

*На правах рукописи*

**ШАМИНА**  
**Мария Александровна**

**ОПТИМИЗАЦИЯ ЛЕЧЕНИЯ БЕСПЛОДИЯ У ПАЦИЕНТОВ С  
ПОВТОРНЫМ ОТСУТСТВИЕМ ИМПЛАНТАЦИИ ЭМБРИОНА НА  
ОСНОВАНИИ ОЦЕНКИ ПРОФИЛЯ ЭКСПРЕССИИ МАЛЫХ  
НЕКОДИРУЮЩИХ РНК**

3.1.4. Акушерство и гинекология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

МОСКВА 2022

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

Научные руководители:

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

Официальные оппоненты:

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

**Вартанян Эмма Врамовна** - доктор медицинских наук, профессор кафедры акушерства и гинекологии лечебного факультета ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России

**Ведущая организация** - ГБУЗ МО “Московский областной научно-исследовательский институт акушерства и гинекологии”

Защита состоится 24 января 2023г. в 13:00 часов на заседании диссертационного совета 21.1.022.01 на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации <https://science.ncagp.ru/upfiles/pdf/Shamina%20MA-disser.pdf?1192206132>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2022г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор медицинских наук, профессор

Калинина Елена Анатольевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

В настоящее время, несмотря на стремительное развитие и совершенствование методов вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), частота наступления беременности после проведения программы экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) в среднем не превышает 30 - 40% (Рудакова Е.Б. и др., 2020). В связи с этим пристальное внимание клиницистов и исследователей направлено на разработку новых методов диагностики, профилактики и лечения бесплодия и, соответственно, улучшения качества жизни бесплодных пар.

При условии отсутствия вмешивающихся факторов наступление беременности в циклах ВРТ зависит от правильного гаметогенеза и последующего эмбриогенеза, а также успешной имплантации. Основными условиями для имплантации эмбриона в полости матки являются: качественный эмбрион с высоким имплантационным потенциалом, рецептивность эндометрия, а также синхронизация процессов эмбриогенеза и созревания эндометрия (Вартанян Э.В. и др., 2018).

В связи с тем, что качество эмбриона напрямую зависит от гаметогенеза, для установления причины ненаступления беременности у бесплодной пары необходимо производить обследование фертильности как женщины, так и мужчины. Среди основных факторов, оказывающих влияние на оогенез, является возраст пациентки, с которым связаны высокий риск хромосомных аномалий ооцитов, а также снижение овариального резерва и снижение качества гамет (Калинина Е.А., 2019). Кроме того, ряд заболеваний репродуктивной системы и сопутствующая соматическая патология нарушают функцию репродуктивных органов (Краснопольская К.В. и др., 2020). Правильное функционирование яичников у женщин зависит от скоординированного взаимодействия аутокринных, эндокринных и паракринных сигнальных путей (Esfandyari S. et al., 2020). Рост и созревание ооцита происходит в фолликулах яичников, которые содержат

фолликулярную жидкость, обеспечивающую межклеточную связь, питание и созревание ооцита. Изменение ее нормального состава может привести к нарушениям оогенеза, что в последующем может вызвать нарушение эмбриогенеза.

Одними из циркулирующих в фолликулярной жидкости молекул являются малые некодирующие РНК (мнкРНК), а именно: микроРНК (miRNAs) и PIWI-взаимодействующие РНК (piRNAs). МнкРНК важны для реализации многих клеточных процессов, выполняя свои регуляторные функции внутри клетки и обеспечивая межклеточную коммуникацию (Тимофеева А.В. и др., 2019). Было проведено множество исследований, направленных на изучение их роли в оогенезе, оценке качества ооцита и эмбриональном развитии (Sun Y.-M. et al., 2021).

Также в последние годы все чаще причиной ненаступления беременности является мужской фактор, при этом его частота достигает примерно 50% (Fainberg J. et al., 2019). Правильный сперматогенез зависит от множества факторов, одним из которых является нормальный состав среды, в которой происходит питание и транспортировка сперматозоидов. Такой средой является семенная плазма, состоящая из различных биологически активных веществ и молекул. Исследователи определили, что семенная плазма поддерживает правильное функционирование сперматозоидов и, соответственно, обеспечивает их оплодотворяющую способность. В связи с этим перспективным является углубленное исследование состава семенной плазмы. В ряде последних исследований определена различная экспрессия мнкРНК на разных стадиях сперматогенеза (Nixon B. et al., 2019). Выявлены различия в профилях экспрессии мнкРНК при различных нарушениях сперматогенеза (Barbu M.G. et al., 2021). Ученые пришли к выводу, что изменение профиля экспрессии мнкРНК в семенной плазме может привести к нарушениям сперматогенеза и последующему аномальному развитию эмбриона.

Кроме того, известно, что мнкРНК присутствуют не только внутриклеточно, но также высвобождаются через экзосомы и апоптотические тельца и связаны с липидами или белками (Makri D. et al., 2020), а внеклеточные мнкРНК присутствуют в различных биологических жидкостях организма. Учитывая, что мнкРНК секретируются эмбрионами в их окружающую среду, изучение профиля данных молекул в эмбриональной среде для прогнозирования наступления беременности представляется актуальной задачей.

Таким образом, оценка уровней экспрессии мнкРНК в фолликулярной жидкости/семенной плазме и сопоставление их с профилем мнкРНК в культуральной среде эмбриона позволяет определить вклад каждого из партнеров в развитие бесплодия, индивидуализировать подход к ведению бесплодной пары с неудачами имплантации в анамнезе, а также прогнозировать исходы программ ВРТ, чему посвящено данное диссертационное исследование. Данный подход позволит внести вклад в изучение причин неудач имплантации у бесплодной пары, принять возможные меры по их предотвращению и персонифицировать проведение программы ВРТ.

#### Степень разработанности темы исследования

Исследователи во всем мире заинтересованы в поиске новых маркеров женского и мужского бесплодия, необходимых для диагностики, дальнейшего лечения и, соответственно, улучшения репродуктивных исходов. Существенную роль в регуляции репродуктивных процессов играют мнкРНК (Timofeeva A.V. et al., 2019), в связи с чем они предложены в качестве возможных биомаркеров причин ненаступления беременности при женском и мужском бесплодии.

В 2018 году ученые обнаружили, что уровень экспрессии мнкРНК в фолликулярной жидкости определял дальнейшее формирование и созревание бластоцисты, а также ее морфологическую характеристику (Fu J. et al., 2018).

В последующих исследованиях были выявлены отличия в уровне экспрессии мнкРНК в зависимости от возраста (Mihalas B.P. et al., 2019).

Роль мнкРНК на всех стадиях сперматогенеза описана в научной публикации (Nixon B. et al., 2019), также определены различные профили экспрессии мнкРНК при различных нарушениях сперматогенеза (Barbu M.G. et al., 2021).

Хотя многими учеными уже была изучена роль мнкРНК в гаметогенезе, эмбриогенезе и успешной имплантации в полости матки, оценка их влияния на данные процессы в организме человека требует дальнейшего изучения. Поэтому данная диссертационная работа представляется актуальной и своевременной.

Таким образом, определение мнкРНК в фолликулярной жидкости, семенной плазме, а также сопоставление их с профилем мнкРНК в культуральной среде бластоцисты и оценкой ее имплантационного потенциала поможет разработать новые и улучшенные неинвазивные диагностические и прогностические подходы для лечения бесплодия у пар с неоднократными неудачными попытками ВРТ. Дополнительные методы исследования могут быть использованы с целью оптимизации отбора эмбрионов с наиболее высоким имплантационным потенциалом, что, в свою очередь, позволяет улучшить репродуктивные исходы.

#### Цель исследования

Индивидуализация программ вспомогательных репродуктивных технологий у бесплодных пар с неудачными попытками в анамнезе на основании оценки профиля экспрессии малых некодирующих РНК, регулирующих гамето- и эмбриогенез.

#### Задачи исследования

1. Проанализировать данные анамнеза, параметры клинического и гормонального статуса у обследуемых пациенток с неудачными попытками.

2. Изучить особенности фолликулогенеза, оогенеза и раннего эмбриогенеза у данных пациенток с различными результатами программ вспомогательных репродуктивных технологий.
3. Оценить профиль экспрессии мнкРНК в среде культивирования бластоцисты хорошего, отличного качества у обследуемых пар в программах вспомогательных репродуктивных технологий. Построить модель логистической регрессии прогнозирования наступления беременности по профилю экспрессии мнкРНК в культуральной среде бластоцисты.
4. Оценить профиль экспрессии мнкРНК в фолликулярной жидкости в программах вспомогательных репродуктивных технологий. Построить модель логистической регрессии оценки качества ооцитов по профилю экспрессии мнкРНК в фолликулярной жидкости.
5. Оценить профиль экспрессии мнкРНК в семенной плазме. Построить модель логистической регрессии оценки качества эякулята по профилю экспрессии мнкРНК в семенной плазме.
6. Разработать персонифицированный алгоритм проведения программ вспомогательных репродуктивных технологий у бесплодных пар с неудачными попытками в анамнезе на основании уровня экспрессии мнкРНК в фолликулярной жидкости/семенной плазме и среде культивирования бластоцисты хорошего/отличного качества

#### Научная новизна

Впервые, на основании проведенного исследования представлены и научно обоснованы новые данные о неинвазивном методе прогнозирования качества эмбриона и его имплантационного потенциала с использованием профиля экспрессии мнкРНК hsa-let-7a-5p, hsa-miR-381-3p, hsa\_piR\_020497, hsa\_piR\_008113, hsa\_piR\_022258, секретлируемых в культуральную среду на ранних стадиях развития эмбриона, и совпадающего с профилем мнкРНК фолликулярной жидкости и семенной плазмы.

Разработана формула, полученная при построении моделей логистической регрессии с использованием значений относительных уровней

экспрессии четырех комбинаций мнкРНК, позволяющая определять имплантационный потенциал бластоцисты.

Определены мнкРНК в фолликулярной жидкости, оказывающие влияние на оогенез (piR\_020497, piR\_020500, let-7f-5p) и позволяющие прогнозировать наличие качественного ооцита, способного к оплодотворению и образованию бластоцисты хорошего/отличного качества с высоким имплантационным потенциалом.

Выявлена корреляция между уровнем экспрессии мнкРНК (hsa-let-7i-5p, hsa\_piR\_004152, hsa\_piR\_008113, hsa-miR-30a-5p, hsa\_piR\_020541, hsa\_piR\_008113, hsa\_piR\_022296 и hsa-let-7i-5p) в семенной плазме и оплодотворяющей способностью сперматозоидов.

Установлено, что уровень экспрессии мнкРНК в фолликулярной жидкости и в семенной плазме, ассоциирующихся с качеством гамет, статистически значимо коррелирует с уровнем экспрессии мнкРНК hsa-let-7a-5p и hsa\_piR\_020497, определяющих имплантационный потенциал бластоцисты хорошего/отличного качества.

Полученные результаты позволяют персонифицировать подход к лечению бесплодия методом ВРТ у пар с неудачными попытками в анамнезе.

#### Практическая значимость

Результаты проведенного исследования позволили разработать алгоритм ведения бесплодных пар с неоднократными неудачными попытками ВРТ в анамнезе на основании сочетанного определения уровня экспрессии мнкРНК в фолликулярной жидкости, семенной плазме и культуральной среде бластоцисты для оптимизации лечения бесплодия и прогнозирования исходов ВРТ и увеличения частоты беременности.

Также возможна индивидуализация программ ВРТ у бесплодных пар с неудачными попытками в анамнезе на основании оценки профиля экспрессии мнкРНК, регулирующих гамето- и эмбриогенез.



## Методология и методы исследования

Пациентам, включенным в данное проспективное исследование, проведено полное клинико-лабораторное обследование в соответствии с приказом Минздрава России № 107н от 30.08.2012 г. «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению». Для исследования образцов фолликулярной жидкости и семенной плазмы отбирали от пары в день проведения трансвагинальной пункции фолликулов (ТВП) в программе ВРТ. На 5-е сутки культивирования собирали культуральную среду от полученных эмбрионов.

Оценка профиля экспрессии мнкРНК произведена в 103 образцах фолликулярной жидкости, 52 образцах эякулята и 135 образцах среды культивирования blastocyst различного качества методами глубокого секвенирования и количественной ОТ-ПЦР в реальном времени. Произведено сопоставление уровней экспрессии мнкРНК в фолликулярной жидкости, семенной плазме и культуральной среде эмбрионов с последующей оценкой качества гаметогенеза, эмбриогенеза, имплантационного потенциала эмбрионов, репродуктивных исходов и частотой наступления беременности.

## Положения, выносимые на защиту

1. У обследуемых пациентов с неудачами имплантации эмбриона количество попыток вспомогательных репродуктивных технологий в анамнезе имеет положительную корреляцию с возрастом, оказывающим влияние на качество ооцитов и результативность программ вспомогательных репродуктивных технологий. Продолжительность бесплодия прямо коррелирует с параметрами сперматогенеза и обратно коррелирует с общим количеством blastocyst, полученных в программах вспомогательных репродуктивных технологий. Представленный клинический портрет обследованных пациенток с неудачными попытками в анамнезе соответствует контингенту пациенток, проходящих лечение методом вспомогательных репродуктивных технологий с различными исходами.

2. Наибольший вклад в имплантационный потенциал эмбриона на стадии бластоцисты вносят малые некодирующие РНК hsa-let-7a-5p, hsa-miR-381-3p, hsa\_piR\_020497, hsa\_piR\_008113, hsa\_piR\_022258. Количественная оценка уровня их экспрессии в среде культивирования бластоцисты хорошего/отличного качества позволяет выбрать оптимальный эмбрион для переноса в полость матки и, при отсутствии вмешивающихся факторов, улучшить результативность программ вспомогательных репродуктивных технологий

3. Профиль экспрессии малых некодирующих РНК piR\_020497, piR\_020500, let-7f-5p в фолликулярной жидкости позволяет прогнозировать наличие или отсутствие качественного ооцита, способного к оплодотворению и образованию бластоцисты хорошего/отличного качества с высоким имплантационным потенциалом.

4. Профиль экспрессии малых некодирующих РНК hsa-let-7i-5p, hsa\_piR\_004152, hsa\_piR\_008113, hsa-miR-30a-5p hsa\_piR\_020541, hsa\_piR\_008113, hsa\_piR\_022296 и hsa-let-7i-5p в семенной плазме ассоциированы с качеством сперматогенеза и статистически значимо коррелируют с профилем экспрессии малых некодирующих РНК hsa-let-7a-5p, hsa-miR-381-3p, hsa\_piR\_020497 в среде культивирования получаемой бластоцисты, определяющих ее имплантационный потенциал.

#### Личный вклад автора

Автор участвовал в формулировании темы диссертации, постановке цели и определении задач работы; осуществлял сбор клинико-анамнестических данных, обследование и сопровождение пар на всех этапах лечения бесплодия методом ВРТ; принимал непосредственное участие в клинико-лабораторных исследованиях, анализе и интерпретации полученных данных. Автором сформулированы основные положения и выводы диссертационной работы, разработаны практические рекомендации.

### Соответствие диссертации паспорту научной специальности

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

### Апробация материалов диссертации

Работа обсуждена на межклинической конференции сотрудников отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова института репродуктивной медицины (23.06.2022) и заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (протокол №7 от 29.08.2022).

### Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены и используются в практической работе отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова института репродуктивной медицины (заведующий — д.м.н., профессор Е. А. Калинина), лаборатории прикладной транскриптомики отдела системной биологии в репродукции (заведующий — к. б. н. Тимофеева А.В.) ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России (директор – академик РАН, д.м.н., профессор Сухих Г. Т.).

Материалы и результаты исследования включены в лекции и практические занятия для клинических ординаторов и аспирантов ФГБУ «НМИЦАГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России.

По теме диссертации опубликовано 4 печатные работы, из которых 2 входят в перечень рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК, 1 статья опубликована в иностранном журнале Life с Impact Factor 3,251 (SCOPUS), 1 статья опубликована в иностранном журнале International Journal of Molecular Sciences с Impact Factor 6,208 (SCOPUS).

### Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 144 страницах машинописного текста, иллюстрирована 20 таблицами и 23 рисунками, состоит из введения, обзора

литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений и списка литературы, содержащего 140 литературных источников зарубежных и отечественных авторов.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материал и методы исследования

Проведено обследование 108 бесплодных пар, обратившихся в отделение вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова института репродуктивной медицины. Критерии включения в исследование: возраст пациенток от 18 до 37 лет; трубно-перитонеальный фактор бесплодия; нормальный овариальный резерв; мужской фактор бесплодия (без тяжелой патозооспермии); 2 и более неудачные попытки ВРТ в анамнезе; нормальное анатомическое строение матки; наличие информированного согласия на участие в исследовании. В зависимости от исхода программы ВРТ обследованные пары были разделены на две группы: 1 группа - 41 пара с наступлением беременности; 2 группа - 67 пар с отсутствием беременности.

Овариальная стимуляция у пациенток проводилась по стандартному протоколу со 2-3 дня менструального цикла с использованием препаратов рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона (р-ФСГ) в комбинации с препаратом антагонистом гонадотропин-рилизинг гормона (ант-ГнРГ). На 5-е сутки культивирования производился перенос одного эмбриона в полость матки с последующей криоконсервацией оставшихся эмбрионов. Поддержка посттрансферного периода и дальнейшая диагностика беременности были произведены по стандартизированной методике.

Для исследования молекулярно-биологического профиля фолликулярной жидкости, семенной плазмы и культуральной среды эмбриона были выбраны 52 пары. В день ТВП осуществляли забор фолликулярной жидкости после извлечения ооцит-кумулюсных комплексов и забор эякулята, оставшегося после оплодотворения. На 5-е сутки после оплодотворения

осуществляли забор культуральной среды. Всего было исследовано 103 образца фолликулярной жидкости, 52 образца эякулята и 135 образцов среды культивирования бластоцист различного качества. Образцы заморожены в жидком азоте и хранились при температуре  $-80^{\circ}\text{C}$ . Из собранных образцов выделены РНК колоночным способом с использованием набора «miRNeasy Serum/Plasma Kit» (Qiagen). Идентификация всех имеющихся мнкРНК в образцах осуществлена методом глубокого секвенирования. Валидацию данных секвенирования проводили методом количественной ПЦР в реальном времени.

Относительный уровень экспрессии кДНК оценивали по кратности изменения (КИ) методом  $\Delta\Delta\text{Ct}$ . Для статистической обработки результатов использовали скрипты, написанные на языке R, и программу RStudio. Статистически значимыми считали отличия при  $p \leq 0,05$ .

#### Результаты собственных исследований и их обсуждение

Анализ клинико-anamnestических данных, параметров цикла ВРТ у обследуемых пациенток показал отсутствие достоверных различий между группами. При анализе возрастных и антропометрических параметров статистически значимых различий выявлено не было. Параметры репродуктивной функции и акушерского анамнеза значимо не различались между группами. При анализе анамнеза бесплодия у данных парвыявили, что в I группе преобладал мужской фактор, во II группе – трубно-перитонеальный и сочетанный факторы. При изучении лабораторных показателей статистически значимых различий выявлено не было (Таблица 1).

Таблица 1 - Клинико-anamnestическая характеристика пациенток, включенных в исследование

Параметры	Группа I (наступление беременности) (n = 41)	Группа II (отсутствие беременности) (n = 67)	p - уровень значимости
Средний возраст пациенток (лет)	M=31; (30;34)	M=32.5; (30;35)	> 0,05

Средний возраст партнеров (лет)	M=33; (31;36)	M=34.5; (32;38)	> 0,05
ИМТ	M=21.2; (20.3;22)	M=21.3; (20.1;22.1)	> 0,05
Продолжительность бесплодия (лет)	4 (1–16)	4 (1–10)	> 0,05
АМГ, нг/мл	M=2.7; (1.85;3.24)	M=2.2; (1.52;2.89)	> 0,05
ФСГ, мЕд/мл	M=6.98; (6.26;8.54)	M=7.6; (6.32;8.88)	> 0,05
ЛГ, мЕд/мл	M=5.45; (4.38;6.53)	M=5.78; (4.43;6.9)	> 0,05

Параметры стимулированного цикла, а также эмбриологического этапа у пар, включенных в исследование, достоверно не отличались между группами (Таблица 2).

Таблица 2 – Параметры фолликулогенеза, оогенеза, сперматогенеза и эмбриогенеза пар, включенных в исследование

<b>Параметры</b>	<b>Группа I (наступление беременности) (n = 41)</b>	<b>Группа II (отсутствие беременности) (n = 67)</b>	<b>p - уровень значимости</b>
Суммарная доза препарата, МЕ/сут	M=1575;(1200;1800)	M=1725;(1350;1931.25)	> 0,05
Количество фолликулов в день ТВП	M=8; (4;10.5)	M=8; (6;11)	> 0,05
Количество полученных ОКК	M=7; (4;12)	M=6; (5;12)	> 0,05
Количество ооцитов МП	M=6; (3;8)	M = 6; (4;9.75)	> 0,05
% морф. N сперматозоидов	M=2; (2; 3)	M = 2; (2; 3)	> 0,05
%прогрес. подвижн. сперматозоидов	M=57; (50.5;67)	M = 56; (43;67.5)	> 0,05
Общая конц. сперматозоидов	M=69; (36;97)	M= 59; (31.25;109.75)	> 0,05

Количество эмбрионов 2PN	M=5; (2;7.25)	M=6; (3;8)	> 0,05
Количество бластоцист	M=1.5; (1;3.25)	M =1; (1;3)	> 0,05

При построении корреляционной матрицы с использованием метода ранговой корреляции Спирмена по данным клинко-инструментальных методов исследования пар были обнаружены следующие корреляции (Рисунок 1):

- Возраст пациенток статистически значимо коррелировал с количеством попыток ЭКО в анамнезе ( $p = 0,0001$ ,  $r = 0,75$ ).
- Длительность бесплодия положительно коррелировала с количеством прогрессивно-подвижных ( $p = 0,019$ ,  $r = 0,5$ ) и морфологически нормальных ( $p = 0,021$ ,  $r = 0,44$ ) сперматозоидов в эякуляте.
- Продолжительность овариальной стимуляции положительно коррелировала с суммарной дозой гонадотропинов ( $p = 0,008594$ ,  $r = 0,77$ ), используемой в протоколе ВРТ.
- Доза гонадотропинов положительно коррелировала с ИМТ пациенток ( $p = 0,0104$ ,  $r = 0,53$ ) и имела обратную корреляцию с уровнем АМГ ( $p = 0,0461$ ,  $r = - 0,43$ ).
- Уровень АМГ положительно коррелировал с количеством фолликулов в день назначения триггера овуляции ( $p = 0,0168$ ,  $r = 0,5$ ).
- Количество МП ооцитов статистически значимо коррелировало с количеством попыток ЭКО в анамнезе ( $p = 0,0302$ ,  $r = - 0,46$ ).
- Общее количество бластоцист обратно коррелировало с возрастом женщины ( $p = 0,0328$ ,  $r = - 0,46$ ), а также длительностью бесплодия ( $p = 0,0193$ ,  $r = - 0,49$ ).
- Общее количество эмбрионов, пригодных к проведению криоконсервации, статистически значимо коррелировало с возрастом супругов ( $p = 0,0317$ ,  $r = 0,46$ ).

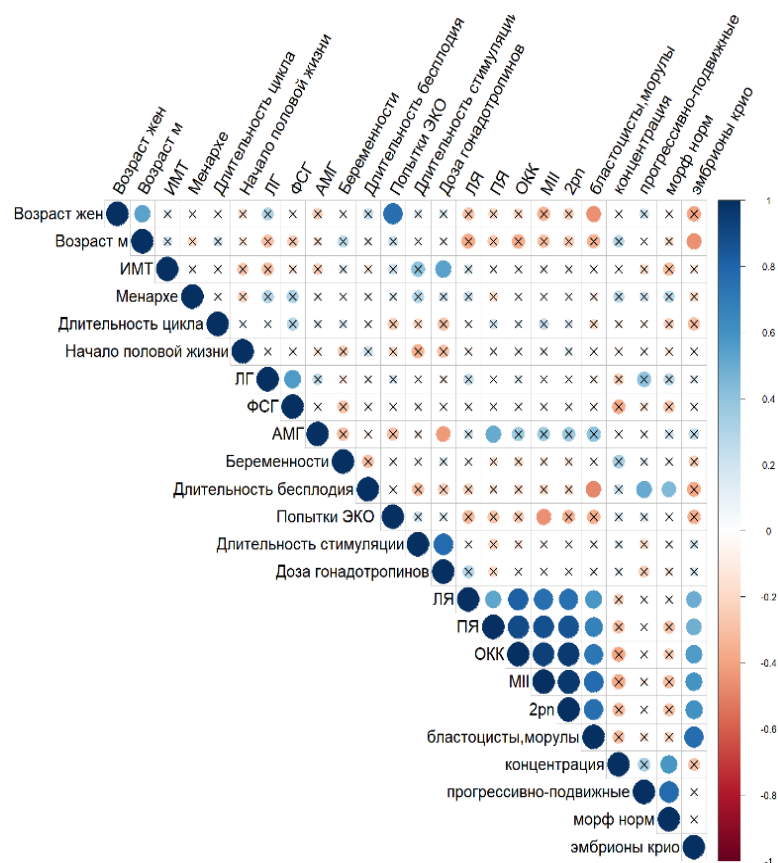


Рисунок 1. Корреляционная матрица клинико-анамнестических данных пациенток, включенных в исследование, параметров стимулированного цикла и характеристик эмбриогенеза.

Полученные данные характеризуют клинический портрет пациенток с неоднократными неудачными попытками ВРТ в анамнезе, включенных в данное исследование.

Далее, с целью определения возможных причин неудач имплантации у данных пар и определения имплантационного потенциала эмбриона, из 135 образцов культуральных сред от бластоцист различного качества отобран 31 образец от эмбрионов хорошего/отличного качества (после переноса в полость матки без последующей имплантации — 16, с имплантацией — 15).

По результатам исследования построена модель дискриминантного анализа с частичной регрессией наименьших квадратов (PLS-DA) по уровню экспрессии мнкРНК в среде культивирования бластоцист. Сформированы 2 кластера: кластер 1 - образцы с последующей имплантацией после переноса



их в полость матки; кластер 2 – образцы с отсутствием имплантации после переноса их в полость матки (Рисунок 2).

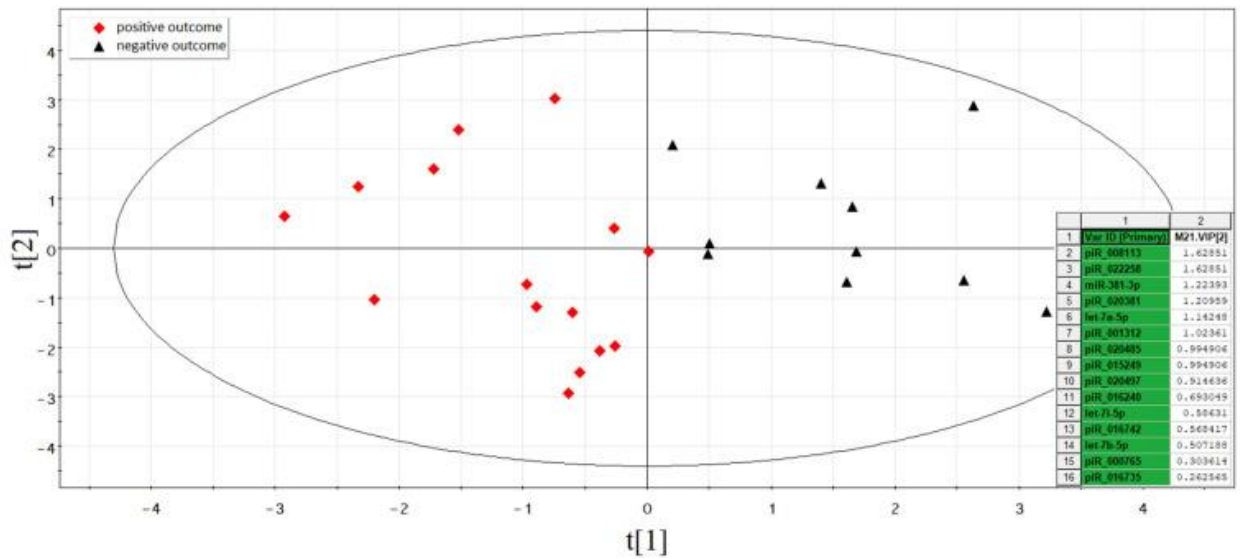


Рисунок 2. Модель PLS-DA для образцов культуральной среды бластоцист.

На основании значений ( $-\Delta\Delta Ct$ ) мнкРНК в культуральной среде бластоцист разработаны различные варианты модели логистической регрессии для расчета вероятности имплантации эмбриона (Рисунок 3).

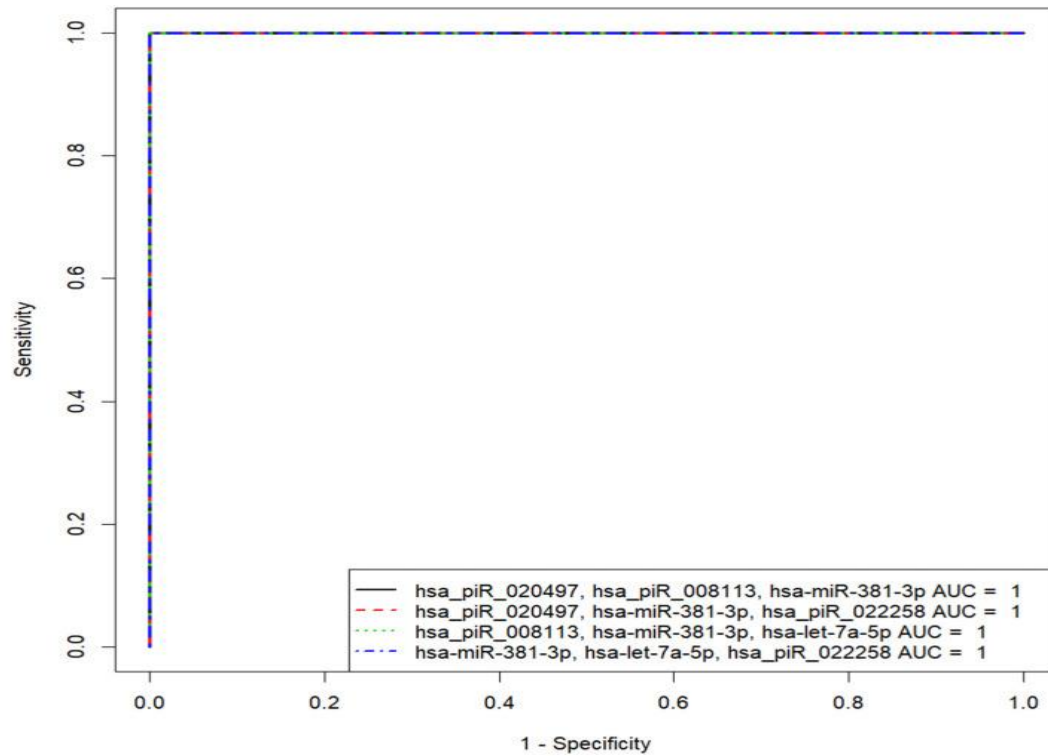


Рисунок 3. ROC-кривые модели логистической регрессии для прогнозирования имплантационного потенциала эмбриона на стадии бластоцисты.

Характеристики построенных моделей описываются формулой:

$$e = \frac{1}{1 + e^{-i - k_1 * x_1 - k_2 * x_2 - \dots}}$$

где  $i$  – свободный член;  $k_1, k_2, \dots$  – коэффициенты для каждой из мнкРНК;  $x_1, x_2, \dots$  – значения «-ΔΔSt» для каждой из мнкРНК

Исходя из полученных данных определено, что прогностическая точность моделей при оценке уровня экспрессии мнкРНК в любой комбинации, представленной на Рисунке 4, составила 100 % (AUC = 1, чувствительность — 100 %, специфичность — 100 %, частота истинно положительных результатов — 1, частота ложноположительных результатов — 0).

Установлено, что белковые продукты генов-мишеней мнкРНК, ассоциированных с имплантационным потенциалом бластоцисты, участвуют в основных процессах раннего эмбриогенеза, четкая координация которых в клеточном пространстве и времени обеспечивает правильное развитие эмбриона. Дисбаланс уровня экспрессии выделенных мнкРНК может привести к нарушению биологических процессов, ведущих к формированию качественных эмбрионов. Полученные данные исследования позволяют оптимизировать алгоритм выбора эмбриона с наибольшим имплантационным потенциалом, а также прогнозировать исходы ВРТ.

Известно, что компоненты фолликулярного микроокружения играют важную роль в развитии качественных ооцитов. Изменение нормального молекулярного состава фолликулярной жидкости может привести к нарушению оогенеза, а также впоследствии оказать негативное влияние на эмбриогенез. В связи с этим, на следующем этапе производилась оценка уровня экспрессии мнкРНК в 103 образцах фолликулярной жидкости у 52 пациенток.

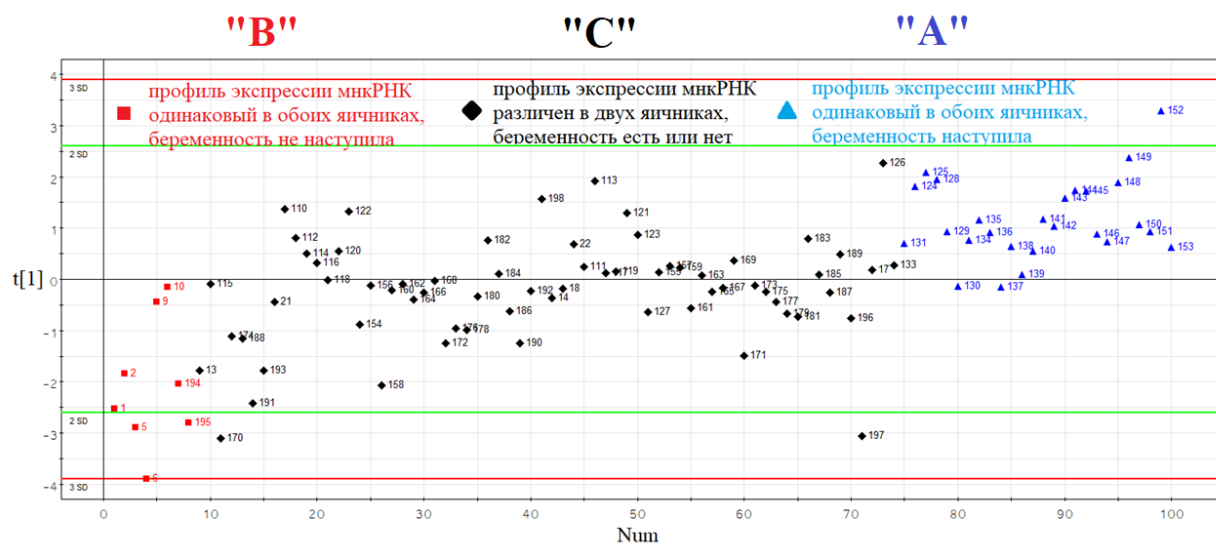


Рисунок 4. График распределения образцов фолликулярной жидкости левого и правого яичников по уровню экспрессии мнкРНК при использовании метода анализа главных компонент.

На основании полученных данных построены модели логистической регрессии и формула расчета вероятности наличия качественного ооцита в фолликулярной жидкости (Рисунок 5).

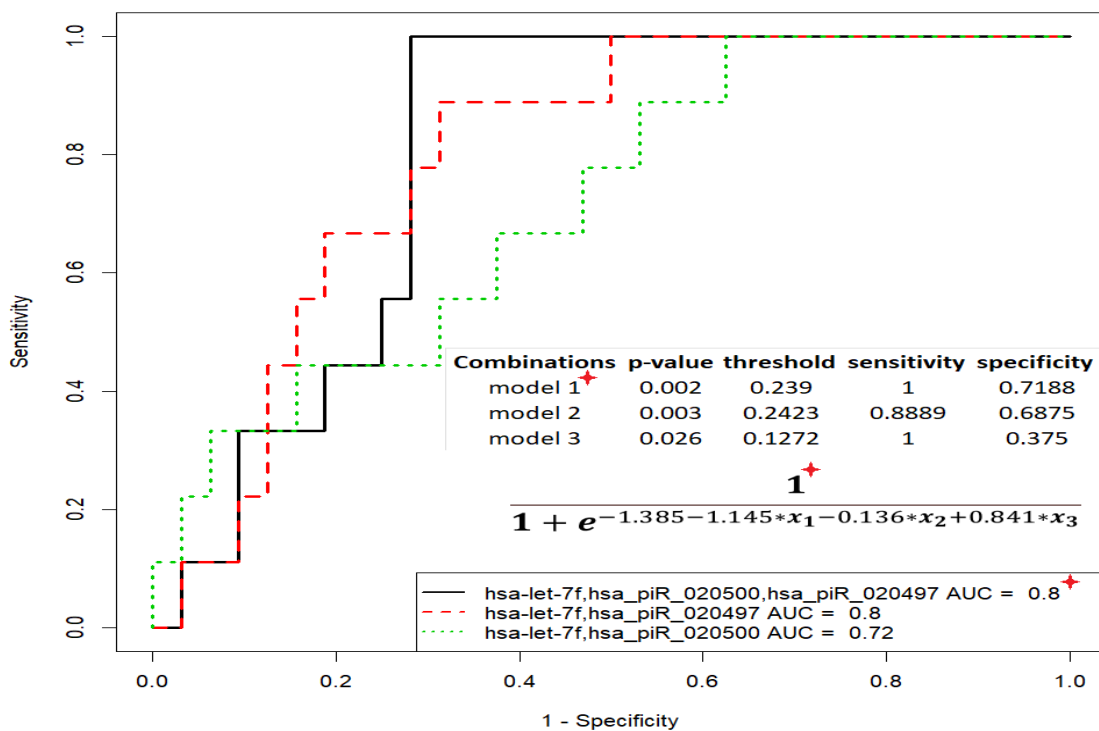


Рисунок 5. Модель логистической регрессии оценки качества ооцита по профилю экспрессии мнкРНК в фолликулярной жидкости.

Далее построена корреляционная матрица взаимосвязи качества ооцитов и получаемых эмбрионов у одной и той же бесплодной пары (Рисунок 6).

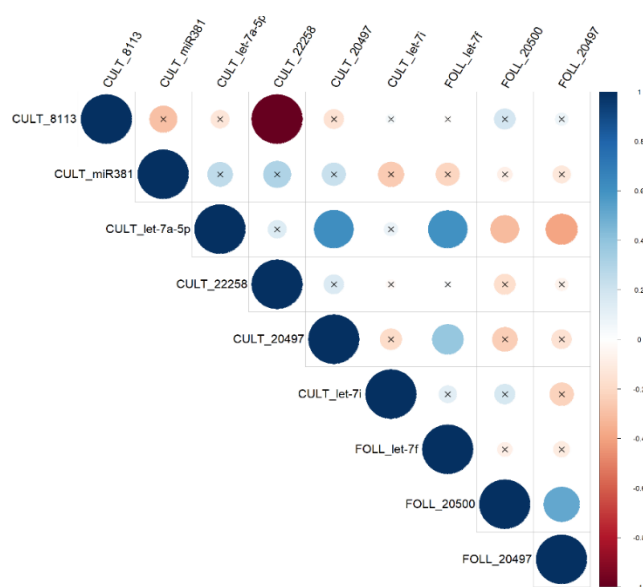


Рисунок 6. Корреляционная матрица уровня экспрессии мнкРНК в фолликулярной жидкости и среде культивирования эмбриона по результатам непараметрического метода ранговой корреляции Спирмена.

Таким образом, найдена наилучшая комбинация мнкРНК, по уровню экспрессии которых построена модель, статистически значимо ( $p=0,002$ ) прогнозирующая со 100 % чувствительностью и 72 % специфичностью наличие качественного ооцита в фолликулярной жидкости, способного к оплодотворению и образованию бластоцисты хорошего/отличного качества с высоким имплантационным потенциалом. Выявленные статистически значимые корреляции между уровнем экспрессии мнкРНК в фолликулярной жидкости и культуральной среде отображают влияние молекулярно-биологических свойств оплодотворяемого ооцита на потенциал развития получаемого эмбриона, переносимого в полость матки и вероятную последующую беременность.

Так как ряд специфичных для сперматозоидов мнкРНК после фертилизации ооцита играют важную роль в эпигенетической регуляции раннего эмбриогенеза, в том числе путем контроля материнско-зиготического перехода и экспрессии эмбриональных генов, на следующем этапе

исследования производилась оценка уровня экспрессии мнкРНК в 52 образцах семенной плазмы обследованных пар.

При использовании метода регрессии частных наименьших квадратов (PLS) сформированы три кластера образцов: кластер А - нормозооспермия; кластер Б - выраженная патозооспермия; кластер С – тератозооспермия (Рисунок 7).

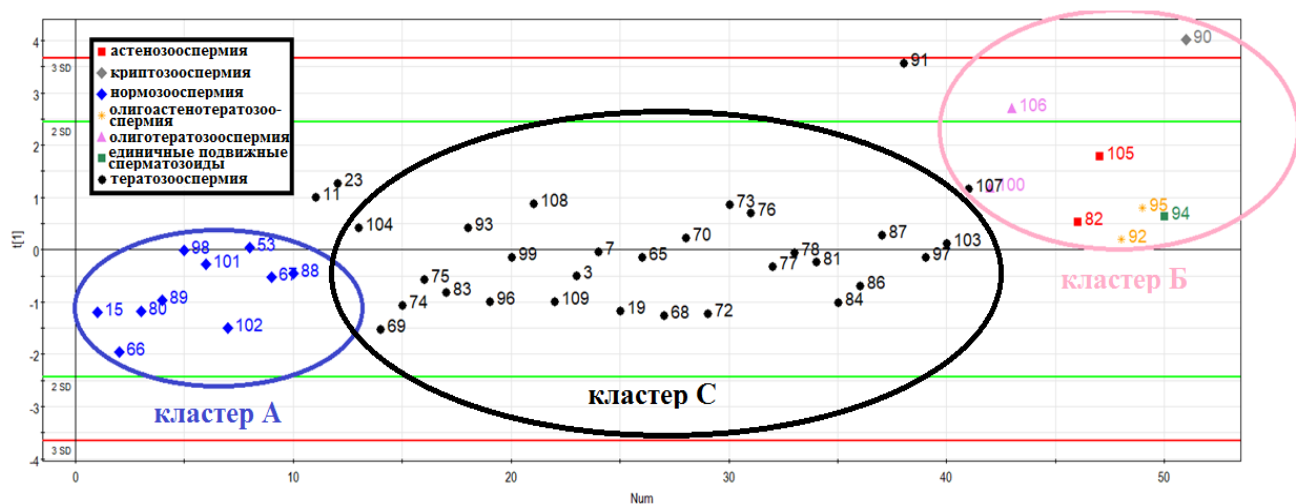


Рисунок 7. График распределения образцов семенной плазмы по уровню экспрессии мнкРНК при использовании метода PLS

Для классификации образцов полученных кластеров в зависимости от уровня экспрессии данных мнкРНК был использован алгоритм дискриминантного анализа регрессии частных наименьших квадратов (PLS-DA). Выявлено, что не все образцы семенной плазмы пациентов с тератозооспермией имеют одинаковый молекулярно-биологический профиль, который или приближен к норме, или подобен профилю мнкРНК при выраженной патозооспермии, что характеризует различную оплодотворяющую способность сперматозоидов (Рисунок 8).

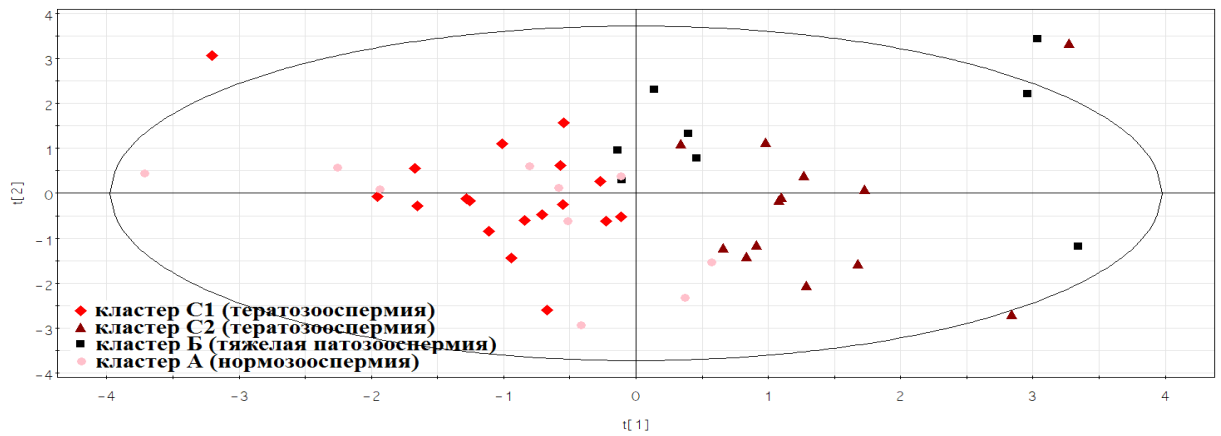


Рисунок 8. Модель PLS-DA для образцов семенной плазмы

На основании полученных значений уровня экспрессии мнкРНК в семенной плазме мужчин при тератозооспермии были разработаны различные варианты моделей логистической регрессии для оценки фертильности эякулята (Рисунок 9).

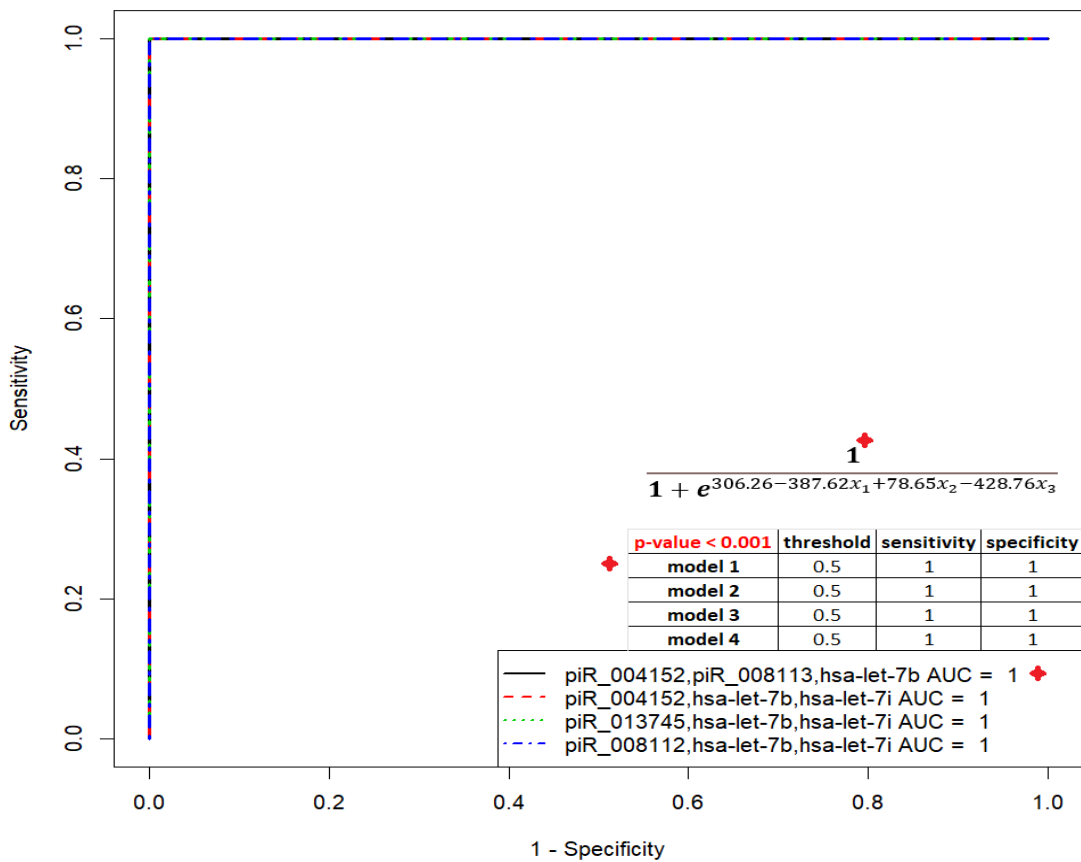


Рисунок 9. Модели логистической регрессии оценки фертильности образцов с тератозооспермией по профилю экспрессии мнкРНК в семенной плазме.

Исходя из полученных данных определено, что прогностическая точность моделей при оценке уровня экспрессии мнкРНК в любой комбинации, представленной на Рисунке 9, составила 100 % (AUC = 1, чувствительность — 100 %, специфичность — 100 %, частота истинно положительных результатов — 1, частота ложноположительных результатов — 0).

При оценке взаимосвязи мужского фактора бесплодия и качества получаемых эмбрионов у одной и той же бесплодной пары были найдены корреляции уровня экспрессии мнкРНК семенной плазмы с уровнем экспрессии мнкРНК в среде культивирования получаемой бластоцисты (Рисунок 10).

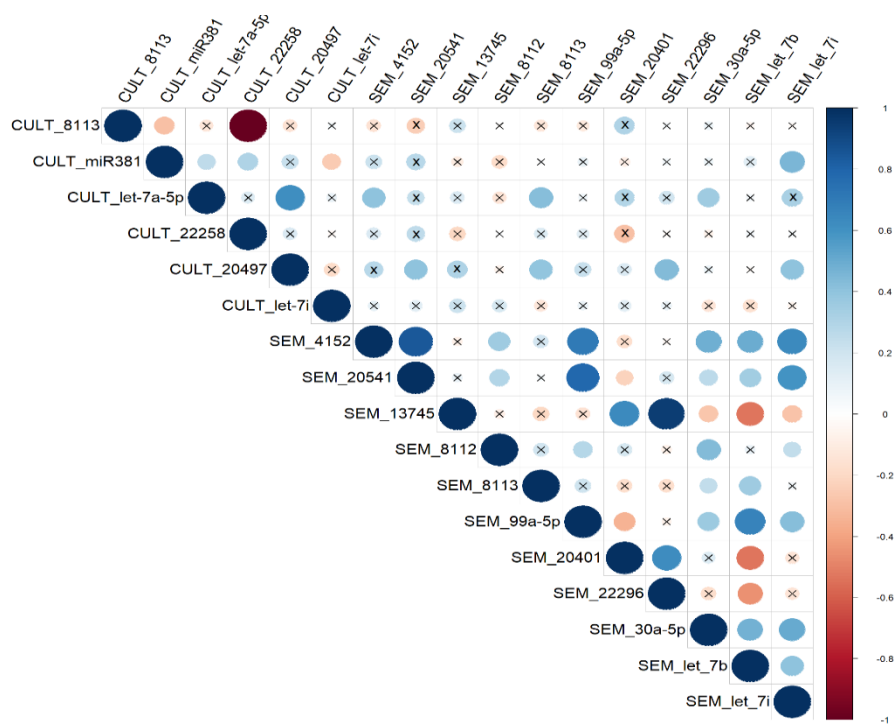


Рисунок 10. Корреляционная матрица уровня экспрессии мнкРНК в семенной плазме и среде культивирования эмбриона по результатам непараметрического метода ранговой корреляции Спирмена.

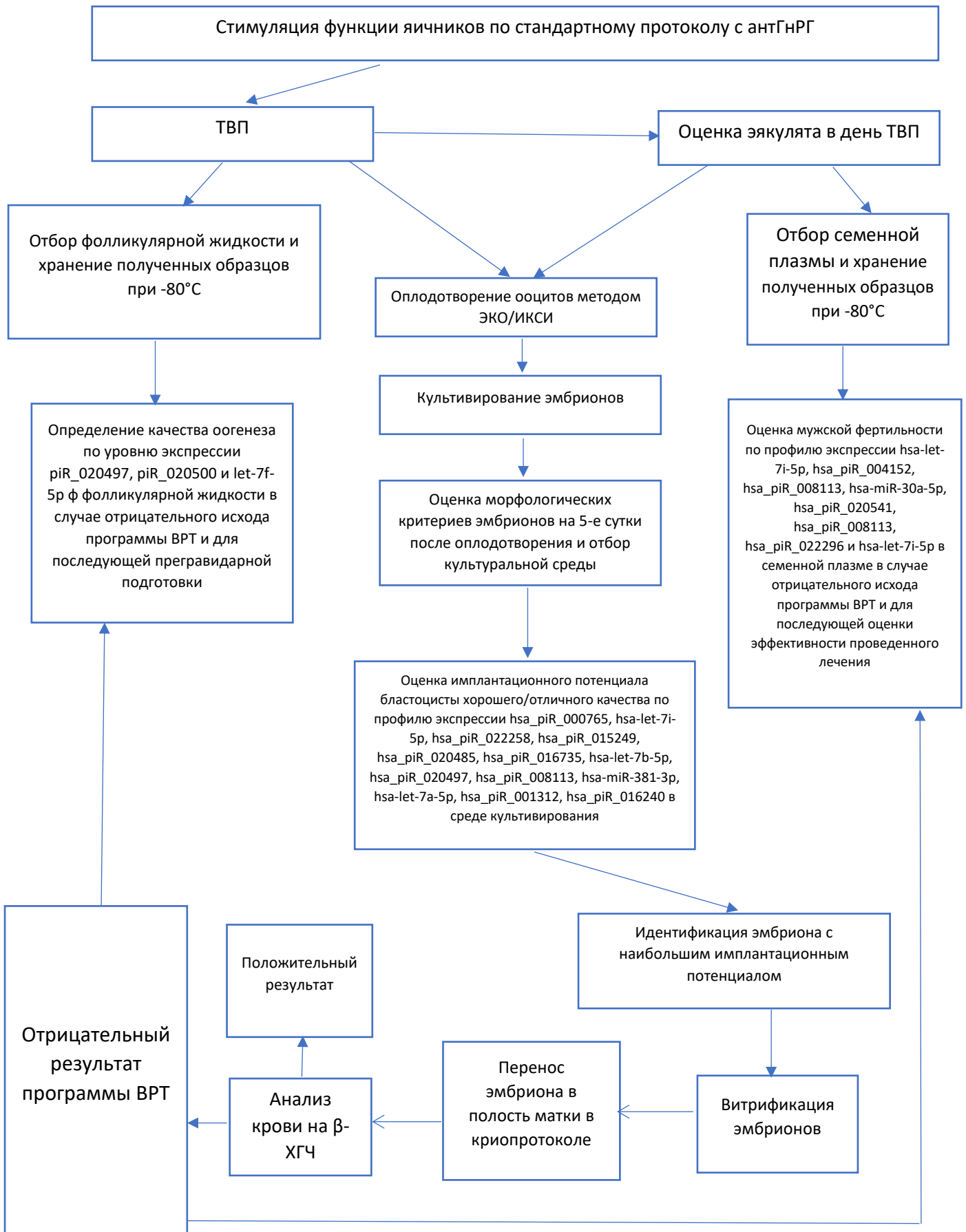
Выявленные статистически значимые корреляции между уровнем экспрессии мнкРНК в семенной плазме и культуральной среде отображают влияние мужского фактора на потенциал развития получаемого эмбриона и вероятность последующей беременности в программах ВРТ.

Таким образом, в настоящем исследовании идентифицированы молекулы мнкРНК, уровень экспрессии которых в фолликулярной жидкости и в семенной плазме ассоциирован с качеством гамет данных пар и статистически значимо коррелирует с уровнем экспрессии молекул мнкРНК, определяющих имплантационный потенциал бластоцисты хорошего/отличного качества. Определение данных молекул в программах ВРТ может не только дополнить стандартные методы диагностики причин бесплодия, но и оптимизировать тактику ведения бесплодных пар с неудачными попытками ВРТ в анамнезе.

На основании полученных результатов предложен алгоритм проведения программ ВРТ у бесплодных пар с неудачными попытками на основании уровня экспрессии мнкРНК в фолликулярной жидкости/семенной плазме и среде культивирования бластоцисты хорошего/отличного качества (Рисунок 11).



Рисунок 11. Алгоритм проведения программ ВРТ у бесплодных пар с неудачными попытками на основании уровня экспрессии мнкРНК в фолликулярной жидкости/семенной плазме и среде культивирования бластоцисты хорошего/отличного качества



## Выводы

1. Клинический портрет обследованных пациентов с неудачными попытками вспомогательных репродуктивных технологий в анамнезе имеет следующие характеристики: количество попыток ВРТ положительно коррелирует с возрастом, оказывающим влияние на качество ооцитов и результативность лечения бесплодия; продолжительность бесплодия у обследуемых пар имеет прямую корреляцию с количеством патологических сперматозоидов в эякуляте и снижением прогрессивно-подвижных форм сперматозоидов, что указывает на их различную оплодотворяющую способность.
2. У пациентов с неудачными попытками ВРТ в анамнезе имплантационный потенциал эмбрионов различен несмотря на аналогичные клинико-анамнестические данные, характеристики гаметогенеза и параметры стимулированного цикла. Количество эмбрионов на 5-е сутки развития обратно коррелирует с длительностью бесплодия у супружеских пар, что снижает вероятность получения эмбриона с высоким имплантационным потенциалом для переноса в полость матки.
3. У пациентов в исследуемых группах мнкРНК hsa-let-7a-5p, hsa-miR-381-3p, hsa\_piR\_020497, hsa\_piR\_008113, hsa\_piR\_022258, определяемые в среде культивирования эмбриона на 5 сутки после оплодотворения, дифференцируют бластоцисты хорошего/отличного качества с различным имплантационным потенциалом в программах ВРТ.
4. Сочетанное определение уровня экспрессии piR\_020497, piR\_020500, let-7f-5p в фолликулярной жидкости пациенток позволяет статистически значимо ( $p=0,002$ ) со 100 % чувствительностью и 72 % специфичностью прогнозировать наличие качественного ооцита, способного к оплодотворению и образованию бластоцисты хорошего/отличного качества с высоким имплантационным потенциалом.
5. Малые некодирующие РНК hsa-let-7i-5p, hsa\_piR\_004152, hsa\_piR\_008113, hsa-miR-30a-5p, hsa\_piR\_020541, hsa\_piR\_008113, hsa\_piR\_022296 и hsa-let-

7i-5p, определяемые в семенной плазме, коррелируют с параметрами сперматогенеза. При этом не все образцы семенной плазмы пациентов с тератозооспермией имеют одинаковый молекулярно-биологический профиль: приближенный к норме или аналогичный профилю мнкРНК при выраженной патозооспермии, что влияет на оплодотворяющую способность сперматозоидов.

- б. Сочетанное определение мнкРНК, уровень экспрессии которых в фолликулярной жидкости и в семенной плазме ассоциирован с качеством гамет и статистически значимо коррелирует с уровнем экспрессии мнкРНК hsa-let-7a-5p и hsa\_piR\_020497, определяющих имплантационный потенциал бластоцисты хорошего/отличного качества, позволяет оптимизировать алгоритм выбора эмбриона, а также прогнозировать вероятность наступления беременности в цикле ВРТ.

#### Практические рекомендации

1. В программах ВРТ у супружеских пар с неоднократными неудачными попытками в анамнезе для прогнозирования наступления беременности целесообразно помимо клинико-анамнестических данных и морфологических параметров эмбриона оценивать профиль экспрессии мнкРНК hsa-let-7a-5p, hsa-miR-381-3p, hsa\_piR\_020497, hsa\_piR\_008113, hsa\_piR\_022258 в культуральной среде на 5 сутки после оплодотворения (стадии бластоцисты). Имплантационный потенциал эмбриона определяют по одной из формул в лаборатории молекулярно-биологических методов исследования:

Для первой комбинации мнкРНК (hsa\_piR\_020497, hsa\_piR\_008113, hsa-miR-381-3p):

$$\frac{1}{1 + e^{-1860 + 1999.77x_1 - 3345.75x_2 + 98.52x_3}}$$

Для второй комбинации мнкРНК (hsa\_piR\_020497, hsa-miR-381-3p, hsa\_piR\_022258):

$$\frac{1}{1 + e^{-1860 + 1999.77x_1 + 98.52x_2 + 3345.75x_3}}$$

Для третьей комбинации мнкРНК (hsa\_piR\_008113, hsa-miR-381-3p, hsa-let-7a-5p):

$$\frac{1}{1 + e^{6233.3 - 6761.63x_1 + 516.07x_2 + 369.58x_3}}$$

Для четвертой комбинации мнкРНК (hsa-miR-381-3p, hsa-let-7a-5p, hsa\_piR\_022258):

$$\frac{1}{1 + e^{6233.3 + 516.07x_1 + 369.58x_2 + 6761.63x_3}}$$

Прогностическая точность всех моделей при оценке уровня экспрессии мнкРНК в любой комбинации составляет 100 % (чувствительность — 100 %, специфичность — 100 %).

2. Выбор эмбриона для переноса в полость матки, проведения преимплантационного генетического тестирования и криоконсервации возможно проводить на основании оценки профиля экспрессии мнкРНК hsa-let-7a-5p, hsa-miR-381-3p, hsa\_piR\_020497, hsa\_piR\_008113, hsa\_piR\_022258 в культуральной среде бластоцисты хорошего/отличного качества для оптимизации программ ВРТ.

3. Определение профиля экспрессии мнкРНК piR\_020497, piR\_020500 и let-7f-5p в фолликулярной жидкости позволяет прогнозировать наличие качественного ооцита, способного к оплодотворению и образованию бластоцисты хорошего/отличного качества с высоким имплантационным потенциалом.

4. Дополнительным диагностическим методом оценки качества сперматогенеза и оплодотворяющей способности сперматозоидов помимо стандартного микроскопического исследования эякулята является количественное определение профиля экспрессии мнкРНК piR\_004152, piR\_020541, piR\_013745, piR\_008112, piR\_008113, miR-99a-5p, piR\_020401, piR\_022296, miR-30a-5p, let-7b-5p, let-7i-5p в семенной плазме. Это позволяет расценивать семенную плазму пациентов при тератозооспермии как образец с

нормальной или патологической фертильностью и, соответственно, модифицировать эмбриологический этап.

5. Пациенткам с неудачными попытками ВРТ в анамнезе целесообразно исследовать профиль экспрессии указанных мнкРНК в фолликулярной жидкости, семенной плазме и в среде культивирования эмбриона на стадии бластоцисты для выбора оптимальных гамет и эмбрионов.

#### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Шамина М.А.**, Тимофеева А.В., Калинина Е.А. / Малые некодирующие РНК и их потенциальная роль в оценке фертильности супружеской пары в программах вспомогательных репродуктивных технологий // **Акушерство и гинекология**. 2019; 11:33-39.
2. **Шамина М.А.**, Тимофеева А.В., Федоров И.С., Калинина Е.А. / Оценка уровня экспрессии пивиРНК hsa\_piR\_020497 в фолликулярной жидкости пациенток с различными исходами программ экстракорпорального оплодотворения // **Акушерство и гинекология**. 2021; 11: 143-153.
3. 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 Development Stages // **Life** – 2021 – 11 – 1328.
4. Timofeeva A.V.; Drapkina Y.S.; Fedorov I.S.; Chagovets V.V.; Makarova N.P.; **Shamina M.A.**; Kalinina E.A.; Sukhikh G.T. / Small noncoding RNA signatures for determining the developmental potential of an embryo at the morula stage // **International Journal of Molecular Sciences** –2020–Vol. 21. – No 24. – P. 1-25.