнкРНК в качестве потенциального биомаркера имплантационного потенциала эмбрионов [174].

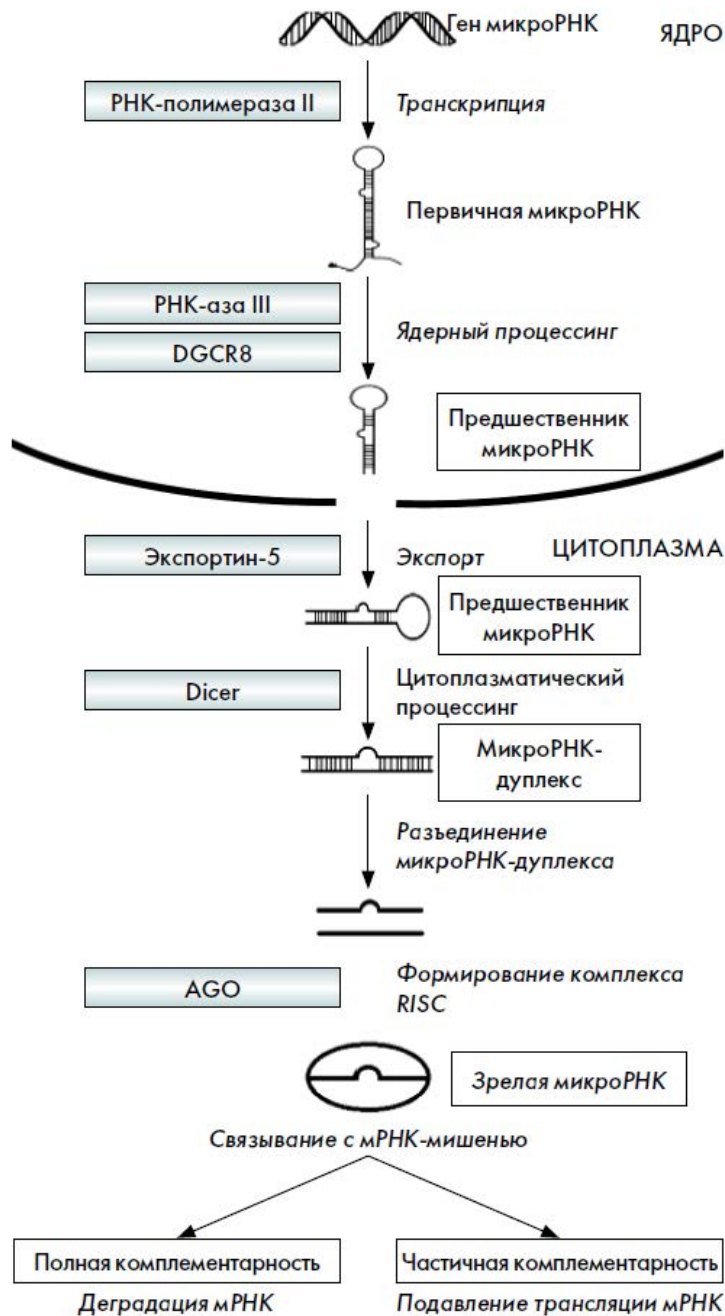
## **1.4.1 Образование и механизм действия мнкРНК**

### **1.4.1.1 МикроРНК (microRNAs)**

МикроРНК представляют собой эволюционно консервативные одноцепочечные молекулы длиной 21 – 25 нуклеотидов. В геноме человека насчитывается около 37 000 различных микроРНК, которые являются основными транскрипционными и постранскрипционными регуляторами экспрессии генов [175].

Механизм образования микроРНК хорошо изучен и подробно описан. Гены, ответственные за транскрипцию микроРНК располагаются на протяжении всего генома, включая интронные и межгенные области. МикроРНК транскрибируются в ядре клетки с помощью фермента РНК-полимеразы II с образованием первичной микроРНК [176] [177]. Далее микропроцессорный комплекс, состоящий из DGCR8 (Di George syndrome critical region gene 8 – область 8, критическая для синдрома Ди Джорджи) и фермента РНКазы III (drosha) расщепляет первичную микроРНК до элемента вторичной структуры РНК, так называемой «шпильки» (англ. stem-loop, hairpin) – предшественника микроРНК. После транспортировки в цитоплазму предшественник микроРНК с помощью фермента рибонуклеазы III (Dicer) превращается в зрелую двухцепочечную микроРНК, одна из цепей которой

включается в формирование рибонуклеинового комплекса RISC (RNA-induced silencing complex – РНК-индуцируемый комплекс выключения гена [176] [178] [177]. Находясь в составе комплекса RISC, микроРНК связывается с мРНК, посредством определенного участка микроРНК – «seed region» (затравочная область). Экспрессия генов регулируется различной степенью комплементарного спаривания затравочной области микроРНК с мРНК. При полном комплементарном соответствии происходит разрезание и деградация мРНК, при неполном – трансляция мРНК подавляется, мРНК дестабилизируется и направляется в Р-тельца (processing bodies) [177], [179]. Долгое время было принято считать, что микроРНК осуществляют только отрицательную регуляцию экспрессии генов-мишеней, однако в последнее время появились данные, демонстрирующие способность микроРНК индуцировать экспрессию генов [177], [179], [180]. При этом одна микроРНК может спариваться сразу с несколькими мРНК, в то время как каждая мРНК регулируется несколькими микроРНК. В результате образуется сложная регуляторная сеть, в которой изменение экспрессии определенной микроРНК ведет к изменению экспрессии сразу нескольких мРНК, а экспрессия одной мРНК контролируется и другими микроРНК [177][178][180].



**Рис. 1.** Механизм образования микроРНК [177]

#### 1.4.1.2 Пиви-взаимодействующие РНК (piwiRNAs)

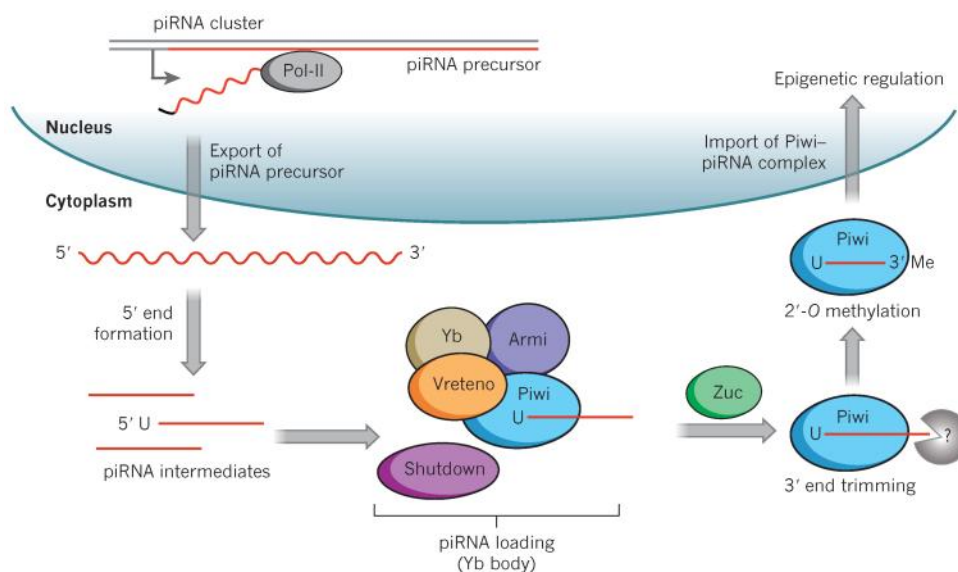
ПивиРНК представляют собой наиболее многочисленный класс мнкРНК, длина молекулы пивиРНК составляет от 26 до 32 нуклеотидов. Данный класс мнкРНК был назван пиви-взаимодействующими РНК из-за возможности связываться с белками семейства PIWI, класс Argonaute. ПивиРНК экспрессируются преимущественно в мужских половых клетках в период профазы первого мейотического деления сперматогенеза, также возможна экспрессия их соматическими клетками [30] [181]. При этом на сегодняшний

день нет данных, указывающих на присутствие пивиРНК в фолликулярной жидкости, несмотря на наличие пивиРНК и пиви-подобных РНК (PIWIL3) в ооцитах [182].

Механизмы образования пивиРНК менее изучены. Известно, что в основном экспрессия пивиРНК осуществляется в клетках зародышевой линии, однако возможна и в соматических клетках [183] [30]. В отличие от микроРНК и малых интерферирующих РНК (миРНК) предшественники пивиРНК не образуют соответствующих вторичных структур и следовательно их образование не контролируется белком Dicer [184], [185]. Отличительной особенностью биогенеза пивиРНК является то, что образуются они из одноцепочечных молекул ДНК, о чем свидетельствует также наличие у определенных пивиРНК только смысловых последовательностей.

Биогенез пивиРНК исторически был разделен на две отдельные ветви: первичный и вторичный. Однако недавние исследования показали, что данные процессы взаимосвязаны посредством механизма «пинг-понг», запускающего образование первичных пивиРНК. Первичный процессинг представляет собой укорочение 5'- и 3'-концов первичных транскриптов с образованием пивиРНК подобных мнкРНК. Далее пивиРНК подобные мнкРНК связываются с белками семейства Piwi и в результате укорочения 3'- конца приобретают размеры, соответствующие первичным пивиРНК. При образовании комплекса с белками Piwi, первичные антисмысловые пивиРНК транспортируются в ядро клетки, где участвуют в сайленсинге экспрессии генов транспозонов. При образовании комплекса с белками класса Aubergine, первичные пивиРНК комплементарно связывают транскрипты транспозонов, а вследствие эндонуклеазной активности Aub образуются два фрагмента РНК, один из которых является вторичной смысловой пивиРНК, не комплементарной транскрипту транспозона. В комплексе с белком Ago3 вторичная пивиРНК связывается с первичной пивиРНК с образованием фрагмента последней, который либо осуществляет снижение уровня экспрессии транспозонов, либо участвует в дальнейшем пополнении пула смысловых пивиРНК по механизму «пинг-понг».

Таким образом, посредством репрессии транспозонов пивиРНК участвуют в поддержании целостности генома [30] [186].



**Рис. 2.** Биогенез пивиРНК [187]

#### 1.4.1.3 Малые интерферирующие РНК (siRNAs)

Малые интерферирующие РНК (миРНК) представляют собой короткие двуцепочечные мнкРНК (длиной 20-25 нуклеотидов) с двумя неспаренными выступающими нуклеотидами на 3'-концах. МиРНК образуются из длинных двуцепочечных РНК или малых РНК, образующих шпильки, в результате работы фермента Dicer. Связываясь с мРНК определенного гена миРНК вызывает ее деградацию, тем самым предотвращая трансляцию мРНК в соответствующий ей белок, данный процесс получил название РНК-интерференции. РНК-интерференция является одним из важнейших механизмов поддержания структуры хроматина, а также противовирусной защиты [188]. Экспрессия миРНК возможна как в бластоцистах, так и в клетках эндометрия. Данная разновидность мнкРНК участвует в регуляции активности различных сигнальных путей, в том числе отвечающих за имплантацию эмбриона в полость матки [188] [30].

Основополагающие характеристики идеального прогностического метода оценки имплантационного потенциала эмбрионов включают: высокую

разрешающую способность, точность измерений, неинвазивность, стабильность биомаркеров в меняющихся условиях окружающей среды (возможность криоконсервации и транспортировки образцов), оптимальную трудоемкость и стоимость технологического процесса. Анализ мнкРНК в культуральной среде эмбрионов, фолликулярной жидкости, семенной плазме соответствует вышеописанным критериям [189].

#### **1.4.2 Роль мнкРНК в оогенезе**

Оогенез представляет собой динамичный и хорошо скоординированный физиологический процесс, который включает в себя периоды размножения, роста и созревания ооцитов. Период размножения женских половых клеток протекает во время внутриутробного развития плода и представляет собой митотические деления оогоний. В период роста ооциты вступают в профазу I мейотического деления, где в течение долгого периода происходит увеличение объемов ядра и цитоплазмы, а также синтез всех видов РНК. Примордиальные фолликулы, содержащие ооцит первого порядка, подвергаются рекрутированию, то есть вступают в стадию созревания, посредством активации паракринной взаимосвязи между ооцитом, фолликулярным эпителием, текальными и интерстициальными клетками. Стадия созревания включает два последовательных мейотических деления с образованием зрелого ооцита. Необходимая среда для успешного оплодотворения и развития эмбриона достигается за счет пространственно-временной регуляции экспрессии множества генов на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях. Открытие некодирующих РНК, включая микроРНК, произвело революцию в изучении посттранскрипционной регуляции [190].

На сегодняшний день известно, что экспрессия микроРНК претерпевает закономерные изменения по мере созревания фолликула. На профиль микроРНК в фолликулярной жидкости оказывают влияние и кумулюсные клетки и ооцит [33]. Выявлено, что зрелые и незрелые ооциты отличаются по профилю экспрессии микроРНК (в общей сложности 47 микроРНК были

характерны для незрелых ооцитов, другие 51 микроРНК – для зрелых ооцитов) [33]. В исследовании Wright et al (2016) показано, что ингибирование miR-21 в ооцитах свиней приводило к меньшему количеству зрелых ооцитов и снижению частоты оплодотворения [191]. Аналогичные результаты получены при ингибировании miR-130b в бычьих ооцитах, let-7c, miR-27a и miR-322 в ооцитах мышей, а также miR-15/16 в ооцитах лягушки и miR- 378 в ооцитах свиньи [34] [35] [36] [37]. С другой стороны, в работе Li et al (2017) показано, что при увеличении экспрессии miR-224 в клетках кумулюса отмечается снижение скорости созревания ооцитов и развитие бластоцисты за счет регуляции белка пентраксина-3 [192]. Также в работе Zhang Q et al (2021) продемонстрировано отрицательное влияние miR-103a-3p или miR-10a-5p на созревание ооцитов по средством регуляции нейротрофического фактора мозга, который играет важнейшую роль в процессе созревания ооцитов [32].

В условиях *in vitro* изменения динамического профиля микроРНК частично связаны с особенностями культуральной среды, в то время как в условиях *in vivo* профиль микроРНК может зависеть от физиологических условий, таких как возраст матери. Например, добавление инсулиноподобного фактора роста-1 к незрелым ооцитам (MI) активирует экспрессию miR-133a, miR-205-5p и 145 miRNA и подавляет 200 других мнкРНК, включая miR-152 и miR- 142-5p [193]. При этом различия в профиле экспрессии микроРНК в фолликулярной жидкости у женщин старшего репродуктивного возраста по сравнению с таковыми у женщин младше 35 лет указывают на влияние возраста на профиль мнкРНК в условиях *in vivo* [194].

Однако необходимы дальнейшие исследования, чтобы лучше понять роль тех мнкРНК, экспрессия которых меняется в зависимости от условий культивирования, возраста женщины и других факторов.

В исследовании Tesfaye D. et al (2018) был проведен сравнительный анализ концентрации miR-21 в клетках кумулюса и фолликулярной жидкости у пациенток с женским фактором бесплодия в программах ЭКО и у женщин с

мужским фактором бесплодия в программах ICSI [38]. Выявлено значительное снижение уровня экспрессии miR-21 и в кумулюсных клетках и в фолликулярной жидкости у женщин с женским фактором бесплодия по сравнению с таковым у пациенток с мужским фактором бесплодия. При этом известно, что miR-21 оказывает решающее влияние на зрелость ооцитов, поэтому авторы предлагают использование miR-21 в качестве биомаркера зрелости ооцитов.

Как будут протекать ранние стадии (до 4-8 клеток) эмбриогенеза зависит от транскриптов и белков материнского происхождения, на смену которым в процессе МЗП включаются транскрипты и белки зиготического генома [60]. Также вместе с ооцитом в эмбрион транспортируются и материнские мнкРНК, по-видимому, выполняющие важную роль в оплодотворении и дальнейшем развитии эмбриона. В крупномасштабном исследовании с использованием лабораторных животных (мышей) показано, что профиль микроРНК подвергался значительным изменениям по мере созревания ооцитов, в то время как в зрелых ооцитах и зиготах выявлен сходный профиль микроРНК [195]. В этом же исследовании показано, что около 60% унаследованных от матери микроРНК подвергались деградации на стадии 1-2 клеток, которая у мышей соответствует МЗП. Полученные данные подтверждаются результатами и других исследований [196] [197]. Хранящиеся у матери miRNAs могут регулировать активацию эмбрионального генома и деградацию материнской мРНК.

Недавние исследования демонстрируют влияние гинекологических заболеваний на профиль мнкРНК в фолликулярной жидкости. Так в работе Khan H. et al (2021) показано, что уровень экспрессии микроРНК в фолликулярной жидкости различался у пациенток с СПКЯ и без СПКЯ [39]. У пациенток с СПКЯ и с нормальными уровнями андрогенов в крови выявлена повышенная экспрессия miR-7-5p, miR-378-3p, miR-224, miR-212-3p по сравнению с таковыми у пациенток с СПКЯ и гиперандрогенией. Схожие данные получены и в других исследованиях. [40] [41].



Известно также, что внеклеточные везикулы фолликулярной жидкости, содержащие в том числе мнкРНК, оказывают влияние на морфофункциональные характеристики спермы. В работе Тимофеевой А.В. и соавт. (2022) было изучено влияние сокультивирования сперматозоидов с внеклеточными везикулами фолликулярной жидкости на подвижность сперматозоидов в зависимости от возраста женщины [198]. По результатам трансмиссионной электронной микроскопии были выявлены различия в морфофункциональных характеристиках сперматозоидов при сокультивировании с внеклеточными везикулами женщин разных возрастных групп. Профили микроРНК фолликулярной жидкости у женщин разного возраста также различались, что указывает на различия в функциональном составе и влиянии везикул фолликулярной жидкости на характеристики сперматозоидов в зависимости от возраста женщины.

#### **1.4.3. Роль мнкРНК в сперматогенезе**

Сперматогенез, в результате которого первичные половые клетки дифференцируются в зрелые сперматозоиды, в отличие от развития женских половых клеток представляет собой непрерывный процесс, в ходе которого каждый день образуются миллионы сперматозоидов. В сперматогенезе человека выделяют три основные стадии: пролиферацию и дифференцировку сперматогониев, мейоз и спермиогенез [199]. Регуляция сперматогенеза осуществляется за счет правильного функционирования гипоталамо-гипофизарной системы, в то время как созревание, питание и дифференцировка первичных половых клеток обеспечивается по большей части их микроокружением, важнейшую роль в котором выполняют клетки Сертоли [199]. Также доказано, что процесс сперматогенеза сопровождается «высокоорганизованными транскрипционными волнами», которые генерируют определенные профили транскриптомов, специфичные для каждой стадии сперматогенеза [199]. Дифференцировка сперматогониальных стволовых клеток из которых в результате мейотических делений образуются сперматоциты, регулируется определенными мнкРНК. В недавних

исследованиях продемонстрировано участие miRNA-30, miR-322, miR-224, miR-10b в индукции самообновления и регуляции дифференцировки сперматогониальных стволовых клеток [200] [201] [202] [203]. Однако механизмы с помощью которых определенные микроРНК регулируют самообновление и потенность сперматогониальных стволовых клеток на сегодняшний день не ясны [201].

Стоит отметить, что на заключительных этапах сперматогенеза сперматозоиды транскрипционно и трансляционно неактивны. Это связано с реорганизацией и конденсацией хроматина, а также с удалением большей части цитоплазмы сперматозоидов в процессе сперматогенеза. Несмотря на то, что процессы транскрипции и трансляции заблокированы, а большая часть РНК теряется во время удаления цитоплазмы, небольшая популяция мнкРНК все же сохраняются в зрелых сперматозоидах [204].

По мере пост-тестикулярного созревания профиль мнкРНК в сперматозоидах претерпевает изменения. Принимая во внимание то, что зрелый сперматозоид является транскрипционно неактивным, изменение профиля мнкРНК сперматозоидов может происходить в результате включения мнкРНК, содержащихся в экзосомах, в процессе активного взаимодействия с тестикулярной жидкостью [205] [206]. Результаты исследований, проведенных с использованием лабораторных животных, указывают на то, что мнкРНК семенной плазмы могут участвовать не только в регуляции физиологии сперматозоидов, но и активировать экспрессию генов иммунно-воспалительных реакций в эндометрии в процессе имплантации эмбриона, а также участвовать в регуляции овуляции [207] [208] [209]. В настоящее время является общепризнанным тот факт, что мужские гаметы участвует в передаче не только гаплоидного набора хромосом, но и различных эпигенетических факторов, сложной популяции белков и различных видов РНК, которые могут иметь решающее значение в регуляции процессов раннего эмбриогенеза, имплантации, а также постимплантационного развития эмбриона [210] [211] [212]. МнкРНК сперматозоидов дезактивируют материнские мРНК, тогда как

на мРНК сперматозоидов синтезируются белковые продукты, участвующие в МЗП, которые в свою очередь регулируются трансляционным аппаратом яйцеклетки. [212].

В исследовании Al-Mawlah Y. et al (2022) проведен сравнительный анализ профиля экспрессии мнкРНК в экзосомах спермы у фертильных и бесплодных мужчин [43]. Выявлена статистически значимая зависимость между уровнем экспрессии определенных микроРНК и такими показателями спермограммы, как количество морфологически нормальных сперматозоидов, подвижность сперматозоидов и концентрация спермы [43]. Авторы предполагают, что использование miR-10a, miR-10b, miR-135a and miR-135b в качестве потенциальных биомаркеров качества спермы поможет получить дополнительную информацию о качестве спермы у субфертильных мужчин.

В исследовании Barceló M. et al (2018) проведен дифференциальный анализ профиля экспрессии мнкРНК в экзосомах спермы у мужчин с нормозооспермией, с олигозооспермией, с врожденной обструктивной азооспермией, с азооспермией в результате вазэктомии и секреторной азооспермией. У пациентов с обструктивной и секреторной азооспермией было обнаружено 60 микроРНК, которые демонстрировали значительные различия в экспрессии по сравнению с пациентами с нормозооспермией. Также были выявлены статистически значимые различия в профиле экспрессии мнкРНК в группах с обструктивной и секреторной азооспермией. Полученные данные могут помочь в установке причин развития азооспермии, а дифференциальная экспрессия определенных мнкРНК может быть использована в качестве прогностического маркера наличия сперматозоидов в яичках [42].

В других работах показано, что при удалении белков, участвующих в механизме образования пивиРНК, значительно увеличивается образование транспозонов и нарушается транскриптомная регуляция сперматогенеза и оогенеза у различных видов животных [213] [214].

В исследованиях, проведенных на мышах, наблюдалось снижение частоты бластуляции и живорождения, если оплодотворение было достигнуто путем инъекции в ооциты сперматозоида со сниженным на 90% количеством мнкРНК, чем в контрольной группе [44]. Полученные результаты предполагают потенциальное участие мнкРНК сперматозоидов в раннем эмбриональном развитии, хотя исследований проведенных с использованием человеческих образцов все еще недостаточно.

Выделение мнкРНК из самих сперматозоидов сопряжено с определенными сложностями: во-первых в сперматозоидах содержится критически малое количество мнкРНК; во-вторых помимо сперматозоидов в эякуляте находятся и другие клетки, концентрация мнкРНК в которых превышает таковую в сперматозоидах почти в 100 раз, это может исказить результаты глубокого секвенирования; в-третьих мнкРНК встроены в ядра сперматозоидов, для их высвобождения необходим лизис сперматозоидов, однако повышенное количество дисульфидных мостиков между протаминами в ядрах сперматозоидов препятствует полному высвобождению нуклеиновых кислот. В то время как анализ профиля мнкРНК в экзосомах семенной жидкости осложняется обильной контаминацией чужеродной ДНК [215].

Изучение особенностей эпигенетического наследования, функций мнкРНК в регуляции физиологии сперматозоидов, оплодотворении, раннего эмбриогенеза, имплантации и постимплантационного развития представляет большую актуальность. Возможность использования мнкРНК спермы в качестве дополнительных неинвазивных маркеров качества спермы, причин нарушений сперматогенеза и предикторов успешной имплантации в программах ВРТ является многообещающей и высокоперспективной задачей.

#### **1.4.4. Роль мнкРНК в эмбриогенезе и имплантации эмбриона**

Обнаружение мнкРНК в культуральной среде эмбрионов, а также выявленные закономерности в экспрессии мнкРНК эмбрионами различного качества и пloidности позволяют рассматривать мнкРНК в качестве

потенциальных диагностических и прогностических маркеров имплантационной способности эмбрионов [45].

В одном из первых опубликованных исследований, направленных на анализ уровня концентрации мнкРНК в средах культивирования эмбрионов, выявлено, что эмбрионы крупного рогатого скота в процессе культивирования в условиях *in vitro* высвобождают различные микроРНК в культуральную среду в зависимости от их способности к развитию [216]. В этом исследовании было показано, что определенные виды микроРНК чаще выявляются в культуральной среде остановившихся в развитии эмбрионов, чем в культуральной среде эмбрионов, достигших стадии бластоцисты. Это объясняется тем, что дегенерированные бластоцисты склонны высвобождать клеточное содержимое во внеклеточную среду не только через экзосомы, но и через более крупные везикулы и апоптотические тельца. Согласно данным Caralbo et al (2016), у человека эмбрионы на стадиях дробления и морулы выделяют небольшое количество микроРНК в культуральную среду, в то время как бластоциста, основная часть которой представлена клетками трофэктодермы, экспрессирует гораздо больше внеклеточных микроРНК [217]. В другом исследовании показано, что 4-х клеточный эмбрион в два раза активнее секретит внеклеточные мнкРНК по сравнению с эмбрионом на стадии 2-х клеток [218]. По мере эмбрионального развития секреция внеклеточных мнкРНК усиливается. Таким образом, мнкРНК в культуральных средах эмбрионов более специфичны на поздних стадиях доимплантационного развития.

Ретроспективный анализ микроРНК в культуральных средах эмбрионов в зависимости от исходов имплантации выявил повышенный уровень экспрессии miR-20a и miR-30c в культуральных средах бластоцист с высоким имплантационным потенциалом. Данные виды микроРНК принимают участие в межклеточных коммуникация, клеточной адгезии и клеточном росте.

Известно, что экспрессия мнкРНК эмбрионами в культуральную среду меняется по мере эмбрионального развития. В исследовании Fang F. et al

(2021) продемонстрированы различные уровни экспрессии мнкРНК в культуральных средах эмбрионов на стадии дробления и бластоцисты [219].

При этом нормальное эмбриональное развитие во многом зависит от правильно скоординированного перехода от материнского типа экспрессии генов к зиготическому, который заключается в инактивации мРНК материнского происхождения и образовании зиготических мРНК с последующей трансляцией на них белков. У млекопитающих МЗП происходит на этапе 8 клеток. В недавнем исследовании Cuthbert J. et al (2019), проведенном с использованием эмбрионов крупного рогатого скота, на стадии 8 клеток выявлена повышенная экспрессия микроРНК, пивиРНК и малых ядрышковых РНК в культуральной среде эмбрионов по сравнению с таковой на стадии бластоцисты и ооцитов [220]. Если течение МЗП нарушается, то эмбрион останавливается в развитии. Принимая во внимание то, что микроРНК принимают активное участие в деаденилировании материнской мРНК, нарушения в экспрессии микроРНК могут привести к остановке эмбрионального развития и самопроизвольному прерыванию беременности.

Несмотря на то, что профиль мнкРНК в культуральных средах эмбрионов может варьировать в различных лабораториях, многие исследования демонстрируют схожие результаты относительно уровней экспрессии определенных мнкРНК и качества эмбрионов, их способности к имплантации. В нескольких исследованиях выявлена связь между уровнем экспрессии miR-21-5p в фолликулярной жидкости и культуральных средах эмбрионов и частотой имплантации. Повышенная экспрессия miR-21-5p в фолликулярной жидкости и сниженный уровень miR-21-5p в культуральной среде эмбрионов ассоциированы с образованием бластоцист хорошего и отличного качества и высоким ИП[19] [39] [219] [39]. В исследовании с использованием лабораторных животных показано, что ингибирование miR-21-5p в клетках кумулюса индуцирует клеточный апоптоз посредством активации гена гомолога фосфатазы и тензина [221]. Интересно, что в бычьих эмбрионах уровень miR-21-5p был максимальным на стадии 1-8 клеток и

значительно снижался при достижении стадии бластоцисты и успешной имплантации за счет экспрессии генов-супрессоров miR-21-5p [222]. Это может объяснять сниженную экспрессию miR-21-5p в культуральных средах бластоцист с высоким имплантационным потенциалом в других исследованиях [19] [39] [219].

Также в нескольких работах показана прямая корреляция между уровнем экспрессии MiR-20a в культуральной среде эмбрионов и частотой образования бластоцист хорошего качества и имплантации [223] [224]. Это может объясняться одной из функций данной мнкРНК – инициировать клеточную дифференцировку и гастрюляцию эмбрионов.

В других исследованиях показано, что нарушение экспрессии мнкРНК семейства let-7 в культуральных средах эмбрионов, среди них let-7a-5p, let-7b-5a и let-7i-5p, ассоциировано с образованием бластоцист плохого качества с низким имплантационным потенциалом [16] [46]. Члены семейства let-7 подавляют ген lin-28, который играет решающую роль в самообновлении плюрипатентных стволовых клеток, при этом повышенный уровень let-7 связан с активацией клеточной дифференцировки и снижением пролиферации клеток. [225] [226]. В исследовании Тимофеевой А.В. и соавт. (2021) разработана прогностическая модель, которая на основании анализа уровня экспрессии let-7b-5a, let-7i-5p, piR-016735 и piR-020381 в культуральных средах эмбрионов позволяет спрогнозировать исход программ ВРТ [46].

И хотя плоидность эмбриона на сегодняшний день самый сильный прогностический критерий имплантационного потенциала, около 50% эуплоидных эмбрионов не удается имплантироваться в полость матки. Несколько исследований продемонстрировало наличие диалога между бластоцистой и эндометрием, медиаторами которого выступают внеклеточные мнкРНК. В работе Rozenbluth et al (2014) впервые обнаружена корреляция между повышенной концентрацией miR-191 в культуральной среде эмбрионов и эмбриональными анеуплоидиями [47]. В другом исследовании показано, что эуплоидные бластоцисты имеют значительно

более высокую экспрессию miR-141, miR-27b, miR-339-3p и miR-345 по сравнению с анеуплоидными бластоцистами [48].

Эмбрионы на ранней стадии эмбриогенеза особенно восприимчивы к реактивации мобильных элементов в процессе перепрограммирования генома на этапе МЗП. Удаление белков участвующих в биогенезе пивиРНК приводит к усилению экспрессии мобильных элементов и как следствие нарушению транскриптомной регуляции эмбриогенеза [213] [214].

Данные мировой литературы подтверждают важную роль мнкРНК в поддержании коммуникации между бластоцистой и эндометрием для успешной имплантации [227] [228]. По-видимому, мнкРНК синтезируемые бластоцистой в культуральную среду участвуют в передаче информации между бластоцистой и эндометрием, моделируя тем самым ИП эмбриона [217]. В исследовании Eivazi S. et al (2022) показано, что мнкРНК из культуральной среды эмбрионов с низким имплантационным потенциалом оказывают негативное влияние на рецептивность эндометрия за счет модификации экспрессии определенных генов (VEGF-A, HOXA10 и TGF- $\beta$ 1) в эпителиальных клетках эндометрия [228]. В другом исследовании показано, что miR- $\beta$ 1 экспрессируемая в культуральную среду эмбрионами с низким имплантационным потенциалом при взаимодействии с эндометрием ингибирует адгезивные способности эпителиальных клеток за счет связи с рецептором Pvr11 [229].

Высокая стабильность и устойчивость внеклеточных мнкРНК к изменяющимся условиям окружающей среды (в том числе криоконсервации и транспортировке), отсутствие инвазивного воздействия, благодаря экспрессии их в культуральную среду, а также участие мнкРНК в ключевых процессах гаметогенеза, оплодотворения, эмбриогенеза и имплантации позволяет использовать мнкРНК в качестве потенциальных биомаркеров компетентности ооцитов, сперматозоидов и имплантационного потенциала эмбрионов.



Таким образом, ИП эмбриона определяется не только нормальным кариотипом и генами, кодирующими белок, но и сложнейшей эпигенетической системой, которая значительно влияет на весь наследственный механизм. Поэтому поиск вспомогательных неинвазивных методов оценки плоидности и имплантационного потенциала эмбрионов на эпигенетическом уровне является чрезвычайно актуальным. Учитывая важнейшую роль пивиРНК в поддержании стабильности генома и их широкую распространенность в геноме человека, данные молекулы были выбраны для изучения их в качестве потенциальных маркеров плоидности и имплантационного потенциала эмбрионов.

## **Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **2.1 Материал исследования**

Отбор пациентов для проведения настоящего исследования осуществлялся среди пар, обратившихся для проведения программы ЭКО/ICSI на базе научно-клинического отделения ВРТ им. Ф. Паулсена (заведующая отделением: д.м.н., профессор Назаренко Т.А.) с учетом критериев включения/невключения в соответствии с целью исследования и поставленными для ее достижения задачами. ПГТ-А эмбрионов проводилось в лаборатории молекулярно-генетических методов отдела клинической и молекулярной генетики (руководитель отдела: д.б.н., профессор РАН Трофимов Д.Ю.). Анализ профиля экспрессии мнкРНК в культуральных средах эмбрионов проводился в отделении прикладной транскриптомики отдела системной биологии и репродукции (заведующая лабораторией: к.б.н. Тимофеева А.В.).

Всем супружеским парам, участвующим в исследовании, проведено полное клинико-лабораторное обследование в соответствии с приказом МЗ РФ от 31 июля 2020 г. № 803н.

На ретроспективном этапе исследования были проанализированы клинико-anamнестические данные 671 супружеской пары, которым был

проведен 801 стимулированный цикл и 666 криоциклов в период с 2018 по 2021 гг в НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова.

Группу наблюдения составили 323 супружеских пары, обратившиеся для проведения программы ЭКО 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 (2 и более самопроизвольных прерываний беременности на сроке до 22 недель), повторные неудачи ВРТ (3 и более неудачных попыток переноса «свежих» или размороженных эмбрионов), тяжелая патозооспермия (концентрация сперматозоидов 5 млн/мл и менее, процент прогрессивно-подвижных форм сперматозоидов 19% и менее, нормальных форм сперматозоидов – 1% и менее). 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 криопротокол;

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

IIIa-подгруппа включала 72 женщины с повторными неудачами ВРТ, 106 программ ЭКО/ICSI + ПГТ-А и 88 криоциклов, IIIb-подгруппа– 96 женщин с повторными неудачами ВРТ, 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 проспективном этапе исследования было отобрано и криоконсервировано 93 образца культуральных сред бластоцист пригодных для ПГТ-А, полученных от 73 супружеских пар для анализа профиля мнкРНК. Образцы культуральных сред эмбрионов были распределены в зависимости от результатов ПГТ-А и исходов программ ВРТ на группы:

I группа (n = 53) включала эуплоидные эмбрионы и была разделена на две подгруппы:

Ia группа (n = 27) составили эмбрионы, перенос которых привел к имплантации и впоследствии к родам,

Ib группа (n = 26) – отсутствие имплантации после переноса в полость матки.

II группа (n = 40) – анеуплоидные эмбрионы.

В качестве контроля были использованы среды без культивирования в них эмбрионов.

**Критерии включения:**

1. Возраст женщин 18 лет и старше;
2. Супружеские пары с бесплодием различного генеза, обратившиеся для проведения программы ЭКО/ICSI+ПГТ-А.
3. Наличие одного из показаний для проведения ПГТ-А: старший репродуктивный возраст женщины, привычное невынашивание беременности, повторные неудачные попытки имплантации, тяжелые нарушения сперматогенеза;
4. Нормальный кариотип супружеской пары.
5. Информированное согласие на участие в исследовании.

**Критерии невключения:**

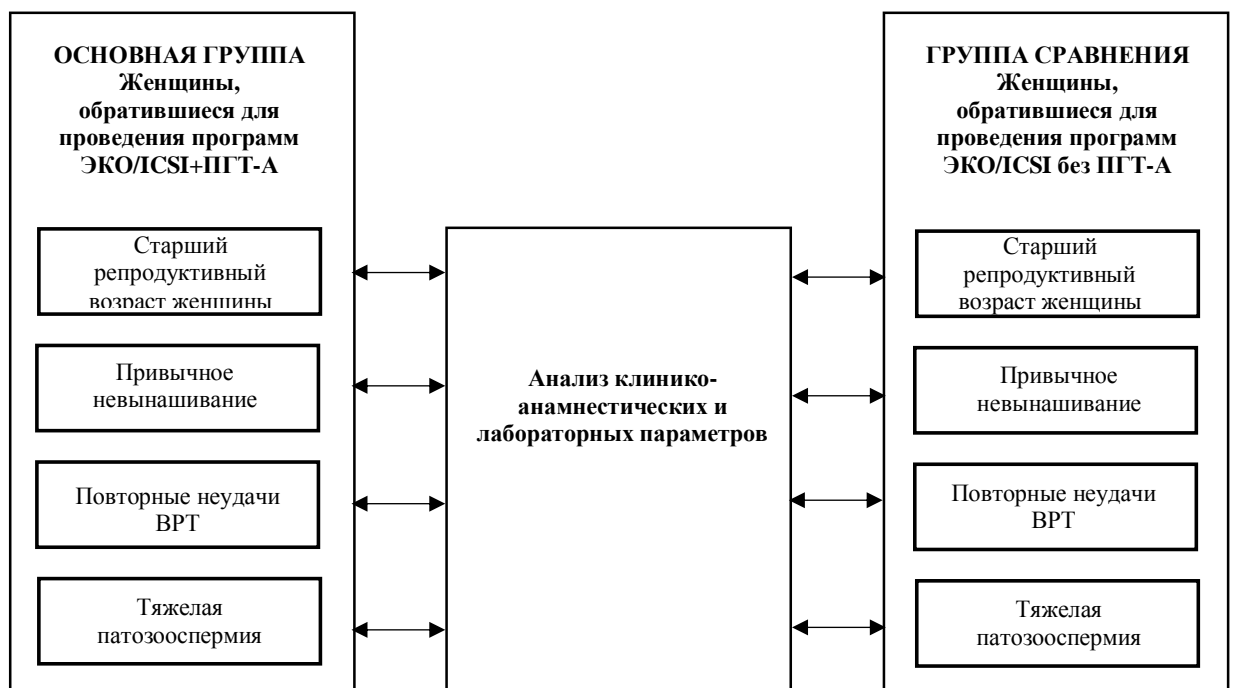
1. Все состояния, являющиеся противопоказаниями к проведению ВРТ и беременности в соответствии с Приказом МЗ РФ от 31 июля 2020 г. №803н "О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению";

Исследуемые группы были подобраны таким образом, чтобы снизить влияние вмешивающихся факторов на исход программ ВРТ. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. Все супружеские пары подписали информированное согласие на участие в исследовании.

## 2.2 Дизайн исследования

### Дизайн исследования для задачи №1

Провести анализ клинико-анамнестических и лабораторных параметров супружеских пар, обратившихся для проведения программ ЭКО/ICSI/ПГТ-А  
Обсервационное ретроспективное исследование.



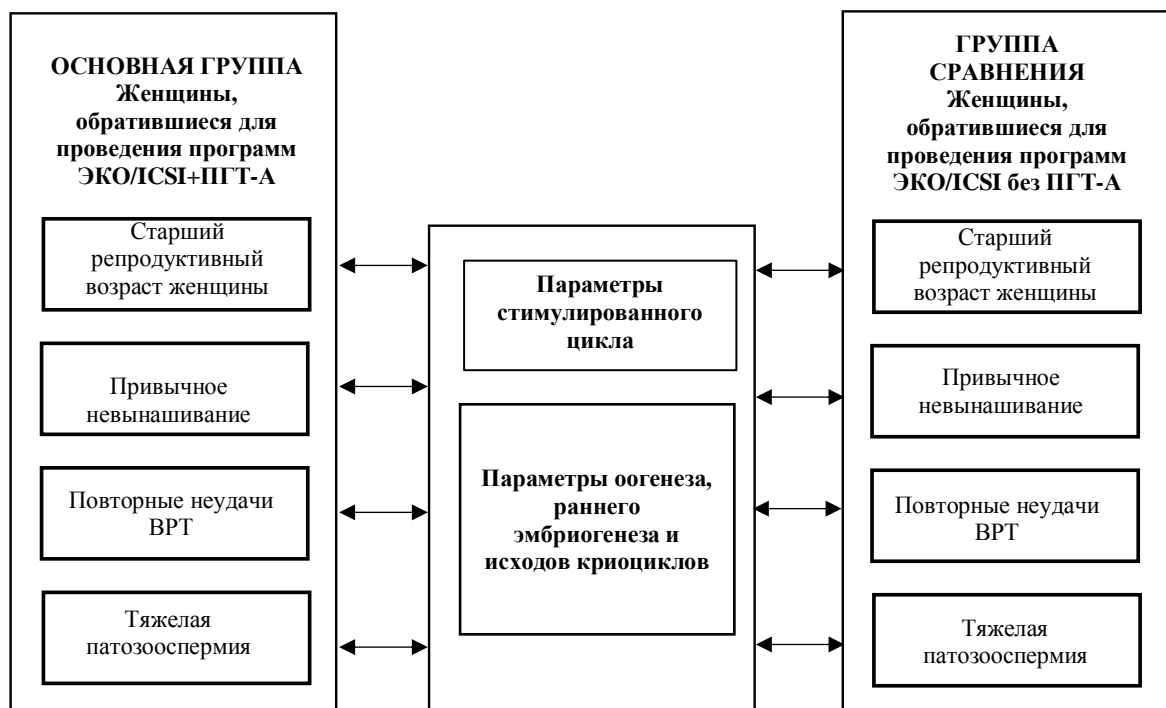
Для решения первой задачи исследования были проанализированы клинико-анамнестические и лабораторные параметры 165 супружеских пар со старшим репродуктивным возрастом женщины, которые были разделены на две подгруппы: Ia подгруппа - включала 86 женщин, обратившихся для проведения программ ЭКО/ICSI + ПГТ-А, Ib подгруппа – 79 женщин, обратившихся для проведения программ ЭКО/ICSI без ПГТ-А; Проанализированы клинико-анамнестические и лабораторные данные 174 супружеских пар с бесплодием и привычным невынашиванием беременности, которые были разделены на две подгруппы: Pa подгруппа включала 90

женщин, обратившихся для проведения программы ЭКО/ICSI+ПГТ-А, IIb подгруппа – 84 женщины, которым проводились программы ЭКО/ICSI без ПГТ-А; Клинико-anamнестические и лабораторные данные 168 супружеских пар с повторными неудачными попытками имплантации, которые были разделены на две подгруппы: IIIa подгруппа включала 72 женщины, обратившихся для проведения программы ЭКО/ICSI + ПГТ-А, IIIb подгруппа – 96 женщин, которым проводилась программа ЭКО/ICSI без ПГТ-А. А также данные 164 супружеских пар с тяжелыми нарушениями сперматогенеза у мужчин, которые были разделены на две подгруппы: IVa подгруппа включала 75 женщин, обратившихся для проведения программы ЭКО/ICSI+ПГТ-А, IVb подгруппа – 89 женщин, которым проводилась программы ЭКО/ICSI без ПГТ-А.

Конечные точки исследования: средние значения и частоты клинико-anamнестических и лабораторных показателей.

### Дизайн исследования для задачи №2

Оценить параметры стимулированного цикла, оогенеза, раннего эмбриогенеза и исходов криоциклов в подгруппах с ПГТ-А и подгруппах без ПГТ-А.



Обсервационное исследование.

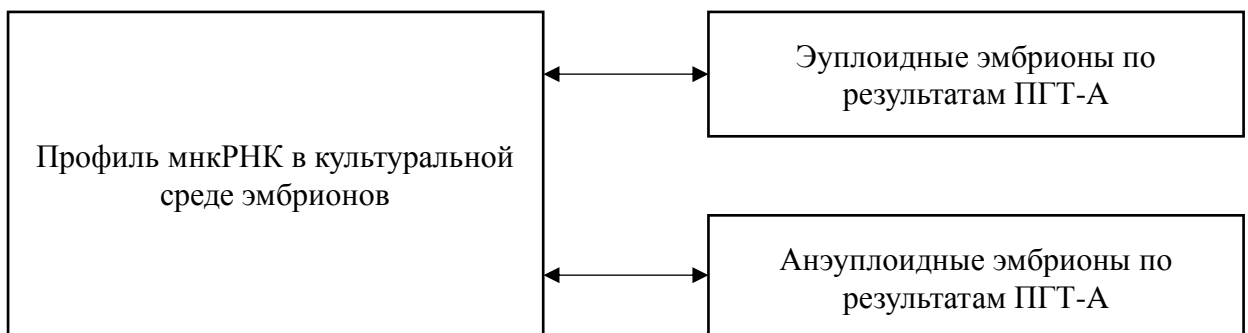
Для решения второй задачи исследования в Ia и Ib группах было проанализировано 97 циклов ЭКО/ICSI с ПГТ-А и 104 цикла ЭКО/ICSI без ПГТ-А, во IIa и IIb группах было проанализировано 119 циклов ЭКО/ICSI с ПГТ-А и 102 цикла ЭКО/ICSI без ПГТ-А, в IIIa и IIIb группах было проанализировано 106 циклов ЭКО/ICSI с ПГТ-А и 91 цикл ЭКО/ICSI без ПГТ-А, в IVa и IVb группах 89 циклов ЭКО/ICSI с ПГТ-А и 93 цикла ЭКО/ICSI без ПГТ-А.

**Конечные точки исследования:** средние значения параметров стимулируемого цикла, раннего эмбриогенеза и исходов криоциклов.

**Дизайн исследования для задачи №3**

Изучить профиль мнкРНК в культуральной среде эмбрионов и проанализировать их в зависимости от хромосомного статуса (плоидности) в программе ЭКО/ICSI/ПГТ-А.

Обсервационное исследование

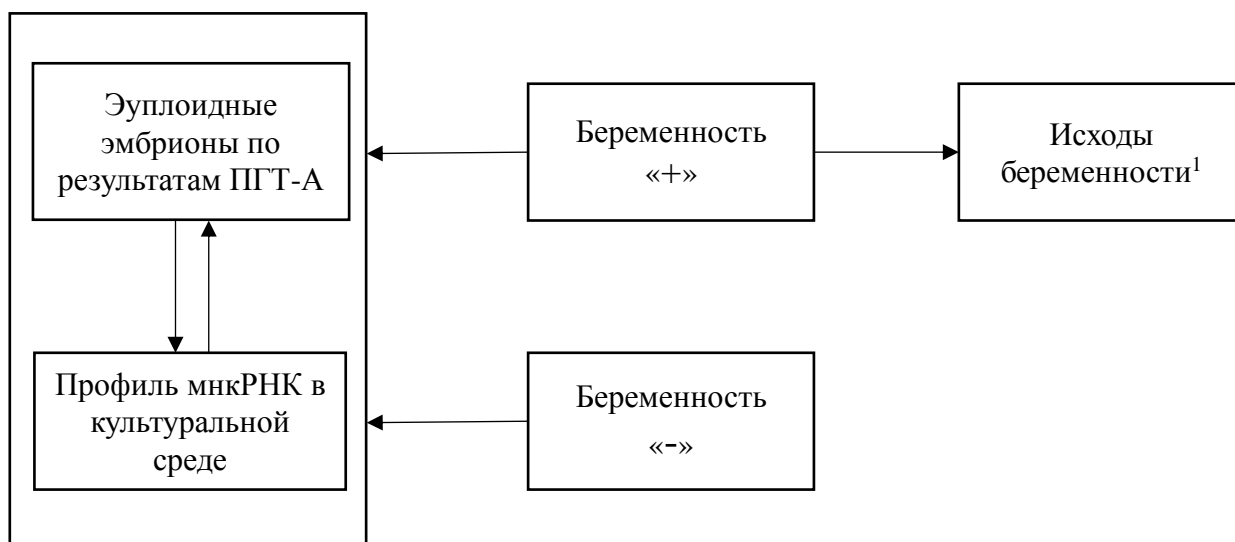


Для решения третьей задачи был проведен сравнительный анализ профиля мнкРНК в культуральных средах 93 эмбрионов после ПГТ-А.

**Конечные точки исследования:** Выявление корреляционной зависимости между хромосомным статусом эмбриона и экспрессией различных мнкРНК в его культуральной среде.

**Дизайн исследования для задачи №4**

Оценить результаты криоциклов с переносом эуплоидных эмбрионов по результатам ПГТ-А с учетом профиля экспрессии мнкРНК, ответственных за ИП, в культуральной среде.



Для решения четвертой задачи было проанализировано 53 криоцикла с переносом в полость матки одного эуплоидного эмбриона и проведен сравнительный анализ профиля экспрессии мнкРНК в культуральных средах 53 эмбрионов в зависимости от исходов программ ВРТ.

Конечные точки: Выявление корреляционной зависимости между профилем мнкРНК в культуральной среде эмбрионов и исходами криоциклов.

## 2.3 Методы исследования

### 2.3.1. Общеклинические методы исследования

Перед вступлением в программу ВРТ все супружеские пары были обследованы в соответствии с приказом Министерства Здравоохранения РФ № 803н "О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению" от 31 июля 2020г.

Проводился сбор соматического анамнеза, включая возраст, наследственные заболевания, хронические и перенесенные соматические заболевания, травмы и операции, аллергологический и эпидемиологический анамнезы. Сбор гинекологического анамнеза включал данные менструальном цикле (менархе, длительность и характер менструации, продолжительность менструального цикла), гинекологические заболевания и операции. Сбор данных о репродуктивной функции включал количество беременностей, их исходы, особенности течения и осложнения; длительность бесплодия,

проводимые методы лечения бесплодия в том числе программы ВРТ (протокол стимулированного цикла, эмбриологический этап, исход программ ВРТ); Сбор анамнеза у партнеров пациенток включал возраст, данные о наследственных заболеваниях, репродуктивный и урологический анамнезы в том числе наличие детей от предыдущих браков, данные спермограммы.

При первичном осмотре оценивался тип телосложения женщин, характер кожного и волосяного покровов, пальпация молочных желез. Объективно оценивали вес, рост пациенток, рассчитывали ИМТ ((масса (кг)/рост<sup>2</sup>(м)); артериальное давление, пульс.

В рамках гинекологического осмотра проводился наружный осмотр женских половых органов, осмотр влагалища и шейки матки в зеркалах, влагалищно-абдоминальное.

### 2.3.2 Гормональное обследование

Перед началом стимулированного цикла в рамках подготовки к программе ЭКО/ICSI на 2-3 день менструального цикла проводилось исследование крови для определения фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), тиреотропного гормона (ТТГ) и антимюллерового гормона (АМГ), которое осуществлялось на 2-3 день менструального цикла. Нормативные значения уровней гормонов в плазме крови представлены в Таблице 1.

**Таблица 1. Нормативные значения уровней гормонов в сыворотке крови у женщин**

Гормоны	Нормативные показатели
ФСГ	2,0–10,0 МЕ/л
ЛГ	2,3–15,0 мМЕ/л
E <sub>2</sub>	150–480 пкмоль/л
АМГ (нг/мл)	1,0–2,5 нг/мл



### **2.3.3 Ультразвуковое исследование органов малого таза**

Для исключения наличия противопоказаний для проведения программ ВРТ перед началом стимулированного цикла и криоцикла на 2-3 день менструального цикла проводилось ультразвуковое исследование (УЗИ) органов малого таза. Проводилась оценка размеров тела матки, структуры миометрия, а также толщины рубца при наличии оперативного родоразрешения в анамнезе. Оценивалась структура и толщина эндометрия, размер и положение яичников, количество и размер антральных фолликулов, наличие объемных образований. Для оценки ответа яичников на гонадотропную стимуляцию на шестой день стимулированного цикла проводилось повторное УЗИ, которое включало оценку количества и размеров фолликулов, а также толщины и структуры эндометрия.

### **2.3.4 Спермиологическое исследование эякулята**

В рамках подготовки к программе ЭКО и в день трансвагинальной пункции яичников (ТВП) проводилась оценка показателей спермиологического исследования эякулята. Перед проведением исследования мужчины были информированы о необходимости соблюдения следующих рекомендаций: половое воздержание в течение 48 часов, но не более 7-ми суток, исключение тепловой и холодной нагрузки, приема алкоголя. Анализ эякулята проводился в соответствии с рекомендациями ВОЗ от 2010 г.

### **2.3.5 Программа ЭКО с сегментацией цикла**

Перед проведением гонадотропной стимуляции на 2-3 день менструального цикла проводили УЗИ органов малого таза с целью исключения противопоказаний для вступления в программу ЭКО/ICSI. Гонадотропную стимуляцию проводили в протоколе с антагонистами гонадотропин релизинг-гормона (антГнРГ) препаратами менотропина и рФСГ. Выбор препарата и стартовой дозы гонадотропинов определялся на основании овариального резерва и анамнестических данных женщины.

Коррекция дозы гонадотропинов, день введения анТГнРГ, триггера овуляции и длительности стимуляции проводилась в зависимости от индивидуального ответа яичников. Введение экзогенных гонадотропинов начинали со 2-3 дня менструального цикла. При достижении лидирующим фолликулом диаметра 13-14 мм начинали ежедневное введение анТГнРГ с целью предупреждения эндогенных паразитарных пиков ЛГ. Триггер овуляции назначали при достижении лидирующими фолликулами диаметра 17-18 мм. Для финального созревания ооцитов использовали человеческий хорионический гонадотропин человека (ХГч) в дозе 5000 – 10000 МЕ, а при риске развития синдрома гиперстимуляции яичников – агонист гонадотропин релизинг-гормона (а-ГнРГ).

ТВП яичников проводили в асептических условиях через 35–36 часов после введения препарата ХГч под внутривенным наркозом путем вакуумной аспирации фолликулярной жидкости под ультразвуковым контролем. Отмытые от фолликулярной жидкости ооциты перемещали в стерильные планшеты с культуральной средой, где они предварительно инкубировались в течение 2-3 часов. Далее выполняли денудирование ооцитов с использованием фермента гиалуронидазы с целью освобождения их от клеток кумулюса и *corona radiata*. Оплодотворение проводили методом ЭКО или ICSI, выбор метода оплодотворения определялся показателями спермограммы и анамнестическими данными супружеской пары. Через 14-16 часов оценивали результат оплодотворения: наличие в цитоплазме двух пронуклеусов и двух полярных телец свидетельствовало о нормальном оплодотворении. Все эмбрионы культивировались в индивидуальных каплях одноступенчатой среды VitroLife G-TL (Швеция) в мультигазовых инкубаторах. Оценка качества полученных эмбрионов проводилась на 5-е сутки культивирования на основании морфологических критериев в соответствии с классификацией Гарднера (ESHRE 2011 «модифицированная» классификация D.Gardner). Эмбрионы хорошего и отличного качества, а также эмбрионы после биопсии криоконсервировали в средах Kitazato (Япония) согласно инструкции

производителя. В день предполагаемого переноса эмбрион размораживали и помещали в среду VitroLife (Швеция) GTL.

#### **2.3.4 Кριοцикл**

Перед вступлением в кριοцикл с целью исключения патологии эндометрия и функциональных кист в яичниках на 2-3 день менструального цикла проводилось УЗИ органов малого таза. Подготовку эндометрия в рамках кριοцикла выполняли на фоне циклической гормональной терапии (ЦГТ) или в естественном цикле (ЕЦ). Подготовка эндометрия на фоне ЦГТ заключалась в пероральном приеме эстрадиола валерата (2 мг, 3 раза в день) начиная со 2-3 дня менструального цикла ежедневно с последующим добавлением микронизированного прогестерона (200 мг, 3 раза в день) вагинально с коррекцией дозы по данным УЗ-мониторинга. Перенос размороженных после криоконсервации blastocист проводили на 6-е сутки от начала приема микронизированного прогестерона при достижении эндометрием удовлетворительной структуры и толщины > 8 мм.

Перенос размороженного эмбриона в ЕЦ проводился под контролем УЗ-мониторинга на 2-3 день менструального цикла с целью исключения функциональных кист яичников и патологии эндометрия, на 8-10 день цикла с целью оценки роста доминантного фолликула и далее для подтверждения спонтанной овуляции. На следующий день после овуляции с целью поддержки лютеиновой фазы цикла назначался микронизированный прогестерон (200 мг, 3 раза в день) вагинально в течение 5-ти дней. Перенос blastocисты проводился на 5-е сутки введения прогестерона при достижении эндометрием удовлетворительной структуры и толщины > 8 мм.

На 12-14 сутки после ПЭ проводился анализ крови на  $\beta$ -ХГч, при получении положительных результатов на 21 день после ПЭ проводилось УЗИ органов малого таза с целью визуализации плодного яйца в полости матки. Следующее УЗИ органов малого таза проводили через 5-6 недель после ПЭ с целью определения сердцебиения плода.

## **2.4 Специальные методы исследования**

### **2.4.1 Преимплантационное генетическое тестирование эмбрионов на анеуплоидии**

На 5-6-е сутки культивирования проводилась биопсия 5-6-ти клеток трофэктодермы эмбрионов хорошего и отличного качества согласно классификации Гарднера (выше 3BB). Полученный материал погружался в пробирки типа Eppendorf, содержащие лизирующий буфер, и криоконсервировался с последующей транспортировкой в лабораторию молекулярно-генетических методов отдела клинической и молекулярной генетики для проведения ПГТ-А. Биопсированные эмбрионы подвергались криоконсервации. ПГТ-А всех эмбрионов проводилось методом NGS с использованием наборов ReproSeq (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции производителя.

#### **Выделение РНК из образцов культуральных сред**

После проведения биопсии и криоконсервации бластоцист образцы культуральных сред эмбрионов, пригодных для ПГТ-А, собирались в пробирки типа Eppendorf и криоконсервировались. Выделение РНК из собранных 96-ти образцов культуральных сред проводилось колоночным способом с использованием набора «miRNeasy Serum/Plasma Kit» (Qiagen).

#### **Глубокое секвенирование малых некодирующих РНК**

Шесть из четырнадцати микролитров элюата колонки miRNeasy Serum/Plasma Kit» (Qiagen), содержащего РНК из культуральной среды, были использованы для синтеза кДНК-библиотек набором NEBNext® Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina® (Set11 and Set2, New England Biolab®), амплифицированных в течение 30 циклов в ходе ПЦР, очищенных в 6% полиакриламидном геле и секвенированных на платформе NextSeq 500/550 (Illumina). Секвенированные последовательности в диапазоне от 16 до 50 п.н. были картированы на базы данных человека GRCh38.p15, miRBase v21 и piRNABase с использованием алгоритма Bowtie [235]. Анализ

дифференциальной экспрессии мнкРНК проводили с помощью программного пакета DESeq2 [232].

### **Обратная транскрипция и количественная ПЦР в реальном времени.**

Пять из четырнадцати микролитров элюата колонки miRNeasy Serum/Plasma Kit» (Qiagen), содержащего РНК из среды культивирования, были использованы для синтеза кДНК набором miScript® II RT Kit (Qiagen) по протоколу фирмы-производителя. Количественная ПЦР в реальном времени была проведена с использованием набора miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany) и смысловых праймеров, специфичных для пивиРНК (Таблица 1). Программа ПЦР: (1) 15 мин при 95 °С и (2) 40 циклов: 94 °С в течение 15 сек, оптимизированная температура отжига (45–61 °С) в течение 30 сек и 70 °С в течение 30 сек; (3) нагревание реакционной смеси от 65 до 95 °С с шагом 0,1 °С для построения кривой плавления продукта ПЦР в термоциклере StepOnePlus™ (Applied Biosystems). Относительную экспрессию пивиРНК в среде культивирования определяли методом  $\Delta\Delta C_t$ , используя hsa\_piR\_022258 в качестве референсной РНК и среду без культивирования эмбриона в качестве контрольного образца.

Таблица 1. Характеристика нуклеотидных последовательностей смысловых праймеров пивиРНК, используемых в количественной ПЦР в реальном времени

мнкРНК 1	Идентификационный номер <sup>1</sup>	Нуклеотидная последовательность смыслового праймера для ПЦР, 5'-3'	Оптимизированная температура отжига праймера, °С
hsa_piR_008112	DQ581031	tgaggtagtagattgtatagttgtgggtagt	46,2
hsa_piR_000765	DQ570956	agcattggtggtcagtggtagaattctcgc	48,9
hsa_piR_004153	DQ575660	tcctggtggtctagtggttaggattcggcac	46,2
hsa_piR_015462	DQ591122	tgtcctgggccagcctgatgatgtcctcctc	45
hsa_piR_016677	DQ592953	cccctggtggtctagtggttaggattcggc	45

hsa_piR_019825	DQ597218	gcattgggtggttcagtggtagaattctcac	52,7
hsa_piR_020326	DQ597916	ggcattgggtggttcagtggtagaattctcgc	61
hsa_piR_020497	DQ598177	gggggggtgtagctcagtggtagagcgcgtgct	45
hsa_piR_020829	DQ598677	gtttccgtagtgtagtggtcatcacgttcgcc	55
hsa_piR_022258	DQ600471	tactacctgattggtcgggtgtgagc	48,9
hsa_piR_020401	DQ598029	ggctgggtctcgaactcctgacctcaggt	45
hsa_piR_004152	DQ575658	tccttggtggtctagtggttaggata	48,9
hsa_piR_017716	DQ594453	ttccttggtggtctagtggttaggattcggc	45

<sup>1</sup> piRNAbank (<http://pirnabank.ibab.ac.in/cgi-bin/accession.cgi>)

### Статистический анализ

Статистическая обработка данных выполнена с использованием скриптов, написанных на языке R [Team, R.C. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria Available online: <https://www.r-project.org> (accessed on Mar 10, 2023)] и программы RStudio [Team, Rs. RStudio: Integrated Development for R. RStudio Available online: <http://www.rstudio.com/>. (accessed on Mar 10, 2023)]. Соответствие анализируемых параметров закону нормального распределения оценивали по значениям теста Шапиро-Уилка. Непрерывные переменные с асимметричным распределением представлены в виде медианы и межквартильных значений (Me [Q1; Q3]). Статистический анализ количественных признаков проводили с помощью теста Манна-Уитни при парном сравнении в случае, когда распределение не соответствовало закону нормального распределения. Для описания категориальных бинарных данных использовали абсолютные значения и процентные доли от общего числа в группе. Сравнение качественных признаков проводили с помощью критерия  $\chi^2$  Пирсона. Величину порогового уровня значимости  $p$  принимали равной 0,05. Если значение  $p$  было меньше 0,001, то  $p$  указывали в формате  $p < 0,001$ .

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.

### **Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

#### **3.1 Клинико-анамнестические данные и лабораторные параметры женщин, обратившихся для проведения программ ЭКО/CSI+ПГТ-А и групп сравнения**

По результатам сравнительного анализа клинико-анамнестических данных супружеских пар на ретроспективном этапе исследования все подгруппы с ПГТ-А и соответствующие подгруппы без ПГТ-А в целом были сопоставимы по возрасту женщины, длительности, типу и факторам бесплодия, количеству самопроизвольных прерываний беременности, неудачных попыток имплантации в анамнезе и параметрах спермограммы (Табл. 2, 3).

Медиана возраста у женщин старшего репродуктивного возраста в Ia подгруппе (с ПГТ-А) составила 41 [40; 43] года, в Ib подгруппе (без ПГТ-А) – 41 [39,5; 43] года ( $p = 0,842$ ). Возраст пациенток с привычным невынашиванием беременности в IIa подгруппе (с ПГТ-А) составил 32 [30; 34] года, в IIb подгруппе (без ПГТ-А) – 32 [30;34] года ( $p = 0,885$ ). Возраст пациенток с повторными неудачными попытками имплантации в IIIa подгруппе (с ПГТ-А) составил 31 [29,75; 33] год, в IIIb подгруппе (без ПГТ-А) – 31 [29,32] год ( $p = 0,082$ ). Возраст пациенток у супружеских пар с тяжелой патозооспермией в IVa подгруппе (с ПГТ-А) составил 31 [30;33] год, в IVb подгруппе (без ПГТ-А) – 31 [29,5; 33] год ( $p = 0,363$ ) (Табл. 2).

У всех пациенток, включенных в исследование, отмечался нормальный тип телосложения. Средние значения ИМТ также были в пределах нормальных показателей и не имели статистически значимых различий между подгруппами с ПГТ-А и соответствующими подгруппами сравнения: в Ia

подгруппе –  $22,1 \pm 1,4$  кг/м<sup>2</sup> и в Ib подгруппе –  $22,0 \pm 1,9$  кг/м<sup>2</sup> ( $p = 0,763$ ), в IIa подгруппе –  $21,8 \pm 1,2$  и в IIb подгруппе –  $22,1 \pm 1,5$  ( $p = 0,641$ ); в IIIa подгруппе –  $20,9 \pm 1,3$  и в IIIb подгруппе  $21,1 \pm 1,4$  ( $p = 0,748$ ); в IVa подгруппе –  $21,3 \pm 2,0$ , IVb –  $21,9 \pm 1,6$  ( $p = 0,836$ ).

Сравнительный анализ показателей менструальной функции женщин, включенных в исследование, в целом не показал существенных различий между основными и соответствующими подгруппами сравнения. Тем не менее среди супружеских пар с привычным невынашиванием беременности, повторными неудачными попытками имплантации и тяжелой патозооспермией основные и соответствующие им подгруппы сравнения статистически значимо различались по возрасту менархе, а среди женщин старшего репродуктивного возраста – по длительности менструального кровотечения (Таблица 3).

По результатам анализа данных репродуктивного анамнеза у женщин, включенных в исследование, медианы длительности бесплодия были сопоставимы в основных и соответствующих подгруппах сравнения у женщин старшего репродуктивного возраста и составили 8[5;13] лет в Ia подгруппе и 8[5;13] лет в Ib подгруппе ( $p = 0,954$ ); у женщин с привычным невынашиванием беременности – 1[1;2] год в IIa подгруппе и 1[1;2] год в IIb подгруппе ( $p = 0,719$ ); у супружеских пар с тяжелой патозооспермией – 4 [3; 6,5] года в IVa подгруппе и 3,5 [2;6] года в IVb подгруппе ( $p = 0,995$ ), а также у супружеских пар с повторными неудачами ВРТ, медиана длительности бесплодия в IIIa подгруппе составила 3 [2; 4,25] года, в IIIb подгруппе – 3 [2; 4,25] года ( $p = 0,06$ ) (Табл. 2).

Во всех группах кроме пациентов с тяжелой патозооспермией было выявлено преобладание вторичного бесплодия над первичным. Процент первичного бесплодия у женщин старшего репродуктивного возраста составил в Ia и Ib подгруппах 32,56% и 32,91% соответственно ( $p = 0,962$ ), во IIa и IIb подгруппах – 0 (0,00%) и 0 (0,00%) соответственно ( $p = 1,000$ ), в IIIa и IIIb – 27,78% и 33,33% соответственно ( $p = 0,442$ ), в то время



как в IVa и IVb подгруппах – 37,33% и 35,96% соответственно ( $p = 0,557$ ) (Таблица 2).

При анализе причин бесплодия практически в половине случаев у пациенток в Ia и Ib подгруппах выявлено бесплодие неясного генеза (56,98% и 50,63% соответственно,  $p = 0,621$ ). У пациенток в IIa и IIb подгруппах наиболее частой причиной бесплодия установлен трубно-перитонеальный фактор (40,00% и 41,67% соответственно,  $p = 0,824$ ). У женщин с повторными неудачными попытками имплантации различные факторы бесплодия представлены практически в равной степени, но чаще всего встречается трубно-перитонеальный фактор бесплодия: в IIIa подгруппе – 31,94%, в IIIb подгруппе – 32,29%,  $p = 0,962$ ). В IVa и IVb подгруппах у подавляющего большинства супружеских пар установлен «чистый» мужской фактор бесплодия (81,33% и 89,89% соответственно,  $p = 0,117$ ), в остальных случаях – сочетанное бесплодие (18,67% и 10,11% соответственно,  $p = 0,117$ ) (Таблица 2).

Таблица 2. Клинико-анамнестические данные пациенток, включенных в исследование (ретроспективный этап)

Изучаемые параметры	I группа (старший репродуктивный возраст женщины)			II группа (привычное невынашивание)			III группа (повторные неудачные попытки имплантации)			IV группа (тяжелая патозооспермия)		
	Ia подгруппа (с ПГТ-А), n=86	Ib подгруппа (без ПГТ-А), n=79	p (Ia vs Ib)	IIa подгруппа (с ПГТ-А), n=90	IIb подгруппа (без ПГТ-А), n=84	p (IIa vs IIb)	IIIa подгруппа (с ПГТ-А), n=72	IIIb подгруппа (без ПГТ-А), n=96	p (IIIa vs IIIb)	IVa подгруппа (с ПГТ-А), n=75	IVb подгруппа (без ПГТ-А), n=89	p (IVa vs IVb)
Возраст, лет (Me [L;H], (min-max))	41 [40; 43] (35 – 45)	41 [39,5; 43] (35 – 45)	0,842	32 [30;34] (22 – 34)	32 [30;34] (24 – 34)	0,885	31 [29,75; 33] (22 – 35)	31 [29,32] (23 – 34)	0,082	31 [30;33] (23 – 34)	31 [29,5; 33] (21 – 34)	0,363
Длительность бесплодия, лет (Me [L;H], (min-max))	8[5;13] (1 – 16)	8 [5;13] (1 – 14)	0,954	1 [1;2] (1 – 7)	1 [1;2] (1 – 9)	0,719	3 [2; 4,25] (1 – 10)	3 [2; 4,25] (1 – 8)	0,060	4 [3; 6,5] (1 – 16)	3,5 [2;6] (1 – 10)	0,995
Первичное бесплодие, n (%)	28 (32,56%)	26 (32,91%)	0,962	0 (0,00%)	0 (0,00%)	1,000	20 (27,78%)	32 (33,33%)	0,442	28 (37,33%)	32 (35,96%)	0,557
Трубно-перитонеальный фактор бесплодия, n (%)	20 (23,26%)	21 (26,58%)	0,622	36 (40,00%)	35 (41,67%)	0,824	23 (31,94%)	31 (32,29%)	0,962	3 (4,00%)	3 (3,37%)	0,831
Абсолютный трубный фактор бесплодия, n (%)	8 (9,3%)	6 (7,59%)	0,695	5 (5,55%)	6 (7,14%)	0,668	13 (18,05%)	14 (14,58%)	0,545	6 (8,00%)	3 (3,37%)	0,195
НГЭ, n (%)	5 (5,81%)	7 (8,86%)	0,452	8 (8,88%)	10 (11,90%)	0,514	21 (29,17%)	25 (26,04%)	0,654	5 (6,67%)	3 (3,37%)	0,329
Мужской фактор бесплодия, n (%)	4 (4,65%)	5 (6,33%)	0,636	13 (14,44%)	10 (11,90%)	0,622	18 (21,95%)	27 (28,13%)	0,651	61 (81,33%)	80 (89,89%)	0,117
Бесплодие неясного генеза, n (%)	49 (56,98%)	40 (50,63%)	0,621	28 (31,11%)	23 (27,38%)	0,590	13 (18,06%)	17 (17,71%)	0,715	0 (0,00%)	0 (0,00%)	1,000
Сочетанный фактор, n (%)	4 (4,65%)	5 (6,33%)	0,636	13 (14,44%)	10 (11,90%)	0,622	18 (21,95%)	27 (28,13%)	0,651	14 (18,67%)	9 (10,11%)	0,117

Таблица 3. Данные менструальной функции пациенток

		Возраст менархе (лет)*	P	Длительность менструального цикла (дней)*	P	Длительность менструации (дней)*	P	Болезненные менструации**	P	Безболезненные менструации**	P
<b>I группа</b> (старший репродуктивный возраст)	<b>Ia подгруппа</b> (с ПГТ-А), n = 86	13,0 [12;14]	0,926	26 [24; 30]	<b>0,044</b>	4,5 [3; 5]	0,254	13 (15,12%)	0,649	73 (84,88%)	0,649
	<b>Ib подгруппа</b> (без ПГТ-А), n = 79	13,0 [13;15]		27 [24; 29]		4,5 [3; 7]		10 (12,66%)		69 (87,34%)	
<b>II группа</b> (привычное невынашивание)	<b>IIa подгруппа</b> (с ПГТ-А), n = 90	13,5 [13;14]	<b>0,052</b>	29,0 [27; 31]	0,238	5,0 [4; 6]	0,448	16 (17,78%)	0,847	74 (82,22%)	0,847
	<b>IIb подгруппа</b> (без ПГТ-А), n = 84	12,0 [12;14]		28,5 [27; 30]		4,5 [4; 5]		14 (16,67%)		70 (83,33%)	
<b>III группа</b> (повторные неудачные попытки имплантации)	<b>IIIa подгруппа</b> (с ПГТ-А), n = 72	14,0 [12;15]	<b>0,049</b>	28,5 [27; 32]	0,366	4,5 [3; 6]	0,317	11 (15,28%)	0,751	61 (84,72%)	0,751
	<b>IIIb подгруппа</b> (без ПГТ-А), n = 96	13,0 [12;15]		28,0 [27; 30]		4,5 [3; 5]		13 (13,54%)		83 (86,46%)	
<b>IV группа</b> (тяжелая патозоспермия)	<b>IVa подгруппа</b> (с ПГТ-А), n = 75	12,75 [12;14]	<b>0,051</b>	28,5 [27; 29]	0,429	4,0 [3; 7]	0,225	17 (22,67%)	0,759	58 (77,33%)	0,759
	<b>IVb подгруппа</b> (без ПГТ-А), n = 89	14,0 [12;15]		28,5 [27; 30]		4,51 [3;6]		22 (22,47%)		67 (75,28%)	

Примечание. \* данные представлены в виде Me (L;H) , где Me – медиана, L – 25-й квартиль, H – 75-й квартиль;

\*\* данные представлены в виде абсолютных и процентных значений.

Данные акушерского анамнеза женщин с вторичным бесплодием, включая количество женщин с ранними репродуктивными потерями, внематочными беременностями, преждевременными и своевременными родами в анамнезе, представлены в Таблице 4. Во всех подгруппах за исключением IIa и IIb подгрупп отмечалось преобладание женщин с наличием своевременных родов в анамнезе, что является закономерным, учитываяотягощенный акушерский анамнез у женщин с привычным невынашиванием беременности. Процент женщин с наличием своевременных родов в Ia-подгруппе составил 85,97% (49/57), в Ib подгруппе – 87,50% (42/48) и не имел статистически значимых различий ( $p = 0,818$ ). В то время как в IIa-подгруппе процент женщин со своевременными родами в анамнезе составил лишь 31,12% (28/90) и был сопоставим с данными в IIb подгруппе – 36,90% (31/84),  $p = 0,420$ . Среди супружеских пар с повторными неудачами ВРТ примерно у половины женщин были зарегистрированы своевременные роды – 58,18% (32/55) в IIIa подгруппе и 57,35% (39/68) в IIIb подгруппе, без статистически значимых различий ( $p = 0,927$ ). Среди супружеских пар с тяжелой патозооспермией процент женщин с наличием своевременных родов в анамнезе был статистически значимо выше в подгруппе с ПГТ-А (IVa подгруппа) – 88,57% (31/35) по сравнению с данными подгруппы без ПГТ-А (IVb подгруппа) – 72,34% (34/47),  $p = 0,073$ .

Процент женщин с ранними репродуктивными потерями в анамнезе в Ia и Ib подгруппах составил 57,89% (33/57) и 54,17% (26/48) соответственно и не имел статистически значимых различий ( $p = 0,702$ ). В IIa и IIb подгруппах у всех пациенток были зарегистрированы ранние репродуктивные потери в анамнезе. Процент женщин с ранними репродуктивными потерями в IIIa и IIIb подгруппах также был сопоставим и составил 34,55% (19/55) и 30,88% (21/68) соответственно ( $p = 0,667$ ), в IVa и IVb подгруппах – 22,86% (8/35) и 23,40% (11/47) соответственно без статистически значимых различий ( $p = 0,954$ ). При этом максимальное количество невынашиваний в анамнезе не превышало 1 во всех подгруппах за исключением женщин с привычным невынашиванием

беременности. Среди которых среднее количество ранних репродуктивных потерь в IIa подгруппе составило 3 [3;4] и 3 [3;4] – в IIb подгруппе ( $p = 0,772$ ).

Таблица 4. Данные акушерского анамнеза женщин с вторичным бесплодием

		Женщины с ранними репродуктивными потерями в анамнезе, n (%)*	P <sub>1</sub>	Количество ранних репродуктивных потерь в анамнезе, Me [L;H], (min-max)**	P <sub>2</sub>	Женщины с внематочными беременностями в анамнезе, n (%)*	P <sub>3</sub>	Женщины с преждевременными родами в анамнезе, n (%)*	P <sub>4</sub>	Женщины со своевременными родами в анамнезе, n (%)*	P <sub>5</sub>
I группа (старший репродуктивный возраст)	Ia подгруппа (с ПГТ-А) n = 57	33 (57,89%)	0,702	1 [0;1] (0 – 1)	0,103	0 (0,00%)	0,120	1 (3,03%)	0,028	49 (85,97%)	0,818
	Ib подгруппа (без ПГТ-А) n = 48	26 (54,17%)		1 [0;1] (0 – 1)		2 (4,16%)		6 (12,50%)		42 (87,50%)	
II группа (привычное невынашивание)	IIa подгруппа (с ПГТ-А) n = 90	90 (100,00%)	1,000	3 [3;4] (2 – 5)	0,772	2 (2,22%)	0,359	7 (7,78%)	0,874	28 (31,12%)	0,420
	IIb подгруппа (без ПГТ-А) n = 84	84 (100,00%)		3 [3;4] (2 – 7)		4 (4,76%)		6 (7,14%)		31 (36,90%)	
III группа (повторные неудачные попытки ВРТ)	IIIa подгруппа (с ПГТ-А) n = 55	19 (34,55%)	0,667	0 [0;1] (0 – 1)	0,894	2 (3,63%)	0,439	3 (05,45%)	0,919	32 (58,18%)	0,927
	IIIb подгруппа (без ПГТ-А) n = 68	21 (30,88%)		0 [0;1] (0 – 1)		1 (1,47%)		4 (5,89%)		39 (57,35%)	
IV группа (тяжелая пагозоостермия)	IVa подгруппа (с ПГТ-А) n = 35	8 (22,86%)	0,954	1 [0;1] (0 – 1)	0,846	0 (0,00%)	0,047	0 (0,00%)	0,386	31 (88,57%)	0,073
	IVb подгруппа (без ПГТ-А) n = 47	11 (23,40%)		1 [0;1] (0 – 1)		5 (10,6%)		1 (2,13%)		34 (72,34%)	

Примечание.\* данные представлены в виде абсолютных и процентных значений; \*\* данные представлены в виде Me (L;H) , где Me – медиана, L – 25-й квартиль, H – 75-й квартиль; p<sub>1</sub> - стат. значимость различий в частоте ранних репродуктивных потерь; p<sub>2</sub> - стат. значимость различий в количестве невынашиваемей; p<sub>3</sub> - стат. значимость различий в частоте внематочных беременностей; p<sub>4</sub> - стат. знач. различий в частоте преждевременных родов; p<sub>5</sub> - стат. знач. различий в частоте своевременных родов

Данные о количестве неудачных попыток имплантации в программах ВРТ представлены в Таблице 5. Исходя из данных таблицы более чем у половины пациенток в Ia и Ib подгруппах отмечались неудачные попытки переноса эмбрионов в программах ВРТ (56,98% и 51,90%, соответственно,  $p = 0,513$ ). Такой высокий процент женщин с неудачными попытками ВРТ в анамнезе может объясняться возрастом женщин, а также более длительным бесплодием по сравнению с женщинами других групп. Во II и IV группах процент женщин с неудачными попытками имплантации был гораздо меньше и составил в IIa и IIb подгруппах 21,11% и 17,86%, соответственно ( $p = 0,589$ ), в IVa и IVb подгруппах – 32,00% и 34,83%, соответственно ( $p = 0,703$ ). При этом, у большинства пациенток I, II, и III групп выявлено не более одной неудачной попытки имплантации в анамнезе. В то время как у всех пациенток IIIa и IIIb подгрупп зарегистрировано 3 и более неудачных попыток имплантации, а медианы количества неудачных попыток имплантации в данных подгруппах составили 5 [3; 6] и 5 [3; 7], соответственно ( $p = 0,527$ ), максимальное количество неудачных попыток имплантации в IIIa подгруппе – 8, в IIIb подгруппе – 7. Таким образом основные и соответствующие им подгруппы сравнения были сопоставимы между собой по количеству неудачных попыток ВРТ.

Таблица 5. Данные о количестве повторных неудачных попыток имплантации у женщин, включенных в исследование

		Наличие неудачных попыток имплантации в анамнезе	$p_1$	1 неудачная попытка имплантации	$p_2$	2 неудачных попытки имплантации	$p_3$	3 и более неудачных попыток имплантации	$p_4$
<b>I группа</b> (старший репродуктивный возраст)	<b>Ia</b> подгруппа (с ПГТ-А), n = 86	49 (56,98%)	0,513	32 (65,30%)	0,672	17 (34,69%)	0,672	0 (0,00%)	1,000
	<b>Ib</b> подгруппа (без ПГТ-А), n = 79	41 (51,90%)		25 (60,98%)		16 (39,02%)		0 (0,00%)	
<b>II группа</b> (привычное невынашивание)	<b>IIa</b> подгруппа (с ПГТ-А), n = 90	19 (21,11%)	0,589	15 (89,47%)	0,940	4 (21,05%)	0,922	0 (0,00%)	1,000
	<b>IIb</b> подгруппа (без ПГТ-А), n = 84	15 (17,86%)		12 (80,00%)		3 (20,00%)		0 (0,00%)	
<b>III группа</b> (повторные неудачные попытки ВРТ)	<b>IIIa</b> подгруппа (с ПГТ-А), n = 72	72 (100,00%)	1,000	0 (0,00%)	1,000	0 (0,00%)	1,000	100%	1,000
	<b>IIIb</b> подгруппа (без ПГТ-А), n = 96	96 (100,00%)		0 (0,00%)		0 (0,00%)		100%	
<b>IV группа</b> (тяжелая патозооспермия)	<b>IVa</b> подгруппа (с ПГТ-А), n = 75	24 (32,00%)	0,703	21 (87,50%)	0,965	3 (12,50%)	0,878	0 (0,00%)	1,000
	<b>IVb</b> подгруппа (без ПГТ-А), n = 89	31 (34,83%)		27 (87,10%)		3 (9,68%)		0 (0,00%)	

Примечание. Данные представлены в виде абсолютных и процентных значений;  $p_1$  – статистическая значимость различий в количестве женщин с неудачными попытками имплантации,  $p_2$  – статистическая значимость различий в количестве женщин с одной неудачной попыткой имплантации,  $p_3$  – статистическая значимость различий в количестве женщин с двумя неудачными попытками имплантации,  $p_4$  – статистическая значимость различий в количестве женщин с тремя и более неудачными попытками имплантации

Данные о гинекологических заболеваниях у женщин, участвующих в



исследовании, представлены в Таблице 6. В целом основные и соответствующие им подгруппы сравнения были сопоставимы по количеству женщин с сальпингоофоритом, миомой матки, наружным генитальным эндометриозом и кистами яичников в анамнезе. Среди женщин старшего репродуктивного возраста процент пациенток с гинекологической патологией в анамнезе был довольно высоким и составил 74,42% (64/86) в Ia-подгруппе и 75,95% (65/79) в Ib подгруппе ( $p = 0,223$ ), что является закономерным, принимая во внимание отягощение анамнеза по мере увеличения возраста женщины. В остальных группах количество женщин с гинекологической патологией было значительно ниже. У пациенток с привычным невынашиванием беременности в IIa-подгруппе – 47,78% (43/90), в IIb-подгруппе – 48,81% (41/84),  $p = 0,892$ . У женщин с повторными неудачами ВРТ в IIIa-подгруппе – 40,28% (29/72), в IIIb-подгруппе – 43,75% (42/96),  $p = 0,653$ . У супружеских пар с тяжелой патозооспермией процент женщин с гинекологическими заболеваниями в анамнезе был значительно ниже: в IVa-подгруппе – 25,33% (19/75), в IVb-подгруппе – 19,10% (17/89),  $p = 0,337$ . По-видимому, это связано с более молодым возрастом женщин в данных подгруппах, а также с тем, что у подавляющего большинства супружеских пар бесплодие ассоциировано с нарушениями мужского репродуктивного здоровья.

**Таблица 6. Данные о гинекологических заболеваниях женщин, включенных в исследование**

		Хронический сальпингоофорит	$p_1$	Миома матки	$p_2$	Наружный генитальный эндометриоз	$p_3$	Кисты яичников	$p_4$
<b>I группа</b> (старший репродуктивный возраст)	<b>Ia подгруппа</b> (с ПГТ-А), n = 86	24 (27,90%)	0,573	19 (22,09%)	0,929	21 (23,60%)	0,957	11 (12,80%)	0,784
	<b>Ib подгруппа</b> (без ПГТ-А) n = 79	19 (25,00%)		17 (21,52%)		19 (24,05%)		9 (11,39%)	
<b>II группа</b> (привычное невынашивание беременности)	<b>IIa подгруппа</b> (с ПГТ-А) n = 90	24 (26,67%)	0,651	15 (16,67%)	0,665	17 (18,89%)	<b>0,033</b>	5 (5,56%)	0,668
	<b>IIb подгруппа</b> (без ПГТ-А) n = 84	25 (29,42%)		12 (14,29%)		6 (07,59%)		6 (7,14%)	

<b>III группа</b> (повторные неудачные попытки имплантации)	<b>IIIa подгруппа</b> (с ПГТ-А) n = 72	19 (26,39%)	0,719	10 (13,89%)	0,792	12 (16,67%)	0,332	4 (5,56%)	0,922
	<b>IIIb подгруппа</b> (без ПГТ-А) n = 96	23 (24,10%)		12 (12,50%)		11 (11,46%)		5 (5,21%)	
<b>IV группа</b> (тяжелая патозоспермия)	<b>IVa подгруппа</b> (с ПГТ-А) n = 75	11 (14,67%)	0,375	6 (8,00%)	0,822	4 (05,33%)	<b>0,053</b>	2 (2,68%)	0,794
	<b>IVb подгруппа</b> (без ПГТ-А) n = 89	9 (10,11%)		8 (8,99%)		13 (14,61%)		3 (3,37%)	

Примечание. Данные представлены в виде абсолютных и процентных значений;  $p_1$  – статистическая значимость различий в количестве женщин с сальпингофоритом,  $p_2$  – статистическая значимость различий в количестве женщин с миомой матки,  $p_3$  – статистическая значимость различий в количестве женщин с наружным генитальным эндометриозом,  $p_4$  – статистическая значимость различий в количестве женщин с кистами яичников в анамнезе

Оперативные вмешательства на органах малого таза в Ia и Ib подгруппах были проведены более чем у половины пациенток: 54,65% (47/86) и 51,90% (41/79). В остальных группах данные показатели были ниже и составили: в IIa и IIb подгруппах – 31,11% (28/90) и 29,76% (25/84), в IIIa и IIIb подгруппах – 26,39% (19/72) и 23,96% (23/96), в IVa и IVb подгруппах – 17,33% (13/75) и 20,23% (18/89), что также объясняется более молодым возрастом женщин в данных подгруппах.

Показатели гормонального статуса исследуемых женщин представлены в Таблице 7. Согласно данным таблицы, уровни гормонов пациенток, участвовавших в исследовании, не имели статистически значимых различий между основными подгруппами и подгруппами сравнения. А также не выходили за пределы нормативных показателей, за исключением уровней гормонов у пациенток Ia и Ib подгрупп. Минимальные и максимальные значения ФСГ в Ia подгруппе составили 3,9 мЕд/мл и 15,2 мЕд/мл, в Ib подгруппе – 4,2 мЕд/мл и 16,7 мЕд/мл. Процент пациенток с уровнем АМГ ниже 1,2 нг/мл в Ia и Ib составили 48,84% (42) и 53,16% (42) соответственно, во IIa и IIb – 7,78% (7) и 5,95% (5), в IIIa и IIIb подгруппах – 5,56% (4), 5,21% (5), в IVa и IVb подгруппах – 2,67% (2), 3,37% (3).

**Таблица 7. Показатели гормонального профиля пациенток, включенных в исследование**

		ФСГ мМЕ/мл	p <sub>1</sub>	ЛГ мМЕ/мл	p <sub>2</sub>	Е2 пмоль/л	p <sub>3</sub>	АМГ нг/мл	p <sub>4</sub>
<b>I группа</b> (старший репродуктивный возраст)	<b>Ia подгруппа</b> (с ПГТ-А) n = 86	9,45 [7,50; 12,00]	0,622	5,7 [4,1; 7,6]	0,533	84 [71 – 112]	0,631	1,45 [1,09; 1,97]	0,796
	<b>Ib подгруппа</b> (без ПГТ-А) n = 79	10,02 [8,10; 12,98]		6,1 [3,9; 8,0]		90 [74 – 126]		1,25 [1,06; 1,73]	
<b>II группа</b> (привычное невынашивание)	<b>IIa подгруппа</b> (с ПГТ-А) n = 90	7,5 [5,47; 9,63]	0,784	5,1 [3,5; 7,1]	0,891	162 [132 – 374]	0,420	3,1 [2,34; 3,78]	0,833
	<b>IIb подгруппа</b> (без ПГТ-А) n = 84	8,12 [5,48; 9,42]		5,8 [3,0; 8,2]		157 [106 – 325]		3,4 [2,4; 3,7]	
<b>III группа</b> (повторные неудачные попытки ВРТ)	<b>IIIa подгруппа</b> (с ПГТ-А) n = 72	8,6 (5,9; 8,45)	0,682	8,3 [4,8; 10,9]	0,781	124 [76 – 289]	0,765	3,45 [2,0; 4,25]	0,925
	<b>IIIb подгруппа</b> (без ПГТ-А) n = 96	7,4 [5,4; 8,45]		8,9 [4,1; 11,5]		116 [79 – 241]		3,05 [2,1; 3,53]	
<b>IV группа</b> (тяжелая патозооспермия)	<b>IVa подгруппа</b> (с ПГТ-А) n = 75	7,5 [5,7; 8,45]	0,837	6,7 [4,2; 8,6]	0,831	96 [74 – 116]	0,526	2,8 [2,1; 3,5]	0,906
	<b>IVb подгруппа</b> (без ПГТ-А) n = 89	7,9 [5,7; 8,55]		6,2 [3,9; 8,1]		90 [73 – 198]		2,4 [2,1; 3,5]	
<b>Нормативные показатели</b>		3,0 – 10,0		2,4 – 12,6		73 – 587		1,2 – 4,5	

Примечание. Данные представлены в виде Me (Q1; Q3), где Me – медиана, Q1 – 25-й квартиль, Q3 – 75-й квартиль. P<sub>1</sub> – статистически значимые различия в уровнях ФСГ, p<sub>2</sub> – статистически значимые различия в уровнях ЛГ, p<sub>3</sub> – статистически значимые различия в уровнях Е2, p<sub>4</sub> – статистически значимые различия в уровнях АМГ

В день проведения трансвагинальной пункции яичников у всех мужчин, участвующих в исследовании, проводилось спермиологическое исследование эякулята. Показатели спермограммы представлены в Таблице 8. Концентрация сперматозоидов в 1 мл, процент прогрессивно-подвижных

сперматозоидов, процент патологических форм сперматозоидов были сопоставимы между всеми основными и соответствующими подгруппами сравнения. В группах женщин старшего репродуктивного возраста, с привычным невынашиванием беременности, повторными неудачными попытками имплантации вышеперечисленные показатели спермограммы в большинстве случаев находились в пределах нормативных значений. В группе женщин старшего репродуктивного возраста у 5,45% (9/165) мужчин отмечались не критичные отклонения в показателях спермограммы, в группе женщин с привычным невынашиванием беременности этот процент составил – 13,22% (23/174), в группе пациенток с повторными неудачными попытками имплантации – 26,79% (45/168). Среди мужчин с тяжелой патозооспермией у всех пациентов показатели спермограммы были значительно ниже нормальных значений: концентрация сперматозоидов  $\leq 5$  млн/мл, процент прогрессивно-подвижных сперматозоидов  $\leq 19\%$ , процент патологических форм сперматозоидов  $\geq 99\%$ . В большинстве случаев была диагностирована олигоастенотератозооспермия – 92,07% (151/164), в остальных случаях олиготератозооспермия – 7,93% (13/164).

**Таблица 8. Показатели спермограммы у мужчин, включенных в исследование**

Параметры	I группа (старший репродуктивный возраст женщины)			II группа (привычное невынашивание)			III группа (повторные неудачные попытки имплантации)			IV группа (тяжелая патозооспермия)		
	Ia подгруппа, n=86	Ib подгруппа, n=79	p (Ia vs Ib)	IIa подгруппа, n=90	IIb подгруппа, n=84	p (IIa vs IIb)	IIIa подгруппа, n=72	IIIb подгруппа, n=96	p (IIIa vs IIIb)	IVa подгруппа, n=75	IVb подгруппа, n=89	p (IVa vs IVb)
Концентрация сперматозоидов (млн/мл)	61 [33; 95,75]	60,5 [34; 91,5]	0,831	64 [42; 95,75 ]	64 [42; 96,25]	0,922	59 [42,75 ; 87]	60 [43,75 ; 85,5]	0,652	3 [2;4]	3 [2;4]	0,723
Прогрессивно- подвижные сперматозоиды a+b (%)	42 [37;46 ]	42 [36; 45]	0,411	42 [37; 48,75 ]	42 [36,75 ]	0,862	38 [36,75 ; 47]	38 [36,75 ; 46,25]	0,338	13 [11;1 7]	13,5 [10,5; 17]	0,941

<b>Патологические формы сперматозоидов (%)</b>	89 [87; 92]	90 [88;92 ]	0,455	89 [86; 91]	90 [86,75 ; 92]	0,144	91 [89; 92]	91 [89;93 ]	0,175	99 [99; 100]	99 [100;1 00]	0,070
--	-------------------	-------------------	-------	-------------------	-----------------------	-------	-------------------	-------------------	-------	--------------------	---------------------	-------

Примечание. Данные представлены в виде Me [L; H], где Me – медиана, L – 25-й квартиль, H – 75-й квартиль

Таким образом, основные и соответствующие им подгруппы сравнения среди женщин старшего репродуктивного возраста, с привычным невынашиванием беременности, повторными неудачными попытками имплантации и супружеских пар с тяжелой патозооспермией, в целом были сопоставимы по возрасту женщины, ИМТ, характеру менструальной функции, длительности, факторам бесплодия, количеству неудачных попыток имплантации в анамнезе, данным акушерского и гинекологического анамнезов, показателям гормонального профиля и спермограммы.

## **3.2 Анализ параметров стимулированных циклов, гаметогенеза, раннего эмбриогенеза и исходов криоциклов в программах**

### **ЭКО/ICSI с ПГТ-А и без ПГТ-А**

#### **3.2.1 Анализ параметров стимулированных циклов, гаметогенеза и раннего эмбриогенеза в основных группах и группах сравнения**

С целью анализа эффективности программ ЭКО в подгруппах с ПГТ-А и соответствующих им подгруппах без ПГТ-А была проведена оценка показателей овариальной стимуляции (тип протокола, стартовая и суммарная доза гонадотропинов, длительность стимуляции) и эмбриологического этапа (количество зрелых ооцитов и зигот, метод оплодотворения, количество и качество бластоцист). Также были проанализированы результаты ПГТ-А в группе наблюдения. Анализ исходов программ ВРТ был проведен на основании результатов криоциклов в основных группах и группах сравнения.

Параметры стимулированных циклов и раннего эмбриогенеза представлены в Таблице 9. При анализе параметров «свежих» циклов выявлено, что в подавляющем числе случаев использовался протокол стимуляции яичников с антГнРГ: в Ia и Ib подгруппах доля данного вида стимуляции составила 100,00% (97/97) и 100,00% (104/104), соответственно (р

= 1,000), в IIa и IIb подгруппах – 99,16% (118/119) и 100,00% (102/102) соответственно ( $p = 0,354$ ), в IIIa и IIIb подгруппах 95,28% (101/106) и 96,70% (88/91) соответственно ( $p = 0,615$ ), в IVa и IVb подгруппах – 100,00% (89/89) и 100,00% (93/93) соответственно ( $p = 1,000$ ). Исходя из данных Таблицы 9 стартовые и суммарные дозы гонадотропинов были сопоставимы во всех основных и соответствующих им подгруппах сравнения. Среди женщин старшего репродуктивного возраста в обеих подгруппах средние значения доз гонадотропинов были максимально высокими и составили в Ia-подгруппе 300 [225; 325], в Ib-подгруппе – 300 [225; 300], что является закономерным, учитывая снижение овариального резерва по мере увеличения возраста женщин. У всех пациенток в Ia и Ib подгруппах схема стимуляции овуляции включала комбинацию рФСГ и менотропинов: 100,00% (97/97) и 100,00% (104/104) соответственно ( $p = 1,000$ ). В IIa и IIb подгруппах также в большинстве случаев применялась комбинация рФСГ и менотропинов: 61,34% (73/119) и 63,73% (65/102), соответственно ( $p = 0,716$ ), доли протоколов с использованием рФСГ составили 36,97% (44/119) и 35,29% (36/102), соответственно ( $p = 0,796$ ), и несколько протоколов были проведены с использованием корифоллитропин альфа 1,68% (2/119) и 0,01% (1/102) соответственно ( $p = 0,654$ ).

Таблица 9. Параметры стимулированных циклов, оогенеза и раннего эмбриогенеза у супружеских пар, включенных в исследование (ретроспективный этап)

Параметры	I группа (старший репродуктивный возраст женщины)			II группа (привычное невынашивание)			III группа (повторные неудачные попытки имплантации)			IV группа (тяжелая патозооспермия)		
	Ia подгруппа (с ПГТ-А), n=97	Ib подгруппа (без ПГТ- А), n=104	p (Ia vs Ib)	IIa подгруппа (с ПГТ-А), n=119	IIb подгруппа (без ПГТ- А), n=102	p (IIa vs IIb)	IIIa подгруппа (с ПГТ-А), n=106	IIIb подгруппа (без ПГТ- А), n=91	p (IIIa vs IIIb)	IVa подгруппа (с ПГТ-А), n=89	IVb подгруппа (без ПГТ- А), n=93	p (IVa vs IVb)
Стартовая доза гонадотропина, МЕ (Ме [L; H])	300 [225; 325]	300 [225; 300]	0,782	150 [150; 225]	150 (75; 225)	0,238	225 [225; 300]	225 [150; 300]	0,184	150 [150; 300]	150 [75; 225]	0,063
Суммарная доза гонадотропина, МЕ (Ме [L; H])	2645 [1500; 3150]	2530 [1500; 3000]	0,326	1500 [1425; 2250]	1575 (1350; 2325)	0,081	1650 [1425; 2400]	1725 [1350; 2175]	0,094	1275 [1050; 1800]	1350 [1125; 1875]	0,214
Продолжительность стимуляции, дни (Ме [L;H])	10,5 [9; 12]	11,25 [9; 12]	0,294	9,5 [9;11,5]	10,25 [9;11]	0,072	8,75 [8; 10]	9,00 [8;10,5]	0,736	9,25 [8;11]	9,75 [8;11]	0,892
Число ОКК Ме [L; H]	6 [5; 7]	6 [5;8]	0,353	13 [8;16]	13 [9,5; 16]	0,981	12 [8;14]	12 [8;13,25]	0,834	13 [9,5; 15]	13 [9,75; 14;25]	0,558
Количество зрелых ооцитов Ме [L; H]	5 [4; 6]	5 [4;6]	0,776	11 [6; 13]	11 [6; 13,25]	0,781	9 [6;11]	8 [6;11]	0,901	10 [6; 13]	10 [6; 12]	0,556
Количество зигот Ме [L; H]	4 [3;5]	4 [3; 5]	0,843	9 [5; 11]	8 [5;10]	0,238	7 [4;8]	7 [4,75; 8,25]	0,919	8 [4; 10]	7,5 [4; 9,25]	0,103
Количество бластоцист Ме [L; H]	3 [2; 4]	3 [2;4]	0,693	6 [4; 7,25]	6 [4;8]	0,849	5 [3;7]	5 [3,75; 7]	0,391	6 [3; 8]	5,5 [3;7]	0,291
Количество бластоцист хорошего и отличного качества Ме [L; H]	2 [1; 3]	2 [1;3]	0,658	3 [2;5]	3 [2;5]	0,569	3 [2;4]	3 [1,75; 4]	0,842	3 [1; 4]	2,5 [1,4]	0,383

Примечание. Данные представлены в виде Ме (Q1; Q3), где Ме – медиана, Q1 – 25-й квартиль, Q3 – 75-й квартиль

В IIIa и IIIb подгруппах доли протоколов с использованием комбинации рФСГ и менотропинов составили: 76,42% (81/106) и 74,73% (68/91), соответственно ( $p = 0,783$ ), доли протоколов с применением рФСГ – 19,81% (21/106) и 21,98% (20/91) соответственно ( $p = 0,709$ ), доли протоколов с использованием корифоллитропин альфа – 3,77% (4/106) и 3,29% (3/91), соответственно. В IVa и IVb подгруппах также в большинстве случаев использовалась комбинация рФСГ и менотропинов: 71,91% (64/89) и 77,42% (72/93), соответственно ( $p = 0,393$ ), рФСГ применялся в 23,60% (21/89) и 21,51% (20/93) случаев ( $p = 0,736$ ), а препарат корифоллитропин альфа в 4,49% (4/89) и 1,08% (1/93) соответственно ( $p = 0,159$ ). Таким образом, во всех группах женщин в качестве гонадотропной стимуляции в большинстве случаев использовалась комбинация рФСГ и менотропинов, однако в группе женщин старшего репродуктивного возраста этот процент был наиболее высоким, что объясняется более низким овариальным резервом у пациенток данной возрастной группы.

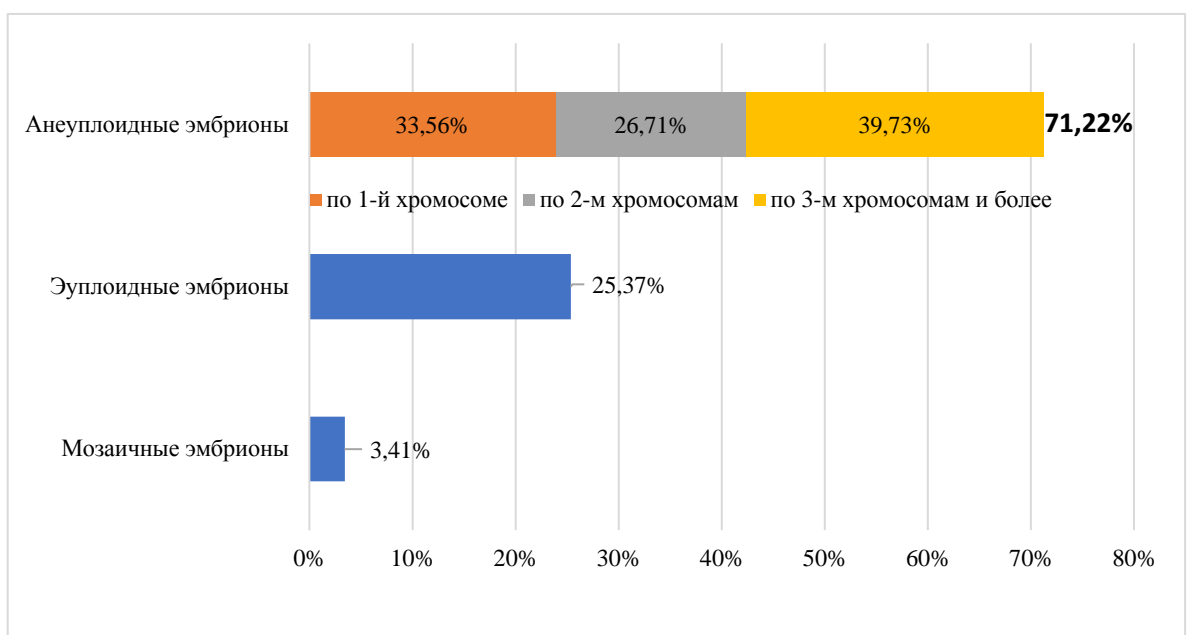
В результате анализа эмбриологического этапа не было выявлено статистически значимых различий между основными подгруппами и подгруппами сравнения в количестве ОКК, зрелых ооцитов, зигот, бластоцист и их качестве. Выбор способа оплодотворения осуществлялся на основании данных спермограммы и результатов предыдущих программ ВРТ. В результате ретроспективного анализа параметров эмбриологического этапа, выявлены статистически значимые различия в методе оплодотворения между основными подгруппами и подгруппами сравнения в I, II, и III группах. Так доля протоколов с оплодотворением методом ICSI была выше в Ia-подгруппе по сравнению с таковой в Ib-подгруппе и составили: 94,85% (92/97) и 71,15% (74/104) ( $p < 0,001$ ). В IIa-подгруппе доля протоколов с оплодотворением методом ICSI также преобладала по сравнению с таковой в IIb-подгруппе: 62,18% (74/119) и 27,45% (21/102) ( $p < 0,001$ ). В IIIa и IIIb подгруппах доли протоколов с оплодотворением методом ICSI составили: 73,58% (78/106) и 46,15% (42/91) ( $p < 0,001$ ). В IVa и IVb подгруппах не было выявлено



статистически значимых различий в методе оплодотворения, в обеих подгруппах во всех случаях оплодотворение проводилось методом ICSI: 100% (89/89) и 100% (93/93) ( $p=1,000$ ). Значимые различия в методе оплодотворения между подгруппами с ПГТ-А и соответствующими подгруппами без ПГТ-А у супружеских пар в I, II и III группах, по-видимому, связаны с устоявшимся мнением о целесообразности оплодотворения ооцитов методом ICSI при планировании ПГТ-А, так как снижается риск контаминации образца чужеродной ДНК сперматозоидов и кумулюсных клеток.

### 3.2.2 Анализ результатов ПГТ-А в подгруппах наблюдения

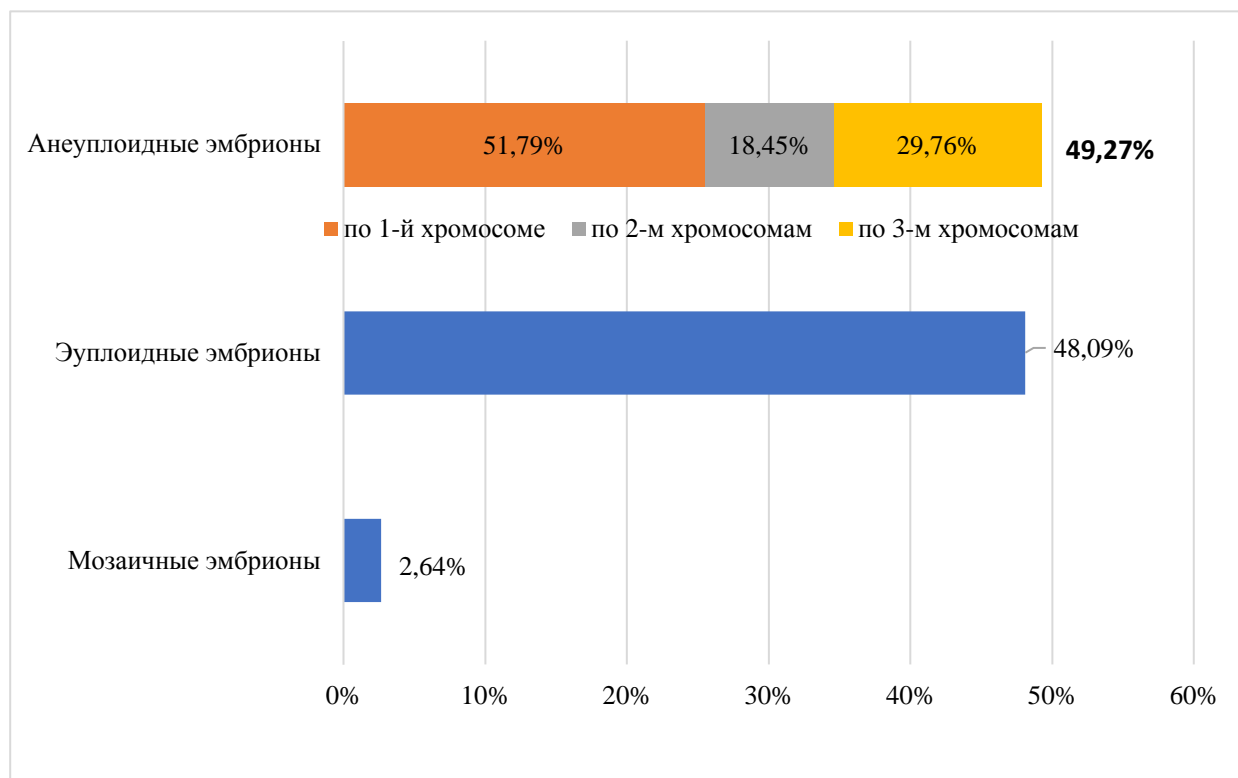
По результатам ПГТ-А у женщин старшего репродуктивного возраста из 205 эмбрионов хорошего и отличного качества 25,37% (52/205) были эуплоидными, 71,22% (146/205) – анеуплоидными, 3,41% (7/205) – мозаичными (рис.3). При этом 33,56% (49/146) эмбрионов включали хромосомные аномалии по 1-й хромосоме, 26,71% (39/146) – по 2-м хромосомам, 39,73% -- (58/146) по 3-м хромосомам и более. Корреляционный анализ показал наличие обратной зависимости между возрастом женщины и количеством эмбрионов, пригодных для проведения ПГТ-А ( $r = - 0.320$ ,  $p = 0.001$ ), а также наличие положительной корреляции между возрастом женщины и количеством анеуплоидных эмбрионов ( $r = 0.449$   $p= 0.042$ ).



**Рис. 3.** Результаты ПГТ-А у женщин старшего репродуктивного возраста

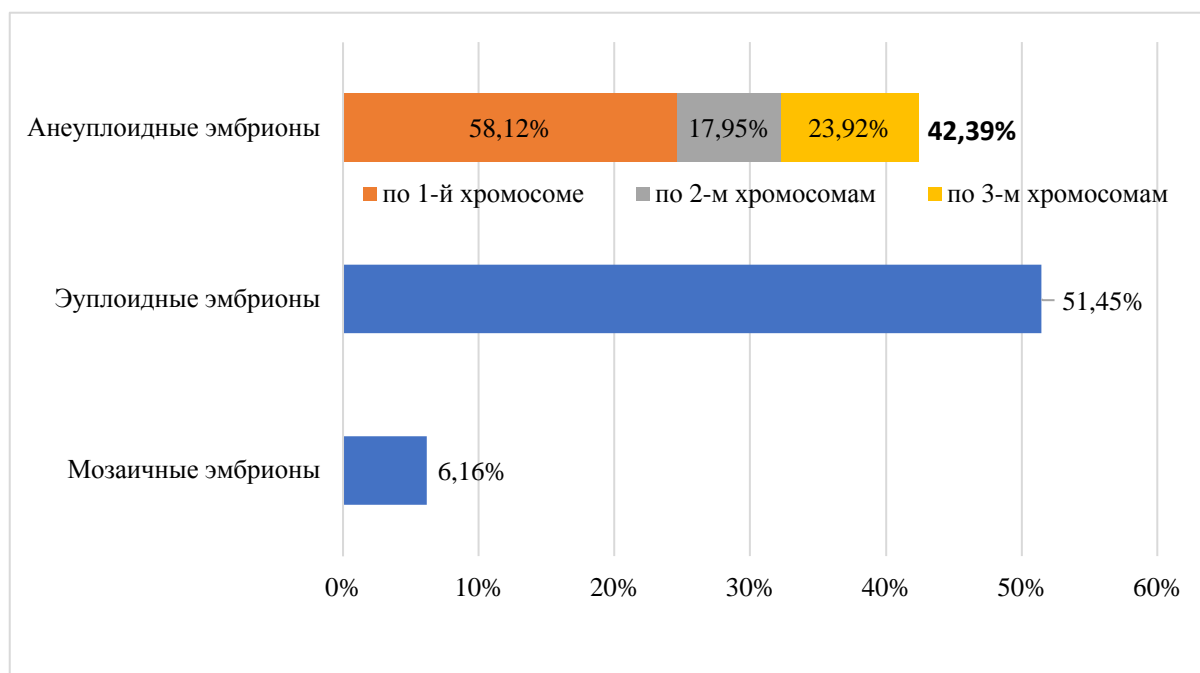
У супружеских пар с привычным невынашиванием беременности из 341 эмбриона хорошего и отличного качества 48,09% (164/341) были эуплоидными, 49,27% (168/341) – анеуплоидными, 2,64% (9/341) – мозаичными (Рис. 4).

По результатам ПГТ-А 51,79% (87/168) включали хромосомные аномалии по 1-й хромосоме, 18,45% (31/168) – по 2-м хромосомам, 29,76% (50/168) – по 3-м хромосомам.



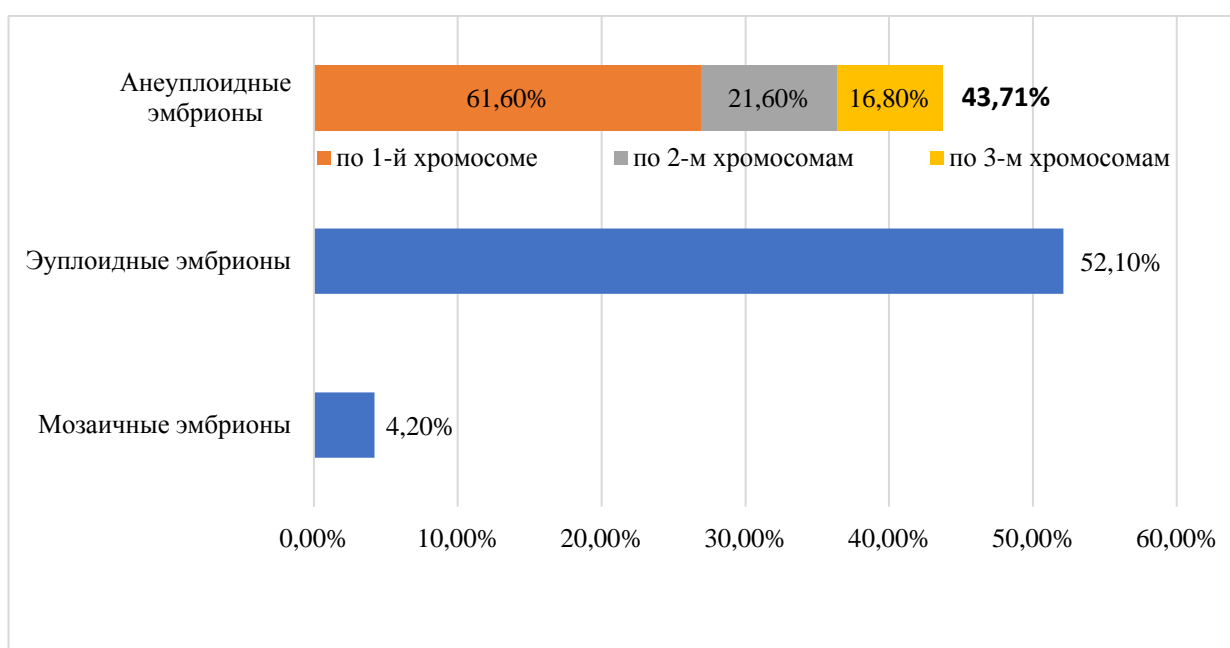
**Рис. 4.** Результаты ПГТ-А у супружеских пар с привычным выкидышем

У супружеских пар с повторными неудачными попытками имплантации из 276 эмбрионов хорошего и отличного качества 51,45% (142/276) были эуплоидными, 42,39% (117/276) – анеуплоидными, 6,16% (17/276) – мозаичными (Рис. 5). Анеуплоидные эмбрионы с хромосомными аномалиями по 1-й хромосоме составили 58,12% (68/117), по 2-м хромосомам – 17,95% (21/117), по 3-м хромосомам – 23,92% (28/117).



**Рис. 5.** Результаты ПГТ-А у супружеских пар с повторными неудачами ВРТ

У супружеских пар с тяжелой патозооспермией из 286 эмбрионов хорошего и отличного качества 52,10% (149/286) были эуплоидными, 43,71% (125/286) анеуплоидными, 4,20% (12/286) – мозаичными (рис.6). При этом 61,60% (77/125) анеуплоидных эмбрионов включали хромосомные аномалии по 1-й хромосоме, 21,60% (27/125) – по 2-м хромосомам, 16,80% (21/125) – по 3-м хромосомам.



**Рис. 6.** Результаты ПГТ-А у супружеских пар с тяжелой патозооспермией

Процент анеуплоидных эмбрионов во всех группах был высоким, но у женщин старшего репродуктивного возраста – максимальным. Наиболее часто отмечались анеуплоидии по 22 хромосоме (13,81%), 16 хромосоме (11,19%), X хромосоме (9,93%) и 18 хромосоме (9,57%). Кроме того, в группе старшего репродуктивного возраста большая часть анеуплоидных эмбрионов включала множественные хромосомные аномалии по 3-м и более хромосомам, тогда как в остальных группах пациентов большая часть анеуплоидных бластоцист характеризовалась наличием аномалий по 1 хромосоме, что может указывать на более значимые нарушения мейотического деления клеток с образованием множественных хромосомных аномалий у женщин старшего репродуктивного возраста по сравнению с пациентами остальных групп.

### **3.2.3 Клинические исходы криоциклов в группах с ПГТ-А и без ПГТ-А**

Исходы криоциклов у пациенток старшего репродуктивного возраста представлены в Таблице 10. Всего в Ia подгруппе было проанализировано 86 супружеских пар, 97 программ ЭКО/ICSI+ПГТ-А и 52 криоцикла. В Ib подгруппе – 79 супружеских пар, 104 программы ЭКО/ICSI без ПГТ-А и 61 криоцикл. По результатам анализа исходов 52 криоциклов в Ia подгруппе частота наступления клинической беременности составила 36,5% (19/52), биохимических беременностей зафиксировано не было. Доля ранних репродуктивных потерь составила 3/19 (15,8%). Также однократно были зарегистрированы преждевременные роды – 5,3% (1/19). Частота живорождения составила 84,2% (16/19). При анализе исходов в Ib подгруппе частота биохимических беременностей составила 1,6% (1/61), частота клинической беременности – 11,5% (7/61). Частота ранних репродуктивных потерь – 14,3% (1/7), частота живорождения – 71,4% (5/7). Также была зарегистрирована одна внематочная беременность – 14,3% (1/7). Таким образом, частота клинической беременности в Ia подгруппе была статистически значимо выше таковой в Ib подгруппе ( $p=0,002$ ; ОР (95% ДИ) =3,18 (1,45; 6,97)). Однако не было выявлено статистически значимого увеличения родов живым плодом в Ia подгруппе, по сравнению с Ib

подгруппой. Также не было выявлено статистически значимых различий в частоте ранних репродуктивных потерь. При этом частота ранних репродуктивных потерь увеличивалась по мере увеличения возраста женщины в Ia-подгруппе ( $r = 0,329$ ,  $p < 0,001$ ) и в Ib-подгруппе ( $r = 0,248$ ,  $p = 0,033$ ). А частота живорождения напротив снижалась по мере увеличения возраста женщины в Ia-подгруппе ( $r = - 0,426$ ,  $p < 0,001$ ) и в Ib-подгруппе ( $r = - 0,293$ ,  $p < 0,001$ ).

**Таблица 10. Исходы криоциклов у пациенток старшего репродуктивного возраста**

<b>Исследуемые параметры</b>	<b>Ia подгруппа (n=52)*</b>	<b>Ib подгруппа (n=61)*</b>	<b>ОР (95% ДИ)</b>	<b>p</b>
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)	<b>0,002</b>
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. \*число проведенных криоциклов; \*\* процент указан в расчете на число клинических беременностей.

Исходы криоциклов у пациенток с привычным невынашиванием представлены в Таблице 11. Всего в Ia-подгруппе было проанализировано 90 супружеских пар, 119 программ ЭКО/ICSI+ПГТ-А и 90 криоциклов. В Ib-подгруппе – 88 супружеских пар, 102 программ ЭКО/ICSI без ПГТ-А и 84 криоцикла. Частота наступления клинической беременности составила 31,1% (28/90), биохимической беременности – 2,2% (2/90). Частота ранних репродуктивных потерь составила 17,9% (5/28), частота преждевременных родов – 7,2% (2/28); частота живорождения – 82,1% (23/28). При анализе

исходов в IIb подгруппе частота биохимических беременностей составила 1,2% (1/84), частота клинической беременности – 28,6% (24/84); частота ранних репродуктивных потерь – 45,8% (11/24), частота преждевременных родов – 4,7% (1/24); частота живорождения – 50,0% (12/24). Таким образом, не было выявлено статистически значимых различий в частоте клинической беременности в IIa и IIb подгруппах. Частота живорождения в IIa подгруппе статистически значимо выше, по сравнению с IIb подгруппой ( $p=0,015$ ; ОР (95% ДИ) = 1,64 (1,06; 2,54)). Выявлено статистически значимое снижение частоты репродуктивных потерь в IIa подгруппе по сравнению с IIb подгруппой ( $p=0,031$ ; ОР (95% ДИ)=0,39 (0,16; 0,96)).

Таблица 11. **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)	<b>0,031</b>
Живорождение**	23 (82,1%)	12 (50,0%)	1,64 (1,06; 2,54)	<b>0,015</b>

Примечание. \*число проведенных криоциклов; \*\* процент указан в расчете на число клинических беременностей.

Исходы криоциклов у пациенток с повторными неудачными попытками имплантации представлены в Таблице 12. Всего в IIIa-подгруппе было проанализировано 80 супружеских пар, 106 программ ЭКО/ICSI+ПГТ-А и 88 криоциклов. В IIIb-подгруппе – 76 супружеских пар, 91 программа ЭКО/ICSI без ПГТ-А и 114 криоциклов. Частота наступления клинической беременности

в Ша-подгруппе составила 33,0% (29/88), биохимических беременностей зарегистрировано не было. Частота ранних репродуктивных потерь составила 6,9% (2/29); частота живорождения – 93,1% (27/29), среди них был зарегистрирован один случай рождения ребенка с врожденным пороком сердца (дефект межжелудочковой перегородки). При анализе исходов в Шб-подгруппе частота биохимических беременностей составила 3,5% (4/114), частота клинической беременности – 16,7% (19/114). Частота ранних репродуктивных потерь составила – 10,5% (2/19), частота живорождения – 89,5% (17/19). Таким образом, выявлено статистически значимое увеличение частоты клинической беременности в Ша подгруппе, по сравнению с таковой в Шб подгруппе ( $p=0,007$ ; ОР (95% ДИ) =1,98 (1,19; 3,28)). Частота живорождения и ранних репродуктивных потерь значимо не различались в основной подгруппе и подгруппе сравнения.

**Таблица 12. Исходы криоциклов у пациенток с повторными неудачными попытками имплантации**

<b>Исследуемые параметры</b>	<b>Ша подгруппа (n=88)*</b>	<b>Шб подгруппа (n=114)*</b>	<b>ОР (95% ДИ)</b>	<b>p</b>
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)	<b>0,007</b>
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. \*число проведенных криоциклов; \*\* процент указан в расчете на число клинических беременностей.

Исходы криоциклов у супружеских пар с тяжелой патозооспермией представлены в Таблице 13. Всего в IVa подгруппе было проанализировано 85

супружеских пар, 89 программ ЭКО/ICSI+ПГТ-А и 79 криоциклов. В IVb подгруппе – 92 супружеских пары, 93 программы ЭКО/ICSI без ПГТ-А и 98 криоциклов. Частота наступления клинической беременности в IVa подгруппе составила 37,97% (30/79), биохимических беременностей – 2,5% (2/79). Частота ранних репродуктивных потерь составила 10,0% (3/30), также был зарегистрирован один поздний выкидыш – 3,3% (1/30). Частота живорождения составила 90,0% (27/30). В IVb подгруппе частота наступления клинической беременности составила 36,73% (36/98). Биохимических беременностей диагностировано не было. Частота ранних репродуктивных потерь составила 13,9% (5/36), частота преждевременных родов – 2,8% (1/36), частота живорождения – 83,3% (30/36). Соответственно не было выявлено статистически значимых различий в частоте клинической беременности, а также в частоте ранних репродуктивных потерь и в частоте живорождения между IVa и IVb подгруппами.

**Таблица 13. Исходы криоциклов у пациенток с тяжелой патозооспермией партнера**

<b>Исследуемые параметры</b>	<b>IVa подгруппа (n=79)*</b>	<b>IVb подгруппа (n=98)*</b>	<b>ОР (95% ДИ)</b>	<b>p</b>
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. \*число проведенных криоциклов; \*\* процент указан в расчете на число клинических беременностей.



Таким образом, применение ПГТ-А в программах ВРТ у пациенток старшего репродуктивного возраста достоверно увеличивает вероятность наступления клинической беременности в 3 раза (OR = 3,18, 95% ДИ:1,45 – 6,97). Однако не было выявлено статистически значимого увеличения родов живым плодом в группе ПГТ-А по сравнению с группой без ПГТ-А (хи-квадрат 0,16,  $p=0,687$ ). Также проведение ПГТ-А в данной группе не снижает риск ранних репродуктивных потерь по сравнению с группой без ПГТ-А в данной группе пациентов (OR = 1,11, 95% ДИ 0,14 – 8,94).

У женщин с привычным невынашиванием применение ПГТ-А не влияет на частоту клинической беременности, но снижает риск ранних репродуктивных потерь в 2,5 раза по сравнению с группой без ПГТ-А (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,  $p = 0,015$ ). У пациенток с повторными неудачными попытками имплантации использование ПГТ-А увеличивает вероятность наступления клинической беременности по сравнению с группой без ПГТ-А в 2 раза (OR = 1,98, 95% ДИ 1,19 – 3,28). При этом частота живорождения ( $p = 0,660$ ) и ранних репродуктивных потерь ( $p = 0,660$ ) не различалась в обеих подгруппах. Среди супружеских пар с тяжелой патозооспермией использование ПГТ-А не оказало положительного влияния на частоту наступления клинической беременности, ранних репродуктивных потерь и живорождения.

### **3.3 Анализ профиля экспрессии мнкРНК в культуральной среде эмбрионов в зависимости от плоидности и имплантационного потенциала эмбрионов в программах ЭКО/ICSI+ПГТ-А**

На проспективном этапе исследования оценка клинико-лабораторных данных 73-х супружеских пар в исследуемых группах не выявила статистически значимых различий за исключением более длительного периода бесплодия в группе Ia в сравнении с группой Ib (Таблица 14). Супружеские пары с отсутствием имплантации при наличии эуплоидного эмбриона характеризовались более низкой концентрацией сперматозоидов по

сравнению с супружескими парами, у которых после переноса blastocysts беременность закончилась своевременными родами ( $p = 0,06$ ). При анализе особенностей менструального цикла, овариального резерва и гинекологического анамнеза в группах статистически значимых различий не выявлено.

Таблица 14. Клинико-лабораторные характеристики супружеских пар, обратившихся для проведения программы ЭКО/ICSI+ПГТ-А.

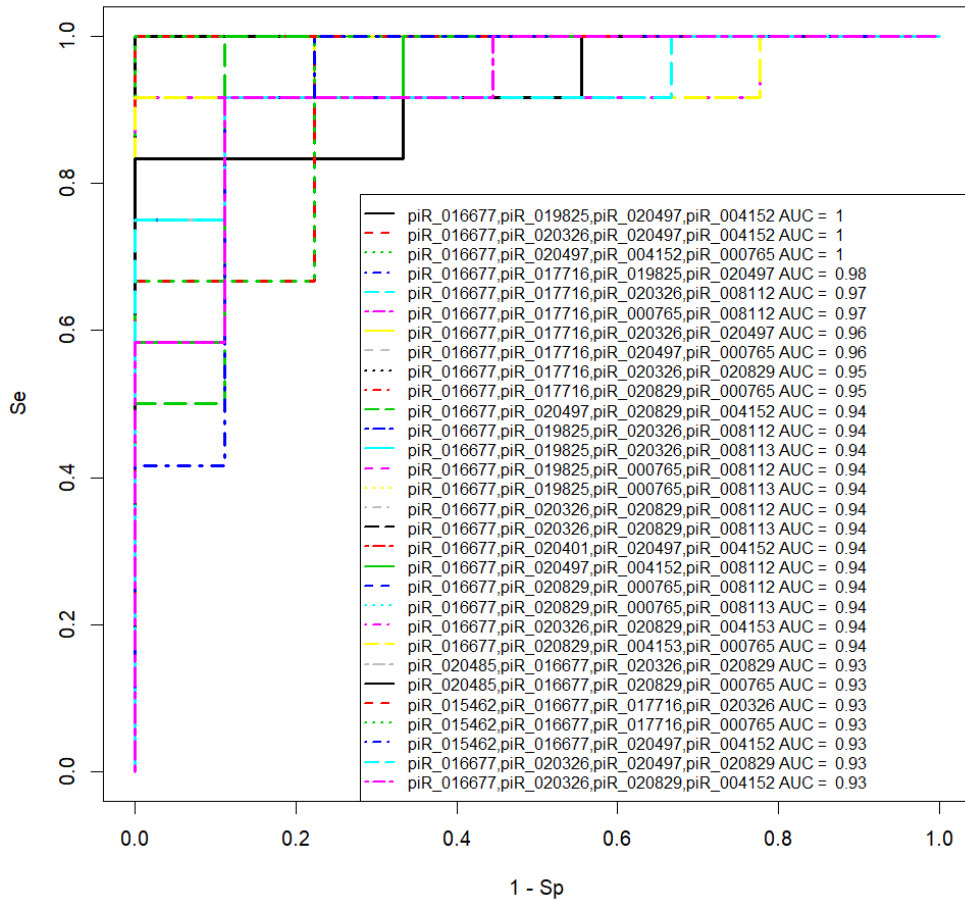
Изучаемые параметры	I группа (эуплоидные эмбрионы), n = 53			II группа (анеуплоидные эмбрионы), n = 40	Статистическая значимость, p, (Ia vs Ib)
	Ia (имплантация эмбриона, роды), n = 27	Ib (отсутствие имплантации эмбриона), n = 26	Статистическая значимость, p, (Ia vs Ib)		
Возраст женщины (количество лет)*	34(32;36,25)	32(32;34)	0,11	34(31,25;39)	0,26
Длительность бесплодия (количество лет)*	4(3;6,25)	3(2;4,75)	0,04	3(2,25;5,75)	0,63
Вторичное бесплодие**	16(55%)	13(50%)	0,2	26(65%)	0,1
Количество выкидышей в анамнезе*	0(0;1)	0(0;1)	0,49	1(0;1)	0,13
Количество неудачных попыток ВРТ*	1(0;3)	1(0;1)	0,23	1(0,25;1)	0,55
Показатели спермограммы					
Концентрация сперматозоидов (млн/мл)*	21,5(14;33)	15(12;20)	0,06	22(16;23)	0,16
Доля прогрессивно-подвижных форм сперматозоидов (a + b); %*	32,5(31,5;35,25)	32(28,5;38,25)	0,58	32(30,5;40,75)	0,56
Доля патологических форм сперматозоидов (%)*	94(90;98)	95,5(93,25;98,75)	0,16	94(92;97)	0,78
Показатели эмбриологического этапа					
Количество зрелых ооцитов*	9,5(7;14)	10,5(9;13,75)	0,35	9(6;10,75)	0,09
Количество зигот*	7(5;9)	8(7;9,75)	0,13	6(5;8)	0,20
Количество blastocysts на 5-е сутки культивирования*	5(3;6)	6(5;7)	0,12	4(3;6)	0,17

Примечание: \*Показатели представлены в виде Me(Q1;Q3); где Me – медиана; Q1 – 25-й квартиль; Q3 – 75-й квартиль;

\*\* Данные представлены как абсолютные числа N и процентные доли от общего числа пациенток в группе в формате N(%) с указанием значимости отличий при использовании критерия Фишера.

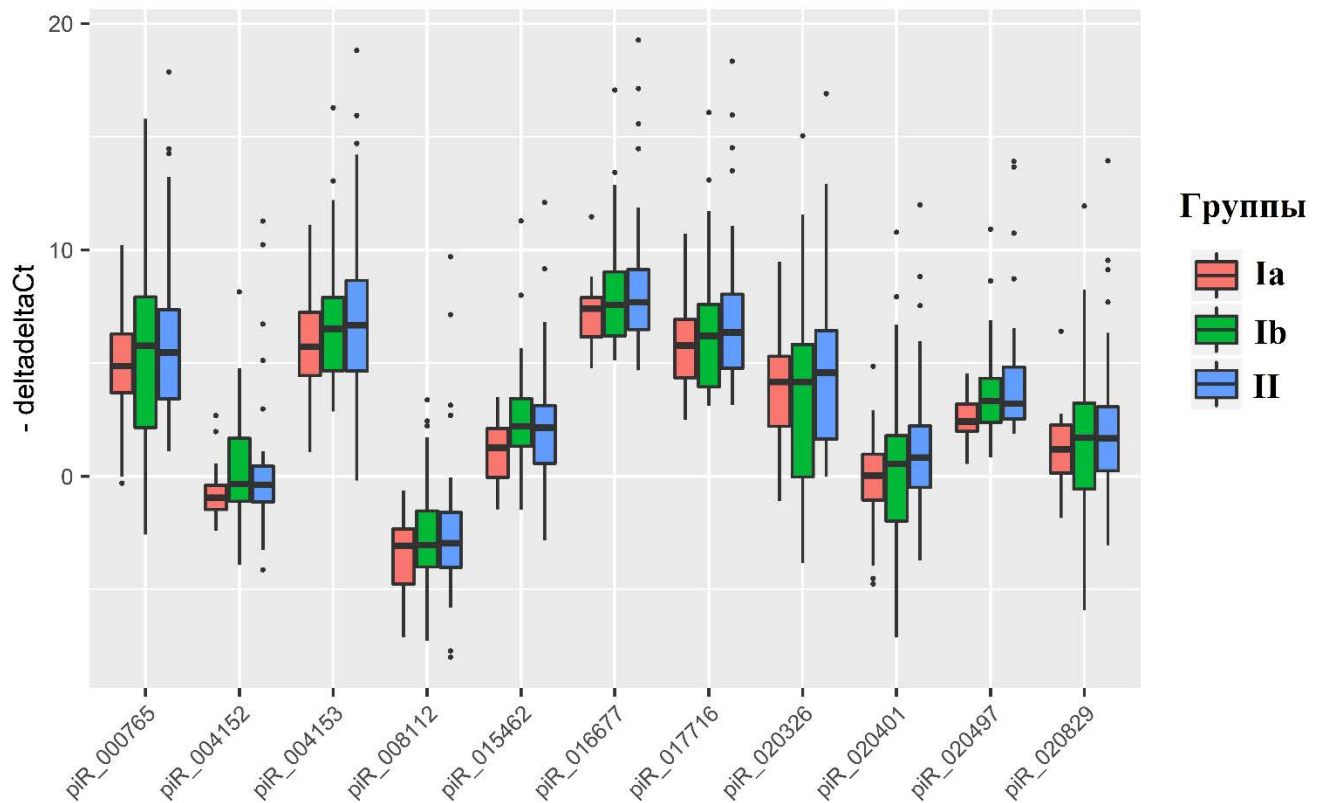
С целью идентификации малых некодирующих РНК, ассоциированных с анеуплоидией эмбриона, было проведено глубокое секвенирование РНК, выделенной из 20 образцов среды культивирования бластоцисты: 8 эуплоидных эмбрионов и 12 анеуплоидных эмбрионов по данным ПГТ-А (seq(22)x1; seq(22)x1; seq(22)x3; seq(7p)x3,(22)x3; seq(5)x1, (7)x1,6; seq(7)x1, (14)x1; seq(12)x3, (16)x3, (21)x3; seq(7,22)x1, (16)x3; seq(18)x1; seq(19)x3; seq(14)x3; seq(12)x3,(22)x1). Ввиду важной роли пивиРНК в регуляции стабильности генома клеток человека, предметом настоящего исследования явился именно данный тип малых некодирующих РНК. Всего 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 (Рисунок 7), где в качестве зависимой переменной (переменной отклика) выступала плоидность эмбриона (0 – эуплоидный эмбрион, перенесенный в полость матки с дальнейшим развитием беременности и родов; 1 – анеуплоидный эмбрион, не подлежащий переносу в полость матки). 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 наличия анеуплоидий в клетках эмбриона.



**Рис. 7.** Модели логистической регрессии выявления анеуплоидии в клетках эмбриона по данным глубокого секвенирования пивиРНК в среде культивирования бластоцисты при сопоставлении группы II с группой Ia в соответствии с Таблицей 2. Se – чувствительность, Sp – специфичность.

Данные секвенирования были валидированы методом количественной ПЦР в реальном времени на всей выборке из 93 образцов, указанных в Таблице 2, и 3 контрольных образцов среды без культивирования в ней эмбриона. По значениям «- $\Delta\Delta C_t$ » для каждой пивиРНК, в программе RStudio была построена бокс-диаграмма содержания пивиРНК в каждой из исследуемых групп (Рисунок 8).



**Рис. 8.** Бокс-диаграмма уровня пивиРНК в среде культивирования бластоцисты в группах Ia (эуплоидные эмбрионы с наличием имплантации), Ib (эуплоидные эмбрионы с отсутствием имплантации), II (анеуплоидные эмбрионы, не подлежащие переносу в полость матки).

На бокс-диаграммах, представленных на Рисунке 8, по оси ординат отложены значения логарифма по основанию 2 кратности изменения пивиРНК в культуральной среде анализируемых групп бластоцист. Обнаружено статистически значимое повышение уровня piR\_004152, piR\_015462, piR\_020497 в среде культивирования эуплоидных эмбрионов с отрицательным результатом программы ВРТ относительно группы эуплоидных эмбрионов с наличием имплантации. В среде культивирования анеуплоидных эмбрионов зафиксировано повышение уровня piR\_015462, piR\_016677, piR\_020497 относительно группы эуплоидных эмбрионов с наличием имплантации. Важно отметить, что группа эуплоидных бластоцист, способных имплантироваться в ткань эндометрия, статистически значимо отличается от любых других бластоцист (эуплоидных эмбрионов без имплантационного

потенциала и анеуплоидных бластоцист, не подлежащих переносу в полость матки) по сниженному уровню piR\_015462 и piR\_020497 в среде их культивирования. Примечательным фактом является выявленная нами ранее взаимосвязь между уровнем piR\_020497 в фолликулярной жидкости и качеством ооцита, способного к оплодотворению и формированию бластоцисты с высоким имплантационным потенциалом [209].

**Таблица 15. Количественное определение пивиРНК в образцах среды культивирования бластоцисты методом количественной ПЦР в реальном времени.**

пивиРНК	Группа	Me(Q1;Q3)	тест Вилкоксона, p
piR_000765	Ia	4,87(3,68;6,3)	
	Ib	5,77(2,15;7,92)	0,63*
	II	5,48(3,41;7,37)	0,44**
	Ib+II	5.48(2.96;7.4)	0,46***
piR_004152	Ia	-0,95(-1,47;-0,4)	
	Ib	-0,34(-1,1;1,68)	0,04*
	II	-0,38(-1,14;0,45)	0,13**
	Ib+II	-0.38(-1.17;0.9)	0,06***
piR_004153	Ia	5,73(4,45;7,24)	
	Ib	6,52(4,67;7,9)	0,32*
	II	6,67(4,65;8,65)	0,09**
	Ib+II	6.66(4.65;8.56)	0,12***
piR_008112	Ia	-3,07(-4,76;-2,32)	
	Ib	-3,04(-4,01;-1,53)	0,33*
	II	-2,95(-4,02;-1,59)	0,26**
	Ib+II	-2.95(-4.07;-1.44)	0,22***
piR_015462	Ia	1,26(-0,05;2,11)	
	Ib	2,21(1,33;3,44)	0,02*
	II	2,15(0,57;3,13)	0,04**
	Ib+II	2.19(0.86;3.25)	0,02***
piR_016677	Ia	7,41(6,16;7,89)	
	Ib	7,57(6,21;9,03)	0,21*
	II	7,69(6,48;9,13)	0,05**
	Ib+II	7.67(6.47;9.12)	0,06***
piR_017716	Ia	5,78(4,36;6,93)	

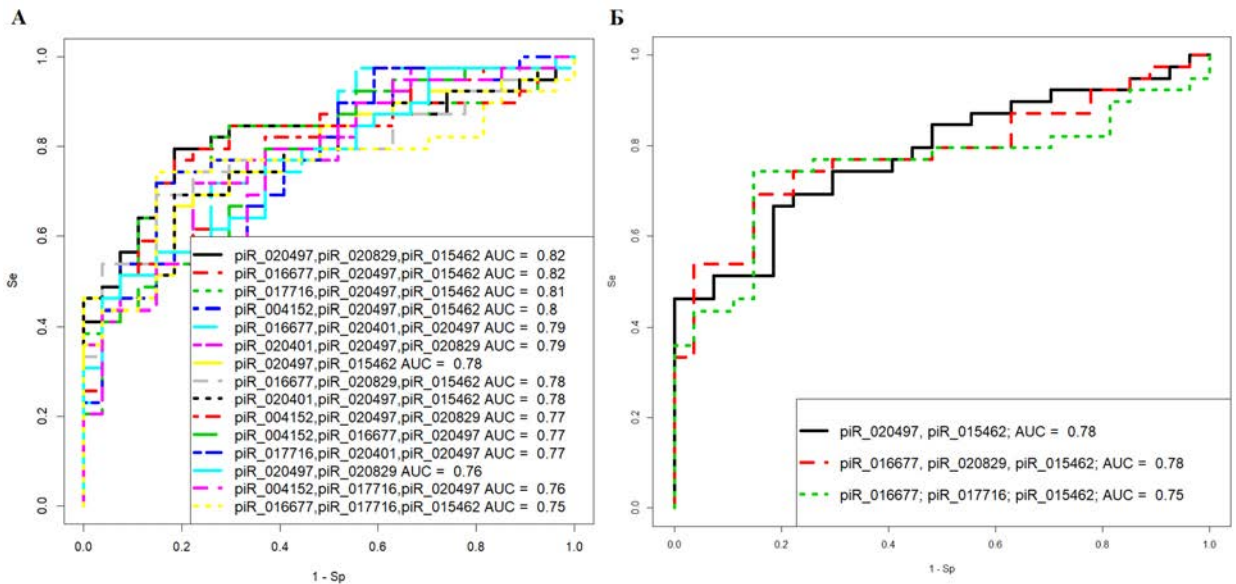
	Ib	6,2(3,96;7,6)	0,52*
	II	6,36(4,77;8,04)	0,14**
	Ib+II	6.32(4.4;7.7)	0,2***
piR_020326	Ia	4,16(2,21;5,3)	
	Ib	4,16(-0,03;5,83)	0,89*
	II	4,58(1,64;6,44)	0,24**
	Ib+II	4.57(1;6.42)	0,48***
piR_020401	Ia	0,04(-1,05;0,97)	
	Ib	0,54(-1,98;1,79)	0,79*
	II	0,83(-0,49;2,23)	0,06**
	Ib+II	0.66(-1.41;2.13)	0,18***
piR_020497	Ia	2,41(1,99;3,19)	
	Ib	3,32(2,37;4,33)	0,01*
	II	3,21(2,53;4,83)	0,002**
	Ib+II	3.21(2.44;4.54)	0,001***
piR_020829	Ia	1,19(0,15;2,26)	
	Ib	1,71(-0,57;3,23)	0,83*
	II	1,68(0,24;3,07)	0,41**
	Ib+II	1.68(-0.28;3.17)	0,52***

Примечание: \*сопоставление группы Ib с группой Ia;

\*\*сопоставление группы II с группой Ia;

\*\*\*сопоставление «Ib+II» с группой Ia.

С целью проверки значимости пивирНК, перечисленных в Таблице 15, с точки зрения оценки качества бластоцисты (эуплоидный набор хромосом в бластомерах и высокий ИП) были построены модели логистической регрессии. В программе RStudio были найдены оптимальные комбинации пивирНК, ассоциированные с качеством эмбриона, в соответствии с их вкладом в построение моделей логистической регрессии (Рисунок 9), где в качестве зависимой переменной (переменной отклика) выступало качество бластоцисты (0 – эуплоидный эмбрион, перенесенный в полость матки с дальнейшим развитием беременности и родов; 1 – анеуплоидный эмбрион, не подлежащий переносу в полость матки).



**Рис. 9.** Модели логистической регрессии оценки качества бластоцисты по содержанию пивиРНК в среде его культивирования согласно данным количественной ПЦР в реальном времени при сопоставлении группы II с группой Ia в соответствии с Таблицей 2. Se – чувствительность, Sp – специфичность.

На рисунке 9А представлены все возможные комбинации пивиРНК, участвующие в выявлении анеуплоидии, из которых были отобраны модели, представленные на Рисунке 9Б, где все независимые переменные были статистически значимы. Параметры моделей Рисунка 9Б указаны в Таблице 15. Формулы 1, 2 и 3, описывающие модели Рисунка 9Б, представлены ниже.

$$(1) \quad \frac{1}{1 + e^{2.8 - 0.84 \cdot x_1 - 0.36 \cdot x_2}}$$

где  $x_1$  – значение «-ΔΔCt» для piR\_020497,  $x_2$  – значение «-ΔΔCt» для piR\_015462;

$$(2) \quad \frac{1}{1 + e^{8.23 - 1.205 \cdot x_1 + 0.79 \cdot x_2 - 0.36 \cdot x_3}}$$

где  $x_1$  – значение «-ΔΔCt» для piR\_016677,  $x_2$  – значение «-ΔΔCt» для piR\_020829,  $x_3$  – значение «-ΔΔCt» для piR\_015462;

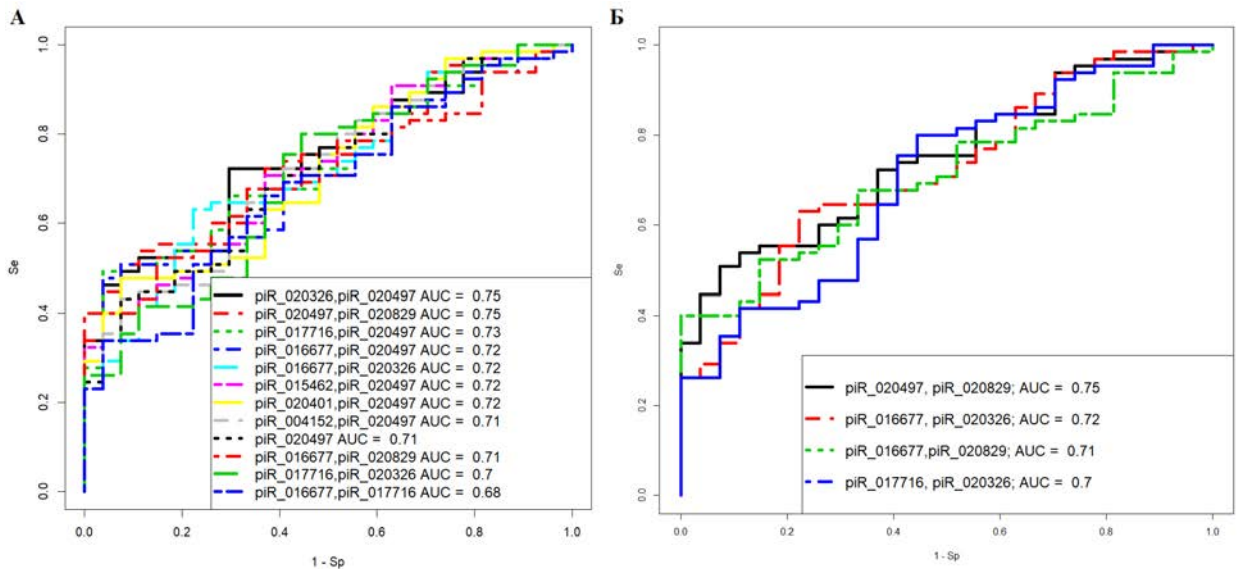
$$(3) \quad \frac{1}{1 + e^{5.78 - 1.85 \cdot x_1 + 1.38 \cdot x_2 - 0.38 \cdot x_3}}$$



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.

Модели Рисунка 9Б обладали высокой специфичностью (81–85%), а значит высокой диагностической ценностью по выявлению эуплоидных бластоцист с высоким имплантационным потенциалом. Более низкие значения чувствительности построенных моделей (67-74%) могут быть обусловлены отсутствием информации об имплантационном потенциале анеуплоидного эмбриона в связи с противопоказанием к переносу в полость матки.

Поскольку не всегда эуплоидный эмбрион обладает высоким имплантационным потенциалом, то для повышения вероятности отбора наиболее качественной бластоцисты для переноса в полость матки с учетом двух факторов – ploидности клеток эмбриона и его имплантационного потенциала – было решено построить модели логистической регрессии при сопоставлении группы Ia с объединенными группами «Ib + II». В программе RStudio путем поэтапного включения и исключения каждой молекулы были найдены оптимальные комбинации пивирНК в соответствии с их вкладом в построение моделей логистической регрессии (Рисунок 10), где в качестве зависимой переменной (переменной отклика) выступало качество бластоцисты (0 – эуплоидный эмбрион, перенесенный в полость матки с дальнейшим развитием беременности и родов; 1 – некачественный эмбрион: анеуплоидный эмбрион, не подлежащий переносу в полость матки, и эуплоидный эмбрион с отсутствием имплантации после переноса в полость матки).



**Рис. 10.** Модели логистической регрессии оценки качества бластоцисты по содержанию пивирНК в среде его культивирования согласно данным количественной ПЦР в реальном времени при сопоставлении групп Ib и II с группой Ia в соответствии с Таблицей 14. Se – чувствительность, Sp – специфичность.

На рисунке 10А представлены все возможные комбинации пивирНК, участвующие в выявлении некачественной бластоцисты, из которых были отобраны модели, представленные на Рисунке 10Б, где все независимые переменные были статистически значимы. Формулы 4, 5 и 6, описывающие модели Рисунка 10Б, представлены ниже.

(4)

$$\frac{1}{1 + e^{1.67 - 0.95*x_1 + 0.27*x_2}}$$

где  $x_1$  – значение «-ΔΔCt» для piR\_020497,  $x_2$  – значение «-ΔΔCt» для piR\_020829;

(5) 
$$\frac{1}{1 + e^{5.02 - 1.07*x_1 + 0.56*x_2}}$$

где  $x_1$  – значение «-ΔΔCt» для piR\_016677,  $x_2$  – значение «-ΔΔCt» для piR\_020326;

(6) 
$$\frac{1}{1 + e^{5.32 - 0.93*x_1 + 0.62*x_2}}$$

где  $x_1$  – значение «- $\Delta\Delta Ct$ » для piR\_016677,  $x_2$  – значение «- $\Delta\Delta Ct$ » для piR\_020829;

$$(7) \frac{1}{1 + e^{3.29 - 1.16*x_1 + 0.77*x_2}}$$

где  $x_1$  – значение «- $\Delta\Delta Ct$ » для piR\_017716,  $x_2$  – значение «- $\Delta\Delta Ct$ » для piR\_020326.

Наибольшей диагностической значимостью с точки зрения выявления качественного эмбриона (эуплоидный с высоким имплантационным потенциалом) обладают модели 4 и 6 Рисунка 10Б ввиду наибольшей специфичности (93% и 100%, соответственно) при сравнении с моделями 5 и 7 Рисунка 10Б. Более низкую чувствительность моделей 4 и 6 (51% и 40%, соответственно) в сравнении с их специфичностью можно объяснить отсутствием информации об имплантационном потенциале анеуплоидного эмбриона в связи с противопоказанием к переносу в полость матки и отсутствием информации о рецептивности эндометрия на момент переноса эуплоидного эмбриона в полость матки.

**Таблица 16. Параметры моделей логистической регрессии Рисунков 9Б и 10Б.**

Модели рисунка 9								
Модель	Пороговый уровень	Sp	Se	Параметры	Коэффициенты (95% ДИ)	Критерий Вальда	Статистическая значимость, p	ОШ(95% ДИ)
1	0,5803	0,81	0,67	(Intercept)	-2,79(-4,91;-1,09)	-2,9	0,004	0,06(0,01;0,33)
				piR_020497	0,84(0,34;1,53)	2,79	0,005	2,32(1,41;4,63)
				piR_015462	0,36(0,07;0,72)	2,23	0,026	1,44(1,08;2,05)
2	0,5802	0,85	0,69	(Intercept)	-8,23(-14,75;-3,01)	-2,78	0,005	0,00027(0,000003;0,05)
				piR_016677	1,21(0,42;2,19)	2,71	0,007	3,34(1,52;8,92)
				piR_020829	-0,79(-1,56;-0,15)	-2,23	0,026	0,45(0,21;0,86)
				piR_015462	0,36(0,07;0,7)	2,23	0,025	1,43(1,08;2,02)

3	0,5837	0,85	0,74	(Intercept)	-5,78(-10,7;-1,74)	-2,56	0,011	0,003(0,00002;0,18)
				piR_01 6677	1,85(0,23;3,7)	2,12	0,034	6,36(1,26;40,41)
				piR_01 7716	-1,38(-2,96;0,05)	-1,82	0,049	0,25(0,05;1,05)
				piR_01 5462	0,39(0,1;0,73)	2,42	0,016	1,47(1,11;2,08)
<b>Модели рисунка 10</b>								
Модель	Пороговый уровень	Sp	Se	Коэфф	Коэфф(95% ДИ)	Критерий Вальда	p	ОШ(95% ДИ)
4	0,7731	0,93	0,51	(Intercept)	-1,67(-3,29;-0,29)	-2,2	0,027	0,19(0,037;0,75)
				piR_02 0497	0,95(0,44;1,6)	3,22	0,001	2,6(1,55;4,95)
				piR_02 0829	-0,27(-0,58;0,007)	-1,8	0,051	0,76(0,56;1,007)
5	0,6911	0,78	0,63	(Intercept)	-5,02(-9,25;-1,64)	-2,6	0,009	0,0067(0,0001;0,19)
				piR_01 6677	1,07(0,44;1,87)	2,95	0,003	2,91(1,55;6,46)
				piR_02 0326	-0,57(-1,05;-0,17)	-2,54	0,011	0,57(0,35;0,84)
6	0,8018	1	0,4	(Intercept)	-5,32(-10,04;-1,41)	-2,43	0,015	0,005(0,00004;0,243)
				piR_01 6677	0,93(0,33;1,67)	2,72	0,006	2,53(1,39;5,33)
				piR_02 0829	-0,62(-1,25;-0,12)	-2,17	0,031	0,54(0,29;0,89)
7	0,6082	0,55	0,8	(Intercept)	-3,29(-6,34;-0,79)	-2,33	0,019	0,038(0,002;0,45)
				piR_01 7716	1,16(0,44;2,06)	2,81	0,005	3,19(1,56;7,85)
				piR_02 0326	-0,77(-1,43;-0,24)	-2,52	0,012	0,46(0,24;0,79)

При анализе функциональной значимости молекул пивиРНК, входящих в состав моделей Рисунка 9Б и Рисунка 10Б, было выявлено их участие в регуляции формирования веретена деления (Таблица 17).

**Таблица 17. Функциональное значение потенциальных генов-мишеней пивиРНК, ассоциированных с плоидностью клеток бластоцисты и ее имплантационным потенциалом.**

Название пивиРНК*	Альтернативное название пивиРНК**	Genbank ID	Локализация на хромосоме	Расположение в локусе гена	Ген-мишень	
hsa_piR_020497	piR-hsa-28392	DQ598177	6	LINC01623 (long intergenic non-protein coding RNA 1623)	PLK3 (polo like kinase 3)	
hsa_piR_016677	piR-hsa-23231	DQ592953	2	PARD3B (par-3 family cell polarity regulator beta)	CDH23 (cadherin related 23)	
					PSMD2 (proteasome 26S subunit ubiquitin receptor, non-ATPase 2)	
					KIF20A (kinesin family member 20A)	
					MAP1A (microtubule associated protein 1A)	
hsa_piR_015462	piR-hsa-21401	DQ591122	10, 15	GOLGA2P6 (GOLGA2 pseudogene 6)	BNC1 (basenuclin 1)	
					DNM1P46 (dynamin 1 pseudogene 46)	PLEKHA7 (pleckstrin homology domain containing A7)
					MTPAP (mitochondrial poly(A) polymerase)	CROCC (ciliary rootlet coiled-coil, rootletin)
						CEP128 (centrosomal protein 128)
						RASSF1 (Ras association domain family member 1)
						PPP2R5B (protein phosphatase 2 regulatory subunit B'beta)
	FZR1 (CDH1) (fizzy and cell					

					division cycle 20 related 1)
hsa_piR_01771 6	piR-hsa-24672	<a href="#">DQ594453</a>	1, 3, 6		CEP164 (centrosomal protein 164) KIF20A (kinesin family member 20A) PXN (paxillin)
hsa_piR_02082 9	piR-hsa-28877	DQ598677	5	LINC01962 (long intergenic non-protein coding RNA 1962)	TAF1 (TATA-box binding protein associated factor 1)
hsa_piR_02032 6	piR-hsa-28131	DQ597916	1, 3, 6, 16	VAC14 (component of the PIKfyve protein kinase complex) COLQ (collagen like tail subunit of asymmetric acetylcholinesterase) CROCC (ciliary rootlet coiled-coil, rootletin)	DROSHA (drosha ribonuclease III)

Примечание: \* piRNAbank (<http://pirnabank.ibab.ac.in/cgi-bin/accession.cgi>)

\*\* piRBase, Release v3.0 (<http://bigdata.ibp.ac.cn/piRBase/index.php>)

#### Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проблема выбора эмбриона с оптимальным имплантационным потенциалом не только сохраняет свою актуальность, но и становится мощным катализатором для поиска новых более достоверных и менее инвазивных методов оценки качества эмбриона. В клинической практике выбор наиболее оптимального, с точки зрения успешной имплантации, эмбриона проводится на основании морфологических критериев эмбрионов. Однако внешние характеристики эмбрионов слабо коррелируют с их хромосомным статусом и исходами программ ВРТ. В течение последних двух лет частота использования ПГТ-А в программах ВРТ увеличилась почти в 2,5 раза [113]. Тем не менее, в соответствии с данными мировой литературы,

применение ПГТ-А в общей популяции женщин не улучшает исходы программ ВРТ, но в то же время увеличивает вероятность имплантации у женщин старшего репродуктивного возраста. Согласно устоявшемуся мнению, применение ПГТ-А в группах пациентов с высоким риском образования анеуплоидных эмбрионов положительно влияет на исходы программ ВРТ [114]. Однако, все больше исследований указывают на противоречивые данные о влиянии ПГТ-А на частоту имплантации, живорождения и ранних репродуктивных потерь в программах ВРТ у пациенток с привычным невынашиванием, повторными неудачными попытками имплантации и тяжелой патозооспермией у партнера. [114].

Последние исследования показывают, что качество эмбриона и его ИП определяются не только генами, кодирующими белок, и нормальным кариотипом, но и сложнейшей эпигенетической системой, которая оказывает существенное влияние на весь наследственный механизм [230]. Функционирование эпигенотипа имеет четкую траекторию, которая ведет к образованию нормального для популяции эмбриона с оптимальным имплантационным потенциалом. Наряду с основной траекторией развития имеются субтраектории, приводящие к формированию отличных от нормы устойчивых состояний фенотипа эмбриона, которые могут сопровождаться снижением имплантационного потенциала. Эпигенетический наследственный материал представлен определенными генами в том числе в некодирующих областях ДНК, ответственными за образование некодирующих РНК, посредством которых осуществляется контроль генов, кодирующих белок [230] [231].

Бурное развитие инновационных технологий открывает новые перспективы в изучении роли мнкРНК с точки зрения стабилизации генома и посттранскрипционной регуляции эмбриогенеза. Недавние исследования выявили сильную корреляцию между уровнем внеклеточных микроРНК и пивиРНК в культуральных средах эмбрионов и их имплантационным потенциалом, а также хромосомным статусом. Изучение особенностей

экспрессии мнкРНК в культуральных средах эмбрионов позволяет получить более подробную информацию о качестве эмбриона и его способности к имплантации. А также открывает новые возможности для оптимизации селективного переноса эмбриона в полость матки и увеличения эффективности программ ВРТ.

Проведено проспективное клиническое исследование, цель которого основана на гипотезе о том, что ИП эмбриона определяется не только его хромосомным статусом, но и эпигенетическим состоянием, которое может отражаться в профиле мнкРНК в культуральной среде эмбрионов. Подгруппы наблюдения составили 323 супружеских пары, обратившихся для проведения программы ЭКО/ICSI+ПГТ-А, которые были разделены на 4 подгруппы в зависимости от показаний к ПГТ-А: старший репродуктивный возраст женщины, привычное невынашивание, повторные неудачные попытки имплантации, тяжелая патозооспермия. Группу сравнения составили 352 супружеских пары, обратившихся для проведения программы ЭКО/ICSI без ПГТ-А, которые также были распределены на 4 соответствующие подгруппы.

Для выполнения поставленной цели **на первом этапе** был проведен ретроспективный анализ клинико-лабораторных параметров женщин, обратившихся для проведения программы ЭКО/ICSI+ПГТ-А и группы сравнения.

При анализе клинико-лабораторных показателей супружеских пар соответствующие подгруппы в целом были сопоставимы между собой по возрасту женщины, типу телосложения, ИМТ, показателям менструальной функции, длительности и причинам бесплодия, данным гинекологического, акушерского и репродуктивного анамнезов, а также показателям гормонального профиля и спермограммы.

**На втором этапе** изучены показатели стимулированного цикла, раннего эмбриогенеза, результатов ПГТ-А, а также исходов криоциклов у женщин, обратившихся для проведения программы ЭКО/ICSI+ПГТ-А, и подгрупп сравнения. Сравнительный анализ «свежих» циклов не показал статистически



значимых различий между основными и соответствующими подгруппами сравнения, что является закономерным, учитывая идентичные клинико-анамнестические данные и показатели овариального резерва в соответствующих подгруппах. Тем не менее среди пациентов с тяжелой патозооспермией в IVa-подгруппе (с ПГТ-А) выявлено значимое увеличение стартовой дозы гонадотропинов по сравнению с IVb-подгруппой (без ПГТ-А), а в группе женщин с повторными неудачными попытками имплантации статистически значимое увеличение суммарной дозы гонадотропинов в IIIa-подгруппе (с ПГТ-А) по сравнению с подгруппой без ПГТ-А. Назначение более высоких доз гонадотропинов в программах ЭКО/ICSI+ПГТ-А может объясняться стремлением получить больший пул ооцитов и как следствие blastocyst пригодных для ПГТ-А. Впрочем по результатам анализа показателей раннего эмбриогенеза количество зрелых ооцитов, зигот и blastocyst хорошего и отличного качества было сопоставимым в основных и соответствующих им подгруппах сравнения, в том числе и среди супружеских пар с повторными неудачными попытками ВРТ и тяжелой патозооспермией.

Анализ результатов ПГТ-А показал, что во всех четырех группах процент анеуплоидных эмбрионов был достаточно высоким, но у женщин старшего репродуктивного возраста значительно превалировал и составил 71,22%, тогда как у супружеских пар с привычным невынашиванием – 49,27%, с повторными неудачными попытками ВРТ – 42,39%, с тяжелой патозооспермией – 43,71%. Следовательно, назначение ПГТ-А в данных группах пациентов является обоснованным. При более детальном анализе анеуплоидных эмбрионов было выявлено, что у женщин старшего репродуктивного возраста подавляющее большинство анеуплоидных blastocyst имеют хромосомные аномалии сразу по нескольким (трем и более) хромосомам, тогда как во всех остальных группах большая часть анеуплоидных эмбрионов включала аномалии по одной хромосоме. Это косвенно указывает на более глобальные нарушения мейотического деления клеток с образованием множественных хромосомных аномалий у женщин

старшего репродуктивного возраста, тогда как у супружеских пар с привычным невынашиванием беременности, повторными неудачными попытками имплантации и тяжелой патозооспермией ошибки расхождения единичных хромосом могут иметь случайный характер.

При изучении результатов программ ВРТ с ПГТ-А и без ПГТ-А были получены неоднозначные данные в различных группах пациентов. Так, при анализе исходов программ ВРТ в Ia и Ib подгруппах, включающих женщин в возрасте 35 лет и старше, выявлено статистически значимое увеличение частоты наступления беременности в программах ЭКО/ICSI+ПГТ-А по сравнению с данными подгруппы сравнения ( $p = 0,002$ ). Частота живорождения хоть и была выше в Ia-подгруппе по сравнению с таковой в Ib-подгруппе, однако различия были статистически не значимы ( $p = 0,472$ ). Частота ранних репродуктивных потерь также статистически значимо не различалась между подгруппами ( $p = 0,926$ ). Схожие результаты были получены в работе Sacchi, L et al (2019), но помимо увеличения частоты клинической беременности, у женщин старшего репродуктивного возраста также выявлено увеличение частоты живорождения и снижение ранних репродуктивных потерь по сравнению с показателями контрольной группы [118]. В недавнем исследовании Pantou A. et al (2022) у пациенток старшего репродуктивного возраста выявлено значимое увеличение частоты клинической беременности при использовании ПГТ-А по сравнению с контролем, при этом частота живорождения не отличалась между группами [236]. Потенциально снижение риска переноса анеуплоидного эмбриона в полость матки должно положительно влиять не только на частоту клинической беременности, но и на частоту живорождения и самопроизвольных прерываний беременности в I триместре, однако негативное влияние также оказывает отягощающийся по мере увеличения возраста гинекологический и соматический анамнез пациенток. Основываясь на результатах настоящей работы и данных мировой литературы, анеуплоидии эмбрионов, по-видимому, играют решающую роль в неудачах имплантации у

женщин старше 35 лет [118, 113, 233, 236]. В то время как, применение ПГТ-А может нивелировать влияние анеуплоидий на частоту наступления беременности у пациенток старшей возрастной группы, оно все же не исключает самопроизвольного прерывания беременности и не гарантирует рождения здорового ребенка. Течение беременности также определяется возрастом пациенток и ухудшающимися по мере его увеличения данными гинекологического и соматического анамнезов, а также морфокинетическими особенностями бластоцисты.

При анализе результатов программ ВРТ во IIa и IIb подгруппах, включающих женщин с привычным невынашиванием беременности, выявлено статистически значимое снижение частоты ранних репродуктивных потерь и увеличение частоты живорождения в программах ЭКО/ICSI + ПГТ-А по сравнению с группой без ПГТ-А ( $p = 0,031$  и  $p = 0,015$  соответственно). При этом частота клинической беременности не различалась в обеих подгруппах ( $p = 0,715$ ). Полученные данные подтверждаются результатами других исследований [236] [234]. Тем не менее неоднозначные данные продемонстрированы в недавнем исследовании Sato T. et al (2020), включавшем женщин различных возрастных групп с привычным невынашиванием беременности в анамнезе: ни в одной возрастной группе не было выявлено статистически значимых различий в частоте ранних репродуктивных потерь и живорождения при использовании ПГТ-А по сравнению с контролем, при этом в группе старшего репродуктивного возраста выявлено увеличение частоты клинической беременности по сравнению с контролем [127]. Противоречивые результаты могут объясняться недостаточным обследованием пар, направленным на исключение других, несвязанных с анеуплоидиями, причин привычного невынашивания. Большое значение в этиологии привычного невынашивания отводится состоянию эндометрия. И несмотря на то, что в настоящей работе, патологические состояния эндометрия, в том числе хронический эндометрит, служили критерием исключения, на сегодняшний день не существует достоверного

метода, способного с высокой чувствительностью и специфичностью определить рецептивность эндометрия. Перенос эмбрионов группам проводили при достижении эндометрия оптимальной структуры и толщины выше 8 мм. Неоднозначные данные мировой литературы также могут быть связаны с ретроспективным характером исследований, различными методами ПГТ-А и техниками биопсии эмбрионов. Тем не менее использование ПГТ-А у пациенток с привычным невынашиванием снижает частоту ранних репродуктивных потерь и его применение целесообразно, при условии тщательного обследования супружеских пар с целью исключения других причин невынашивания беременности.

При анализе Ша и Шб подгрупп, включавших женщин с повторными неудачными попытками переноса эмбрионов, было выявлено увеличение частоты клинической беременности ( $p=0,007$ ) при использовании ПГТ-А по сравнению с группой без ПГТ-А, при этом не было отмечено статистически значимых различий в частоте ранних репродуктивных потерь и живорождения. Полученные результаты подтверждают данные других исследований [133], [134], [135], [136]. По-видимому, отсутствие хромосомных аномалий в эмбрионе играет более важную роль в исходах программ ВРТ по сравнению с акушерско-гинекологическим анамнезом и в том числе с состоянием эндометрия. Однако на сегодняшний день опубликовано лишь небольшое количество исследований, направленных на оценку влияния ПГТ-А в данной группе пациентов. И несмотря на то, что все они подтверждают улучшение исходов ВРТ после ПГТ-А, необходимо проведение многоцентровых рандомизированных контролируемых исследований с большей выборкой пациентов и более персонализированным подходом к выбору кандидатов для участия в работе.

Среди супружеских пар с тяжелой патозооспермией не было выявлено положительного влияния ПГТ-А на частоту наступления беременности, репродуктивных потерь и живорождения. По результатам исследования Rossella Mazzilli et al. (2017) эмбрионы, полученные от пациентов с тяжелой

патозооспермией, характеризуются сниженной скоростью оплодотворения и более медленным эмбриональным развитием на доимплантационном этапе [237]. Однако тяжелый мужской фактор не оказывал влияния на плоидность эмбрионов и их ИП. В недавнем исследовании Mehmet Resit Asoglu et al. (2022) включавшем пациентов с тяжелым мужским фактором было продемонстрировано отсутствие положительного влияния ПГТ-А на исходы программ ВРТ: не было статистически значимых различий ни в частоте клинической беременности, ни в частоте живорождения [143]. По-видимому, тяжелый мужской фактор бесплодия не является критическим фактором в этиологии образования анеуплоидных эмбрионов. Это может быть связано с репаративной способностью ооцитов восстанавливать нормальный кариотип до момента активации зиготического генома, который регулируют пивиРНК, или с тем фактом, что анеуплоидии отцовского геноза могут приводить к остановке эмбрионального развития на более ранних этапах [114].

Таким образом, использование ПГТ-А у женщин старшего репродуктивного возраста и в группе пациенток с повторными неудачными попытками имплантации приводит к статистически значимому увеличению частоты клинической беременности, однако не оказывает положительного влияния на частоту живорождения и ранних репродуктивных потерь. У пациенток с привычным невынашиванием при использовании ПГТ-А отмечается снижение частоты самопроизвольных прерываний беременности и увеличение частоты живорождения, что подтверждает важное значение хромосомных аномалий эмбрионов в этиологии невынашивания беременности. И полное отсутствие положительного влияния ПГТ-А на результативность программ ВРТ у супружеских пар с тяжелой патозооспермией по результатам настоящего исследования. Кроме того, выявлено, что из 309 эуплоидных эмбрионов лишь 108 бластоцист имплантировались в полость матки, подавляющее число (65,05%) эуплоидных эмбрионов не привели к наступлению беременности.

Отсутствие влияния ПГТ-А на исходы программ ВРТ может быть связано и с ограничениями самого метода. Так наиболее оптимальным среди всех существующих методов ПГТ-А является NGS, а самым безопасным с точки зрения инвазивности способом забора материала – биопсия клеток трофэктодермы. И хотя точность NGS стремится к 99% не исключается получение ложноположительных результатов [114], что связано, по-видимому, с высокой частотой мозаицизма в эмбрионах человека и доказанной способностью бластоцисты к самокоррекции, то есть активации апоптоза анеуплоидных клеток в процессе эмбрионального развития [5].

В масштабном исследовании Cimadomo D et al (2023) направленном на изучение причин отрицательных исходов программ ВРТ при переносе зуплоидного эмбриона продемонстрировано отрицательное влияние возраста, ИМТ и повторных неудачных попыток имплантации на исходы программ ВРТ при переносе зуплоидного эмбриона [238]. Также, по данным автора, исход программ ЭКО/ICSI+ПГТ-А зависит от качества бластоцисты, дня биопсии и манипуляций с эмбрионом. В настоящем исследовании продемонстрирована положительная корреляция между возрастом женщин и частотой ранних репродуктивных потерь ( $r = 0,329$ ,  $p < 0,001$ ), тогда как частота живорождения напротив снижалась по мере увеличения возраста пациенток ( $r = - 0,426$ ,  $p < 0,001$ ). ИМТ у всех пациенток, включенных в исследование, не выходил за пределы нормальных значений, а количество неудачных попыток имплантации не имело корреляции с частотой образования анеуплоидных эмбрионов. Что касается данных эмбриологического этапа, стоит отметить, что среди зуплоидных эмбрионов, которые привели к рождению живого ребенка, наиболее часто встречались эмбрионы сбиопсированные на 5-е сутки после оплодотворения – 84,26% (91/108), меньшая часть бластоцист были сбиопсирована на 6-е сутки после оплодотворения и составила 15,74% (17/108). Все зуплоидные эмбрионы, перенос которых привел беременности, были хорошего и отличного качества (ЗВВ и выше). Несмотря на то, что ploidy эмбриона является сильным предиктором имплантационного

потенциала эмбриона, большая часть эуплоидных эмбрионов не имплантируется.

Для поиска вспомогательных маркеров имплантационного потенциала эмбрионов **на третьем этапе** проведен анализ профиля мнкРНК в культуральных средах эмбрионов, в зависимости от их хромосомного статуса. По результатам ПГТ-А и исходов криоциклов были отобраны 93 образца культуральных сред эмбрионов, полученных от 73-х супружеских пар. Анализ клиничко-анамнестических данных и показателей эмбриологического этапа супружеских пар не показал статистически значимых различий. По результатам глубокого секвенирования в образцах сред культивирования было идентифицировано 133 PIWI РНК. Далее методом количественной ПЦР было выделено 12 пивиРНК, которые в различных комбинациях с высокой чувствительностью и специфичностью идентифицировали эуплоидный эмбрион. Полученные данные были валидированы методом количественной ПЦР в реальном времени. Далее было построено 15 моделей логистической регрессии по уровню пивиРНК в различных комбинациях. Из них были отобраны 3 модели у которых все независимые переменные были статистически значимы. Специфичность моделей варьировала в пределах 81 – 85%, что говорит о высокой диагностической значимости. В результате проведенной работе на данном этапе было идентифицировано 5 пивиРНК (piR\_020497, piR\_015462, piR\_016677, piR\_020829, piR\_017716) по уровню экспрессии которых в среде культивирования бластоцист на 5-е сутки построены 3 модели логистической регрессии, позволяющие статистически значимо со специфичностью 81% -- 85% дифференцировать эмбрионы в зависимости от плоидности.

**На четвертом этапе** для определения имплантационного потенциала эуплоидных эмбрионов был проведен анализ профиля мнкРНК в культуральных средах 93-х эмбрионов в зависимости от исходов программ ЭКО/ICSI+ПГТ-А. В результате проведенного исследования были получены модели логистической регрессии по идентификации эуплоидной бластоцисты

с высоким имплантационным потенциалом по уровню piwiRNA в среде культивирования эмбриона на 5 сутки после оплодотворения, среди которых количественная оценка комбинация piR\_020497 и piR\_020829 либо piR\_016677 и piR\_020829 обладала наибольшей специфичностью (93% и 100%, соответственно), а значит диагностической ценностью при отборе наиболее качественной бластоцисты для переноса в полость матки с учетом двух факторов – ploидности клеток эмбриона и его имплантационного потенциала. Очевидно, что для применения разработанных моделей в клинической практике необходима их валидация на многочисленных тестовых выборках с подтверждением ploидности клеток эмбриона методом ПГТ-А. Кроме того, для повышения точности работы разработанных моделей необходима оценка рецептивности эндометрия в день переноса криоконсервированного эмбриона. В случае получения доказательств надежности и эффективности разработанных моделей появится возможность подтверждать результаты ПГТ-А и дифференцировать эуплоидные эмбрионы в зависимости от их имплантационного потенциала.

Одной из функций piwiRNA является регуляция стабильности генома клетки путем взаимодействия в ядре с транскриптом ретротранспозона в составе комплекса RISC, контактирующий с деацетилазой и метилтрансферазой гистонов и/или ДНК-метилтрансферазой, которые блокируют дальнейшую транскрипцию ретротранспозона, тем самым препятствуя его активности и встраиванию в различные участки генома [239]. В работе Stephen A. Krawetz и коллег были обнаружены piwiRNA сперматозоидов, которые имели потенциальную аффинность связывания с определенными транспозонами [240]. Среди идентифицированных нами piwiRNA в среде культивирования бластоцисты две молекулы, hsa\_piR\_020829 и hsa\_piR\_017716, по данным этого исследования экспрессировались в сперматозоидах, а для hsa\_piR\_020829 были идентифицированы места связывания с ретротранспозонами L1 (длинные диспергированные ядерные повторы) и MER.



ДНК-последовательности определенных классов piwiRNA расположены внутри белок-кодирующих генов, и функционально активные молекулы piwiRNA, в основном, продуцируются из 3'-нетранслируемых областей (3'-НТО) мРНК во время их трансляции [239]. Кроме того, 3'-НТО мРНК, продуцирующие piwiRNA, как правило, содержат последовательности транспозонов, активность которых контролируется данными piwiRNA на посттранскрипционном уровне, что было продемонстрировано во время постмейотических стадий сперматогенеза [241]. Согласованные процессы трансляции мРНК и одновременного образования функциональных piwiRNA, нацеленных на снижение активности транспозонов, являются проявлением тонкой регуляции гаметогенеза, от которой в дальнейшем зависит качество образуемого эмбриона. Некоторые piwiRNA, идентифицированные в настоящем исследовании как маркеры эуплоидной бластоцисты с высоким имплантационным потенциалом, расположены в локусах белок-кодирующих генов, а именно: ДНК-последовательность hsa\_piR\_016677 расположена в гене PARD3B, hsa\_piR\_015462 – в генах DNM1P46 и MTPAP, hsa\_piR\_020326 – в генах VAC14, COLQ и CROCC.

Помимо супрессорной активности piwiRNA в отношении транспозонов, также известно об их регуляторном воздействии на сигнальные пути в клетке посредством различных молекулярных механизмов [239]. Например, пахитенные piwiRNA направляют белок MIWI к мРНК-мишени либо для взаимодействия с деаденилазой CAF1, осуществляющую деаденилирование и последующую деградацию мРНК [242], либо для прямого расщепления мРНК [243][244]. Данные механизмы по удалению огромного числа мРНК-мишеней, например, работают на стадии поздних сперматид перед началом их морфологической трансформации в сперматозоиды. Парадоксально, но piwiRNA могут как дестабилизировать, так и стабилизировать мРНК-мишень, активируя ее трансляцию. Например, недавнее исследование показало, что пахитенные piwiRNA в комплексе с MIWI, субъединицей F фактора инициации трансляции 3 (eIF3F) и РНК-связывающим белком HuR

активируют трансляцию ряда спермиогенных мРНК в круглых сперматиде, тем самым детерминируя определенную стадию гаметогенеза [245]. При использовании алгоритма miRanda нами были идентифицированы потенциальные гены-мишени piwiRNA, являющихся маркерами эуплоидной бластоцисты с высоким имплантационным потенциалом. Важно отметить, что белковые продукты данных генов-мишеней участвуют в формировании веретена деления, образовании и функционировании кинетохора, цитокинезе, нарушения которых приводят к возникновению анеуплоидии клетки.

Так, например, Polo-подобная киназа 3 (PLK3) – ген-мишень hsa\_piR\_020497 – локализуется в области ядра, центросомы и борозды деления клетки и участвует в регуляции клеточного цикла путем активации CDC25A и CDC25C, индуцируя G1/S- и G2/M-переход, соответственно, и в цитокинезе [246]. Филогенетический анализ показал высокую консервативность киназного и белок-связывающего домена у PLK1–3, поэтому структурное сходство этих киназ обуславливает одинаковую функциональную активность. Доказано участие PLK1 в разъединении центросом путем поддержания активности протеинкиназы NEK2A, фосфорилирующей линкер двух центросом - рутлетин (CROCC, ген-мишень hsa\_piR\_015462). В случае мутаций в гене CROCC возникают выраженная хромосомная нестабильность и нарушения сегрегации хромосом [247]. Участие PLK1–3 в цитокинезе происходит за счет взаимодействия с различными субстратами, в том числе с белком семейства кинезинов (KIF20A, ген-мишень hsa\_piR\_016677 и hsa\_piR\_017716), которые и обеспечивают перемещение PLK1-3 из центросом и кинетохор в среднюю зону веретена деления за счет катализа быстрого пространственного ремоделирования микротрубочек, необходимого для внутриклеточного транспорта белков и органелл [248]. Кроме того, ряд субъединиц основной фосфатазы ассоциированных с микротрубочками белков - PP2A (PPP2R1A, PPP2R2D, PPP2R3B, PPP2R5B и PPP2R5D) также взаимодействуют с PLK1 и участвуют в поддержании геномной стабильности [249]. Продемонстрировано, что ингибирование PPP2R5B (ген-мишень

hsa\_piR\_015462) воздействует на сцепление сестринских хроматид в клетках с повышенным уровнем экспрессии PLK1. SET/TAF1 (ген-мишень hsa\_piR\_020829) является ингибитором PP2A, локализуется в центромерах и поддерживает активность киназы Aurora B, которая фосфорилирует различные компоненты кинетохора для коррекции неправильного соединения кинетохора с микротрубочками. Своевременное высвобождение SET из кинетохорного белкового комплекса во время метафазы обеспечивает стабилизацию соединения кинетохора с микротрубочками под действием фосфатазной активности PP2A [250].

Центросома является сайтом концентрации протеасомы и ассоциированных регуляторных белков [251]. В клетках эукариот деградация 80-90% белков осуществляется протеасомой 26S [252], состоящей из двух комплексов – корового 20S и регуляторного 19S, в котором PSMD2 (ген-мишень hsa\_piR\_016677) кодирует одну из субъединиц [253]. Важно отметить, что Polo-подобные киназы подвергаются убиквитин-зависимому протеолизу в протеасоме [246], что в случае регуляции концентрации PSMD2 и PLK3 под действием hsa\_piR\_016677 и piR\_020497, соответственно, подчеркивает сложную систему контроля формирования структур веретена деления для правильной сегрегации хромосом. Другим важным регулятором клеточного цикла с использованием убиквитин-опосредованного протеолиза является индуцирующий анафазу комплекс или циклосома APC/C, активирующаяся Cdc20 или Cdh1 (ген-мишень hsa\_piR\_015462). Во время оогенеза APC/CCdh1 путем деградации циклина B1 обеспечивает поддержание пролонгированного ареста примордиальных фолликулов на стадии профазы I мейоза и блокирование их вхождения в метафазу I [254]. На стадии анафазы I APC/CCdh1 обеспечивает фосфорилирование связанного с центромерами хромосом Sgol2 (shugoshin-подобного белка 2) под действием киназы Aurora B/C, что приводит к диссоциации Sgol2 и расхождению хромосом [255]. В случае делеции генов *Apc* and *Cdh1* в ооците, Sgol2 остается связанным с

хромосомами в анафазе I, что не приводит к их расхождению и обуславливает возникновение анеуплоидий после первого мейотического деления.

Выявленные нами piwiRNA, ассоциированные с анеуплоидией клеток бластоцисты, потенциально регулируют уровень центриолярных белков, играющих важную роль в оогенезе и сперматогенезе. CEP128 (ген-мишень hsa\_piR\_015462), CEP164 (ген-мишень hsa\_piR\_017716) и базонуклин 1 (BNC1, ген-мишень hsa\_piR\_015462) являются ключевыми белками придатка материнской центриоли мужских половых клеток, участвуя в организации центриолярных микротрубочек и формировании аксонемы, а в случае дефектов кодирующих их генов происходят нарушения сперматогенеза и фертилизации в следствие снижения концентрации и морфологии сперматозоидов [256] [257] [258].

На доимплантационном этапе эмбриогенеза начиная с 8-клеточной стадии бластомеры подвергаются поляризации и компактизации путем реорганизации микротрубочек, актиновых и промежуточных филаментов, четкая и своевременная регуляция которой обуславливает формирование эмбриобласта и трофобласта бластоцисты, способной к имплантации [259]. При миграции клеток растущие концы микротрубочек заякориваются в участках фокальной адгезии, что приводит к дестабилизации адгезивного контакта и откреплению клетки от субстрата. Основную роль в данном процессе играет белок фокальной адгезии паксиллин (PXN, ген-мишень hsa\_piR\_017716) путем взаимодействия с  $\alpha$ -тубулином [260]. Продемонстрировано значительное повышение экспрессии PXN в области образования фокальных контактов после компактизации и бластуляции эмбриона для формирования адгезивных свойств бластоцисты и обеспечения имплантации [261]. Белок адгезии CDH23 (ген-мишень hsa\_piR\_016677) является регулятором сети микротрубочек, поддерживая полимеризацию “-” конца микротрубочек путем взаимодействия с белком CAMSAP3 [262], при этом обеспечивая стабильность адгезионного межклеточного контакта при взаимодействии с белком PLEKHA7 (ген-мишень hsa\_piR\_015462) [263].

Примечательно, что PLEKHA7 участвует не только в стабилизации основных трансмембранных компонентов адгезионного межклеточного контакта, но и взаимодействует с ферментным комплексом процессинга miRNA (DROSHA and DGCR8), обеспечивая регуляцию miR-24, miR-30a, miR30-b и let7-g, которые подавляют экспрессию индуцирующих клеточный рост белков SNAIL, MYC и циклина D1 непосредственно в местах межклеточного контакта [264]. Надо отметить, что потенциальным геном-мишенью молекулы hsa\_piR\_020326, идентифицированной нами как один из маркеров анеуплоидии клеток эмбриона, является фермент DROSHA, что подчеркивает сложную взаимосвязь разных видов малых некодирующих РНК (piwiRNA и miRNA) и белок-кодирующих РНК, при дисбалансе которых возникает та или иная патология.

Таким образом, анализ литературных данных о функции потенциальных генов-мишеней определенного набора молекул piwiRNA, идентифицированных в настоящем исследовании как маркеры плоидности эмбриона и его имплантационного потенциала, позволяют заключить, что качество эмбриона зависит от четко координированного в пространстве и времени гаметогенеза, где постоянство числа хромосом при каждом клеточном делении зависит от правильного формирования веретена деления, обеспечивающего равноценную для обеих дочерних клеток сегрегацию хромосом, где одними из ключевых регуляторных молекул выступают piwiRNA. В связи с этим, в настоящем исследовании предложен инновационный неинвазивный способ идентификации эуплоидного эмбриона с высоким ИП на основе количественной оценки piwiRNA в среде его культивирования, позволяющий с высокой специфичностью (93-100%) осуществлять выбор эмбриона для переноса в полость матки.

## Глава 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на то, что ПГТ-А является единственным на сегодняшний день методом, позволяющим с высокой чувствительностью и специфичностью выявлять анеуплоидные эмбрионы, а частота его использования с каждым годом растет, около 50% эуплоидных эмбрионов не имплантируется. В настоящем исследовании были проанализированы исходы программ ЭКО/ICSI с ПГТ-А и без ПГТ-А у супружеских пар с повышенным риском образования анеуплоидных эмбрионов: женщины старшего репродуктивного возраста, супружеские пары с привычным невынашиванием беременности, повторными неудачными попытками имплантации и тяжелой патозооспермией. На фоне большого количества противоречивых данных о влиянии ПГТ-А на исходы программ ВРТ в зарубежной и отечественной литературе, результаты настоящего исследования подтверждают положительное влияние ПГТ-А на исходы криоциклов у женщин старшего репродуктивного возраста, а также пациенток с повторными неудачными попытками имплантации и привычным невынашиванием беременности. Однако у супружеских пар с тяжелой патозооспермией не было выявлено статистически значимого увеличения частоты наступления клинической беременности и родов, а также снижения частоты ранних репродуктивных потерь при использовании ПГТ-А, что ставит под сомнение целесообразность его использования в качестве скринингового метода в данной группе пациентов. Отсутствие положительного влияния ПГТ-А на исходы программ ВРТ может быть связано и с ограничениями самого метода. На фоне высокой частоты хромосомного мозаицизма в эмбрионах человека нельзя исключить наличие анеуплоидий во ВКМ эмбриона по результатам анализа лишь нескольких клеток трофэктодермы. Кроме того, инвазивное воздействие на эмбрион в процессе биопсии может негативно отразиться на его способности к имплантации.

При этом, как известно, имплантационный потенциал эмбриона определяется не только нормальным кариотипом и генами, кодирующими

белок, но и сложнейшей эпигенетической системой, значительно влияющей на весь наследственный механизм. Основными эпигенетическими регуляторами раннего эмбриогенеза являются мнкРНК, среди которых уникальную функцию выполняют пивиРНК, которая заключается в поддержании стабильности генома за счет подавления активности транспозонов. Принимая во внимания их важнейшую роль, а также высокую распространенность в геноме человека, данные молекулы были выбраны для изучения их в качестве потенциальных маркеров плоидности и имплантационного потенциала эмбрионов.

В ходе настоящей работы были идентифицированы определенные комбинации пивиРНК в культуральных средах эмбрионов, коррелирующие с плоидностью и имплантационным потенциалом эмбрионов. Далее используя алгоритм miRanda были идентифицированы потенциальные гены-мишени данных пивиРНК, белковые продукты которых участвуют в регуляции формирования веретена деления. От функционирования которого зависит правильная сегрегация хромосом в анафазе митотического и мейотического делений. Были разработаны модели логистической регрессии, позволяющие с высокой чувствительностью и специфичностью дифференцировать эмбрионы в зависимости от плоидности и имплантационного потенциала. По результатам проведенного исследования предложен инновационный неинвазивный метод оценки плоидности и имплантационного потенциала эмбрионов по уровню экспрессии определенных комбинаций пивиРНК в культуральной среде эмбрионов. А также разработан персонафицированный алгоритм выбора эуплоидного эмбриона с высоким имплантационным потенциалом на основании интегральной оценки его хромосомного статуса методом 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) (ОР = 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 (ОР = 1,03, 95% ДИ 0,71 – 1,52,  $p = 0,866$ ), ранних репродуктивных потерь (ОР = 0,72, 95% ДИ 0,19 – 2,77,  $p = 0,6330$ ) и живорождения (ОР = 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 и 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. Pлоидность бластоцисты определяется по формуле, полученной на основании модели логистической регрессии, обладающей специфичностью – 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  $piR\_015462$

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 «- $\Delta\Delta Ct$ » для  $piR\_016677$ ,  $x_2$  – значение «- $\Delta\Delta Ct$ » 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

17-ОН – 17-гидроксипрогестерон

АМГ – антимюллеров гормон

антГнРГ – антагонисты гонадотропин-рилизинг гормона

АТФ – аденозинтрифосфат

вкДНК – внеклеточная дезоксирибонуклеиновая кислота

ВКМ – внутриклеточная масса

ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения

ВРТ – Вспомогательные репродуктивные технологии

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

Е2 – эстрадиол

ИМТ – индекс массы тела

ИП – Имплантационный потенциал

КАФ – количество антральных фолликулов

ЛГ – лютеинизирующий гормон

МЗП – материнско-зиготический переход

миРНК – Малые интерферирующие рибонуклеиновые кислоты

мнкРНК – Малые некодирующие рибонуклеиновые кислоты

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

НГЭ – наружный генитальный эндометриоз

ОКК – ооцит-кумулюсный комплекс

ОТ-ПЦР – количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

ПГТ-А – Преимплантационное генетическое тестирование эмбрионов на анеуплоидии

пивиРНК – Пиви-взаимодействующие рибонуклеиновые кислоты (piwiRNAs)

ПЭ – перенос эмбриона в полость матки

РКИ – рандомизированное клиническое исследование

РНК – рибонуклеиновая кислота

СПКЯ – синдром поликистозных яичников

ТВП – трансвагинальная пункция яичников

УЗИ – ультразвуковое исследование

ФНО $\alpha$  – фактор некроза опухоли-альфа

ФСГ – фолликулостимулирующий гормон

ХЭ – хронический эндометрит

ЭКО – Экстракорпоральное оплодотворение

aCGH – array comparative genomic hybridization (равнительная геномная гибридизация)

AGO – Argonaute

Aub – Aubergine

ERA – Endometrial Receptivity Analysis

FISH – флюоресцентная гибридизация in situ

ICSI– интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида

MI – первое мейотическое деление

MicroRNAs – микроРНК

MII – второе мейотическое деление

NGS – next generation sequencing (высокопроизводительное секвенирование нового поколения)

PIWIL3 – пиви-подобные рибонуклеиновые кислоты

RISC-комплекс – RNA-induced silencing complex (РНК-индуцируемый комплекс выключения гена)

SNP array - single nucleotide polymorphism (микроматричный анализ с помощью однонуклеотидных полиморфизмов)

$\beta$ -ХГЧ – хорионический гонадотропин человека

ИЛ-8 – интерлейкин 8

DGCR8 – Di George syndrome critical region gene 8 (область 8, критическая для синдрома Ди Джорджи)

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

- [1] Бесплодный брак. Современные подходы к диагностике и лечению: руководство / под ред. Г.Т. Сухих, Т.А. Назаренко. 2-е изд. испр. и доп. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2010. - 784 с. : ил. - ISBN 978-5-9704-1535-1.
- [2] Российская Ассоциация Репродукции Человека. Отчет за 2018 год. [http://www.rahr.ru/registr\\_otchet.php](http://www.rahr.ru/registr_otchet.php).
- [3] Вартамян Э.В., Девятова Е.А., Цатурова К.А., Аглямова Д.Р./Роль системной терапии при бесплодии и неудачах реализации репродуктивной функции. //Акушерство, гинекология и репродукция. - 2018. - N 12. - С. 6– 16.
- [4] Donaghay M., Lessey B.A. /Uterine receptivity: alteration associated with benign gynecological disease. //Semin. Reprod. Med. - 2007; 25(6): 461-75.
- [5] Rossant J, Tam PPL. /Early human embryonic development: Blastocyst formation to gastrulation. //Dev Cell. -2022 Jan 24;57(2):152-165. doi: 10.1016/j.devcel.2021.12.022. PMID: 35077679.
- [6] Franasiak JM, Forman EJ, Hong KH, Werner MD, Upham KM, Treff NR, Scott RT Jr. /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. PMID: 24355045.
- [7] Королькова А.И., Мишиева Н.Г., Бурменская О.В. /Современные методы селекции эмбрионов при проведении программ вспомогательных репродуктивных технологий. //Акушерство и гинекология. - 2018. № 2. С. 13-18. DOI 10.18565/aig.2018.2.13-18.
- [8] Minasi MG, Fiorentino F, Ruberti A, Biricik A, Cursio E, Cotroneo E, Varricchio MT, Surdo M, Spinella F, Greco E. /Genetic diseases and aneuploidies can be detected with a single blastocyst biopsy: a successful clinical approach. //Hum Reprod. - 2017 Aug 1;32.

- [9] Gleicher N, Patrizio P, Brivanlou A. /Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy - a Castle Built on Sand. //Trends Mol Med. 2021 Aug;27(8):731-742. doi: 10.1016/j.molmed.2020.11.009. Epub 2021 Jan 11. PMID: 33446425.
- [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.
- [11] Capalbo A, Romanelli V, Patassini C, Poli M, Girardi L, Giancani A, Stoppa M, Cimadomo D, Ubaldi FM, Rienzi L. /Diagnostic efficacy of blastocoel fluid and spent media as sources of DNA for preimplantation genetic testing in standard clinical conditions. //Fertil Steril. 2018 Oct;110(5):870-879.e5. doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.05.031. Erratum in: Fertil Steril. 2019 Jan;111(1):194. PMID: 30316433..
- [12] Kong Q, Quan X, Du J, Tai Y, Liu W, Zhang J, Zhang X, Mu Y, Liu Z. /Endo-siRNAs regulate early embryonic development by inhibiting transcription of long terminal repeat sequence in pig†. //Biol Reprod. - 2019 Jun 1;100(6):1431-1439. doi: 10.1093/biolre/ioz042. PMID: 30883641.
- [13] Czech B, Munafò M, Ciabrelli F, Eastwood EL, Fabry MH, Kneuss E, Hannon GJ. /piRNA-Guided Genome Defense: From Biogenesis to Silencing. //Annu Rev Genet. - 2018 Nov 23;52:131-157. doi: 10.1146/annurev-genet-120417-031441. PMID: 30476449.
- [14] Tóth KF, Pezic D, Stuwe E, Webster A. /The piRNA Pathway Guards the Germline Genome Against Transposable Elements. //Adv Exp Med Biol. - 2016;886:51-77. doi: 10.1007/978-94-017-7417-8\_4. PMID: 26659487; PMCID: PMC4991928.
- [15] Dexheimer PJ, Cochella L. /MicroRNAs: From Mechanism to Organism. Front Cell Dev Biol. 2020 Jun 3;8:409. doi: 10.3389/fcell.2020.00409. PMID: 32582699; PMCID: PMC7283388.

- [16] Timofeeva, A.; Drapkina, Y.; Fedorov, I.; Chagovets, V.; Makarova, N.; Shamina, M.; Kalinina, E.; Sukhikh, G. /Small Noncoding RNA Signatures for Determining the Developmental Potential of an Embryo at the Morula Stage. //Int. J. Mol. Sci. 2020, 21, 9399.
- [17] 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. Epub 2014 Mar 12. PMID: 24786747.
- [18] 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 trophoctoderm 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. Epub 2015 Oct 9. PMID: 26453979.
- [19] Abu-Halima M, Khaizaran ZA, Ayesh BM, Fischer U, Khaizaran SA, Al-Battah F, Hammadeh M, Keller A, Meese E. /MicroRNAs in combined spent culture media and sperm are associated with embryo quality and pregnancy outcome. //Fertil Steril. 2020 May;113(5):970-980.e2. doi: 10.1016/j.fertnstert.2019.12.028. Epub 2020 Mar 25. PMID: 32222254.
- [20] Handyside AH. Noninvasive preimplantation genetic testing: dream or reality? Fertil Steril. 2016 Nov;106(6):1324-1325. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.08.046. Epub 2016 Sep 16. PMID: 27645293..
- [21] 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. PMID: 19087971.
- [22] Jensen PL, Beck HC, Petersen TS, Stroebech L, Schmidt M, Rasmussen LM, Hyttel P. /Proteomic analysis of the early bovine yolk sac fluid and cells from the day 13 ovoid and elongated preimplantation embryos. //Theriogenology. 2014 Sep 15;82(5):657-67. doi: 10.

- [23] Tedeschi G, Albani E, Borroni EM, Parini V, Brucculeri AM, Maffioli E, Negri A, Nonnis S, Maccarrone M, Levi-Setti PE. /Proteomic profile of maternal-aged blastocoel fluid suggests a novel role for ubiquitin system in blastocyst quality. //J Assist Reprod Genet. 2017 Feb;34(2):225-238. doi: 10.1007/s10815-016-0842-x. Epub 2016 Dec 6. PMID: 27924460; PMCID: PMC5306408.
- [24] Sanchez DJD, Vasconcelos FR, Teles-Filho ACA, Viana AGA, Martins AMA, Sousa MV, Castro MS, Ricart CA, Fontes W, Bertolini M, Bustamante-Filho IC, Moura AA. /Proteomic profile of pre-implantational ovine embryos produced in vivo. //Reprod Domest Anim. 2021 Ap.
- [25] Jensen PL, Beck HC, Petersen J, Hreinsson J, Wånggren K, Laursen SB, Sørensen PD, Christensen ST, Andersen CY. /Proteomic analysis of human blastocoel fluid and blastocyst cells. //Stem Cells Dev. 2013 Apr 1;22(7):1126-35. doi: 10.1089/scd.2012.0239. Epub 20.
- [26] Abreu CM, Thomas V, Knaggs P, Bunkheila A, Cruz A, Teixeira SR, Alpuim P, Francis LW, Gebril A, Ibrahim A, Margarit L, Gonzalez D, Freitas PP, Conlan RS, Mendes Pinto I. /Non-invasive molecular assessment of human embryo development and implantation potential. //Biosens Bioelectron. 2020 Jun 1;157:112144. doi: 10.1016/j.bios.2020.112144. Epub 2020 Mar 14. PMID: 32250927.
- [27] 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. doi: 10.15252/emmm.201505344. PMID: 26471863; PMCID:.
- [28] Leese HJ. /Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on. //Reproduction. 2012 Apr;143(4):417-27. doi: 10.1530/REP-11-0484. Epub 2012 Mar 9. PMID: 22408180.
- [29] Gardner DK, Harvey AJ. /Blastocyst metabolism. //Reprod Fertil Dev. 2015 May;27(4):638-54. doi: 10.1071/RD14421..



- [30] Dabi Y, Suisse S, Marie Y, Delbos L, Poilblanc M, Descamps P, Golfier F, Jornea L, Forlani S, Bouteiller D, Touboul C, Puchar A, Bendifallah S, Daraï E. /New class of RNA biomarker for endometriosis diagnosis: The potential of salivary piRNA expression. //Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2023 Dec;291:88-95. doi: 10.1016/j.ejogrb.2023.10.015. Epub 2023 Oct 13. PMID: 37857147.
- [31] Czech B, Munafò M, Ciabrelli F, Eastwood EL, Fabry MH, Kneuss E, Hannon GJ. /piRNA-Guided Genome Defense: From Biogenesis to Silencing. //Annu Rev Genet. 2018 Nov 23;52:131-157. doi: 10.1146/annurev-genet-120417-031441. PMID: 30476449.
- [32] Zhang Q, Su J, Kong W, Fang Z, Li Y, Huang Z, Wen J, Wang Y. /Roles of miR-10a-5p and miR-103a-3p, Regulators of BDNF Expression in Follicular Fluid, in the Outcomes of IVF-ET. //Front Endocrinol (Lausanne). 2021 May 12;12:637384. doi: 10.3389/fendo.2021.637.
- [33] Abd El Naby WS, Hagos TH, Hossain MM, Salilew-Wondim D, Gad AY, Rings F, Cinar MU, Tholen E, Looft C, Schellander K, Hoelker M, Tesfaye D. /Expression analysis of regulatory microRNAs in bovine cumulus oocyte complex and preimplantation embryos. //Zygote. 2013 Feb;21(1):31-51. doi: 10.1017/S0967199411000566. Epub 2011 Oct 11. PMID: 22008281.
- [34] Sinha PB, Tesfaye D, Rings F, Hossien M, Hoelker M, Held E, Neuhoff C, Tholen E, Schellander K, Salilew-Wondim D. /MicroRNA-130b is involved in bovine granulosa and cumulus cells function, oocyte maturation and blastocyst formation. //J Ovarian Res. 2017 Jun 19;10(1):37. doi: 10.1186/s13048-017-0336-1. PMID: 28629378; PMCID: PMC5477299.
- [35] Kim YJ, Ku SY, Kim YY, Liu HC, Chi SW, Kim SH, Choi YM, Kim JG, Moon SY. /MicroRNAs transfected into granulosa cells may regulate oocyte meiotic competence during in vitro maturation of mouse follicles. //Hum Reprod. 2013 Nov;28(11):3050-61. doi: 10.1093/humrep/det338. Epub 2013 Aug 26. PMID: 23980055.

- [36] Wilczynska A, Git A, Argasinska J, Belloc E & Standart N 2016 CPEB and miR-15/16 co-regulate translation of cyclin E1 mRNA during xenopus oocyte maturation. PLoS ONE 11 e0146792. (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146792>).
- [37] Pan B, Toms D, Shen W, Li J. /MicroRNA-378 regulates oocyte maturation via the suppression of aromatase in porcine cumulus cells. //Am J Physiol Endocrinol Metab. 2015 Mar 15;308(6):E525-34. doi: 10.1152/ajpendo.00480.2014. Epub 2015 Jan 27. PMID: 25628423; PMCID: PMC4360015.
- [38] Tesfaye D, Gebremedhn S, Salilew-Wondim D, Hailay T, Hoelker M, Grosse-Brinkhaus C, Schellander K. /MicroRNAs: tiny molecules with a significant role in mammalian follicular and oocyte development. //Reproduction. 2018 Mar;155(3):R121-R135. doi: 10.1530/REP-.
- [39] Khan HL, Bhatti S, Abbas S, Kaloglu C, Isa AM, Younas H, Ziders R, Khan YL, Hassan Z, Turhan BO, Yildiz A, Aydin HH, Kalyan EY. /Extracellular microRNAs: key players to explore the outcomes of in vitro fertilization. //Reprod Biol Endocrinol. 2021 May 15;19(.
- [40] Scalici E, Traver S, Mullet T, Molinari N, Ferrières A, Brunet C, Belloc S, Hamamah S. /Circulating microRNAs in follicular fluid, powerful tools to explore in vitro fertilization process. //Sci Rep. 2016 Apr 22;6:24976. doi: 10.1038/srep24976. PMID: 2710264.
- [41] ElMonier AA, El-Boghdady NA, Fahim SA, Sabry D, Elsetohy KA, Shaheen AA. /LncRNA NEAT1 and MALAT1 are involved in polycystic ovary syndrome pathogenesis by functioning as competing endogenous RNAs to control the expression of PCOS-related target genes. //Noncoding RNA Res. 2023 Mar 3;8(2):263-271. doi: 10.1016/j.ncrna.2023.02.008. PMID: 36935861; PMCID: PMC10020466.
- [42] Barceló M, Mata A, Bassas L, Larriba S. /Exosomal microRNAs in seminal plasma are markers of the origin of azoospermia and can predict the presence

- of sperm in testicular tissue. //Hum Reprod. 2018 Jun 1;33(6):1087-1098. doi: 10.1093/humrep/dey072. PMID: 296.
- [43] Al-Mawlah YH, Al-Darraji MN, Al-Imari MJ. /Study of Small Non-Coding RNA (miRNA) Expression Pattern of Fertile/Infertile Male Semen. //Acta Inform Med. 2022 Sep;30(3):205-212. doi: 10.5455/aim.2022.30.205-212. PMID: 36311149; PMCID: PMC9559773..
- [44] Guo L Chao S-B Xiao L Wang Z-B Meng T-G Li Y-Y Han Z-M Ouyang Y-C Hou Y Sun Q-Y. et al. /Sperm-carried RNAs play critical roles in mouse embryonic development. //Oncotarget 2017;8:67394–67405..
- [45] Huang W, Chen ACH, Ng EHY, Yeung WSB, Lee YL. /Non-Coding RNAs as Biomarkers for Embryo Quality and Pregnancy Outcomes: A Systematic Review and Meta-Analysis. //Int J Mol Sci. 2023 Mar 17;24(6):5751. doi: 10.3390/ijms24065751. PMID: 36982824; PMCID: PMC10052.
- [46] Timofeeva, A.V.; Fedorov, I.S.; Shamina, M.A.; Chagovets, V.V.; Makarova, N.P.; Kalinina, E.A.; Nazarenko, T.A.; Sukhikh, G.T. /Clinical Relevance of Secreted Small Noncoding RNAs in an Embryo Implantation Potential Prediction at Morula and Blastocyst Deve, 2021.
- [47] 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..
- [48] Ranganathan K, Sivasankar V. /MicroRNAs - Biology and clinical applications. //J Oral Maxillofac Pathol. 2014 May;18(2):229-34. doi: 10.4103/0973-029X.140762. PMID: 25328304; PMCID: PMC4196292..
- [49] Esmaeilvand M, Fattahi A, Abedelahi A, Hamdi K, Farzadi L, Goharitaban S, Niknafs B. /microRNAs in the blastocoel fluid as accessible indicators of chromosomal normality. //Reprod Biol. 2022 Dec;22(4):100695. doi: 10.1016/j.repbio.2022.100695. Epub 2022 Sep.

- [50] Diakiw SM, Hall JMM, VerMilyea MD, Amin J, Aizpurua J, Giardini L, Briones YG, Lim AYG, Dakka MA, Nguyen TV, Perugini D, Perugini M. /Development of an artificial intelligence model for predicting the likelihood of human embryo euploidy based on blastocyst images from multiple imaging systems during IVF. //Hum Reprod. 2022 Jul 30;37(8):1746-1759. doi: 10.1093/humrep/deac131. PMID: 35674312; PMCID: PMC9340116.
- [51] Pirtea P, Scott RT Jr, de Ziegler D, Ayoubi JM. /Recurrent implantation failure: how common is it? //Curr Opin Obstet Gynecol. 2021 Jun 1;33(3):207-212. doi: 10.1097/GCO.0000000000000698. PMID: 33896917.
- [52] Перминова С.Г., Савостина Г.В., Екимов А.Н., Белова И.С. /Роль преимплантационного генетического тестирования эмбрионов на анеуплоидии в исходах программ вспомогательных репродуктивных технологий у различных групп пациентов. //Акушерство и Гинекология, 2023 №3.
- [53] Fesahat F, Montazeri F, Hoseini SM. /Preimplantation genetic testing in assisted reproduction technology. //J Gynecol Obstet Hum Reprod. 2020 May;49(5):101723. doi: 10.1016/j.jogoh.2020.101723. Epub 2020 Feb 26. PMID: 32113002..
- [54] Bhatt SJ, Marchetto NM, Roy J, Morelli SS, McGovern PG. /Pregnancy outcomes following in vitro fertilization frozen embryo transfer (IVF-FET) with or without preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A) in women with recurrent pregnancy loss (RPL, with recurrent pregnancy loss (RPL): a SART-CORS study. //Hum Reprod. 2021 Jul 19;36(8):2339-2344. doi: 10.1093/humrep/deab117. PMID: 34027546.
- [55] Lin XH, Guo MX, Wu DD, Lu Y, Zhang JL, Zhou CL, Jin L, Wang L, Zhang C, Xu CM, Chen SC, Zhang SY, Sun XX, Wu YT, Sun Y, Huang HF. /Preimplantation genetic testing for aneuploidy in severe male factor infertility: protocol for a multicenter randomised, controlled trial. //BMJ

- Open. 2022 Jul 13;12(7):e063030. doi: 10.1136/bmjopen-2022-063030. PMID: 35831058; PMCID: PMC9280869.
- [56] 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..
- [57] Simopoulou M, Sfakianoudis K, Maziotis E, Tsioulou P, Grigoriadis S, Rapani A, Giannelou P, Asimakopoulou M, Kokkali G, Pantou A, Nikolettos K, Vlahos N, Pantos K. /PGT-A: who and when? A systematic review and network meta-analysis of RCTs. //J Assist Reprod Genet. 2021 Aug;38(8):1939-1957. doi: 10.1007/s10815-021-02227-9. Epub 2021 May 25. PMID: 34036455; PMCID: PMC8417193.
- [58] Савостина Г.В., Перминова С.Г., Екимов А.Н., Веюкова М.А. /Преимплантационное генетическое тестирование эмбрионов на анеуплоидии: возможности, проблемы и перспективы. //Акушерство и Гинекология, 2021 №8
- [59] Popovic M, Dhaenens L, Boel A, Menten B, Heindryckx B. /Chromosomal mosaicism in human blastocysts: the ultimate diagnostic dilemma. //Hum Reprod Update. 2020 Apr 15;26(3):313-334. doi: 10.1093/humupd/dmz050. Erratum in: Hum Reprod Update. 2020 Apr 15;26(3):450-451. PMID: 32141501.
- [60] Карпухина А.А., Васецкий Е.С. /Экспрессия активатора зиготического генома DUX4 в соматических клетках приводит к развитию наследственных и онкологических заболеваний. //Онтогенез, 2020. т.51 №3, стр. 210 – 217.
- [61] Hong Li Y, Marren A. /Recurrent pregnancy loss: A summary of international evidence-based guidelines and practice. //Aust J Gen Pract. 2018 Jul;47(7):432-436. doi: 10.31128/AJGP-01-18-4459. PMID: 30114870..
- [62] El Hachem H, Crepaux V, May-Panloup P, Descamps P, Legendre G, Bouet PE. /Recurrent pregnancy loss: current perspectives. //Int J Womens Health.

- 2017 May 17;9:331-345. doi: 10.2147/IJWH.S100817. PMID: 28553146; PMCID: PMC5440030..
- [63] Popescu F, Jaslow CR, Kutteh WH. /Recurrent pregnancy loss evaluation combined with 24-chromosome microarray of miscarriage tissue provides a probable or definite cause of pregnancy loss in over 90% of patients. //Hum Reprod. 2018 Apr 1;33(4):579-587. doi: 1.
- [64] Tanaka A, Watanabe S. /Can cytoplasmic donation rescue aged oocytes? //Reprod Med Biol. 2018 Oct 28;18(2):128-139. doi: 10.1002/rmb2.12252. PMID: 30996676; PMCID: PMC6452014..
- [65] Ubaldi FM, Cimadomo D, Capalbo A, Vaiarelli A, Buffo L, Trabucco E, Ferrero S, Albani E, Rienzi L, Levi Setti PE. /Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy testing in women older than 44 years: a multicenter experience. //Fertility and Sterility. 2017.
- [66] Оразов М.Р., Хамошина М.Б., Михалева Л.М., Волкова С.В., Абитова М.З., Шустова В.Б., Хованская Т.Н. /Молекулярногенетические особенности состояния эндометрия при эндометриозассоциированном бесплодии // Трудный пациент. 2020. №1-2. URL: <https://cyberleninka>.
- [67] 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>..
- [68] Назаренко Т. А., Краснопольская К. В. /Модификации схем стимуляции яичников: показания и эффективность //Rossiiskii Vestnik Akushera-Ginekologa. – 2017. – Т. 17. – №. 5..
- [69] Osman A, Alsomait H, Seshadri S, El-Toukhy T, Khalaf Y. /The effect of sperm DNA fragmentation on live birth rate after IVF or ICSI: a systematic review and meta-analysis. //Reprod Biomed Online. 2015 Feb;30(2):120-7. doi: 10.1016/j.rbmo.2014.10.018. Epub 20.

- [70] Robinson L, Gallos I.D, Conner S.J, Rajkhowa M, Miller D, Lewis S, Kirkman-Brown J, Coomarasamy A. /The effect of sperm DNA fragmentation on miscarriage rates: a systematic review and meta-analysis. //Hum. Reprod. 2012; 27: 2908-2917.
- [71] Киселева Ю. Ю., Кодылева Т. А., Кириллова А. О. /Использование скрининговых тестов на выявление наиболее распространенных мутаций перед программой вспомогательных репродуктивных технологий. //Проблемы репродукции. – 2017. – Т. 23. – №. 2. – С. 47-49.
- [72] Tarozzi N, Nadalini M, Lagalla C, Coticchio G, Zacà C, Borini A. /Male factor infertility impacts the rate of mosaic blastocysts in cycles of preimplantation genetic testing for aneuploidy. //J Assist Reprod Genet. 2019 Oct;36(10):2047-2055. doi: 10.1007/s10.
- [73] Панченко Е. Г. /Диагностика хромосомных аномалий плода при потерях беременности//Тверской медицинский журнал. – 2021. – №. 2. – С. 65-73.
- [74] Capalbo A, Hoffmann ER, Cimadomo D, Ubaldi FM, Rienzi L. /Human female meiosis revised: new insights into the mechanisms of chromosome segregation and aneuploidies from advanced genomics and time-lapse imaging. //Hum Reprod Update. 2017 Nov 1;23(6):706-722. doi: 10.1093/humupd/dmx026. PMID: 28961822.
- [75] Смирнова А.А., Зыряева Н.А., Аншина М.Б. /Возрастные изменения и риск хромосомных аномалий в ооцитах человека (обзор литературы). //Проблемы репродукции. 2019;25(2):16-26.
- [76] Chambers GM, Paul RC, Harris K, Fitzgerald O, Boothroyd CV, Rombauts L, Chapman MG, Jorm L. /Assisted reproductive technology in Australia and New Zealand: cumulative live birth rates as measures of success. //Med J Aust. 2017 Aug 7;207(3):114-118. doi: 10.5694/mja16.01435. PMID: 28764619.

- [77] Tarozzi N, Nadalini M, Coticchio G, Zacà C, Lagalla C, Borini A. /The paternal toolbox for embryo development and health. //Mol Hum Reprod. 2021 Jul 1;27(7):gaab042. doi: 10.1093/molehr/gaab042. PMID: 34191013.
- [78] L. Uroz, C. Templado /Meiotic non-disjunction mechanisms in human fertile males //Human Reproduction, Volume 27, Issue 5, May 2012, Pages 1518–1524, <https://doi.org/10.1093/humrep/des051>.
- [79] Bolton H, Graham SJL, Van der Aa N, Kumar P, Theunis K, Fernandez Gallardo E, Voet T, Zernicka-Goetz M. /Mouse model of chromosome mosaicism reveals lineage-specific depletion of aneuploid cells and normal developmental potential. //Nat Commun. 2016 Mar 29;7.
- [80] Singla S, Iwamoto-Stohl LK, Zhu M, Zernicka-Goetz M. /Autophagy-mediated apoptosis eliminates aneuploid cells in a mouse model of chromosome mosaicism. //Nat Commun. 2020 Jun 11;11(1):2958. doi: 10.1038/s41467-020-16796-3. PMID: 32528010; PMCID: PMC7290028.
- [81] Li X, Hao Y, Elshewy N, Zhu X, Zhang Z, Zhou P. /The mechanisms and clinical application of mosaicism in preimplantation embryos. //J Assist Reprod Genet. 2020 Mar;37(3):497-508. doi: 10.1007/s10815-019-01656-x. Epub 2019 Dec 14. PMID: 31838629; PMCID: PMC71.
- [82] Los FJ, Van Opstal D, van den Berg C. /The development of cytogenetically normal, abnormal and mosaic embryos: a theoretical model. //Hum Reprod Update. 2004 Jan-Feb;10(1):79-94. doi: 10.1093/humupd/dmh005. PMID: 15005466.
- [83] Greco E, Minasi MG, Fiorentino F. /Healthy Babies after Intrauterine Transfer of Mosaic Aneuploid Blastocysts. //New England Journal of Medicine. 2015;373(21):2089-2090. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1500421>.
- [84] Munné S, Blazek J, Large M, Martinez-Ortiz PA, Nisson H, Liu E, Tarozzi N, Borini A, Becker A, Zhang J, Maxwell S, Grifo J, Babariya D, Wells D, Fragouli E. /Detailed investigation into the cytogenetic constitution and



- pregnancy outcome of replacing mosaic blastocysts detected with the use of high-resolution next-generation sequencing. //Fertil Steril. 2017 Jul;108(1):62-71.e8. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.05.002. Epub 2017 Jun 1. PMID: 28579407.
- [85] Victor AR, Tyndall JC, Brake AJ, Lepkowsky LT, Murphy AE, Griffin DK, McCoy RC, Barnes FL, Zouves CG, Viotti M. /One hundred mosaic embryos transferred prospectively in a single clinic: exploring when and why they result in healthy pregnancies. //Fertil Steril. 2019 Feb;111(2):280-293. doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.10.019. PMID: 30691630.
- [86] Zhang L, Wei D, Zhu Y, Gao Y, Yan J, Chen ZJ. /Rates of live birth after mosaic embryo transfer compared with euploid embryos. //Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 2019;36(1):165-172. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1322-2>.
- [87] Zore T, Kroener LL, Wang C, Liu L, Buyalos R, Hubert G, Shamonki M. /Transfer of embryos with segmental mosaicism is associated with a significant reduction in live-birth rate. //Fertility and Sterility. 2019;111(1):69-76. [https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019;111\(1\):69-76](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019;111(1):69-76).
- [88] Информационное письмо Международного общества ПГД от 27 мая 2019 г. Проблемы репродукции. 2019;25(4):8-12.
- [89] Saifitdinova, A. F., et al. (2020) Mosaicism in preimplantation human embryos // Integrative Physiology, vol. 1, no. 3, pp. 225–230. DOI: 10.33910/2687-1270-2020-1-3-225-230.
- [90] Prados, F.J.; Debrock, S.; Lemmen, J.G.; Agerholm, I. /The cleavage stage embryo. //Hum. Reprod. 2012, 27 (Suppl. 1), i50–i71.
- [91] Fordham DE, Rosentraub D, Polsky AL, Aviram T, Wolf Y, Perl O, Devir A, Rosentraub S, Silver DH, Gold Zamir Y, Bronstein AM, Lara Lara M, Ben Nagi J, Alvarez A, Munné S. /Embryologist agreement when assessing blastocyst implantation probability: is data-driven prediction the solution to

- embryo assessment subjectivity? //Hum Reprod. 2022 Sep 30;37(10):2275-2290. doi: 10.1093/humrep/deac171. PMID: 35944167.
- [92] Storr, A.; Venetis, C.A.; Cooke, S.; Kilani, S.; Ledger, W. /Inter-observer and intra-observer agreement between embryologists during selection of a single Day 5 embryo for transfer: A multicenter study. //Hum. Reprod. 2017, 32, 307–314.
- [93] Majumdar, G.; Majumdar, A.; Verma, I.C.; Upadhyaya, K.C. /Relationship Between Morphology, Euploidy and Implantation Potential of Cleavage and Blastocyst Stage Embryos. J. //Hum. Reprod. Sci. 2017, 10, 49–57.
- [94] Aparicio-Ruiz B, Basile N, Pérez Albalá S, Bronet F, Remohí J, Meseguer M. /Automatic time-lapse instrument is superior to single-point morphology observation for selecting viable embryos: retrospective study in oocyte donation. //Fertil Steril. 2016 Nov;106(6):1379-1385.e10. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.07.1117. Epub 2016 Aug 13. PMID: 27530063.
- [95] Benchaib, M.; Labrune, E.; Giscard d'Estaing, S.; Salle, B.; Lornage, J. /Shallow artificial networks with morphokinetic time-lapse parameters coupled to ART data allow to predict live birth. //Reprod. Med. Biol. 2022, 21, e12486. [Google Scholar] [CrossRef].
- [96] Armstrong, S.; Bhide, P.; Jordan, V.; Pacey, A.; Marjoribanks, J.; Farquhar, C. /Time-lapse systems for embryo incubation and assessment in assisted reproduction. Cochrane. //Database. Syst. Rev. 2019, 5, Cd011320. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed].
- [97] Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and the Society for Assisted Reproductive Technology. Electronic address: ASRM@asrm.org; Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and the Society for Assisted Reproductive Technology. The use of preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A): a committee opinion. //Fertil Steril. 2018 Mar;109(3):429-436. doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.01.002. PMID: 29566854.

- [98] Dahdouh EM, Balayla J, Audibert F; Genetics Committee; Wilson RD, Audibert F, Brock JA, Campagnolo C, Carroll J, Chong K, Gagnon A, Johnson JA, MacDonald W, Okun N, Pastuck M, Vallée-Pouliot K. /RETIRED: Technical Update: Preimplantation Genetic Diagnosis and Screening. //J Obstet Gynaecol Can. 2015 May;37(5):451-63. doi: 10.1016/s1701-2163(15)30261-9. PMID: 26168107.
- [99] Keltz MD, Vega M, Sirota I, Lederman M, Moshier EL, Gonzales E, Stein D. /Preimplantation genetic screening (PGS) with Comparative genomic hybridization (CGH) following day 3 single cell blastomere biopsy markedly improves IVF outcomes while lowering multiple pregnancies and miscarriages. //J Assist Reprod Genet. 2013 Oct;30(10):1333-9. doi: 10.1007/s10815-013-0070-6. Epub 2013 Aug 16. PMID: 23949213; PMCID: PMC3824853.
- [100] ESHRE PGT-SR/PGT-A Working Group; Coonen E, Rubio C, Christopikou D, Dimitriadou E, Gontar J, Goossens V, Maurer M, Spinella F, Vermeulen N, De Rycke M. ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the detection of structural and numerical chromosomal aberrations. Hum Reprod Open. 2020 May 29;2020(3):hoaa017. doi: 10.1093/hropen/hoaa017. PMID: 32500102; PMCID: PMC7257111.
- [101] Munné S, Cohen J. /Advanced maternal age patients benefit from preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. //Fertil Steril. 2017 May;107(5):1145-1146. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.03.015. Epub 2017 Apr 6. PMID: 28390694.
- [102] Munné S, Kaplan B, Frattarelli JL, Child T, Nakhuda G, Shamma FN, Silverberg K, Kalista T, Handyside AH, Katz-Jaffe M, Wells D, Gordon T, Stock-Myer S, Willman S; STAR Study Group. /Preimplantation genetic testing for aneuploidy versus morphology as selection criteria for single frozen-thawed embryo transfer in good-prognosis patients: a multicenter

- randomized clinical trial. //Fertil Steril. 2019 Dec;112(6):1071-1079.e7. doi: 10.1016/j.fertnstert.2019.07.1346. Epub 2019 Sep 21. PMID: 31551155.
- [103] Малышева О. В. /Технологические платформы преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии: сравнительная эффективность диагностики хромосомной патологии // Акушерство и Гинекология. 2020. № 4. С. 65–71.
- [104] Aleksandrova NV, Shubina ES, Ekimov AN, Kodyleva TA, Mukosey IS, Makarova NP, Kulakova EV, Levkov LA, Barkov IY, Trofimov DY, Sukhikh GT. /Comparative results of preimplantation genetic screening by array comparative genomic hybridization and new-generation sequencing.// Mol Biol (Mosk). 2017 Mar-Apr;51(2):308-313. Russian. doi: 10.7868/S0026898417010025. PMID: 28537237.
- [105] Friedenthal J, Maxwell SM, Munné S, Kramer Y, McCulloh DH, McCaffrey C, Grifo JA. /Next generation sequencing for preimplantation genetic screening improves pregnancy outcomes compared with array comparative genomic hybridization in single thawed euploid embryo transfer cycles. //Fertil Steril. 2018 Apr;109(4):627-632. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.12.017. Epub 2018 Mar 28. PMID: 29605407.
- [106] Лебедев И.Н. /Преимплантационное генетическое тестирование анеуплоидий: современное состояние, тренды и перспективы развития. //Медицинская генетика. 2019;18(3):3-12. <https://doi.org/10.25557/2073-7998.2019.03.3-12>.
- [107] Neumann K, Sermon K, Bossuyt P, Goossens V, Geraedts J, Traeger-Synodinos J, Parriego M, Schmutzler A, van der Ven K, Rudolph-Rothfeld W, Vonthein R, Griesinger G. /An economic analysis of preimplantation genetic testing for aneuploidy by polar body biopsy in advanced maternal age. //BJOG. 2020 May;127(6):710-718. doi: 10.1111/1471-0528.16089. Epub 2020 Feb 4. PMID: 31930663.

- [108] Adler A. /Blastocyst culture selects for euploid embryos: Comparison of blastomere and trophectoderm biopsies // Reproductive BioMedicine Online. 2014. № 4 (28). С. 485–491.
- [109] Magli M. C. /Preimplantation genetic testing: Polar bodies, blastomeres, trophectoderm cells, or blastocoelic fluid? // Fertility and Sterility. 2016. № 3 (105). С. 676-683.e5..
- [110] Scott RT Jr, Upham KM, Forman EJ, Hong KH, Scott KL, Taylor D, Tao X, Treff NR. /Blastocyst biopsy with comprehensive chromosome screening and fresh embryo transfer significantly increases in vitro fertilization implantation and delivery rates: a randomized controlled trial. //Fertil Steril. 2013 Sep;100(3):697-703. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.04.035. Epub 2013 Jun 1. PMID: 23731996.
- [111] Viotti M. /Preimplantation Genetic Testing for Chromosomal Abnormalities: Aneuploidy, Mosaicism, and Structural Rearrangements. //Genes (Basel). 2020 May 29;11(6):602. doi: 10.3390/genes11060602. PMID: 32485954; PMCID: PMC7349251.
- [112] Schmutzler AG. /Theory and practice of preimplantation genetic screening (PGS). //Eur J Med Genet. 2019 Aug;62(8):103670. doi: 10.1016/j.ejmg.2019.103670. Epub 2019 May 25. PMID: 31136844.
- [113] Е. Кулакова , Е. А. Калинина и Д. Ю. Трофимов /Вспомогательные репродуктивные технологии у супружеских пар с высоким риском генетических нарушений. Преимплантационный генетический скрининг. //Акушерство и Гинекология, 2017.
- [114] Greco E, Litwicka K, Minasi MG, Cursio E, Greco PF, Barillari P. /Preimplantation Genetic Testing: Where We Are Today. //Int J Mol Sci. 2020 Jun 19;21(12):4381. doi: 10.3390/ijms21124381. PMID: 32575575; PMCID: PMC7352684.
- [115] Адамян Л.В., ред. Женское бесплодие (современные подходы к диагностике и лечению). Клинические рекомендации (Протокол

- лечения). М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации; 2019.
- [116] Mikwar M, MacFarlane AJ, Marchetti F. /Mechanisms of oocyte aneuploidy associated with advanced maternal age. //Mutat Res Rev Mutat Res. 2020 Jul-Sep;785:108320. doi: 10.1016/j.mrrev.2020.108320. Epub 2020 Jul 4. PMID: 32800274.
- [117] Shi WH, Jiang ZR, Zhou ZY, Ye MJ, Qin NX, Huang HF, Chen SC, Xu CM. /Different Strategies of Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidies in Women of Advanced Maternal Age: A Systematic Review and Meta-Analysis. //J Clin Med. 2021 Aug 30;10(17):3895. doi.
- [118] Sacchi, L.; Albani, E.; Cesana, A.; Smeraldi, A.; Parini, V.; Fabiani, M.; Poli, M.; Capalbo, A.; Levi-Setti, P.E. /Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy Improves Clinical, Gestational, and Neonatal Outcomes in Advanced Maternal, Age Patients Without Compromising Cumulative Live-Birth Rate. //J. Assist. Reprod. Genet. 2019, 36, 2493–2504.
- [119] Vitagliano A, Paffoni A, Viganò P. /Does maternal age affect assisted reproduction technology success rates after euploid embryo transfer? A systematic review and meta-analysis. //Fertil Steril. 2023 Aug;120(2):251-265. doi: 10.1016/j.fertnstert.2023.02.036. Epub 2023 Mar 5. PMID: 36878347.
- [120] Rubio C, Bellver J, Rodrigo L, Castellón G, Guillén A, Vidal C, Giles J, Ferrando M, Cabanillas S, Remohí J, Pellicer A, Simón C. /In vitro fertilization with preimplantation genetic diagnosis for aneuploidies in advanced maternal age: a randomized, controlled study. //Fertil Steril. 2017 May;107(5):1122-1129. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.03.011. Epub 2017 Apr 19. PMID: 28433371.
- [121] Бейк Е.П., Коротченко О.Е., Гвоздева А.Д., Сыркашева А.Г., Долгушина Н.В. /Роль преимплантационного генетического скрининга в повышении эффективности программ вспомогательных

репродуктивных технологий у пациенток позднего репродуктивного возраста// Акушерство и гинекология, 2018 4:78 – 84.

- [122] Reig A, Franasiak J, Scott RT Jr, Seli E. /The impact of age beyond ploidy: outcome data from 8175 euploid single embryo transfers. //J Assist Reprod Genet. 2020 Mar;37(3):595-602. doi: 10.1007/s10815-020-01739-0. Epub 2020 Mar 16. PMID: 32173784; PMCID: PMC.
- [123] Dhillon R.K. Hillman S.C. Morris R.K. McMullan D. Williams D. Coomarasamy A. et al. /Additional information from chromosomal microarray analysis (CMA) over conventional karyotyping when diagnosing chromosomal abnormalities, in miscarriage: a systematic review and meta-analysis. //BJOG. 2014 Jan;121(1):11-21. doi: 10.1111/1471-0528.12382. Epub 2013 Jul 17. PMID: 23859082.
- [124] Philipp T., Philipp K., Reiner A., Beer F., Kalousek D.K. /Embryoscopic and cytogenetic analysis of 233 missed abortions: factors involved in the pathogenesis of developmental defects of early failed pregnancies. //Hum Reprod. 2003; 18(8):1724–32.
- [125] McQueen DB, Lathi RB. /Miscarriage chromosome testing: Indications, benefits and methodologies. //Semin Perinatol. 2019 Mar;43(2):101-104. doi: 10.1053/j.semperi.2018.12.007. Epub 2018 Dec 20. PMID: 30638881.
- [126] Bhatt SJ, Marchetto NM, Roy J, Morelli SS, McGovern PG. /Pregnancy outcomes following in vitro fertilization frozen embryo transfer (IVF-FET) with or without preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A) in women with recurrent pregnancy loss (RPL, with recurrent pregnancy loss (RPL): a SART-CORS study. //Hum Reprod. 2021 Jul 19;36(8):2339-2344. doi: 10.1093/humrep/deab117. PMID: 34027546. .
- [127] Sato, T. /Preimplantation genetic testing for aneuploidy: A comparison of live birth rates in patients with, recurrent pregnancy loss due to embryonic aneuploidy or recurrent implantation failure. //Hum Reprod. 2019 Dec

- 1;34(12):2340-2348. doi: 10.1093/humrep/dez229. Erratum in: Hum Reprod. 2020 Jan 1;35(1):255. PMID: 31811307.
- [128] Liu L., Zhou F., Lin X., Li T., Tong X., Zhu H., Zhang S. /Recurrent IVF failure with elevated progesterone on the day of hCG administration. //Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 2013; 171(1): 78-83.
- [129] Тетруашвили Н. К. /Привычный выкидыш. //Акушерство и гинекология: Новости. Мнения. Обучения. 2017. №4 (18). [Tetruashvili N.K. Recurrent miscarriage. Obstetrics and Gynecology: News. Opinions. Training. 2017. №4 (18)].
- [130] Bashiri A, Halper KI, Orvieto R. /Recurrent implantation failure-update overview on etiology, diagnosis, treatment and future directions. //Reprod Biol Endocrinol. 2018;16:121. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0414-2>.
- [131] Idelevich A, Vilella F. /Mother and Embryo Cross-Communication. //Genes. 2020;11:376. <https://doi.org/10.3390/genes11040376>.
- [132] Tong J, Niu Y, Wan A, Zhang T. Next-Generation Sequencing (NGS)-Based Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy (PGT-A) of Trophectoderm Biopsy for Recurrent Implantation Failure (RIF) Patients: a Retrospective Study. Reprod Sci. 2021 Jul;28(7):1923-.
- [133] Sato T, Sugiura-Ogasawara M, Ozawa F, Yamamoto T, Kato T, Kurahashi H, Kuroda T, Aoyama N, Kato K, Kobayashi R, Fukuda A, Utsunomiya T, Kuwahara A, Saito H, Takeshita T, Irahara M. /Preimplantation genetic testing for aneuploidy: a comparison of live birth, a comparison of live birth rates in patients with recurrent pregnancy loss due to embryonic aneuploidy or recurrent implantation failure. //Hum Reprod. 2019 Dec 1;34(12):2340-2348. doi: 10.1093/humrep/dez229. Erratum in: Hum Reprod. 2020 Jan 1;35(1):255. PM.
- [134] Greco E, Bono S, Ruberti A, Lobascio AM, Greco P, Biricik A, Spizzichino L, Greco A, Tesarik J, Minasi MG, Fiorentino F. /Comparative genomic hybridization selection of blastocysts for repeated implantation failure



- treatment: a pilot study. //Biomed Res Int., 2014;2014:457913. doi: 10.1155/2014/457913. Epub 2014 Mar 23. PMID: 24779011; PMCID: PMC3980987..
- [135] Tong J, Niu Y, Wan A, Zhang T. /Next-Generation Sequencing (NGS)-Based Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy (PGT-A) of Trophectoderm Biopsy for Recurrent Implantation Failure (RIF) Patients: a Retrospective Study. //Reprod Sci., 2021 Jul;28(7):1923-1929. doi: 10.1007/s43032-021-00519-0. Epub 2021 Mar 11. PMID: 33709375; PMCID: PMC8189974..
- [136] Pantou A, Mitrakos A, Kokkali G, Petroutsou K, Tounta G, Lazaros L, Dimopoulos A, Sfakianoudis K, Pantos K, Koutsilieris M, Mavrou A, Kanavakis E, Tzetis M. /The impact of preimplantation genetic testing for aneuploidies (PGT-A) on clinical outcomes in, high risk patients. //J Assist Reprod Genet. 2022 Jun;39(6):1341-1349. doi: 10.1007/s10815-022-02461-9. Epub 2022 Mar 25. PMID: 35338417; PMCID: PMC9174385..
- [137] Rodrigo L, Meseguer M, Mateu E, Mercader A, Peinado V, Bori L, Campos-Galindo I, Milán M, García-Herrero S, Simón C, Rubio C. /Sperm chromosomal abnormalities and their contribution to human embryo aneuploidy. //Biol Reprod. 2019 Dec 24;101(6):1091-1101.
- [138] Saei P, Bazrgar M, Gourabi H, Kariminejad R, Eftekhari-Yazdi P, Fakhri M. /Frequency of Sperm Aneuploidy in Oligoasthenoteratozoospermic (OAT) Patients by Comprehensive Chromosome Screening: A Proof of Concept. J //Reprod Infertil. 2021 Jan-Mar;22(1):57-64.
- [139] Киселева Ю.Ю., Азова М.М., Кодылева Т.А., Ушакова И.В., Кириллова А.О., Екимов А.Н., Ракитько А.С., Володяева Т.О., Мишиева Н.Г., /Результаты преимплантационного генетического скрининга эмбрионов у супружеских пар с фрагментацией ДНК сперматозоидов // Акушерство и гинекология. – 2017. – № 8. – С. 104-108. – DOI 10.18565/aig.2017.8.104-8. – EDN ZFTGNL.

- [140] Киселева Ю.Ю., Азова М.М., Кодылева Т.А., Кириллова А.О., Екимов А.Н., Ракитько А.С., Мишиева Н.Г., Абубакиров А.Н. /Увеличение анеуплоидий эмбрионов ассоциировано с пониженной долей морфологически нормальных сперматозоидов. // Генетика. 2017. Т. 53. № 1.
- [141] Макарова Н.П., Лобанова Н.Н., Кулакова Е.В., Непша О.С., Екимов А.Н., Калинина Е.А. /Влияние преимплантационного генетического тестирования на результаты программ вспомогательных репродуктивных технологий у супружеских пар с мужским фактором бесплодия.//Акушерство и гинекология. 2021. № 11. С. 154-164..
- [142] Asoglu MR, Celik C, Serefoglu EC, Findikli N, Bahceci M. /Preimplantation genetic testing for aneuploidy in severe male factor infertility. //Reprod Biomed Online. 2020 Oct;41(4):595-603. doi: 10.1016/j.rbmo.2020.06.015. Epub 2020 Jun 27. PMID: 32763130.
- [143] Xu R, Ding Y, Wang Y, He Y, Sun Y, Lu Y, Yao N. /Comparison of preimplantation genetic testing for aneuploidy versus intracytoplasmic sperm injection in severe male infertility. //Andrologia. 2021 Jul;53(6):e14065. doi: 10.1111/and.14065. Epub 2021 Apr 6. PMID: 33822394.
- [144] Tšuiiko O, Zhigalina DI, Jatsenko T, Skryabin NA, Kanbekova OR, Artyukhova VG, Svetlakov AV, Teearu K, Trošin A, Salumets A, Kurg A, Lebedev IN. /Karyotype of the blastocoel fluid demonstrates low concordance with both trophectoderm and inner cell mass. //Fertil Steril. 2018 Jun;109(6):1127-1134.e1. doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.02.008. PMID: 29935648.
- [145] Stigliani, S.; Anserini, P.; Venturini, P.L.; Scaruffi, P. /Mitochondrial DNA Content in Embryo Culture Medium Is Significantly Associated with Human Embryo Fragmentation. //Hum. Reprod. Oxf. Engl. 2013, 28, 2652–2660.
- [146] Galluzzi, L.; Palini, S.; Stefani, S.D.; Andreoni, F.; Primiterra, M.; Diotallevi, A.; Bulletti, C.; Magnani, M. /Extracellular Embryo Genomic DNA and Its

- Potential for Genotyping Applications. //Future Sci. OA 2015, 1, FSO62. [Google Scholar] [CrossRef][Gre.
- [147] Vera-Rodriguez M, Diez-Juan A, Jimenez-Almazan J, Martinez S, Navarro R, Peinado V, Mercader A, Meseguer M, Blesa D, Moreno I, Valbuena D, Rubio C, Simon C. /Origin and composition of cell-free DNA in spent medium from human embryo culture during preimplantation development. //Hum Reprod. 2018 Apr 1;33(4):745-756. doi: 10.1093/humrep/dey028. PMID: 29471395.
- [148] Xu J, Fang R, Chen L, Chen D, Xiao JP, Yang W, Wang H, Song X, Ma T, Bo S, Shi C, Ren J, Huang L, Cai LY, Yao B, Xie XS, Lu S. /Noninvasive chromosome screening of human embryos by genome sequencing of embryo culture medium for in vitro fertilization. //Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Oct 18;113(42):11907-11912. doi: 10.1073/pnas.1613294113. Epub 2016 Sep 29. PMID: 27688762; PMCID: PMC5081593.
- [149] Battaglia R, Palini S, Vento ME, La Ferlita A, Lo Faro MJ, Caroppo E, Borzì P, Falzone L, Barbagallo D, Ragusa M, Scalia M, D'Amato G, Scollo P, Musumeci P, Purrello M, Gravotta E, Di Pietro C. /Identification of extracellular vesicles and characterization of miRNA expression profiles in human blastocoel fluid. //Sci Rep. 2019 Jan 14;9(1):84. doi: 10.1038/s41598-018-36452-7. PMID: 30643155; PMCID: PMC6331601.
- [150] Leaver, M.; Wells, D. /Non-Invasive Preimplantation Genetic Testing (NiPGT): The next Revolution in Reproductive Genetics? //Hum. Reprod. Update 2020, 26, 16–42. [Google Scholar] [CrossRef].
- [151] Palini, S.; Galluzzi, L.; De Stefani, S.; Bianchi, M.; Wells, D.; Magnani, M.; Bulletti, C. /Genomic DNA in Human Blastocoele Fluid. //Reprod. Biomed. Online 2013, 26, 603–610. [Google Scholar] [CrossRef][Green Version].
- [152] Magli, M.C.; Pomante, A.; Cafueri, G.; Valerio, M.; Crippa, A.; Ferraretti, A.P.; Gianaroli, L. /Preimplantation Genetic Testing: Polar Bodies,

- Blastomeres, Trophectoderm Cells, or Blastocoelic Fluid? //Fertil. Steril. 2016, 105, 676–683.e5. [Google Scholar].
- [153] Le Verge-Serandour M, Turlier H. /Blastocoel morphogenesis: A biophysics perspective. //Semin Cell Dev Biol. 2022 Oct;130:12-23. doi: 10.1016/j.semcdb.2021.10.005. Epub 2021 Oct 27. PMID: 34756494.
- [154] Tomic M, Vrtacnik Bokal E, Stimpfel M. /Non-Invasive Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy and the Mystery of Genetic Material: A Review Article. //Int J Mol Sci. 2022 Mar 25;23(7):3568. doi: 10.3390/ijms23073568. PMID: 35408927; PMCID: PMC8998436.
- [155] Lal, A.; Roudebush, W.E.; Chosed, R.J. /Embryo Biopsy Can Offer More Information Than Just Ploidy Status. //Front. Cell Dev. Biol. 2020, 8, 78. [Google Scholar] [CrossRef] [PubMed][Green Version].
- [156] Hammond, E.R.; Shelling, A.N.; Cree, L.M. /Nuclear and Mitochondrial DNA in Blastocoele Fluid and Embryo Culture Medium: Evidence and Potential Clinical Use. //Hum. Reprod. 2016, 31, 1653–1661. [Google Scholar] [CrossRef][Green Version].
- [157] Magli, M.C.; Albanese, C.; Crippa, A.; Tabanelli, C.; Ferraretti, A.P.; Gianaroli, L. /Deoxyribonucleic Acid Detection in Blastocoelic Fluid: A New Predictor of Embryo Ploidy and Viable Pregnancy. //Fertil. Steril. 2019, 111, 77–85.
- [158] Hanson BM, Tao X, Hong KH, Comito CE, Pangasnan R, Seli E, J alas C, Scott RT Jr. /Noninvasive preimplantation genetic testing for aneuploidy exhibits high rates of deoxyribonucleic acid amplification failure and poor correlation with results obtained using trophectoderm biopsy. //Fertil Steril. 2021 Jun;115(6):1461-1470. doi: 10.1016/j.fertnstert.2021.01.028. Epub 2021 Mar 19. PMID: 33745720.
- [159] Rule, K.N.; Chosed, R.J.; Chang, T.A.; Robinson, R.D.; Winger, J.D.; Roudebush, W. /Blastocoel Cell-Free DNA, a Marker of Embryonic Quality. //Fertil. Steril. 2017, 108, e106. [Google Scholar] [CrossRef].

- [160] Chosed, R.J.; Lal, A.; Blalock, J.; Chang, T.A.; Robinson, R.D.; Zimmerman, S.; Wininger, J.D.; Roudebush, W.E. /Cell-Free DNA Content in Human Blastocoel Fluid-Conditioned Media Differentiates Euploid versus Aneuploid Embryos. //Integr. Mol. Med. 2019, 6, 1.
- [161] Uyar A, Seli E. /Metabolomic assessment of embryo viability. //Semin Reprod Med. 2014 Mar;32(2):141-52. doi: 10.1055/s-0033-1363556. Epub 2014 Feb 10. PMID: 24515909; PMCID: PMC4109799.
- [162] Miao SB, Feng YR, Wang XD, Lian KQ, Meng FY, Song G, Yuan JC, Geng CP, Wu XH. /Glutamine as a Potential Noninvasive Biomarker for Human Embryo Selection. //Reprod Sci. 2022 Jun;29(6):1721-1729. doi: 10.1007/s43032-021-00812-y. Epub 2022 Jan 24. PMID: 3507561.
- [163] Siristatidis CS, Sertedaki E, Vaidakis D, Varounis C, Trivella M. /Metabolomics for improving pregnancy outcomes in women undergoing assisted reproductive technologies. //Cochrane Database Syst Rev. 2018 Mar 16;3(3):CD011872. doi: 10.1002/14651858.CD011872.p.
- [164] Sanchez DJD, Vasconcelos FR, Teles-Filho ACA, Viana AGA, Martins AMA, Sousa MV, Castro MS, Ricart CA, Fontes W, Bertolini M, Bustamante-Filho IC, Moura AA. /Proteomic profile of pre-implantational ovine embryos produced in vivo. //Reprod Domest Anim. 2021 Ap.
- [165] Li L, Zhu S, Shu W, Guo Y, Guan Y, Zeng J, Wang H, Han L, Zhang J, Liu X, Li C, Hou X, Gao M, Ge J, Ren C, Zhang H, Schedl T, Guo X, Chen M, Wang Q. /Characterization of Metabolic Patterns in Mouse Oocytes during Meiotic Maturation. //Mol Cell. 2020 Nov 5;80(3):525-540.e9. doi: 10.1016/j.molcel.2020.09.022. Epub 2020 Oct 16. PMID: 33068521; PMCID: PMC8034554.
- [166] Kaihola H, Yaldir FG, Bohlin T, Samir R, Hreinsson J, Åkerud H. /Levels of caspase-3 and histidine-rich glycoprotein in the embryo secretome as biomarkers of good-quality day-2 embryos and high-quality blastocysts. //PLoS One. 2019 Dec 19;14(12):e0226419.

- [167] Dominguez, F.; Meseguer, M.; Aparicio-Ruiz, B.; Piqueras, P.; Quiñonero, A.; Simón, C. /New strategy for diagnosing embryo implantation potential by combining proteomics and time-lapse technologies. //Fertil. Steril. 2015, 104, 908–914.
- [168] Tejera A, Castelló D, de Los Santos JM, Pellicer A, Remohí J, Meseguer M. /Combination of metabolism measurement and a time-lapse system provides an embryo selection method based on oxygen uptake and chronology of cytokinesis timing. //Fertil Steril. 2016 Jul;106(1):119-126.e2. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.03.019. Epub 2016 Mar 31. PMID: 27037460.
- [169] Liang, B.; Gao, Y.; Xu, J.; Song, Y.; Xuan, L.; Shi, T.; Wang, N.; Hou, Z.; Zhao, Y.L.; Huang, W.E.; et al. /Raman profiling of embryo culture medium to identify aneuploid and euploid embryos. //Fertil. Steril. 2019, 111, 753–762.e751.
- [170] 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: 24-32.
- [171] Gross, N.; Kropp, J.; Khatib, H. /MicroRNA Signaling in Embryo Development. //Biology 2017, 6, 34. [Google Scholar] [CrossRef].
- [172] Salilew-Wondim, D.; Gebremedhn, S.; Hoelker, M.; Tholen, E.; Hailay, T.; Tesfaye, D. /The Role of MicroRNAs in Mammalian Fertility: From Gametogenesis to Embryo Implantation. //Int. J. Mol. Sci. 2020, 21, 585. [Google Scholar] [CrossRef][Green Version].
- [173] 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..
- [174] 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..

- [175] Okamura K, Hagen JW, Duan H, et al. /The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. //Cell. 2007;130(1):89-100. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.028>.
- [176] Zhuo Y, Gao G, Shi JA, et al. /miRNAs: biogenesis, origin and evolution, functions on virus-host interaction. //Cell Physiol Biochem. 2013;32(3):499-510. <https://doi.org/10.1159/000354455>.
- [177] Камышова Е.С., Бобкова И.Н., Кутырина И.М. /Современные представления о роли микроРНК при диабетической нефропатии: потенциальные биомаркеры и мишени таргетной терапии. //Сахарный диабет. 2017;20(1):42-50. <https://doi.org/10.14341/DM8237>.
- [178] Ha M, Kim VN. /Regulation of microRNA biogenesis. //Nat Rev Mol Cell Biol. 2014;15(8):509-524. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>.
- [179] Dalmay T. /Mechanism of miRNA-mediated repression of mRNA translation. //Essays Biochem. 2013;54:29-38. doi: 10.1042/bse0540029. PMID: 23829525.
- [180] Vasudevan S. /Posttranscriptional upregulation by microRNAs. Wiley Interdiscip Rev RNA. 2012;3(3):311-330. <https://doi.org/10.1002/wrna.121>.
- [181] Jing Z, Xi Y, Yin J, Shuwen H. /Biological roles of piRNAs in colorectal cancer. //Gene. 2021 Feb 15;769:145063. doi: 10.1016/j.gene.2020.145063. Epub 2020 Aug 19. PMID: 32827685.
- [182] Yang, Q.; Li, R.; Lyu, Q.; Hou, L.; Liu, Z.; Sun, Q.; Liu, M.; Shi, H.; Xu, B.; Yin, M.; et al. /Single-cell CAS-seq reveals a class of short PIWI-interacting RNAs in human oocytes. //Nat. Commun. 2019, 10, 3389. [Google Scholar] [CrossRef][Green Version].
- [183] Czech B, Munafò M, Ciabrelli F, Eastwood EL, Fabry MH, Kneuss E, Hannon GJ. /piRNA-Guided Genome Defense: From Biogenesis to Silencing. //Annu Rev Genet. 2018 Nov 23;52:131-157. doi: 10.1146/annurev-genet-120417-031441. PMID: 30476449.

- [184] Houwing S, Kamminga LM, Berezikov E, Cronembold D, Girard A, et al. 2007. A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in zebrafish. *Cell* 129:69–82.
- [185] Pane A, Wehr K, Schüpbach T. *zucchini* and *squash* encode two putative nucleases required for rasiRNA production in the *Drosophila* germline. // *Dev Cell*. 2007 Jun;12(6):851-62. doi: 10.1016/j.devcel.2007.03.022. PMID: 17543859; PMCID: PMC1945814.
- [186] Murugappan G, Ohno MS, Lathi RB. /Cost-effectiveness analysis of preimplantation genetic screening and in vitro fertilization versus expectant management in patients with unexplained recurrent pregnancy loss. // *Fertil Steril*. 2015 May;103(5):1215-20. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.02.012. Epub 2015 Mar 13. PMID: 25772770.
- [187] Ross RJ, Weiner MM, Lin H. /PIWI proteins and PIWI-interacting RNAs in the soma. // *Nature*. 2014 Jan 16;505(7483):353-359. doi: 10.1038/nature12987. PMID: 24429634; PMCID: PMC4265809.
- [188] Ozgur K, Berkkanoglu M, Bulut H, Yoruk GDA, Candurmaz NN, Coetzee K. /Single best euploid versus single best unknown-ploidy blastocyst frozen embryo transfers: a randomized controlled trial. // *J Assist Reprod Genet*. 2019 Apr;36(4):629-636. doi: 10.1007/s10815-018-01399-1. Epub 2019 Jan 7. PMID: 30617927; PMCID: PMC6505013.
- [189] Lu TX, Rothenberg ME. /MicroRNA. // *J Allergy Clin Immunol*. 2018 Apr;141(4):1202-1207. doi: 10.1016/j.jaci.2017.08.034. Epub 2017 Oct 23. PMID: 29074454; PMCID: PMC5889965.
- [190] Eckstein F. /Small non-coding RNAs as magic bullets. // *Trends Biochem Sci*. 2005 Aug;30(8):445-52. doi: 10.1016/j.tibs.2005.06.008. PMID: 15996867.
- [191] Wright EC, Hale BJ, Yang C-X, Njoka JG & Ross JW 2016 MicroRNA-21 and PDCD4 expression during in vitro oocyte maturation in pigs.



Reproductive Biology and Endocrinology 14 21.  
(<https://doi.org/10.1186/s12958-016-0152-2>).

- [192] Vega WHO, Quirino CR, Bartholazzi-Junior A, Rua MAS, Serapião RV, Oliveira CS. /Variants in the CYP19A1 gene can affect in vitro embryo production traits in cattle. //J Assist Reprod Genet. 2018 Dec;35(12):2233-2241. doi: 10.1007/s10815-018-1320-4. Epub 2018 Sep 19. PMID: 30232641; PMCID: PMC6289931.
- [193] Khan D, Ansar Ahmed S. /Regulation of IL-17 in autoimmune diseases by transcriptional factors and microRNAs. //Front Genet. 2015 Jul 14;6:236. doi: 10.3389/fgene.2015.00236. PMID: 26236331; PMCID: PMC4500956.
- [194] Moreno JM, Núñez MJ, Quiñonero A, Martínez S, de la Orden M, Simón C, Pellicer A, Díaz-García C, Domínguez F. /Follicular fluid and mural granulosa cells microRNA profiles vary in in vitro fertilization patients depending on their age and oocyte maturation stage. //Fertil Steril. 2015 Oct;104(4):1037-1046.e1. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.07.001. Epub 2015 Jul 23. PMID: 26209829.
- [195] Tang F, Kaneda M, O'Carroll D, Hajkova P, Barton SC, Sun YA, Lee C, Tarakhovsky A, Lao K & Surani MA 2007 /Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. //Genes and Development 21 644–648. (<https://doi.org/10.1101/gad.418707>).
- [196] Mondou E, Dufort I, Gohin M, Fournier E & Sirard MA 2012 Analysis of microRNAs and their precursors in bovine early embryonic development. Molecular Human Reproduction 18 425–434. (<https://doi.org/10.1093/molehr/gas015>).
- [197] Hawke DC, Watson AJ, Betts DH. /Extracellular vesicles, microRNA and the preimplantation embryo: non-invasive clues of embryo well-being. //Reprod Biomed Online. 2021 Jan;42(1):39-54. doi: 10.1016/j.rbmo.2020.11.011. Epub 2020 Nov 26. PMID: 33303367.

- [198] Sysoeva AP, Nepsha OS, Makarova NP, Silachev DN, Lobanova NN, Timofeeva AV, Shevtsova YA, Bragina EE, Kalinina EA. /Influence of Extracellular Vesicles from the Follicular Fluid of Young Women and Women of Advanced Maternal Age with Different miRNA Profiles on Sperm Functional Properties. //Bull Exp Biol Med. 2022 Aug;173(4):560-568. doi: 10.1007/s10517-022-05589-x. Epub 2022 Sep 12. PMID: 36094592.
- [199] Руднева С.А., Хаченкова А.А. /Роль микроРНК в сперматогенезе // Андрология и генитальная хирургия. 2016. №3.
- [200] Wang Y, Li X, Gong X, Zhao Y, Wu J. /MicroRNA-322 Regulates Self-renewal of Mouse Spermatogonial Stem Cells through Rassf8. //Int J Biol Sci. 2019 Mar 1;15(4):857-869. doi: 10.7150/ijbs.30611. PMID: 30906216; PMCID: PMC6429012.
- [201] Khanehzad M, Abolhasani F, Hassanzadeh G, Nourashrafeddin SM, Hedayatpour A. /Determination of the Excitatory Effects of MicroRNA-30 in the Self-Renewal and Differentiation Process of Neonatal Mouse Spermatogonial Stem Cells. //Galen Med J. 2020 Aug 19;9:e18.
- [202] Cui N, Hao G, Zhao Z, Wang F, Cao J, Yang A. /MicroRNA-224 regulates self-renewal of mouse spermatogonial stem cells via targeting DMRT1. //J Cell Mol Med. 2016 Aug;20(8):1503-12. doi: 10.1111/jcmm.12838. Epub 2016 Apr 21. PMID: 27099200; PMCID: PMC4956939.
- [203] Li J, Liu X, Hu X, Tian GG, Ma W, Pei X, Wang Y, Wu J. /MicroRNA-10b regulates the renewal of spermatogonial stem cells through Kruppel-like factor 4. //Cell Biochem Funct. 2017 Apr;35(3):184-191. doi: 10.1002/cbf.3263. PMID: 28436141.
- [204] Gòdia M, Mayer FQ, Nafissi J, Castelló A, Rodríguez-Gil JE, Sánchez A, Clop A. /A technical assessment of the porcine ejaculated spermatozoa for a sperm-specific RNA-seq analysis. //Syst Biol Reprod Med. 2018 Aug;64(4):291-303. doi: 10.1080/19396368.2018.1464610. Epub 2018 Apr 26. PMID: 29696996.

- [205] Sullivan R & Saez F 2013 Epididymosomes, prostasomes and liposomes; their role in mammalian male reproductive physiology. *Reproduction* 146 R21–R35. (<https://doi.org/10.1530/REP-13-0058>).
- [206] Sharma U, Sun F, Conine CC, Reichholf B, Kukreja S, Herzog VA, Ameres SL, Rando OJ. /Small RNAs Are Trafficked from the Epididymis to Developing Mammalian Sperm. //Dev Cell. 2018 Aug 20;46(4):481-494.e6. doi: 10.1016/j.devcel.2018.06.023. Epub 2018 Jul 26. P.
- [207] Bai R, Latifi Z, Kusama K, Nakamura K, Shimada M & Imakawa K 2018 Induction of immune-related gene expression by seminal exosomes in the porcine endometrium. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 495 .
- [208] McGraw LA, Suarez SS & Wolfner MF 2015 On a matter of seminal importance. *BioEssays* 37 . (<https://doi.org/10.1002/bies.201400117>).
- [209] Watkins AJ, Dias I, Tsuru H, Allen D, Emes RD, Moreton J, Wilson R, Ingram RJM & Sinclair KD 2018 Paternal diet programs offspring health through sperm- and seminal plasma-specific pathways in mice. *PNAS* 115 . (<https://doi.org/10.1073/pnas.1806333115>).
- [210] Amaral A, Castillo J, Ramalho-Santos J & Oliva R 2014 The combined human sperm proteome: cellular pathways and implications for basic and clinical science. *Human Reproduction Update* 20 . (<https://doi.org/10.1093/humupd/dmt046>).
- [211] Carrell DT, Aston KI, Oliva R, Emery BR & De Jonge CJ 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>).
- [212] 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>).

- [213] Zhang, H.; Zhang, F.; Chen, Q.; Li, M.; Lv, X.; Xiao, Y.; Zhang, Z.; Hou, L.; Lai, Y.; Zhang, Y.; et al. /The piRNA pathway is essential for generating functional oocytes in golden hamsters. *Nat. Cell Biol.* //2021, 23, 1013–1022.
- [214] Loubalova, Z.; Fulka, H.; Horvat, F.; Pasulka, J.; Malik, R.; Hirose, M.; Ogura, A.; Svoboda, P. /Formation of spermatogonia and fertile oocytes in golden hamsters requires piRNAs. //*Nat. Cell Biol.* 2021.
- [215] Johnson GD, Mackie P, Jodar M, Moskovtsev S, Krawetz SA. /Chromatin and extracellular vesicle associated sperm RNAs. //*Nucleic Acids Res.* 2015 Aug 18;43(14):6847-59. doi: 10.1093/nar/gkv591. Epub 2015 Jun 13. PMID: 26071953; PMCID: PMC4538811.
- [216] Kropp J, Salih SM & Khatib H /Expression of microRNAs in bovine and human pre-implantation embryo culture media. //*Frontiers in Genetic.* 2014 5 91. (<https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00091>).
- [217] 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 trophoctoderm cells and can be explored for human embryo reproductive competence assessment. //*Fertil Steril.* 2016.
- [218] Viswanathan S. et al. /MicroRNA expression during trophoctoderm specification. //*PLoS One*, 2009 Jul 3;4(7):e6143. doi: 10.1371/journal.pone.0006143.
- [219] Fang, F.; Li, Z.; Yu, J.; Long, Y.; Zhao, Q.; Ding, X.; Wu, L.; Shao, S.; Zhang, L.; Xiang, W. /MicroRNAs secreted by human embryos could be potential biomarkers for clinical outcomes of assisted reproductive technology. //*J. Adv. Res.* 2021, 31, 25–34.
- [220] Cuthbert JM, Russell SJ, White KL, Benninghoff AD. /The maternal-to-zygotic transition in bovine in vitro-fertilized embryos is associated with marked changes in small non-coding RNAs†. //*Biol Reprod.* 2019 Feb 1;100(2):331-350. doi: 10.1093/biolre/iyoy190. PM.

- [221] Bartolucci, A.F.; Uliasz, T.; Peluso, J.J. /MicroRNA-21 as a regulator of human cumulus cell viability and its potential influence on the developmental potential of the oocyte. //Biol. Reprod. 2020, 103, 94–103.
- [222] Mondou, E.; Dufort, I.; Gohin, M.; Fournier, E.; Sirard, M.A. /Analysis of microRNAs and their precursors in bovine early embryonic development. //Mol. Hum. Reprod. 2012, 18, 425–434.
- [223] Larabee, S.M.; Coia, H.; Jones, S.; Cheung, E.; Gallicano, G.I. /MiRNA-17 members that target Bmpr2 influence signaling mechanisms important for embryonic stem cell differentiation in vitro and gastrulation in embryos. //Stem. Cells. Dev. 2015, 24, 354–371..
- [224] Wang, Y.; Baskerville, S.; Shenoy, A.; Babiarz, J.E.; Baehner, L.; Blelloch, R. /Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation. //Nat. Genet. 2008, 40, 1478–1483. [Google Scholar] [CrossRef].
- [225] Melton, C.; Judson, R.L.; Blelloch, R. /Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells. //Nature 2010, 463, 621–626.
- [226] Ali, A.; Bouma, G.J.; Anthony, R.V.; Winger, Q.A. /The Role of LIN28-let-7-ARID3B Pathway in Placental Development. //Int. J. Mol. Sci. 2020, 21, 3637.
- [227] Cuman C, Menkhorst EM, Rombauts LJ, Holden S, Webster D, Bilandzic M, Osianlis T, Dimitriadis E. /Preimplantation human blastocysts release factors that differentially alter human endometrial epithelial cell adhesion and gene expression relative to IVF success. //Hum Reprod. 2013 May;28(5):1161-71. doi: 10.1093/humrep/det058. Epub 2013 Mar 10. PMID: 23477906.
- [228] Eivazi, S.; Tanhaye Kalate Sabz, F.; Amiri, S.; Zandieh, Z.; Bakhtiyari, M.; Rashidi, M.; Aflatoonian, R.; Mehraein, F.; Amjadi, F. /MiRNAs secreted by human blastocysts could be potential gene expression regulators during implantation. //Mol. Biol. Rep. 202.

- [229] Cuman, C.; Van Sinderen, M.; Gantier, M.P.; Rainczuk, K.; Sorby, K.; Rombauts, L.; Osianlis, T.; Dimitriadis, E. /Human Blastocyst Secreted microRNA Regulate Endometrial Epithelial Cell Adhesion. //EBioMedicine 2015, 2, 1528–1535..
- [230] Fu X, Zhang C, Zhang Y. /Epigenetic regulation of mouse preimplantation embryo development. //Curr Opin Genet Dev. 2020 Oct;64:13-20. doi: 10.1016/j.gde.2020.05.015. Epub 2020 Jun 18. PMID: 32563750; PMCID: PMC7641911.
- [231] Du Z, Zhang K, Xie W. /Epigenetic Reprogramming in Early Animal Development. //Cold Spring Harb Perspect Biol. 2022 Jun 14;14(6):a039677. doi: 10.1101/cshperspect.a039677. PMID: 34400552; PMCID: PMC9248830.
- [232] Love, M.I.; Huber, W.; Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. 2014, 1–21, doi:10.1186/s13059-014-0550-8
- [233] Fesahat F, Montazeri F, Hoseini SM. /Preimplantation genetic testing in assisted reproduction technology. //J Gynecol Obstet Hum Reprod. 2020 May;49(5):101723. doi: 10.1016/j.jogoh.2020.101723. Epub 2020 Feb 26. PMID: 32113002.
- [234] McCoy RC. /Mosaicism in Preimplantation Human Embryos: When Chromosomal Abnormalities Are the Norm. //Trends Genet. 2017 Jul;33(7):448-463. doi: 10.1016/j.tig.2017.04.001. Epub 2017 Apr 28. PMID: 28457629; PMCID: PMC5484399.
- [235] Langmead, B.; Trapnell, C.; Pop, M.; Salzberg, S.L. /Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. 2009, 10, doi:10.1186/gb-2009-10-3-r25
- [236] Pantou A, Mitrakos A, Kokkali G, Petroutsou K, Tounta G, Lazaros L, Dimopoulos A, Sfakianoudis K, Pantos K, Koutsilieris M, Mavrou A, Kanavakis E, Tzetzis M. /The impact of preimplantation genetic testing for

- aneuploidies (PGT-A) on clinical outcomes in high risk patients. //J Assist Reprod Genet. 2022 Jun;39(6):1341-1349. doi: 10.1007/s10815-022-02461-9. Epub 2022 Mar 25. PMID: 35338417; PMCID: PMC9174385.
- [237] Mazzilli R, Cimadomo D, Vaiarelli A, Capalbo A, Dovere L, Alviggi E, Dusi L, Foresta C, Lombardo F, Lenzi A, Tournaye H, Alviggi C, Rienzi L, Ubaldi FM. /Effect of the male factor on the clinical outcome of intracytoplasmic sperm injection combined with preimplantation aneuploidy testing: observational longitudinal cohort study of 1,219 consecutive cycles. //Fertil Steril. 2017 Dec;108(6):961-972.e3. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.08.033. Epub 2017 Oct 3. PMID: 28985908.
- [238] Cimadomo D, Rienzi L, Conforti A, Forman E, Canosa S, Innocenti F, Poli M, Hynes J, Gemmell L, Vaiarelli A, Alviggi C, Ubaldi FM, Capalbo A. /Opening the black box: why do euploid blastocysts fail to implant? A systematic review and meta-analysis. //Hum Reprod Update. 2023 Sep 5;29(5):570-633. doi: 10.1093/humupd/dmad010. PMID: 37192834.
- [239] Wang, X.; Ramat, A.; Simonelig, M.; Liu, M.-F. /Emerging roles and functional mechanisms of PIWI-interacting RNAs. //Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2023, 24, 123–141, doi:10.1038/s41580-022-00528-0
- [240] Johnson GD, Mackie P, Jodar M, Moskovtsev S, Krawetz SA. /Chromatin and extracellular vesicle associated sperm RNAs. //Nucleic Acids Res. 2015 Aug 18;43(14):6847-59. doi: 10.1093/nar/gkv591. Epub 2015 Jun 13. PMID: 26071953; PMCID: PMC4538811.
- [241] Sun, Y.H.; Wang, R.H.; Du, K.; Zhu, J.; Zheng, J.; Xie, L.H.; Pereira, A.A.; Zhang, C.; Ricci, E.P.; Li, X.Z. /Coupled protein synthesis and ribosome-guided piRNA processing on mRNAs. //Nat. Commun. 2021, 12, 5970, doi:10.1038/s41467-021-26233-8.
- [242] 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. 2015, 25, 266.

- [243] Goh, W.S.S.; Falciatori, I.; Tam, O.H.; Burgess, R.; Meikar, O.; Kotaja, N.; Hammell, M.; Hannon, G.J. PiRNA-directed cleavage of meiotic transcripts regulates spermatogenesis. //Genes Dev. 2015, 29, 1032–1044, doi:10.1101/gad.260455.115.
- [244] Reuter, M.; Berninger, P.; Chuma, S.; Shah, H.; Hosokawa, M.; Funaya, C.; Antony, C.; Sachidanandam, R.; Pillai, R.S. Miwi catalysis is required for piRNA amplification-independent LINE1 transposon silencing. //Nature 2011, 480, 264–267, doi:10.1038/nature10672.
- [245] Dai, P.; Wang, X.; Gou, L.-T.; Li, Z.-T.; Wen, Z.; Chen, Z.-G.; Hua, M.-M.; Zhong, A.; Wang, L.; Su, H.; et al. A Translation-Activating Function of MIWI/piRNA during Mouse Spermiogenesis. //Cell 2019, 179, 1566–1581.e16, doi:10.1016/j.cell.2019.11.022.
- [246] Zitouni, S.; Nabais, C.; Jana, S.C.; Guerrero, A.; Bettencourt-Dias, M. Polo-like kinases: structural variations lead to multiple functions. //Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2014, 15, 433–452, doi:10.1038/nrm3819.
- Remo, A.; Li, X.; Schiebel, E.; Pancione, M. The Centrosome Linker and Its
- [247] Role in Cancer and Genetic Disorders. //Trends Mol. Med. 2020, 26, 380–393, doi:10.1016/j.molmed.2020.01.011.
- [248] Li, X.; Shu, K.; Wang, Z.; Ding, D. Prognostic significance of KIF2A and KIF20A expression in human cancer: A systematic review and meta-analysis. //Medicine (Baltimore). 2019, 98, e18040, doi:10.1097/MD.00000000000018040.
- [249] Cunningham, C.E.; Li, S.; Vizeacoumar, F.S.; Bhanumathy, K.K.; Lee, J.S.; Parameswaran, S.; Furber, L.; Abuhusseini, O.; Paul, J.M.; McDonald, M.; et al. Therapeutic relevance of the protein phosphatase 2A in cancer. //Oncotarget 2016, 7, 61544–61561, doi:10.18632/oncotarget.11399.
- [250] Asai, Y.; Matsumura, R.; Hasumi, Y.; Susumu, H.; Nagata, K.; Watanabe, Y.; Terada, Y. SET/TAF1 forms a distance-dependent feedback loop with Aurora B and Bub1 as a tension sensor at centromeres. //Sci. Rep. 2020, 10, 15653, doi:10.1038/s41598-020-71955-2.



- [251] Wigley, W.; Fabunmi, R.; Lee, M.G.; Marino, C.; Muallem, S.; DeMartino, G.; Thomas, P. /Dynamic Association of Proteasomal Machinery with the Centrosome. //J. Cell Biol. 1999, 145, 481–490.
- [252] Lilienbaum, A. /Relationship between the proteasomal system and autophagy. //Int. J. Biochem. Mol. Biol. 2013, 4, 1–26.
- [253] Gerhardt, C.; Lier, J.M.; Burmühl, S.; Struchtrup, A.; Deutschmann, K.; Vetter, M.; Leu, T.; Reeg, S.; Grune, T.; Rütter, U. /The transition zone protein Rpgrip11 regulates proteasomal activity at the primary cilium. //J. Cell Biol. 2015, 210, 115–133, doi:10.1083/jcb.201408060.
- [254] Holt, J.E.; Tran, S.M.-T.; Stewart, J.L.; Minahan, K.; García-Higuera, I.; Moreno, S.; Jones, K.T. /The APC/C activator FZR1 coordinates the timing of meiotic resumption during prophase I arrest in mammalian oocytes. //Development 2011, 138, 905–913, doi:10.1242/dev.059022.
- Rattani, A.; Ballesteros Mejia, R.; Roberts, K.; Roig, M.B.; Godwin, J.;
- [255] Hopkins, M.; Eguren, M.; Sanchez-Pulido, L.; Okaz, E.; Ogushi, S.; et al. /APC/C(Cdh1) Enables Removal of Shugoshin-2 from the Arms of Bivalent Chromosomes by Moderating Cyclin-Dependent Kinase Activity. //Curr. Biol. 2017, 27, 1462-1476.e5, doi:10.1016/j.cub.2017.04.023.
- [256] Zhang, X.; Wang, L.; Ma, Y.; Wang, Y.; Liu, H.; Liu, M.; Qin, L.; Li, J.; Jiang, C.; Zhang, X.; et al. CEP128 is involved in spermatogenesis in humans and mice. Nat. Commun. 2022, 13, 1395, doi:10.1038/s41467-022-29109-7.
- [257] Pitaval, A.; Senger, F.; Letort, G.; Gidrol, X.; Guyon, L.; Sillibourne, J.; Théry, M. /Microtubule stabilization drives 3D centrosome migration to initiate primary ciliogenesis. //J. Cell Biol. 2017, 216, 3713–3728, doi:10.1083/jcb.201610039.
- [258] Yang, Z.; Gallicano, G.I.; Yu, Q.C.; Fuchs, E. /An unexpected localization of basoenuclin in the centrosome, mitochondria, and acrosome of developing spermatids. //J. Cell Biol. 1997, 137, 657–669, doi:10.1083/jcb.137.3.657.

- [259] Lim, H.Y.G.; Plachta, N. /Cytoskeletal control of early mammalian development. //Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2021, 22, 548–562, doi:10.1038/s41580-021-00363-9.
- [260] Herreros, L.; Rodríguez-Fernandez, J.L.; Brown, M.C.; Alonso-Lebrero, J.L.; Cabañas, C.; Sánchez-Madrid, F.; Longo, N.; Turner, C.E.; Sánchez-Mateos, P. /Paxillin localizes to the lymphocyte microtubule organizing center and associates with the microtubule cytoskeleton. //J. Biol. Chem. 2000, 275, 26436–26440, doi:10.1074/jbc.M003970200.
- [261] Ezoe, K.; Miki, T.; Ohata, K.; Fujiwara, N.; Yabuuchi, A.; Kobayashi, T.; Kato, K. /Prolactin receptor expression and its role in trophoblast outgrowth in human embryos. //Reprod. Biomed. Online 2021, 42, 699–707, doi:10.1016/j.rbmo.2021.01.006.
- [262] Takahashi, S.; Mui, V.J.; Rosenberg, S.K.; Homma, K.; Cheatham, M.A.; Zheng, J. /Cadherin 23-C Regulates Microtubule Networks by Modifying CAMSAP3's Function. //Sci. Rep. 2016, 6, 28706, doi:10.1038/srep28706.
- [263] Meng, W.; Mushika, Y.; Ichii, T.; Takeichi, M. /Anchorage of microtubule minus ends to adherens junctions regulates epithelial cell-cell contacts. //Cell 2008, 135, 948–959, doi:10.1016/j.cell.2008.09.040.
- [264] Shah, J.; Guerrero, D.; Vasileva, E.; Sluysmans, S.; Bertels, E.; Citi, S. /PLEKHA7: Cytoskeletal adaptor protein at center stage in junctional organization and signaling. //Int. J. Biochem. Cell Biol. 2016, 75, 112–116, doi:10.1016/j.biocel.2016.04.001.

## 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

