

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

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

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Е. А. Калинина

кандидат биологических наук

А.В. Тимофеева

Оглавление

Оглавление	2
Введение	4
Актуальность темы исследования	4
Степень разработанности темы исследования	6
Цель исследования	8
Задачи исследования.....	8
Научная новизна.....	9
Теоретическая и практическая значимость	10
Методология и методы исследования.....	10
Положения, выносимые на защиту	12
Личный вклад автора	13
Соответствие диссертации паспорту научной специальности.....	13
Апробация результатов	13
Внедрение результатов исследования в практику	14
Структура и объем диссертации	14
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1. Бесплодие в современном мире.....	15
1.2. Биомаркеры женского и мужского бесплодия.....	18
1.2.1. Оогенез	19
1.2.2. Роль микроРНК в фолликуло- и оогенезе.....	21
1.2.3. Преждевременная недостаточность яичников	24
1.2.4. Эндометриоз-ассоциированное бесплодие.....	27
1.2.5. Бесплодие, связанное с отсутствием овуляции.....	29
1.2.6. Сперматогенез.....	30
1.2.7. Дисрегуляция микроРНК как один из факторов мужского бесплодия.....	36
1.3. Эмбриогенез и имплантация эмбриона в полости матки	39
1.3.1 Эмбриогенез.....	39
1.3.2. Имплантация эмбриона в полости матки	42
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	45
2.1. Материал исследования.....	45
2.2. Дизайн исследования	46
2.3. Методы исследования.....	52
2.3.1. Общеклинические методы обследования.....	54
2.3.2. Гормональное исследование	56
2.3.3. Ультразвуковое исследование малого таза	56
2.3.4. Обследование партнера.....	57
2.3.5. Протокол овариальной стимуляции	58

2.3.6. Трансвагинальная пункция яичников	60
2.3.7. Морфологическая оценка ооцитов и этап оплодотворения	60
2.3.8. Морфологическая оценка эмбрионов	61
2.3.9. Перенос эмбрионов в полость матки и ведение посттрансферного периода	62
2.4. Специальные методы исследования.....	63
2.5. Статистическая обработка полученных данных	66
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	67
3.1. Клинико-лабораторная характеристика пациенток, включенных в исследование.....	67
3.2. Характеристика циклов ЭКО и переноса эмбрионов.....	72
3.3. Характеристика эмбриологического этапа	73
3.4. Исходы программы ЭКО у пациенток, включенных в исследование	74
3.5. Корреляционный анализ данных клинико-инструментальных методов исследования супружеских пар	75
3.6. Роль мнкРНК в имплантационном потенциале эмбриона на стадии бластоцисты	76
3.7. Роль мнкРНК в оогенезе и последующем эмбриогенезе	84
3.8. Анализ взаимосвязи прегравидарной подготовки, качества ооцитов и уровня экспрессии мнкРНК в фолликулярной жидкости яичников.....	89
3.9. Анализ профиля экспрессии мнкРНК в семенной плазме	98
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ	105
ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	120
ВЫВОДЫ	124
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	126
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	129
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	132

ВВЕДЕНИЕ

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% [11]. 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 [3].

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 [7]. Кроме того, ряд заболеваний репродуктивной системы и сопутствующая соматическая патология нарушают функцию репродуктивных органов [8]. Правильное функционирование яичников у женщин зависит от скоординированного взаимодействия аутокринных, эндокринных и паракринных сигнальных путей [52]. 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 [122]. Было проведено множество исследований, направленных на изучение их роли в оогенезе, оценке качества ооцита и эмбриональном развитии [118].

Также в последние годы все чаще причиной ненаступления беременности является мужской фактор, при этом его частота достигает примерно 50% [54]. 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 [89]. Выявлены различия в профилях экспрессии мнкРНК при различных нарушениях сперматогенеза [24]. 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 [81], а внеклеточные мнкРНК присутствуют в различных биологических жидкостях организма. Учитывая, что мнкРНК секретируются эмбрионами в их окружающую среду (культуральную среду), изучение профиля

данных молекул в эмбриональной среде во время проведения программ ВРТ 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 и принять возможные меры по их предотвращению, персонифицировать проведение программы ВРТ, что является современным и перспективным.

Степень разработанности темы исследования

С каждым годом число бесплодных пар увеличивается, несмотря на стремительное развитие репродуктивной медицины. В связи с этим исследователи во всем мире заинтересованы в поиске новых маркеров женского и мужского бесплодия, которые бы помогли в диагностике, дальнейшем лечении и, соответственно, обеспечивали улучшение репродуктивных исходов. Клетки и ткани, отвечающие за выполнение репродуктивных функций, уникальны в том, что они непрерывно подвергаются существенной реорганизации как на транскриптомном, так и протеомном уровнях во время гаметогенеза и эмбриогенеза. Принято считать, что существенную роль в регуляции данных процессов играют малые некодирующие РНК [13], в связи с чем они были предложены в качестве возможных биомаркеров мужского и женского бесплодия.

В 2013 г. впервые были идентифицированы мнкРНК в фолликулярной жидкости человека. При этом исследователи определили, что данные мнкРНК влияют на стероидогенез, а также регулируют концентрации эстрадиола и прогестерона [105]. Santonocito et al. в 2014 году обнаружили, что специфические мнкРНК, содержащиеся в фолликулярной жидкости способны регулировать

развитие фолликулов, возобновление мейоза и последующую овуляцию [107]. В том же году Rosenbluth et al определяли спектр микроРНК в культуральной среде эмбриона и определили, что профиль данных молекул зависит от хромосомного набора эмбриона и его способности к имплантации [101]. В 2018 году Jing Fu et al. обнаружили, что уровень экспрессии мнкРНК в фолликулярной жидкости определял дальнейшее формирование и созревание бластоцисты, а также ее морфологическую характеристику [58]. Различные группы ученых доказали участие мнкРНК, синтезирующихся в клетках гранулезы и кумулюса и секретирующихся в фолликулярную жидкость, в созревании ооцитов и их влиянии на качество эмбриона [80][105].

В последующих исследованиях был определен спектр мнкРНК при различных гинекологических заболеваниях, таких как: синдром поликистозных яичников (СПКЯ) и преждевременная недостаточность яичников (ПНЯ), а также при старении организма [112]. Juan Manuel Moreno et al., Diez-Fraile et al. также выявили различия в уровне экспрессии мнкРНК в различных возрастных группах пациенток, при этом список данных молекул у этих групп ученых различался [86][46]. Было проведено множество исследований, изучающих роль мнкРНК в развитии ПНЯ у пациенток. Определено, что спектр молекул имел различный уровень экспрессии у пациенток с ПНЯ в сравнении с контрольной группой [44]. Данные исследования показывают влияние мнкРНК на оогенез, что в свою очередь играет роль в последующем правильном эмбриогенезе. Elke F. Roovers с коллегами представил доказательства выраженной экспрессии пивиРНК в ооцитах человека, быка и макаки, причем спектр пивиРНК в ооцитах был сходен с таковым в сперматозоидах яичек на пахитенной стадии мейоза, чья основная роль заключается в регуляции экспрессии транспозонов, а значит стабильности генома [100]. Роль пивиРНК и микроРНК на всех стадиях сперматогенеза описана в научной публикации [89], также определены различные профили экспрессии мнкРНК при различных нарушениях сперматогенеза [24].

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 современной.

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 персонафицированный 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, секретируемых 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.

Теоретическая и 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

Проведено обследование 108 супружеских пар с различными факторами бесплодия на базе ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава России в отделении вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова института репродуктивной медицины (заведующий — д. м. н., профессор Е. А. Калинина). Для исследования молекулярно-биологического профиля фолликулярной жидкости, семенной плазмы и культуральной среды эмбриона были выбраны 52 пары, подписавшие добровольное информированное согласие на участие в исследовании, от которых было получено 103 образца фолликулярной жидкости, 52 образца эякулята и 135 образцов среды культивирования бластоцист различного качества. Перед началом программы

ВРТ всем пациенткам проведено полное клинико-лабораторное обследование в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации № 107н. Далее всем пациенткам проводилось лечение бесплодия методом ВРТ. При стимуляции функции яичников препаратами рФСГ и антГнРГ была проведена трансвагинальная пункция фолликулов у всех супружеских пар проводилась оценка степени зрелости и качества ооцитов, оценка качества эмбрионов согласно классификации Гарднера («модифицированная» классификация D. Gardner).

Проводился анализ исхода программ ВРТ в зависимости от различных факторов: клинических, молекулярно-биологических и др. Из специальных методов исследования проводился сравнительный анализ профиля экспрессии малых некодирующих РНК фолликулярной жидкости, семенной плазмы супругов и культуральной среды эмбриона на 5 сутки после оплодотворения. Из собранных образцов были выделены РНК колоночным способом с использованием набора «miRNeasy Serum/Plasma Kit» (Qiagen). Идентификация всех имеющихся мнкРНК в образцах была осуществлена методом глубокого секвенирования с использованием набора по синтезу кДНК-библиотек NEBNext® Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina® (Set11, New England Biolab®, Germany) на платформе NextSeq 500 platform (Illumina, USA). Валидацию данных секвенирования проводили методом количественной ПЦР в реальном времени наборами miScript® II RT Kit (Qiagen, Hilden, Germany) и miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Относительный уровень экспрессии кДНК оценивали по кратности изменения (КИ) методом $\Delta\Delta C_t$.

$M0s1 / M0s2 = 2^{-\Delta\Delta C_t}$, где $M0s1$ и $M0s2$ – исходные количества кДНК в образцах $s1$ и $s2$, $\Delta\Delta C_t = (C_{ts1} - C_{tnorm1}) - (C_{ts2} - C_{tnorm2})$, C_t - значение цикла амплификации в точке пересечения кинетической кривой накопления продукта амплификации с линией порогового уровня флуоресценции, который определяется автоматически программным обеспечением амплификатора StepOnePlus; C_{ts1} и C_{ts2} - значение порогового цикла амплификации кДНК анализируемой мнкРНК в двух сравниваемых образцах $s1$ и $s2$; C_{tnorm1} и C_{tnorm2}

- значение порогового цикла амплификации кДНК нормировочной эндогенной мнкРНК в двух сравниваемых образцах s1 и s2.

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 бластоцист, 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 результатов

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 была опубликована в иностранном журнале Life с Impact Factor 3,251 (SCOPUS), 1 статья была 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Бесплодие в современном мире

В последние годы одной из основных медико-социальных проблем современности является бесплодие. По примерным статистическим подсчетам Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) у 8 – 29 % супружеских пар не наступает самопроизвольная беременность. Актуальность данной проблемы связана с падением уровня рождаемости во всем мире, в то время как число бесплодных браков не имеет тенденции к снижению.

В настоящее время разработано множество методов, помогающих супружеским парам преодолеть бесплодие, среди которых наиболее эффективными являются вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ). Основными методами ВРТ являются: проведение искусственной инсеминации (ИИ) и проведение программы экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) в сочетании с различными дополнительными методиками. ИИ не является достаточно эффективным методом достижения беременности, т.к. частота наступления беременности в одной лечебном цикле ИИ не превышает 15,8 % [51]. В связи с этим всё чаще методом выбора является ЭКО несмотря на то, что частота наступления беременности после первой попытки в среднем не превышает 40%, а частота живорождения не превышает 33,2 % [12]. Основными условиями для успешной имплантации являются: эмбрион с высоким имплантационным потенциалом, рецептивность эндометрия, а также синхронизация процессов эмбриогенеза и созревания эндометрия [140]. Получение большого числа ооцитов, благодаря стимуляции суперовуляции, позволило выбирать эмбрионы, наиболее подходящие для последующего переноса в полость матки [9]. Качество эмбриона служит основополагающим фактором успеха программ ВРТ при условии отсутствия влияния других факторов бесплодия. В связи с тем, что качество эмбриона напрямую зависит от

гаметогенеза и последующего эмбриогенеза, установление причины ненаступления беременности у супружеской пары необходимо начинать с обследования фертильности как женщины, так и мужчины.

Основными причинами бесплодия со стороны женской репродуктивной системы являются: нарушение процесса овуляции, трубно-перитонеальные факторы, маточные факторы [10]. В отдельную группу принято выделять эндометриоз-ассоциированное бесплодие, несмотря на то, что механизмы и причины развития бесплодия при данной патологии до сих пор противоречивы и дискуссионны [57].

Одним из самых важных факторов, влияющих на фертильность у женщин, является возраст. В современном мире отмечается планирование беременности и деторождения в более позднем возрасте, что сказывается на снижении частоты наступления и вынашивания самопроизвольной беременности, что привело к увеличению спроса на вспомогательные репродуктивные технологии. Основными маркерами овариального резерва яичников на данный момент являются: уровень Антимюллерова гормона (АМГ), а также число антральных фолликулов при проведении УЗ-исследования органов малого таза. В последние годы отмечается тенденция к преждевременному снижению функциональной активности яичников, и, как следствие, невозможности наступления самопроизвольной беременности без применения вспомогательных репродуктивных технологий. Помимо отрицательного влияния на количество антральных фолликулов в яичниках, возраст женщины оказывает негативное воздействие непосредственно на качество гамет. Наибольший повреждающий эффект связан с оксидативным стрессом, который напрямую зависит от возраста организма.

Мужское бесплодие может быть вызвано различными факторами, включая анатомические или генетические аномалии, системные или неврологические патологические состояния, инфекции, травмы, ятрогенные воздействия, прием гонадотоксичных препаратов в анамнезе и т.д., но в 30-40% случаев истинная причина не выявляется (идиопатическое мужское бесплодие). В последние годы мужское бесплодие привлекает все больший интерес в связи с превышением доли

мужского фактора в бесплодии супружеской пары [72]. Помимо патологических процессов, влияющих на фертильность, существенный вклад в развитие бесплодия привносит возраст супругов, их образ жизни, а также влияние окружающей среды. Антропогенная деятельность, которая особенно интенсивна в крупных городах развитых стран, является основным источником вредных для здоровья людей загрязнителей воздуха. Многие токсичные выбросы обладают эндокринной активностью, способствовать окислительному стрессу и воспалительным процессам, которые в свою очередь могут повлиять на репродуктивное здоровье женщин. Более того, эти загрязнители воздуха обладают эстрогенной, антиэстрогенной и антиандрогенной активностью, а некоторые могут вызывать метаболические нарушения, такие как инсулинорезистентность и ожирение, которые тесно связаны с развитием бесплодия [40].

Образ жизни в сочетании с профессиональными вредностями также приводят к общему ухудшению репродуктивной функции супружеских пар. Определено негативное влияние сигаретного дыма на качество гамет, а также была обнаружена передача изменений ДНК сперматозоидов, вызванных курением, у эмбрионов до имплантации, что в свою очередь может являться риском развития пороков развития плода и генетических аномалий [59].

Регулярные тепловые воздействия, которые могут быть связаны, как с образом жизни, так и с профессиональными вредностями, оказывают негативное влияние на концентрацию сперматозоидов у мужчин [67].

Для мужчин методы диагностики бесплодия ограничены и часто состоят только из стандартного анализа спермы. В последние годы для оценки мужской фертильности стали применять метод оценки “целостности генома” – оценка фрагментации ДНК сперматозоидов [1]. Фрагментация ДНК играет важную роль в этиологии мужского бесплодия и в основном происходит из-за активных форм кислорода (АФК), которые образуются в результате клеточного метаболизма. При этом дефектный хроматин сперматозоидов оказывает неблагоприятное влияние на репродуктивный успех в целом, а не на способность к оплодотворению сперматозоидов, в частности. В 2019 году группа ученых опубликовала

исследование, в котором обозначили, что соматическая патология, возраст мужчины и его образ жизни, а также влияние различных экзогенных факторов (прием лекарственных препаратов, ионизирующее и тепловое воздействие и т.д.) были связаны с увеличением уровня фрагментации ДНК [53].

Стандартное исследование эякулята в совокупности с исследованием фрагментации ДНК сперматозоидов являются приблизительной оценкой мужской фертильности, так как мужское бесплодие является многофакторным состоянием, в связи с чем необходимо определить дополнительные диагностические биомаркеры, которые оказывают влияние на мужскую фертильность.

В то время как получение эякулята пациентов для определения качества является простым в техническом плане методом диагностики, определение качества ооцитов возможно только при трансвагинальной пункции фолликулов (ТВП) во время проведения программ ЭКО. В связи с тем, что программы ЭКО связаны с приемом гормональных препаратов, потенциальными интраоперационными и послеоперационными осложнениями, развитием синдрома гиперстимуляции яичников - в последние годы ученые занимаются поиском биомаркеров качества ооцитов, а также способов улучшения их качества.

С целью улучшения исходов программ ЭКО необходима разработка специализированных тест-систем, которые направлены на предварительную оценку фертильности женщины перед проведением лечебного цикла. Результаты оценки качества ооцитов по данным тест-системам покажут необходимость в назначении персонализированной и оптимальной прегравидарной подготовки с целью достижения положительного результата в программах ЭКО.

1.2 Биомаркеры женского и мужского бесплодия

Несмотря на всестороннее и стремительное развитие клинико-лабораторных методов обследования супружеских пар, примерно в 5-10% случаев причину отсутствия наступления беременности установить не представляется возможным.

Поиск биомаркеров, регулирующих как гаметогенез в женском и мужском

организмах, так и последующий эмбриогенез, является чрезвычайно актуальным для создания способа прогнозирования имплантационной способности эмбриона в программах ЭКО. При этом основными характеристиками биомаркеров должны быть: 1) относительно продолжительное время жизни после забора биоматериала, 2) доступность выделения без инвазивных вмешательств, 3) простота и быстрота измерения концентрации. В качестве таких биомаркеров ученые в последние годы рассматривают малые некодирующие РНК (мнРНК) в связи с их влиянием на протеомный профиль. Регуляторными некодирующими РНК являются: микроРНК (miRNAs), эндогенные малые интерферирующие РНК (endo-siRNAs) и PIWI-взаимодействующие РНК (piRNAs), в связи с чем они в значительной степени влияют на фенотип и функцию клеток. МнРНК важны для реализации многих клеточных процессов, выполняя свои регуляторные функции как внутри клетки, так и обеспечивая межклеточную коммуникацию [80]. Структура мнРНК, их размеры и способ их транспортировки позволяют им стабильно существовать в различных биологических жидкостях. В связи с этим достаточно перспективным исследованием можно считать выделение мнРНК из биологических жидкостей супружеских пар (фолликулярная жидкость, эякулят, культуральная среда бластоцисты) с целью оценки фертильности каждой супружеской пары [13].

1.2.1 Оогенез

Оогенез – это сложный, стадийный процесс дифференцировки, роста и созревания женских половых клеток. Из миллионов первичных ооцитов, присутствующих при рождении женщины, только около 400 ооцитов созревают в течение жизни до метафазы II (стадия МII). Рост и созревание ооцита происходит в фолликуле яичника. Фолликулярная жидкость является средой, содержащей смесь белков, метаболитов, ионов, а также других молекул, каждая из которых оказывает влияние на процесс гаметогенеза, дальнейшее оплодотворение и, как следствие, нормальный эмбриогенез. Паракринная связь между различными типами клеток через фолликулярную жидкость обеспечивает развитие зрелого

ооцита, готового к оплодотворению. Паракринная передача сигналов, которая происходит от кумулюсных клеток к ооциту, поддерживает возобновление мейоза, способствует созреванию ядра и цитоплазмы и контролирует транскрипционную активность [85]. Внутрифолликулярная паракринная передача сигналов активна на протяжении всего оогенеза и играет критическую роль во время роста и созревания фолликулов. При проведении программ вспомогательных репродуктивных технологий при помощи контролируемой стимуляции суперовуляции может происходить фолликулярная асинхронность, которая характеризуется: вариациям в количестве полученных ооцитов, их качестве, жизнеспособности, а также компетентности ооцитов. Ооцит считается компетентным, когда он способен завершить мейоз (от профазы I до метафазы II), подвергнуться оплодотворению сперматозоидом с последующим эмбриогенезом и формированием здорового плода. В антральных фолликулах клетки кумулюса способствуют метаболической поддержке и остановке мейоза в растущем ооците. Фолликулярная жидкость продуцируется клетками гранулезы на более поздних этапах развития вторичных фолликулов, при этом она находится в тесном контакте с ооцит-кумуляным комплексом. Фолликулярная жидкость состоит из плазменного экссудата и секреторных продуктов гранулезных клеток и клеток теки [31].

Точное понимание роли различных компонентов фолликула важно для решения ключевых репродуктивных проблем [13]. Это может помочь в поиске биомаркеров, определяющих физиологическое функционирование яичников, качество ооцитов и эмбрионов, имплантационный потенциал эмбрионов, а также восприимчивость тканей эндометрия [70]. Изменение нормального молекулярного состава фолликулярной жидкости может привести к нарушению гаметогенеза, а также впоследствии оказать негативное влияние на эмбриогенез. Исследователи предположили, что микроРНК, которые содержатся в фолликулярной жидкости, могут потенциально участвовать в регуляции фолликулогенеза. В последних исследованиях доказано, что синтез и деградация микроРНК, играют важную роль во время оогенеза и эмбрионального развития

[118][80][84][96]. Выявлено, что дефекты микроРНК связаны с различными доброкачественными гинекологическими патологиями, злокачественными новообразованиями женских репродуктивных органов и нарушениями фертильности у женщин [96].

В связи с вышесказанным, достаточно перспективным исследованием можно считать выделение мРНК из фолликулярной жидкости женщин, с целью последующей оценки качества ооцитов и, как следствие, оценки возможных исходов программ ЭКО.

1.2.2 Роль микроРНК в фолликуло- и оогенезе

В 2015 году группа исследователей Juan Manuel Moreno et al. провели сравнительный анализ экспрессии микроРНК в фолликулярной жидкости на разных стадиях развития ооцитов. При сравнении образцов фолликулярной жидкости, содержащей GV и МII ооциты, было идентифицировано 13 дифференциально экспрессируемых микроРНК (2 микроРНК с повышенной активностью и 11 со сниженной активностью). Исследователи определили явное подавление hsa-miR-451 в фолликулярной жидкости, содержащей МII, по сравнению с фолликулярной жидкостью, содержащей GV у большинства проанализированных пациентов. Статистически значимая активация hsa-miR-563 также наблюдалась в фолликулярной жидкости, содержащей МII, по сравнению с фолликулами GV. При сравнении образцов фолликулярной жидкости, содержащей MI и МII ооциты, было идентифицировано семь дифференциально экспрессируемых микроРНК (3 микроРНК с повышенной активностью и 4 со сниженной активностью). Исследователи обнаружили значительное подавление miR-451 в фолликулярной жидкости, содержащей МII, по сравнению с фолликулами MI. Также была обнаружена явная активация hsa-miR-574, хотя это не достигло статистической значимости при сравнении образцов MI и МII [86]. Группа исследователей в 2021 году обнаружила, что в общей сложности 47 микроРНК значительно дифференцированно экспрессировались между группами

с высоким и низким качеством ооцитов ($p < 0,05$). Примечательно, что девять микроРНК были ранее известны, среди которых семь были активированы в группе с низким качеством ооцитов (hsa-miR-1246, hsa-miR-548ae-5p, hsa-miR-505-3p, hsa-miR-548au-5p, hsa-miR-320e, hsa-miR-1303), при этом активность двух микроРНК была подавлена в данной группе (hsa-miR-513c-5p, hsa-miR-548au-3p) [133].

В 2017г. Machtinger R. et al. обнаружили, что miR-320b, miR-720, miR-10b-3p, miR-126-5p, miR-30a-5p, miR-202-5p и miR-1274a [80] являются одними из наиболее представленных в фолликулярной жидкости. При этом внеклеточные микроРНК (miR-30d-5p, miR-320b, miR10b-3p, miR-1291 и miR-720) фолликулярной жидкости были ранее обнаружены в клетках гранулезы и клетках кумулюса [80], что является косвенным доказательством наличия межклеточной коммуникации в фолликуле яичника. В данном исследовании выявили различия в уровне экспрессии miR-130b и miR-92a в образцах фолликулярной жидкости, содержащей зрелый ооцит, по сравнению с таковыми, содержащими незрелую клетку (кратность изменения уровня экспрессии, КИ, составила 1,65 и 1,52, соответственно). Исследователи Xu Y.-W. et al. определили динамические изменения микроРНК (miR-15a и miR-20a) во время мейоза от стадии GV к МII стадии созревания ооцита [129]. Кроме того, повышение концентрации ФСГ в среде созревания *in vitro* имела обратный эффект на экспрессию miR-15a и miR-20a, подтверждая возможную роль этих микроРНК в процессе созревания ооцитов [129]. Также было обнаружено, что экспрессия miR202-5p (КИ = 1.82, $p = 0.01$), miR-206 (КИ = 2.09, $p = 0.04$), miR-16-1-3p (КИ = 1.88, $p = 0.05$) и miR-1244 (КИ = 2.72, $p = 0.05$) была значительно выражена в фолликулах, ооциты которых обладали способностью к оплодотворению [80]. В проведенном исследовании выявили дифференциальную экспрессию внеклеточных микроРНК miR-663b (FC = 0.18, $p = 0.02$), miR-766-3p (КИ = 1.95, $p = 0.01$), miR-132-3p (КИ = 2.45, $p = 0.05$) и miR-16-5p (КИ = 3.80, $p = 0.05$) в фолликулярной жидкости в зависимости от качества получаемого после оплодотворения ооцита эмбриона [80].

Снижение компетентности ооцитов с возрастом хорошо известно: количество и качество ооцитов, а также уровень рождаемости обратно пропорциональны возрасту яичников. Примечательно, что спектр секретируемых в фолликулярную жидкость микроРНК, равно как и уровень их экспрессии, зависит от возраста организма. Например, da Silveira et al. [111] обнаружили, что разные стадии развития фолликула у молодых и пожилых кобыл различались по уровню экспрессии 26 и 53 микроРНК, соответственно. И эти списки микроРНК были уникальны для данных возрастных групп. Уровень miR-181a был в 15 раз выше в фолликулярной жидкости преовуляторного фолликула по сравнению с незрелым фолликулом в образцах молодых особей, в то время как уровень miR-181a не имел существенных различий на разных стадиях фолликулогенеза в образцах пожилых особей. В связи с тем, что исследователи выявили различия в уровне экспрессии miR-181 в фолликулярной жидкости молодых и пожилых особей, они предположили, что miR-181 играют важную роль в фолликулогенезе. Аналогично, в 2014 году Diez-Fraile et al. [46] продемонстрировали различия в уровне экспрессии четырех микроРНК(miR-21-5p, miR-134, miR-190b и miR99b-3p) в фолликулярной жидкости в зависимости от возраста женщины. В 2015 году Juan Manuel Moreno et al. также обнаружили, что только hsa-miR-424 дифференциально экспрессируется в более высоких пропорциях в фолликулярной жидкости пациенток старшего репродуктивного возраста [86].

В 2017 году Guo Y. Et al. пришли к выводу, что miR-23a и miR-27a имеют решающее значение для фолликулогенеза, предположительно опосредуя апоптоз клеток гранулезы и созревание ооцитов посредством регулирования факторов роста во время развития фолликулов и, таким образом, могут играть важнейшую роль в развитии такого патологического состояния у женщин, как преждевременная недостаточность яичников (ПНЯ) [66]. Эти данные свидетельствуют о возможном применении методов определения уровня экспрессии внеклеточных микроРНК фолликулярной жидкости для оценки качества ооцитов.

Так как фолликулярное микроокружение, в котором развиваются ооциты, может влиять на дальнейшее развитие эмбриона [10], в некоторых исследованиях была предпринята попытка идентифицировать биомаркеры в фолликулярной жидкости, которые могли бы использоваться в качестве прогностических факторов развития эмбриона и исходов беременности. В 2018 году Jing Fu et al. обнаружили, что уровень экспрессии miR-663b в фолликулярной жидкости определял дальнейшее формирование и созревание бластоцисты, а также ее морфологическую характеристику [58]. Авторы работы пришли к выводу, что высокий уровень экспрессии miR-663b в фолликулярной жидкости может отражать нарушение процесса созревания ооцита. Также авторы исследования предположили, что miR-663b можно использовать в качестве маркера высокого потенциала развития эмбриона. Данные исследования демонстрируют важную регуляторную роль микроРНК в созревании ооцита, его способности к оплодотворению и дальнейшем развитии эмбриона.

В связи с тем, что мнкРНК обнаруживаются в большинстве жидкостей организма с неожиданно высокой стабильностью, при этом профили экспрессии циркулирующих мнкРНК значительно различаются у здоровых и больных людей, исследователи предлагают использовать их в качестве биомаркеров клинической диагностики и мониторинга заболеваний женской репродуктивной системы [28].

Исходя из того, что наиболее часто нарушение фолликулогенеза и оогенеза происходит при ПНЯ, эндометриозе и синдроме поликистозных яичников (СПКЯ), необходимо проведение исследований, направленных на определение спектра мнкРНК в фолликулярной жидкости пациенток при данных патологических состояниях [96].

1.2.3 Преждевременная недостаточность функции яичников

Преждевременная недостаточность яичников (ПНЯ) — это нарушение нормальной гормональной и репродуктивной функции у женщин моложе 40 лет,

возникающее в результате преждевременного истощения пула примордиальных фолликулов в яичниках.

Клиническая картина ПНЯ характеризуется: изменениями менструального цикла; симптомами менопаузы, связанными со снижением секреции эстрогена (такие как приливы, ночная потливость, сухость влагалища); снижением фертильности или бесплодием. Несмотря на сниженный овариальный резерв, примерно у 5–10% женщин с ПНЯ может наблюдаться спонтанная овуляция, что может приводить к естественному наступлению беременности [33]. При этом ПНЯ имеет серьезные долгосрочные последствия для здоровья женщин, которые связаны с преждевременными гормональными изменениями в организме. Изучение различных механизмов патофизиологии ПНЯ может помочь найти конкретные мишени как для эффективного лечения бесплодия, так и для профилактики отдаленных осложнений у этой группы пациенток.

ПНЯ встречается примерно у 1% женщин репродуктивного возраста [127]. Несмотря на то, что 90% случаев ПНЯ являются идиопатическими, ученые смогли выявить основные механизмы и причины развития ПНЯ. Точная причина развития данного патологического состояния до сих пор остается неизвестной, но среди факторов, оказывающих возможное влияние на овариальный резерв женщин репродуктивного возраста, выделяют: ятрогенные причины (проведение оперативных вмешательств на яичниках); генетическая предрасположенность [26]; аутоиммунные заболевания [71]; проведение лучевой или химиотерапии в лечении онкологических заболеваний [115]; влияние образа жизни, инфекционно-токсических воздействий, а также профессиональных вредностей и т.д. [48][62].

Основную роль в развитии ПНЯ отдают генетическим причинам. Благодаря достижениям в секвенировании всего генома был достигнут значительный прогресс в анализе генов-кандидатов. Однако гены, кодирующие белки, обычно интенсивно исследуются, тогда как лежащие в их основе регуляторные роли некодирующих последовательностей в развитии ПНЯ еще недостаточно изучены. Исследование роли мнкРНК в развитии ПНЯ является перспективным, так как

они имеют решающее значение для развития, нормального функционирования, а также развития патологических состояний во всех органах и системах организма.

Определена роль miR-449b, miR-320, miR-133b, miR-132 в регуляции овариального стероидогенеза за счет непосредственного влияния на гены-мишени [135]. В 2018 году исследователи обнаружили, что сверхэкспрессия miR-379-5p ингибирует пролиферацию клеток гранулезы и снижает эффективность репарации ДНК [44]. В 2020 году исследователи выявили повышенную экспрессию miR-127-5p в клетках гранулезы у пациентов с ПНЯ, а также в плазме у данных пациентов, при этом было подтверждено, что miR-127-5p ослабляет способность к репарации ДНК в образцах яичников мышей [136]. Xinran Li et al. оценивали роль miR-21 в развитии аутоиммунной ПНЯ. Была выявлена низкая экспрессия miR-21 и ее гена-мишени мРНК Pellino-1 (Peli1) мононуклеарных клеток периферической крови в сыворотке крови пациентов с ПНЯ, что было положительно связано с АМГ, эстрадиолом (E2), размером матки и объемом яичников, а также отрицательно связано с ФСГ, ЛГ и количеством положительных иммунных параметров (АОАб, ЕМАб, АСЛ, АНА, ds-DNA, АСА, IgG, IgA, IgM, IgE, С3 и С4) [74].

В связи с тем, что в настоящее время не существует эффективного лечения ПНЯ, ученые занимаются разработкой новых стратегий предикции и последующей терапии ПНЯ. В качестве кандидатов для клеточной терапии в регенеративной медицине исследователи рассматривают экзосомальные микроРНК, полученные из мезенхимальных стволовых клеток, в связи с их способностью к самообновлению и потенциалу дифференцировки. Исследователи пришли к мнению, что терапевтический эффект внеклеточных везикул заключается в подавлении апоптоза клеток гранулезы в яичниках, стимулировании ангиогенеза, регуляции иммунитета и снижении окислительного стресса [75]. В 2019 году было опубликовано исследование, которое показало, что miR-664-5p, переносимая экзосомами, выделенными из костно-мезенхимальных стволовых клеток, подавляли апоптоз клеток гранулезы, индуцированный цисплатином, и повышали жизнеспособность клеток [117]. Meiling Yang et al. показали, что экзосомы, полученные из мезенхимальных стволовых клеток

костного мозга, предотвращают атрезию фолликулов яичников у крыс, получавших циклофосфамид, посредством доставки miR-144-5p. При этом отмечалось повышение уровня эстрадиола и АМГ, а также снижение уровня ФСГ и ЛГ в сыворотке крови [130]. В другом исследовании ученые выявили, что экзосомы человеческих амниотических эпителиальных клеток (hAEC) увеличивали количество фолликулов и улучшали функцию яичников у мышей с ПНЯ. На ранней стадии экзосомы значительно ингибировали индуцированный химиотерапией апоптоз гранулезных клеток, защищали сосудистую сеть яичников от повреждения и участвовали в поддержании числа примордиальных фолликулов в поврежденных яичниках посредством переноса miR-1246 [134]. В 2020 году исследователи выявили положительное воздействие miR-17-5P на фенотип и функцию яичников у мышей с ПНЯ за счет пролиферации поврежденных клеток яичников и снижении содержания активных форм кислорода [47].

Исходя из данных, полученных исследователями, апоптоз гранулезных клеток яичников, а также окислительный стресс играют важную роль при ПНЯ, а понимание регуляторного механизма, лежащего в их основе, может быть полезным для предотвращения и последующего эффективного лечения ПНЯ. В связи с этим, дальнейшие исследования, оценивающие вклад мнкРНК в развитие ПНЯ, являются чрезвычайно актуальными.

1.2.4 Эндометриоз-ассоциированное бесплодие

Эндометриоз - заболевание, характеризующееся разрастанием эктопического эндометрия, которое приводит к нарушению физиологических процессов, а также к образованию спаек в полости малого таза у пациенток репродуктивного возраста. Эндометриоз встречается примерно у 10% женщин репродуктивного возраста [15]. Основными методами диагностики эндометриоза на данный момент являются методы визуализации, такие как УЗ-исследование и МРТ исследование органов малого таза. Но для постановки окончательного

диагноза, а также определения степени распространения патологического процесса, часто необходима прямая визуализация во время проведения хирургического вмешательства. Несмотря на то, что лапароскопия является малоинвазивной операцией, она требует общей анестезии, развитых хирургических навыков и требует высоких затрат на процедуру, а также связана с риском потенциальных интраоперационных или послеоперационных осложнений. Одна из основных проблем при эндометриозе, как для пациентов, так и для клиницистов, — это поздняя постановка диагноза. Несмотря на то, что у большинства пациенток клиническая симптоматика ярко выраженная и может приводить к потере трудоспособности, некоторым женщинам диагностируют эндометриоз только после неудачных попыток наступления беременности. Среди пациенток с диагностированным бесплодием, эндометриоз выявляется примерно у 20-50% женщин. Негативное влияние эндометриоза на фертильность хорошо известно, однако молекулярные механизмы, ответственные за эти эффекты, все еще недостаточно изучены [28]. Одним из факторов, влияющих на фертильность, является нарушение анатомии тазовых органов, которое сопровождается образованием тазовых спаек, вызывающих непроходимость маточных труб. Также возможно развитие метаболических и молекулярных аномалий при эндометриозе, которые в свою очередь увеличивают ангиогенез и пролиферацию, уменьшают апоптоз, увеличивают местную концентрацию эстрогена, создают резистентность к прогестерону и ухудшают экспрессию цитокинов [104]. Также эндометриоз способен вызывать иммунную и гормональную дисрегуляцию и повышенный окислительный стресс [57]. Исходя из этого, эндометриоз может оказывать многоуровневое негативное влияние на фолликулогенез, оогенез, оплодотворение, а также на последующий эмбриогенез и имплантацию эмбриона в полости матки.

Проведено множество исследований, в которых было показано негативное влияние эндометриоза на количество и качество полученных ооцитов в программах ЭКО. В 2017 году Omar Shebl et al. определили, что у пациенток с эндометриозом по сравнению с пациентками с другими причинами бесплодия, в

программах ЭКО было получено меньшее количество ооцитов МП и отмечалась более низкая частота оплодотворения. Также в этом исследовании определили, что у пациентов с эндометриозом наблюдалось больше морфологически патологических ооцитов по сравнению с контрольной группой ($p < 0,001$), а частота оплодотворения была значительно ниже у пациентов с эндометриозом по сравнению с контролем при ЭКО (44,9% против 54,4% соответственно, $p < 0,03$) [110]. При проведении ИКСИ в двух группах частота оплодотворения составила 74,9% в группе с эндометриозом против 76,9% в контрольной группе ($p = 0,38$). Кроме того, при тяжелых формах эндометриоза были получены ооциты значительно более низкого качества, чем при эндометриозе I-II стадии ($p < 0,01$) [110].

Исследователи предложили рассмотреть мнкРНК в качестве биомаркеров эндометриоза, а также определить их влияние на специфические мишени и взаимосвязь между эндометриозом и аномальным развитием ооцитов и последующим формированием эмбриона. В своем исследовании Li X. et al. разделили пациенток на две группы с последующим выделением микроРНК из фолликулярной жидкости обследуемых пациенток. В группе эндометриоза по сравнению с контрольной здоровой группой, активность 11 микроРНК (miR-1260, miR-145, miR-125a, miR-21, miR-628, miR-542, miR-223, miR-663, miR-378, miR-23a и miR-451) была снижена, а активность 7 микроРНК (miR-766, miR-133, miR-191, miR-720, miR-143, miR-29c и miR-203) повышалась. Среди данных 18 микроРНК, miR-451 имела уровень экспрессии, который был значительно ниже в группе с эндометриозом, чем в контрольной группе здоровых женщин ($P = 0,0089$) [73].

1.2.5 Бесплодие, связанное с отсутствием овуляции

Синдром поликистозных яичников (СПКЯ) – это распространенное эндокринное заболевание у женщин репродуктивного возраста. Примерно у 5–10% женщин репродуктивного возраста диагностируют СПКЯ, который в свою

очередь составляет 75% случаев ановуляторного бесплодия [63]. По результатам последних исследований установлено, что синдром поликистозных яичников влияет на рост фолликулов, пролиферацию гранулезных клеток, а также эндокринный гомеостаз. Клетки гранулезы и тека-клетки яичников поддерживают развитие фолликулов. Они производят и поддерживают уровень стероидов, а также обеспечивают обмен паракринными факторами, которые способствуют росту и развитию ооцитов в фолликулах. Учитывая роль мнкРНК в развитии фолликулов яичников, за счет регуляции генов, участвующих в фолликулогенезе, ученые пришли к выводу, что мнкРНК могут играть немаловажную роль в развитии синдрома поликистозных яичников.

Е. Scalici et al. определили, что сочетание уровней экспрессии miR-30a, miR-140 и let-7b в фолликулярной жидкости отличалась у пациенток с ановуляцией и нормальным резервом яичников ($p < 0.0001$). В образцах фолликулярной жидкости, содержащих малое количество зрелых ооцитов, экспрессия miR-320a была значительно ниже, чем в тех образцах, которые содержали >2 зрелых ооцитов ($p = 0,04$). [108]. Lin Lin et al. в своем исследовании выявили, что 27 микроРНК дифференциально экспрессировались у пациентов с СПКЯ по сравнению с контрольной группой при этом экспрессия miR-92a и miR-92b была значительно снижена у женщин с СПКЯ ($P < 0,05$) [77]. Авторы работы в 2018 году определили, что уровни экспрессии 263 микроРНК между двумя группами исследуемых женщин значительно различались ($P < 0,05$). При этом уровень экспрессии шести микроРНК (200a-3p, 10b-3p, 200b-3p, 29c-3p, 99a-3p и 125a-5p) был значительно увеличен, в то время как экспрессия miR-105-3p была снижена у пациентов с СПКЯ в сравнении с контрольной группой. Учитывая это, исследователи предположили, что многочисленные микроРНК могут принимать участие в этиологии СПКЯ [35].

Определение мнкРНК у пациенток с бесплодием на этапе гаметогенеза сможет привести к улучшению диагностики, тактики лечения, и, в конечном итоге, исходов в репродуктивной медицине. Диагностика мнкРНК в фолликулярной жидкости женщины может стать достаточно эффективным

индикатором качества ооцитов и, возможно, поможет разобраться в причинах ненаступления беременности.

В связи с тем, что всё чаще бесплодие у супружеской пары обусловлено сочетанными факторами, необходимо проводить полное клинико-диагностическое обследование не только женщин, но и мужчин. С каждым годом мужское бесплодие привлекает все больший интерес в связи со снижением качества спермы у молодых здоровых мужчин во всем мире [72].

1.2.6 Сперматогенез

Сперматогенез является сложным процессом, который состоит из последовательных стадий: митотической пролиферации сперматогоний, мейотического деления и морфологической дифференциации предшественников сперматозоидов (спермиогенез), приводящей к образованию высокоспециализированных клеток, характеризующихся наличием головки, шейки, вставочной части, хвоста и концевой части аксонемы. В течение жизни плода сперматогенез начинается в стенке семенных канальцев из недифференцированных диплоидных клеток, известных как сперматогонии, которые подвергаются нескольким митотическим делениям с целью увеличения пула доступных предшественников половых клеток. В период полового созревания некоторые сперматогонии трансформируются в сперматоциты типа I, которые подвергаются первому мейотическому делению, продуцируя гаплоидные сперматоциты типа II. В этих клетках происходит второе мейотическое деление, образующее гаплоидные сперматиды. Последняя фаза сперматогенеза представлена спермиогенезом, характеризующимся морфологическим и структурным преобразованием клеток. Этот этап, происходящий без дальнейшего деления клетки, приводит к образованию высокоспециализированных клеток, характеризующихся наличием головки, шейки, вставочной части, хвоста и концевой части аксонемы [13]. Семенная плазма является жидким компонентом спермы, которая образуется из яичек и придатков яичка, а также из

предстательной железы, семенных пузырьков и эпителия семенных канальцев. Семенная плазма – среда, обеспечивающая питание и транспортировку сперматозоидов. При этом в последние годы доказана ее немаловажная роль в поддержании правильного функционирования мужских половых клеток и, соответственно, в эффективной оплодотворяющей способности [99]. Состав семенной плазмы многообразен, а основные компоненты, входящие в ее состав – сложная смесь ионов, неорганические и органические соединения, сахара, простагландины, различные белки и другие биологически активные вещества.

Несмотря на то, что анализ спермограммы является наиболее важным тестом при оценке фертильности мужчин, он не является окончательным в определении причины ненаступления беременности у супружеской пары. Пациенты с отклонениями в показателях спермограммы могут иметь возможность зачать ребенка, и, наоборот, у пациентов с результатами в пределах нормальных значений оплодотворение не наступает. Такие случаи относятся к категории необъяснимого мужского бесплодия. Среди патологических отклонений спермограммы выделяют четыре основных категории, включая азооспермию, олигоспермию, астенозооспермию и тератозооспермию, а также их сочетание.

Азооспермия – это полное отсутствие сперматозоидов в эякулированной сперме; встречается примерно у 1% мужского населения в мире и является причиной бесплодия примерно в 10–15% случаев [43]. Азооспермия подразделяется на две группы: обструктивная азооспермия и необструктивная азооспермия. Необструктивная азооспермия возникает при нарушении сперматогенеза, в то время как обструктивная азооспермия вызвана обструкцией или нарушением нормального функционирования семенных протоков. Среди этиологических причин развития необструктивной азооспермии выделяют: претестикулярные и тестикулярные. Претестикулярная необструктивная азооспермия (или вторичный гипогонадизм) возникает из-за гипоталамо-гипофизарных нарушений, таких как: гипогонадотропный гипогонадизм; опухоль гипофиза; дисфункцию гипоталамуса; токсические воздействия и радиационные воздействия ионизирующей радиации (а также рентгеновского излучения) и

лучевой терапии и тд. Тестикулярная азооспермия (или первичный гипогонадизм) связана с внутренним дефектом яичек, ведущим к нарушению сперматогенеза. Основными факторами, вызывающими тестикулярную азооспермию являются: генетические факторы; недоразвитие или аплазия яичек; крипторхизм; варикоцеле); осложнения после перенесенных инфекционных заболеваний и тд [39].

Олигозооспермия определяется количеством сперматозоидов в анализируемом эякуляте и диагностируется при снижении количества сперматозоидов ниже 15 млн/мл эякулята. Олигозооспермию подразделяют на: легкую степень (от 10 до 15 млн/мл), умеренную степень (от 5 до 10 млн/мл) и тяжелую степень (менее 5 млн/мл). В основе развития олигозооспермии лежит нарушение функционирования гипоталамо-гипофизарно-тестикулярной оси, которое характеризуется подавлением секреции гонадотропинов с последующим нарушением интратестикулярного биосинтеза тестостерона и, как следствие, нарушением сперматогенеза. Чаще всего олигозооспермия сочетается с нарушениями подвижности сперматозоидов и/или их морфологией.

Астенозооспермия характеризуется снижением прогрессивной подвижности сперматозоидов или полным отсутствием подвижности. Согласно критериям, опубликованным ВОЗ, астенозооспермия характеризуется общей подвижностью <40% и прогрессирующей подвижностью <32% в образцах свежей спермы. Выделяют ряд факторов, увеличивающих риск развития такого состояния: генетические факторы, которые приводят к дефекту жгутика сперматозоида; инфекционно-воспалительные процессы; изменение состава семенной жидкости; травматические воздействия; воздействия токсических веществ и тд. Астенозооспермия часто сопровождается олигозооспермией или тератозооспермией.

Тератозооспермия снижение количества морфологически нормальных сперматозоидов в эякуляте ниже 4%. Морфологические дефекты сперматозоидов человека включают большое разнообразие необычных форм сперматозоидов в головке, шейке, средней части и хвосте. Тератозооспермия делится на два на 2

подтипа: мономорфный и полиморфный типы. При мономорфной тератозооспермии все сперматозоиды несут одну и ту же морфологическую аномалию, тогда как в полиморфном типе есть разные виды патологий морфологии сперматозоидов. Этиология тератозооспермии схожа с остальными патологическими изменениями показателей спермы и включает в себя множество факторов, приводящих к развитию данного состояния, а именно: генетические и хромосомные аномалии; прием лекарственных препаратов; воздействие тепловых и холодных факторов; влияние токсических веществ; инфекционно-воспалительные процессы и тд. Морфология сперматозоидов является важным параметром спермы и считается предиктором мужской фертильности с использованием или без использования ВРТ.

В последние годы частота использования вспомогательного метода оплодотворения, такого как интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида (ИКСИ), при проведении программ ЭКО увеличилась [30]. Это связано с расширением показаний к применению ИКСИ в программах ЭКО: низкое качество ооцитов; проведение программы ЭКО с использованием криоконсервированных ооцитов; неоднократные неудачные попытки ЭКО в анамнезе; проведение программы ЭКО в сочетании с преимплантационным генетическим тестированием (ПГТ) и у пациенток старшего репродуктивного возраста.

В 2017 году Aurelie Chapuis et al. провели исследование, целью которого являлась оценка влияния качества спермы пациентов на исходы программ традиционного ЭКО и программ с применением ИКСИ. При проведении программы ЭКО характеристики эмбриологических этапов не зависели от концентрации сперматозоидов, хотя частота наступления клинической беременности была несколько ниже в группе олигозооспермии в сравнении с группой >15 млн/мл (28,9% против 38%). Снижение подвижности сперматозоидов влияло на частоту оплодотворения (47,98% против 67,05%; $p < 0,0001$) и среднее число эмбрионов, полученных на 2-й день (5,18 против 6,82; $p = 0,03$). Среднее количество эмбрионов, полученных на 3-й день, также было несколько снижено.

При этом астенозооспермия не влияла на формирование бластоцисты, клиническую беременность и частоту ранних выкидышей. При использовании метода ИКСИ частота оплодотворения и бластуляции была значительно снижена в группе с тяжелой олигозооспермией (менее 2 млн/мл) по сравнению с группами с более высокой концентрацией сперматозоидов ($p < 0,0001$). При этом не было обнаружено четкой связи между концентрацией сперматозоидов и процентом криоконсервированных бластоцист. Как и при ЭКО, олигозооспермия не влияла на клиническую беременность и частоту ранних выкидышей. Исследователи отметили, что частота оплодотворения была значительно снижена в группе с $< 32\%$ быстро прогрессирующих сперматозоидов (64,82% против 67,03%; $p < 0,013$). Несмотря на это, подвижность не влияла на бластуляцию, клиническую беременность и частоту ранних выкидышей [34].

Ранее считалось, что морфология сперматозоидов является наиболее значимым показателем недостаточной фертильности, а также предиктором частоты наступления беременности, связанной с ВРТ. Однако, в последних исследованиях были получены данные, которые свидетельствуют об отсутствии различий в результатах программ ЭКО/ИКСИ у мужчин с тератозооспермией [45] [128] [139]. В 2018 году было опубликовано исследование, в котором оценивалось преимущество модификации метода ИКСИ – интрацитоплазматической инъекции морфологически правильного сперматозоида (ИМСИ). В исследование были включены пары с мужским фактором бесплодия (тератозооспермия, олигоастенотератозооспермия, тяжелая олигоастенотератозооспермия), у которых в анамнезе были неудачные попытки ЭКО/ИКСИ. Исследователи отметили значительную разницу в частоте оплодотворения между ИМСИ и предыдущими попытками ИКСИ у данных супружеских пар (52,0% против 30,0%; $P < 0,05$). Качество эмбрионов, частота имплантации и наступления беременности при ИМСИ также были значительно выше, чем при предыдущих циклах ИКСИ (56,4% против 32,0%; 68,5% против 30,2%; 62,4% против 0,0%; $P < 0,05$). Исходя из полученных данных, исследователи пришли к выводу, что ИМСИ может быть

выбрана в качестве лечения выбора в случаях тяжелого мужского фактора бесплодия [65].

Нарушение регуляторных механизмов сперматогенеза может привести к мужскому бесплодию, а также к различным заболеваниям мужской репродуктивной системы. Нарушение сперматогенеза у бесплодных мужчин может быть связано с различной этиологией, и точные молекулярные механизмы еще предстоит определить. В связи с этим немаловажным в оценке фертильности супружеской пары является и анализ транскриптома во время сперматогенеза, чтобы соотнести возможные его изменения со специфическими формами мужского бесплодия.

1.2.7 Дисрегуляция микроРНК как один из факторов мужского бесплодия

Известно, что микроРНК по-разному экспрессируются на разных стадиях сперматогенеза и, в конечном итоге, отвечают за правильное формирование сперматозоидов [89]. Следовательно, микроРНК могут играть роль в этиологии субфертильности и мужского бесплодия. Чтобы понять роль микроРНК в различных формах нарушений сперматогенеза, профили экспрессии микроРНК были изучены в нормальных тканях яичка человека и в яичках у мужчин с диагностированной азооспермией [17]. В ходе исследования были выделены несколько дифференциально экспрессированных микроРНК (hsa-miR-34c-5p, hsa-miR-449a, hsa-miR-34b, hsa-miR-1274a, hsa-miR-125a-5p). Анализ микроРНК, выделенных из эякулята, представляется более целесообразным для диагностических целей, чем анализ микроРНК, выделенных при исследовании биоптатов яичка, в связи с выраженной гетерогенностью образцов яичка [89]. В 2018 году исследователи оценили уровень экспрессии шести микроРНК (hsa-miR-10a , hsa-miR-10b , hsa-miR-135a , hsa-miR-135b , hsa-miR-888 и hsa-miR-891a) в различных бесплодных группах мужчин, и сообщили о более низких уровнях экспрессии данных микроРНК во всех бесплодных группах по сравнению с фертильными мужчинами [120]. Taymour Mostafa et al. определили, что

экспрессия hsa-miR-122 , hsa-miR-181a и hsa-miR-34c5 положительно коррелирует с концентрацией, подвижностью и морфологией сперматозоидов [87]. В другом исследовании Corral-Vazquez et al . определили, что экспрессия hsa-miR-942-5p / hsa-miR-1208 при астенозооспермии, hsa-miR-296-5p / hsa-miR-328-3p при тератозооспермии и hsa-miR-139-5p / hsa-miR-1260a при олигозооспермии различалась при данных патологических состояниях по сравнению с контрольными образцами [41].

В 2017г. Shao-Qin Ge et al. опубликовали исследование, в котором они изучали влияние микроРНК на сперматогенез [61]. Уровень miR-34c-5p, miR-122, miR-146b-5p, miR-181a, miR-374b, miR-509-5p, и miR-513a-5p был значительно ниже у пациентов с азооспермией в образцах семенной плазмы, при этом уровень тех же микроРНК был значительно выше у пациентов с астенозооспермией по сравнению с нормозооспермией. Fang et al. в 2018 году оценили уровень микроРНК в образцах ткани яичек, полученных при микро – TESE, включая успешно извлеченные сперматозоиды и неудачно извлеченные сперматозоиды. В данных 2 группах исследователи идентифицировали разные уровни экспрессии микроРНК, участвующих в важных клеточных процессах, включая апоптоз, пролиферацию и дифференцировку клеток, которые тесно связаны со сперматогенезом. Было идентифицировано 180 микроРНК со значительно измененными уровнями экспрессии между исследуемыми группами. Из них экспрессия 13 микроРНК была повышена, а экспрессия 167 микроРНК снижена в группе с неудачным извлечением сперматозоидов. Также было обнаружено, что 86 тестикулярных микроРНК полностью отсутствуют в группе с неудачно извлеченными сперматозоидами, но при этом определялась высокая экспрессия данных микроРНК в группе с успешным извлечением [56]. В ходе дальнейших исследований, которые проводили с целью выявления роли микроРНК в развитии азооспермии у пациентов, выявили снижение hsa-miR-188-3p, которое в свою очередь приводило к увеличению регуляции MLH1 и индукции апоптоза в сперматозоидах [114]. Уровень экспрессии микроРНК в человеческих сперматогониях, пахитенных сперматоцитах и круглых сперматидеях пациентов с

обструктивной азооспермией и необструктивной азооспермией показал различия между этими группами. MiR-27a-3p была сверхэкспрессирована у мужчин с необструктивной азооспермией по сравнению с группой пациентов с обструктивной азооспермией [90]. На основании полученных данных, в 2018 году исследователи пришли к выводу, что экзосомальные микроРНК могут быть использованы в качестве неинвазивного диагностического биомаркера, т.к. они выявили различные паттерны экспрессии двух микроРНК - hsa-miR-539-5p и hsa-miR-941. Определение содержания данных микроРНК может быть использовано для прогнозирования присутствия сперматозоидов у пациентов с азооспермией перед проведением биопсии яичка [25].

Уровень экспрессии miR-371a-3p в разных тканях урогенитального тракта показали, что только паренхима семенников и образцы спермы имели детектируемые уровни экспрессии этой микроРНК и, более того, ее экспрессия коррелировала с концентрацией сперматозоидов [29]. Еще в одном исследовании была доказана взаимосвязь уровня экспрессии hsa-miR-371a-3p в семенной плазме пациентов с концентрацией сперматозоидов [97]. В 2019 году исследователи определили, что у мужчин с олигоастенозооспермией уровни содержания miR-23a/b-3p были значительно выше по сравнению с контрольной группой. При этом уровень четырех экспрессируемых генов (PFKFB4, HMMR, SPATA6 и TEX15) в сперме мужчин с олигоастенозооспермией были значительно ниже по сравнению с мужчинами с нормозооспермией [19]. Masood Abu-Halima et al. идентифицировали 36 экзосомальных микроРНК с измененными уровнями экспрессии у мужчин с олигоастенозооспермией по сравнению с фертильными мужчинами. Семь экзосомальных микроРНК были с повышенной экспрессией, а 29 микроРНК - недостаточно экспрессированы у мужчин с олигоастенозооспермией. При этом были отмечены значительно более высокие уровни экспрессии miR-765 и miR-1275 и значительно более низкий уровень экспрессии miR-15a у мужчин с олигоастенозооспермией по сравнению с мужчинами с нормозооспермией [18].

Различные исследователи пытались показать роль микроРНК в нарушении подвижности сперматозоидов. В 2019 году исследователи произвели секвенирование образцов спермы пациентов с идиопатической астенозооспермией и выявили 18 микроРНК с измененными уровнями экспрессии, среди которых уровень экспрессии *miR-888-3p* был сильно повышен по сравнению с контролем [68]. В 2019 году исследование показало, что снижение уровня экспрессии *miR-525-3p* было связано с низкой прогрессивной подвижностью сперматозоидов и бесплодием у пациентов [138]. Zohreh Heidary et al. в 2020 году определили, что экспрессия *miR-4485-3p* ($p = 0,006$) была значительно снижена у мужчин с астенозооспермией по сравнению с контрольной группой и пришли к выводу, что такое подавление может быть молекулярной связью между митохондриальной дисфункцией и развитием астенозооспермии [69].

Таким образом, изменение профиля экспрессии мнкРНК в сперматозоидах и семенной плазме может привести к нарушениям сперматогенеза и последующему аномальному развитию эмбриона. Следовательно, выделение мнкРНК из семенной плазмы мужчин, с последующей оценкой спектра данных молекул, является достаточно перспективным исследованием, направленным на оценку возможных исходов программ ВРТ.

1.3 Эмбриогенез и имплантация эмбриона

1.3.1 Эмбриогенез

Гаметогенез является первым важным этапом на пути к появлению эмбриона “хорошего” качества. После этого следует не менее важный этап формирования эмбриона – это оплодотворение ооцита сперматозоидом, при котором гаплоидные наборы генома каждого родителя объединяются, формируя диплоидный геном новой уникальной зиготы. Во время этих процессов клетки и ткани, которые отвечают за выполнение репродуктивных функций, подвергаются

постоянным преобразованиям на транскриптомном и протеомном уровнях [121]. Зиготический геном изначально находится в состоянии покоя транскрипции, что позволяет перепрограммировать зиготу в тотипотентное состояние. Постепенно геном активируется посредством процесса, известного как материнско-зиготический переход (МЗП), во время которого деградация материнских продуктов координируется с активацией зиготического генома. Это эффективное перепрограммирование зависит от материнских РНК и белков, которые накапливаются в ооците. Транскрипционная активация зиготического генома координируется с деградацией материнских транскриптов, которые контролируют начальные стадии развития [109]. Точные механизмы, с помощью которых материнские мРНК деградируют, пока не установлены. Благодаря исследованиям на животных моделях, было показано, что элиминация материнских транскриптов осуществляется двумя последовательными путями: первый путь полностью опосредуется материнскими факторами, накопленными в зрелых ооцитах, и поэтому называется материнским распадом; второй путь зависит от образованных вновь зиготических продуктов транскрипции после оплодотворения и, таким образом, называется зиготным распадом [126]. Активация зиготического генома человека происходит на 8-клеточной стадии развития. В различных исследованиях было показано, что ключевые процессы раннего развития направляются и регулируются массивами генов и генных продуктов, которые экспрессируются стадийно-специфическим образом. Однако остается неясным, что запускает стадийно-специфическую понижающую регуляцию или повышение экспрессии определенных генов во время эмбрионального развития [103]. Роль микроРНК в преимплантационном развитии эмбриона от момента материнско-зиготического перехода до образования бластоцисты была подтверждена исследованиями профилирования микроРНК, которые указывают на динамическую природу экспрессии микроРНК во время преимплантационного эмбриогенеза [36]. Известно, что некоторые из специфичных для сперматозоидов транскриптов передаются в ооцит при оплодотворении и играют важную роль в эпигенетической регуляции раннего эмбриогенеза, в том числе путем контроля

материнско-зиготического перехода и экспрессии эмбриональных генов уровнях [13].

Оценка качества эмбриона в настоящее время осуществляется на основании визуальной оценки их морфологических свойств. Не все эмбрионы хорошего морфологического качества успешно имплантируются, что объясняется тем, что точность отбора эмбрионов по морфологическим критериям остается на недостаточно высоком уровне [6]. Хромосомная патология у переносимых эмбрионов может быть основной причиной отрицательных результатов в программах ВРТ. Сбалансированный кариотип необходим для жизнеспособности клеток, и поэтому анеуплоидия, характеризующаяся несбалансированными изменениями числа хромосом и субхромосомными структурными вариациями, часто имеет серьезные последствия для физиологии клетки. Анеуплоидия является основной причиной самопроизвольных выкидыше на ранних сроках, а наиболее встречаемые трисомии, которые совместимы с выживаемостью плода, приводят к серьезным дефектам развития. В 2018 году Milena Dürrbaum et al. показали, что микроРНК сверхэкспрессируются в анеуплоидных клетках, подтверждая, что изменения микроРНК вносят вклад в изменения транскрипции, запускаемые анеуплоидией. Наиболее сверхэкспрессируемой микроРНК была - hsa-miR-10a-5p, которая была выделена в большинстве анеуплоидных клеток. В другом исследовании было обнаружено, что уровень экспрессии miR-191 был более выраженным в средах от анеуплоидных эмбрионов, тогда как miR-372, miR-645 и miR-191 имели более высокий уровень экспрессии в средах эуплоидных эмбрионов, перенесенных в полость матки пациенткам, но клиническая беременность не была диагностирована [101].

Помимо качества эмбриона, исход беременности также зависит от ряда уникальных событий, включая имплантацию эмбриона в полости матки, децидуализацию стромы эндометрия, плацентацию и роды. Каждый из этих этапов имеет важное значение для перехода к следующему этапу беременности [91].

1.3.2. Имплантация эмбриона в полость матки

Первый этап – имплантация эмбриона, которая в свою очередь состоит из трех последовательных стадий: адгезия, инвазия и иммунная регуляция. Считается, что микроРНК участвует в этих ключевых процессах развития, а именно в сегрегации эмбриональных клеток и развитии эмбрионального роста и последующей имплантации [116]. Дифференциальная экспрессия определенных микроРНК наблюдалась между эмбрионами на стадии 8 клеток и тканью трофобласта, что также подтверждает роль молекул в эмбриональном росте [27]. При этом, экспрессия микроРНК может как стимулировать имплантацию эмбриона, так и препятствовать ей. В 2014 году исследование продемонстрировало измененную экспрессию let-7a, -7d, -7e, -7f и -7g в покоящихся бластоцистах по сравнению с активированными, что в свою очередь подтверждает важное значение мРНК в развитии эмбриона [36].

Децидуализация — это процесс трансформации стромы эндометрия, характеризующийся дифференцировкой стромальных клеток в децидуальные клетки. Децидуализация начинается в середине секреторной фазы менструального цикла под воздействием повышенного уровня прогестерона [92]. Примерно 1–5% женщин репродуктивного возраста сталкивается с проблемой привычного невынашивания беременности. Привычный выкидыш — это три или более последовательных прерываний беременности на раннем сроке. Основными факторами, которые увеличивают риск этого патологического состояния, являются: хромосомные аномалии, эндокринологические факторы и иммунную дисфункцию. Однако, в почти половине случаев причину определить не представляется возможным. За последние годы несколько исследований показали, что микроРНК оказывают существенное влияние на поддержание нормальной беременности, регулируя дифференцировку, пролиферацию, инвазию и апоптоз клеток трофобласта [137]. В 2015 году было опубликовано исследование, которое показало, что дифференциальная экспрессия miR-30d определялась в эпителии эндометрия фертильной женщины на протяжении всего менструального цикла.

При этом данная микроРНК, связанная с экзосомой, секретировалась в эндометриальную жидкость в период окна имплантации и проникала в эмбрионы через трофэктодерму [123]. В 2019 году группа исследователей пришла к выводу, что miR-184 существует как в децидуальной оболочке, так и в ворсинках, при этом его экспрессия была выше в группе с привычным выкидышем, чем при нормальной беременности [137]. Fulu Dong et al. в своем исследовании определили, что в ворсинках у пациентов с привычным выкидышем экспрессия hsa-miR-184, hsa-miR-187 и hsa-miR-125b-2 была значительно выше, в то время как экспрессия hsa-miR-520f, hsa-miR-3175 и hsa-miR-4672 была значительно ниже по сравнению с контрольной группой нормально протекающей беременности. В этом же исследовании обнаружили пять микроРНК (hsa-miR-517c, hsa-miR-519a-1, hsa-miR-522, hsa-miR-520h и hsa-miR-184), которые активировались в децидуальной оболочке пациентов с привычным выкидышем [49].

Таким образом, все процессы, происходящие с эмбрионом и эндометрием, тщательно организованы, чтобы способствует успешной беременности. Если последовательность любого из этих событий нарушена или неправильно регулируется, это может привести к нарушению имплантации эмбриона в полости матки или аномальной глубине инвазии, что может привести к предлежанию плаценты, внематочной плацентации или прерыванию беременности.

Многочисленные исследования по всему миру продемонстрировали потенциальную роль микроРНК в качестве биомаркеров бесплодия. В области репродуктивной медицины все еще существует множество вопросов, на которые необходимо ответить относительно причины идиопатического бесплодия. При этом необходимо разработать более совершенные методы диагностики с целью улучшения репродуктивных исходов. Одним из таких методов может стать использование различных мнкРНК в качестве потенциальных биомаркеров. Их дисрегуляция может оказаться ключом к разработке новых и улучшенных диагностических и прогностических методов для бесплодных пар, а также может предоставить новые возможности лечения в области персонализированной

медицины. Разработка новых биомаркеров поможет внедрить новые технологии в клиническую практику для репродуктологов и андрологов с целью улучшения исходов программ ВРТ. Это включает в себя прегравидарную подготовку пациентов перед проведением программы ЭКО, определение гамет с наилучшим потенциалом развития эмбриона и оптимизацию отбора эмбрионов с целью повышения показателей успешной имплантации и снижения частоты прерывания беременности.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материал исследования

Отбор пациентов для данного исследования проводился среди супружеских пар, обратившихся по поводу лечения бесплодия в отделение вспомогательных технологий в лечении бесплодия имени профессора Б.В. Леонова института репродуктивной медицины (заведующий — д. м. н., профессор Е. А. Калинина). Анализ и оценка показателей фолликулярной жидкости пациенток, семенной плазмы партнеров и культуральной среды от полученных эмбрионов осуществлялись в лаборатории прикладной транскриптомики отдела системной биологии в репродукции (руководитель лаборатории к.б.н. Тимофеева А.В.) на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор — академик РАН, д.м.н., профессор Г. Т. Сухих.). Исследование было одобрено этическим комитетом при ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (протокол № 9 от 22 ноября 2018 года). Все пациенты подписали письменное информированное согласие на участие в исследовании. В период с января 2019 г. по ноябрь 2020 г. осуществлялся набор пациенток согласно критериям включения/исключения.

Критерии включения пациенток в исследование:

- Возраст пациенток от 18 до 37 лет
- Трубно-перитонеальный фактор бесплодия
- Нормальный овариальный резерв
- Мужской фактор бесплодия (без выраженной патозооспермии)
- 2 и более попытки ЭКО в анамнезе
- Нормальное анатомическое строение матки
- Информированное согласие на участие в исследовании.

Критерии невключения:

- Пациенты с противопоказаниями для проведения ВРТ, в том числе с экстрагенитальной патологией, онкологическими заболеваниями
- Наличие подтвержденного хронического эндометрита по данным морфологического исследования
- Наличие генитального эндометриоза 3-4 степени; миомы матки больших размеров или деформирующей полость матки; опухолевых и опухолевидных образований яичников
- Пороки развития половых органов
- Тяжелые формы мужского бесплодия.

Критерии исключения:

- Необходимость выполнения TESA, MESA
- Использование донорской спермы
- Использование донорского ооцита или применение суррогатного материнства
- Отмена переноса эмбриона в протоколе ВРТ в связи с развитием синдрома гиперстимуляции яичников (СГЯ) средней и тяжелой степени
- Отмена переноса эмбриона в программе ВРТ;
- Отказ пациентки от участия в исследовании.

2.2. Дизайн исследования

В соответствии с поставленными задачами было проведено проспективное и ретроспективное исследование.

Дизайн исследования для задачи №1.

Ретроспективное и проспективное исследование случай-контроль.

Изначально клинико-лабораторное исследование было проведено 108 пациенткам, однако в последствии на этапе анализа исходов программ ВРТ согласно критериям исключения из исследования было исключено 7 пациенток,

из них: отмена переноса эмбриона в связи с риском СГЯ (n=4); отмена переноса эмбриона в связи с неудовлетворительным качеством полученных эмбрионов (n=3) (Рисунок 1).

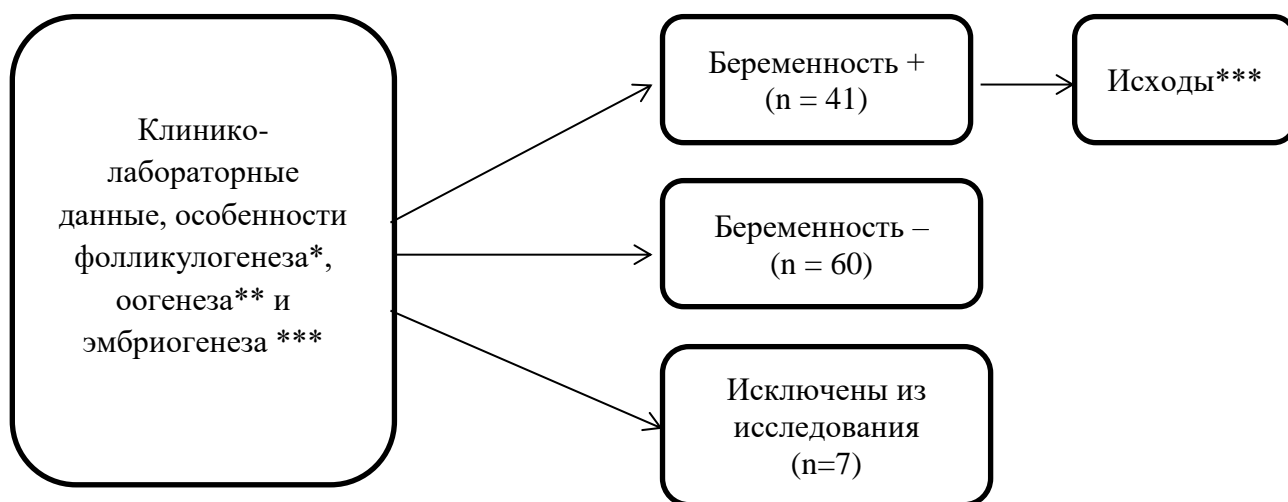


Рисунок 1. Дизайн исследования для задачи №1

*Особенности фолликулогенеза и оогенеза:

- Число полученных ооцит-кумулюсных комплексов
- Число полученных зрелых ооцитов (стадия МІІ)
- Число полученных незрелых ооцитов (GV+MI)
- Число полученных дегенеративных ооцитов.

**Особенности эмбриогенеза:

- Число зигот через 18-20 часов после проведения оплодотворения (2PN2PB)
- Общее количество бластоцист
- Число бластоцист класса AA
- Число бластоцист класса AB, BA
- Число бластоцист класса BB
- Число эмбрионов, остановившихся в развитии на ранних этапах эмбриогенеза (в том числе бластоцист CC, BC, CB).

***Исходы беременности:

- Биохимическая беременность (%)
- Клиническая беременность (%)

- Самопроизвольный выкидыш / неразвивающаяся беременность
- Роды.

Конечная точка исследования: Отношение шансов наступления беременности в зависимости от клинико-лабораторных и эмбриологических параметров.

Дизайн исследования для задачи №2.

Проспективное исследование случай-контроль.

Среди 108 пациенток, проходивших программу ВРТ, исходя из эмбриологического этапа программы, была выделена 31 пациентка, которым были перенесены blastocysts хорошего/отличного качества (без последующей имплантации — 16, с последующей имплантацией — 15) по уровню экспрессии мнкРНК методом глубокого секвенирования с последующей валидацией данных методом количественной ПЦР в реальном времени (Рисунок 2).

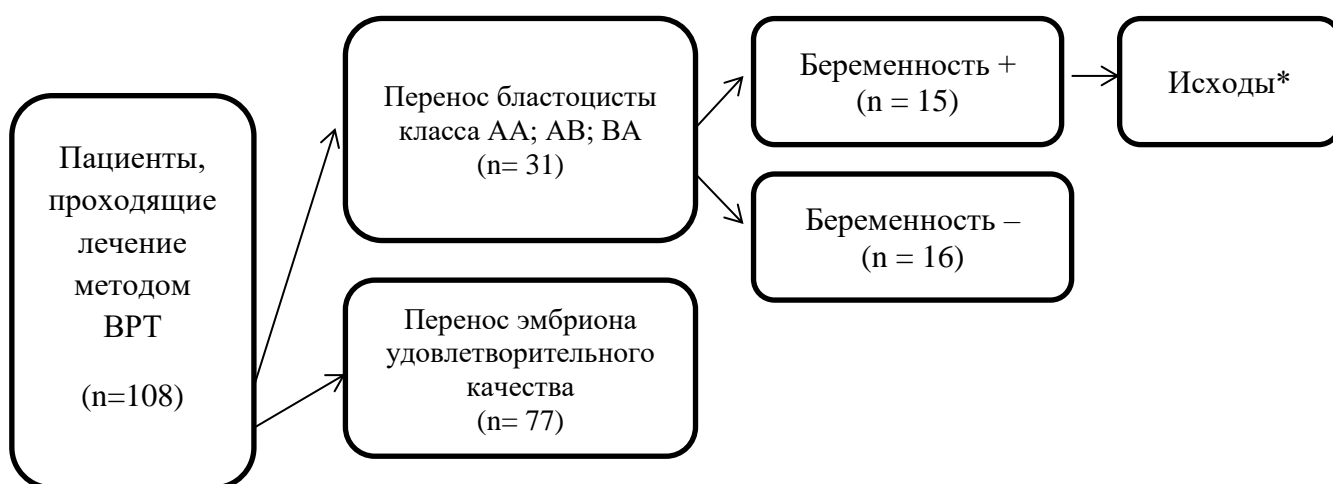


Рисунок 2. Дизайн исследования для задачи №2.

*Исходы беременности:

- Биохимическая беременность (%)
- Клиническая беременность (%)
- Самопроизвольный выкидыш / неразвивающаяся беременность
- Роды.

Конечная точка исследования: построение модели логистической регрессии прогнозирования наступления имплантации по профилю экспрессии малых

некодирующих РНК в среде культивирования бластоцисты хорошего/отличного качества.

Дизайн исследования для задачи №3.

Проспективное исследование случай-контроль.

На данном этапе исследования производилась оценка уровня экспрессии мнкРНК в образцах фолликулярной жидкости (n= 103) для сопоставления профилей экспрессии мнкРНК в данных образцах в зависимости от результата программы ВРТ. Для 31 пациентки, которым был осуществлен перенос бластоцисты класса АА; АВ; ВА, был сопоставлен профиль экспрессии мнкРНК в фолликулярной жидкости с профилем экспрессии мнкРНК в образцах культуральной среды бластоцисты.



Рисунок 3. Дизайн исследования для задачи №3.

*Исходы беременности:

- Биохимическая беременность (%);
- Клиническая беременность (%);
- Самопроизвольный выкидыш / неразвивающаяся беременность;
- Роды.

Конечная точка исследования: построение модели логистической регрессии оценки качества ооцитов в зависимости от исхода программы ВРТ по профилю экспрессии мнкРНК в фолликулярной жидкости; построение корреляционной матрицы уровня экспрессии мнкРНК в фолликулярной жидкости и среде культивирования бластоцисты хорошего/отличного качества.

Дизайн исследования для задачи №4.

Перспективное исследование случай-контроль.

С целью выполнения данной задачи была произведена оценка уровня экспрессии мнкРНК в образцах семенной плазмы (n=52), полученных от супругов пациенток, включенных в задачу №3, для сопоставления профилей экспрессии мнкРНК в данных образцах в зависимости от результата программы ВРТ. Для 31 пациента, супругам которых был осуществлен перенос бластоцисты класса АА; АВ; ВА, был сопоставлен профиль экспрессии мнкРНК в семенной плазме с профилем экспрессии мнкРНК в образцах культуральной среды бластоцисты.

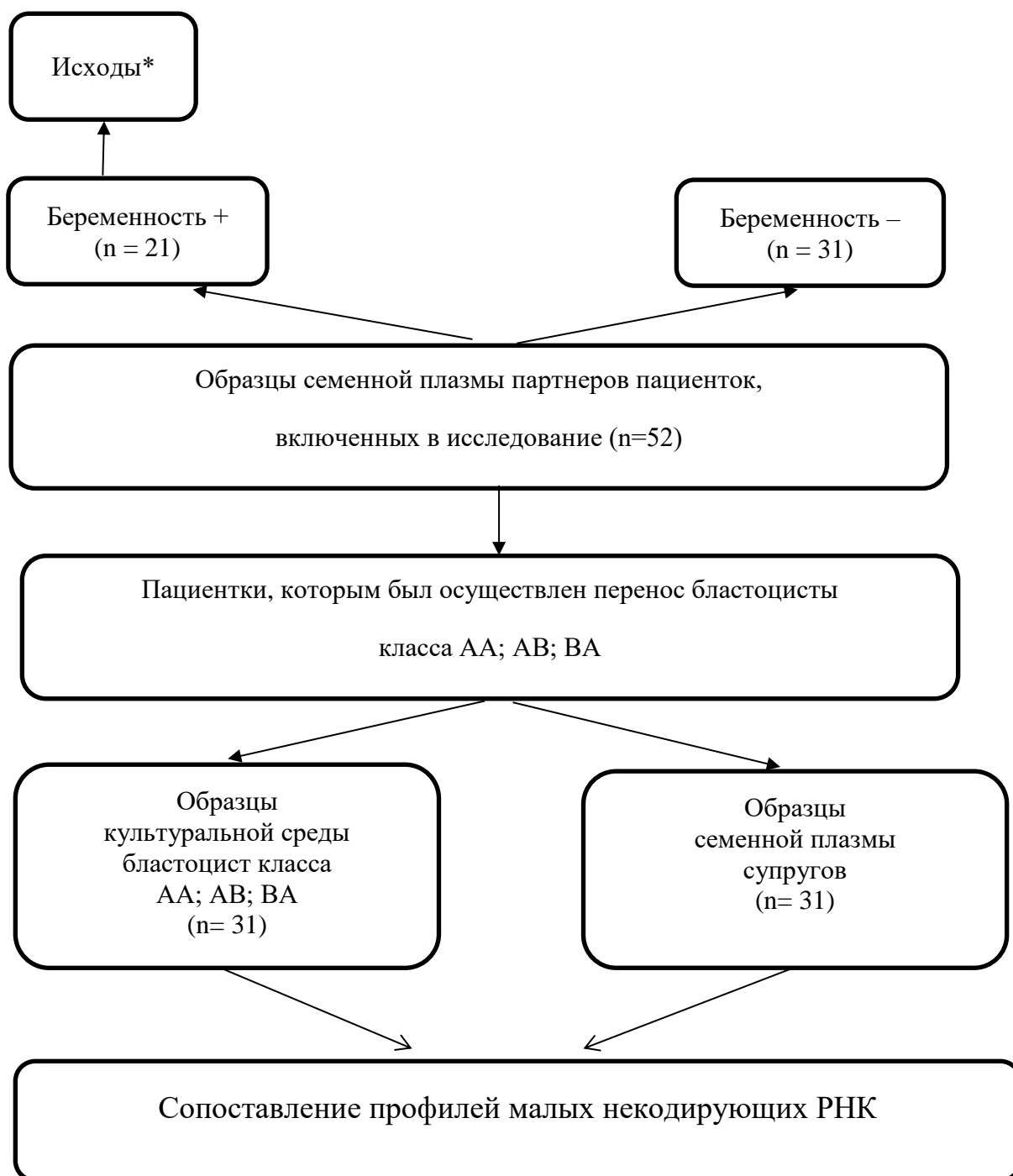


Рисунок 4. Дизайн исследования для задачи №4.

*Исходы беременности:

- Биохимическая беременность (%)
- Клиническая беременность (%)
- Самопроизвольный выкидыш / неразвивающаяся беременность
- Роды.

Конечная точка исследования: Идентификация молекул мнкРНК, определяющих качество гамет пациентов; построение корреляционной матрицы уровня экспрессии мнкРНК в семенной плазме и среде культивирования бластоцисты хорошего/отличного качества.

2.3. Методы исследования

Супружеским парам, включенным в данную диссертационную работу, было проведено предварительное полное клинико-лабораторное обследование в амбулаторных условиях по месту жительства пациентов или в ФГБУ «НМИЦАГиП им.В.И. Кулакова» МЗ РФ в соответствии с приказом Минздрава России №107н от 30.08.2012 г. «О порядке использования вспомогательных репродуктивных технологий, противопоказаниях и ограничениях к их применению». Данное обследование на этапе оказания первичной специализированной медико-санитарной помощи предназначено для определения наличия абсолютных или относительных противопоказаний к применению программ ВРТ.

Обязательное обследование для обоих супругов:

- Определение антител к бледной трепонеме в крови (RW); определение антител класса М, G к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ) 1, 2, к антигену вирусного гепатита В и С (HBsAg, HCV);
- Исследование соскоба на хламидии, микоплазму, уреаплазму, вирус простого герпеса 1, 2, на цитомегаловирус методом ПЦР;
- Микроскопическое исследование отделяемого половых органов на аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы, на грибы рода кандиды, паразитологическое исследование на атрофозоиты трихомонад;

Обязательное обследование для женщин:

- Определение группы крови и резус-фактора;
- Общий (клинический) анализ крови, биохимический анализ крови, коагулограмма;

- Общий анализ мочи;
- Антитела М и G к TORCH-инфекциям: токсоплазма, краснуха, цитомегаловирус, ВПГ I и II типов;
- Исследование гормонов крови на 2–3 день менструального цикла: фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), лютеинизирующий гормон (ЛГ), эстрадиол (E2), тиреотропный гормон (ТТГ), свободный тироксин (Т4св), пролактин, тестостерон, антимюллеров гормон (АМГ), дегидроэпиандростеронсульфат (ДГАЭС), кортизол, соматотропный гормон (СТГ);
- Исследование гормонов крови на 20–22 день менструального цикла: прогестерон
- Микроскопическое исследование отделяемого мочеполовых органов;
- Цитологическое исследование мазков (соскобов) с поверхности шейки матки (наружного маточного зева) и цервикального канала + кольпоскопия;
- Ультразвуковое исследование органов малого таза на 5-7 день менструального цикла с оценкой овариального резерва и состояния эндометрия;
- Обзорная рентгенография органов грудной клетки (флюорография);
- Регистрация электрокардиограммы (ЭКГ);
- Осмотр, консультация врача-терапевта и заключение об отсутствии противопоказаний к проведению программ ВРТ, наступлению и вынашиванию беременности;
- УЗИ молочных желез женщинам в возрасте до 35 лет. Женщинам старше 35 лет - маммография. При выявлении признаков патологии молочной железы – консультация и заключение маммолога об отсутствии противопоказаний к проведению программ ВРТ, наступлению и вынашиванию беременности;
- УЗИ щитовидной железы. При выявлении эндокринных нарушений - консультация и заключение эндокринолога об отсутствии противопоказаний к проведению программ ВРТ, наступлению и вынашиванию беременности;

Обязательное обследование для мужчин:

- Исследование эякулята (спермограмма);
- Консультация и рекомендации врача-андролога.

Дополнительное обследование для супругов по медицинским показаниям:

- Супружеским парам, имеющим в анамнезе (в том числе у близких родственников) случаи врожденных пороков развития и хромосомных болезней, назначается консультация врача-генетика и исследование кариотипов обоих супругов;
- Исследование состояния матки и маточных труб (гистеросальпингография или гистеросальпингоскопия и лапароскопия);
- При наличии соматической патологии у супругов – консультации смежных специалистов и заключение об отсутствии противопоказаний к проведению программ ВРТ, наступлению и вынашиванию беременности.

2.3.1 Общеклинические методы обследования

В день обращения супружеских пар осуществлялся тщательный сбор анамнеза, который включал возраст пациентки и ее супруга, социальный статус, место проживания (наличие бытовых вредностей), условия труда (наличие профессиональных вредностей), особенности питания и физической активности, а также наличие вредных привычек. Изучался анамнез жизни пациентов, включая все перенесенные заболевания в течение жизни, в том числе детские инфекции, а также оперативные вмешательства с указанием объемов, течения послеоперационного периода и осложнений. Производился сбор сведений о наличии наследственных заболеваний, гемо-плазмотрансфузий в анамнезе, тяжелой соматической патологии у ближайших родственников. Уточнялась информация о наличии реакций гиперчувствительности к лекарственным препаратам, с указанием групп препаратов, а также характеристики клинических проявлений.

Основным этапом общеклинического обследования пациентов был сбор акушерско-гинекологического анамнеза. Уточнялись особенности менструальной

функции (возраст менархе, регулярность менструального цикла, средняя его продолжительность, наличие нарушений менструального цикла в анамнезе).

Также оценивалась половая функция: возраст начала половой жизни, длительность и регулярность половых отношений с настоящим партнером, а также применяемые методы контрацепции. Производился сбор данных о репродуктивной функции пациенток: наличии беременностей в анамнезе с уточнением о наступлении беременностей с данным половым партнером, их исходах и особенностях течения данных беременностей. Отмечалось наличие гинекологических заболеваний в прошлом с применяемыми методами лечения. Собирались сведения о перенесенных оперативных вмешательствах с уточнением их объемов, течения послеоперационного периода и осложнениях. Особое внимание уделялось анамнезу бесплодия у супружеских пар. Производился сбор данных о длительности бесплодия, о проведенных мероприятиях, направленных на его преодоление. Отмечалось наличие программ ВРТ в анамнезе, с уточнением выбранных схем стимуляции суперовуляции, эмбриологических характеристик каждого протокола и исходов программ ВРТ.

При первичной консультации супружеской пары производился общий терапевтический осмотр пациентки (определение типа телосложения; оценка состояния кожных покровов и видимых слизистых; степени и типа оволосения), производилось измерение артериального давления и пульса, также было произведено измерение роста и веса пациентки с дальнейшим расчетом индекса массы тела по формуле:

$$\text{ИМТ} = \frac{m}{h^2},$$

где:

m — масса тела в килограммах

h — рост в метрах,

и измеряется в кг/м².

Гинекологический осмотр включал осмотр наружных половых органов, бимануальное влагалищное исследование с целью определения состояния матки и

придатков, а также осмотр влагалища и шейки матки с помощью влагалищных зеркал. Все данные, полученные в ходе опроса и осмотра, заносились в индивидуальную регистрационную карту пациентки.

2.3.2 Гормональное исследование.

Перед вступлением в программу ВРТ у всех пациенток оценивался гормональный статус в период ранней фолликулярной фазы (2–4 день менструального цикла). Производилась оценка концентрации в плазме крови таких гормонов, как: ЛГ, ФСГ, АМГ, эстрадиол, тестостерон, ТТГ, Т4св, пролактин, ДГАЭС, кортизол, 17-ОП. В лютеиновую фазу менструального цикла (20 - 22 день менструального цикла) пациентки сдавали анализ на содержание в плазме крови такого гормона, как прогестерон. Референсные значения содержания гормонов в сыворотке крови с учетом фаз менструального цикла представлены в Таблице 1.

Таблица 1 - Нормативные значения концентрации гормонов в плазме крови у женщин фертильного возраста

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

2.3.3 Ультразвуковое исследование малого таза.

Ультразвуковое исследование (УЗИ) органов малого таза было произведено всем женщинам на 2–3 день менструального цикла при вступлении пациентки в

программу ЭКО с целью определения возможных противопоказаний к применению методов ВРТ. Производилась оценка размеров тела матки, структуры миометрия и эндометрия, размеры и объем яичников, число антральных фолликулов в обоих яичниках, наличие объемных образований в полости малого таза. Учитывая данные анамнеза, данные гормонального обследования, а также данные УЗ-исследования органов малого таза пациентки, производился выбор оптимального протокола овариальной стимуляции с индивидуальным подбором препарата для стимуляции, а также его дозы. В течение цикла овариальной стимуляции УЗИ производилось с целью динамического контроля фолликулогенеза и состояния эндометрия. По мере необходимости производилась коррекция дозы вводимых гонадотропинов.

Исследование производилось с помощью ультразвукового аппарата компании «BK Medical» (Дания) с использованием трансвагинального датчика с частотой 3,5–7,5 МГц.

2.3.4 Обследование партнера.

В день обращения производился опрос и сбор анамнестических данных, таких как возраст, особенности развития, наличие наследственных и хронических заболеваний, наличие бытовых или профессиональных вредностей, а также информация о всех перенесенных заболеваниях в течение жизни.

Перед вступлением в программу ВРТ проводилось исследование эякулята и консультирование андрологом. Перед проведением исследования партнеры проходили рекомендованную подготовку. Сбор материала производился в стерильный контейнер в результате мастурбации. Повторный анализ эякулята производился в день проведения ТВП в цикле программы ЭКО. В спермолаборатории производилась оценка параметров спермы, эмбриологи отбирали необходимое количество эякулята для последующего оплодотворения ооцитов, а оставшийся материал подвергали центрифугированию. Полученную семенную плазму и осадок сперматозоидов замораживали для дальнейшего

исследования, направленного на определение профиля мРНК в полученных образцах. Оценка показателей спермограммы проводилась с учетом нормативных значений Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) по оценке и анализу эякулята (Таблица 2).

Таблица 2 - Нормативы спермограммы (ВОЗ, 5-е издание, 2010)

Показатель	Норматив, единицы измерения
Макроскопическое исследование	
Общий объем эякулята, мл	$\geq 1,5$
Цвет	белый, серый
Консистенция	жидкая, умер. вязк.
pH	$\geq 7,2$
Вязкость, см	0,1–2
Время разжижения, мин	< 60
Микроскопическое исследование	
Концентрация сперматозоидов, млн/мл	≥ 15
Общее количество сперматозоидов, млн	≥ 39
Подвижность сперматозоидов, %:	
а) общая подвижность (PR+NR; A+B+C)	≥ 40
б) прогрессивно подвижные (PR; A+B)	≥ 32
с) непрогрессивно подвижные (NR; C)	
д) неподвижные (IM; D)	
Жизнеспособность сперматозоидов, % живых	≥ 58
Морфология сперматозоидов, %:	
Нормальные сперматозоиды	≥ 4
Дефекты головки	< 96
Дефекты шейки	
Дефекты хвоста	
Круглые клетки, млн/мл	< 1
Лейкоциты, млн/мл	< 1
Эпителиальные клетки	Отсутствует
Лецитиновые зерна	Много
Агглютинация сперматозоидов	Отсутствует
Агрегация сперматозоидов	Отсутствует
MAR-тест	$< 50\%$

2.3.5 Протокол овариальной стимуляции

Овариальная стимуляция у обследуемых женщин проводилась по стандартному протоколу со 2-3 дня менструального цикла с использованием препаратов антагониста гонадотропин-рилизинг гормона (ант-ГнРГ) в

комбинации с рекомбинантным фолликулостимулирующим гормоном (р-ФСГ). Подбор стартовой дозы гонадотропинов рассчитывался с учетом возраста обследуемых пациенток, гормонального статуса, а также овариального резерва пациентки. Далее производили динамическую УЗ-фолликулометрию, с учетом которой производилась коррекция дозы препаратов в зависимости от развития фолликулов и эндометрия. С целью предотвращения эндогенных «паразитарных» пиков ЛГ при достижении фолликулом диаметра 14 мм назначался препарат ант-ГнРГ в дозе 0,25 мг/сутки подкожно. Для финального созревания ооцитов по достижении диаметра фолликулов ≥ 17 мм назначался триггер овуляции. В качестве триггера овуляции использовался человеческий хорионический гонадотропин (чХГ) в дозе 8000- 10000 МЕ/сут внутримышечно в качестве триггера овуляции за 35-36 часов до планируемой трансвагинальной пункции яичников. Начиная со дня ТВП, производилась поддержка лютеиновой фазы цикла препаратами прогестерона (микронизированный прогестерон 300 мг/сутки интравaginaльно или дидрогестерон 30 мг/сутки per os (Рисунок 5).

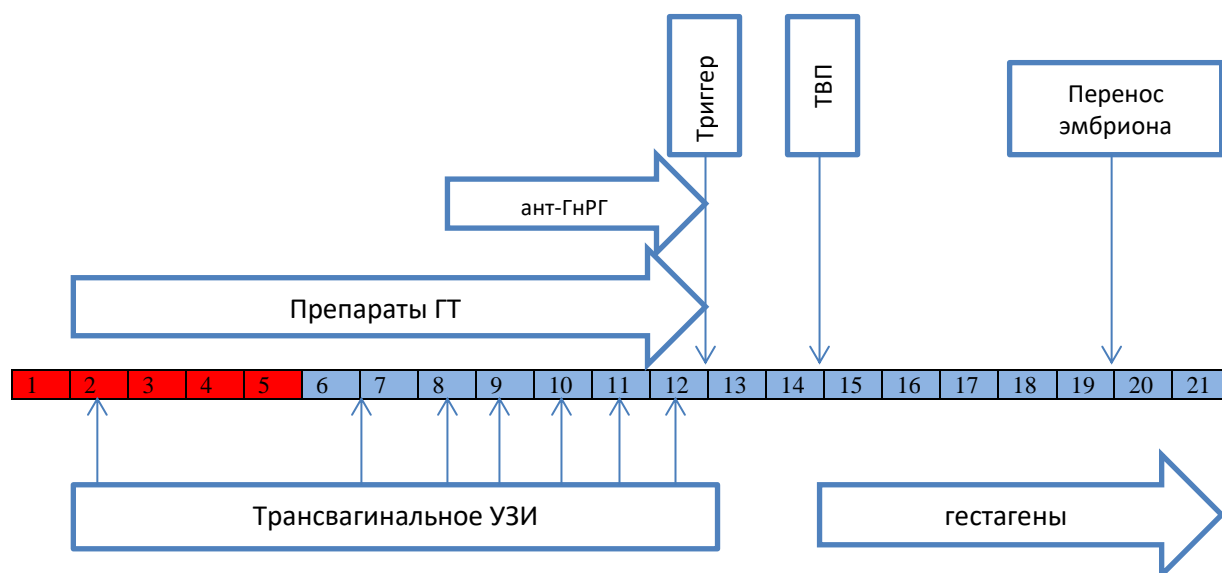


Рисунок 5. Схема овариальной стимуляции по протоколу с ант-ГнРГ

2.3.6 Трансвагинальная пункция яичников

Трансвагинальная пункция яичников производилась в специально оборудованной манипуляционной в стерильных условиях под кратковременным внутривенным наркозом посредством вакуумной аспирации фолликулов под ультразвуковым мониторингом с использованием одноразовых игл (система Cook IVF). Фолликулярная жидкость, полученная во время трансвагинальной пункции фолликулов, помещалась в подогретые стерильные пробирки. Содержимое каждой из пробирок изучалось эмбриологами на предмет присутствия в нем ооцит-кумулюсного комплекса (ОКК), производилась оценка качества и степени зрелости полученных ооцитов.

Фолликулярную жидкость, оставшуюся после выделения ооцит-кумулюсных комплексов, подвергали центрифугированию и последующему замораживанию для дальнейшего исследования, направленного на определение профиля мРНК в полученных образцах.

2.3.7 Морфологическая оценка ооцитов и этап оплодотворения

Идентификация ооцитов производилась сразу же после аспирации фолликулов при помощи диссекционного микроскопа на нагретой поверхности.

Оценка степени зрелости ооцитов производилась на основании данной градации:

- стадия зародышевого пузырька (GV, germinal vesicle)
- в цитоплазме ооцита визуализируется ядро и отсутствует полярное тельце;
- стадия метафазы первого мейотического деления (MI)
- в цитоплазме ооцита отсутствует ядро и полярное тельце
- стадия метафазы второго мейотического деления (MII)
- визуализация полярного тельца

Ооциты преинкубировались *in vitro* в течение 2-3 часов при температуре 37 С в атмосфере с 5% CO₂ в стерильных планшетах (Nunc, Дания) с культуральной

средой Continuous Single Culture (CSCM, Irvine Sc., USA). Оплодотворение всех зрелых ооцитов производилось методом интрацитоплазматической инъекции сперматозоида в ооцит (ИКСИ).

Через 16–18 часов после проведения оплодотворения проводилась оценка формирования зиготы:

2PN — два пронуклеуса (нормальное оплодотворение)

NF – пронуклеусов нет (ооцит просто не оплодотворился)

1PN — один пронуклеус

NS — ооцит не выжил после процедуры ИКСИ

3PN и более — аномальное развитие эмбриона.

2.3.7 Морфологическая оценка эмбрионов

Этап культивирования был произведен с использованием сред культивирования Continuous Single Culture (CSCM, Irvine Sc., USA). Оценка качества полученных эмбрионов проводилась на 5-е сутки культивирования на основании морфологических критериев оценки развития эмбрионов Gardner:

Оценка степени развития бластоцисты:

- полость бластоцисты занимает менее половины объема эмбриона (ранняя бластоциста);
- полость бластоцисты больше половины объема эмбриона (бластоциста);
- полость заполняет весь объем эмбриона (полная бластоциста);
- полость заполняет весь эмбрион, начинается истончение блестящей оболочки (расширенная бластоциста);
- ТФЭ начинает проникать через блестящую оболочку (вылупляющаяся бластоциста);
- бластоциста полностью освобождается от блестящей оболочки (вылупившаяся бластоциста).

Оценка ВКМ:

A — много плотно упакованных клеток;

В — несколько свободно сгруппированных клеток;

С — незначительное число клеток ВКМ.

Оценка ТФЭ:

А — много клеток, формирующих единый эпителиальный слой;

В — несколько клеток, формирующих неплотный эпителиальный слой;

С — незначительное число клеток ТФЭ.

Исходя из данных морфологических характеристик, эмбрионы подразделялись на эмбрионы “отличного”, “хорошего”, “среднего” и “плохого” качества (Таблица 3).

Таблица 3 - Классификация качества эмбрионов по D. Gardner.

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

2.3.9 Перенос эмбрионов в полость матки и ведение посттрансферного периода.

На 5-е сутки после проведения трансвагинальной пункции фолликулов в асептических условиях манипуляционной под ультразвуковым контролем осуществлялся перенос эмбриона в полость матки с помощью «мягкого» (гибкого) катетера Wallace (Portex Ltd., UK) или катетера Cook (Cook Inc., Bloomington, IN, USA). В полость матки производился перенос одного – двух эмбрионов с учетом пожелания супружеской пары. Оставшиеся эмбрионы должного качества с согласия пациентки витрифицировались.

Поддержка посттрансферного периода осуществлялась с увеличением дозы вагинального микронизированного прогестерона, назначенного ранее, в соответствии с инструкцией.

Через 14 дней после проведения переноса эмбриона в полость матки пациенткам производилось определение концентрации бета-субъединицы хорионического гонадотропина человека (β -ХГЧ) в сыворотке крови. Повышение

уровня β -ХГ более 20 МЕ/л свидетельствовало о положительном тесте на беременность.

Через 21 день после переноса эмбриона в полость матки проводилось УЗИ органов малого таза с целью визуализации плодного яйца в полости матки и подтверждении клинической беременности.

2.4 Специальные методы исследования

В день проведения трансвагинальной пункции фолликулов осуществляли забор фолликулярной жидкости после извлечения ооцит-кумулюсных комплексов. Также в день ТВП осуществлялся забор эякулята, оставшегося после оплодотворения. На 5-е сутки после оплодотворения оценивали качество эмбриона, планируемого к переносу в полость матки, и осуществляли забор культуральной среды.

Всего было собрано 103 образца фолликулярной жидкости, 52 образца эякулята, разделенного в последующем на семенную плазму и осадок из сперматозоидов и 135 образцов среды культивирования эмбрионов (Рисунок 6).

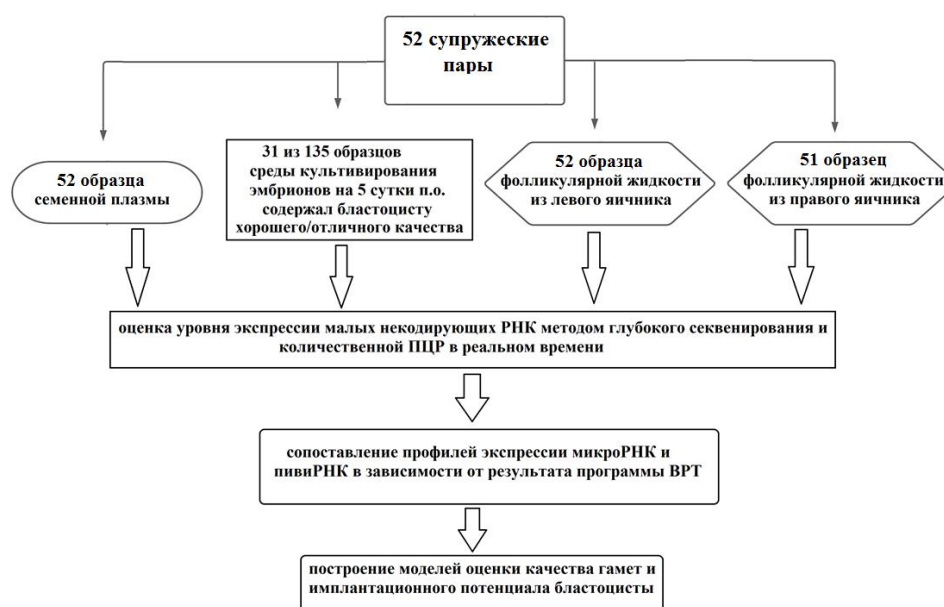


Рисунок 6. Общая схема метода

Из собранных образцов были выделены РНК колоночным способом с использованием набора «miRNeasy Serum/Plasma Kit» (Qiagen). Идентификация всех имеющихся мнкРНК в образцах была осуществлена методом глубокого секвенирования с использованием набора по синтезу кДНК-библиотек NEBNext® Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina® (Set11, New England Biolab®, Germany) на платформе NextSeq 500 platform (Illumina, USA). Валидацию данных секвенирования проводили методом количественной ПЦР в реальном времени наборами miScript® II RT Kit (Qiagen, Hilden, Germany) и miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Относительный уровень экспрессии кДНК оценивали по кратности изменения (КИ) методом $\Delta\Delta Ct$.

$M0s1 / M0s2 = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, где $M0s1$ и $M0s2$ – исходные количества кДНК в образцах $s1$ и $s2$, $\Delta\Delta Ct = (Cts1 - Ctnorm1) - (Cts2 - Ctnorm2)$, Ct - значение цикла амплификации в точке пересечения кинетической кривой накопления продукта амплификации с линией порогового уровня флуоресценции, который определяется автоматически программным обеспечением амплификатора StepOnePlus; $Cts1$ и $Cts2$ - значение порогового цикла амплификации кДНК анализируемой мнкРНК в двух сравниваемых образцах $s1$ и $s2$; $Ctnorm1$ и $Ctnorm2$ - значение порогового цикла амплификации кДНК нормировочной эндогенной мнкРНК в двух сравниваемых образцах $s1$ и $s2$.

Таблица 4 - Данные последовательностей мнкРНК

мнкРНК*	Идентификационный номер*	5'-3' последовательность специфичного праймера, Tm	Температура отжига праймеров в ПЦР, °C
hsa_piR_001312	DQ571813	attggtggttcagtggtagaattctcgcctg	46,2
hsa_piR_002769	DQ573726	Tcataagtgggagctaaatgatgagaac	46,2
hsa_piR_008113	DQ581032	tgaggtagtaggtgtatagtttttagggtc	46,2
hsa_piR_016240	DQ592148	tgtaaccgaaagggttggttcgagcc	48,9
hsa_piR_016742	DQ593049	ccggctagctcagtcggttagagcatgaga	48,9
hsa_piR_019122	DQ596252	gacagagaaaacaaggtggtgaactatgccc	46,2
hsa_piR_020365	DQ597975	ggccgtgatcgtatagtgttagtactctg	46,2

hsa_piR_000765	DQ570956	agcattggtggtcagtggtagaattctcgc	49
hsa_piR_000807	DQ571005	agcctgatgatgtcctcctccagttgccgc	53
hsa_piR_004695	DQ576442	tcttgaccagcctgatgatgtcctcctcc	57
hsa_piR_004880	DQ576715	tcctgtcctggaccagcctgatgatgtcct	45
hsa_piR_008112	DQ581031	tgaggtagtagattgtatagttgtgggtagt	46,2
hsa_piR_015026	DQ590548	Tggttcagtggtagaattctcgcctcc	45
hsa_piR_015249	DQ590830	Tgtagtcgtggccgagtggttaaggc	46,2
hsa_piR_015462	DQ591122	tgtcctgggccagcctgatgatgtcctcctc	45
hsa_piR_016735	DQ593039	ccgcctgggaataaccgggtgcttaggctta	50
hsa_piR_017716	DQ594453	ttcctggtggtctagtggttaggattcggc	45
hsa_piR_020381	DQ597997	ggcgggagtaactatgactctttaaggtta	53
hsa_piR_020485	DQ598159	gggatgtagctcagtggttagagcgcgtgct	53
hsa_piR_020497	DQ598177	Tgtagctcagtggttagagcgcgtgct	45
hsa_piR_022258	DQ600471	Tactacctgattggtcgggtgtgagc	48,9
hsa_piR_022628	DQ600952	tagagcatgagactcttaatctcagggtcgtg	48,9
hsa_piR_020388	DQ598008	ggctcgttggtctaggggtatgattctcgg	45
hsa-miR-381-3p	MIMAT0000736	Tatacaaggcaagctctctgt	52,7

hsa-let-7a-5p	MIMAT0000062	Hs_let-7a_2 miScript, MS00031220, Qiagen	55
hsa-let-7b-5p	MIMAT0000063	Hs_let-7b_1 miScript, MS00003122, Qiagen	55
hsa-let-7i-5p	MIMAT0000415	Hs_let-7i_1 miScript, MS00003157, Qiagen	55

* piRNAbank (<http://pirnabank.ibab.ac.in/cgi-bin/accession.cgi>) для пивиРНК; miRBase (<http://www.mirbase.org/search.shtml>) для микроРНК

2.5. Статистическая обработка полученных данных

Статистическая обработка данных выполнялась на персональном компьютере с помощью программы Microsoft Excel, пакета статистических программ Statistica 12 (StatSoft, США) и SPSS Statistics 23 (IBM, США). Учитывая небольшой объем выборки, использованы непараметрические статистические методы. При анализе непрерывных и дискретных данных определялось значение медианы и межквартильный размах. Для оценки значимости различий непрерывных данных производилось сравнение медианы распределения признака с определением U-критерия Манна-Уитни (Mann-Whitney) для независимых выборок. Для качественных данных определяли частоту выявления признака (%).

Для расчета вероятности наступления беременности производилось построение модели на основе метода логистической регрессии с учетом относительного вклада предикторов с использованием метода χ^2 . Различия между статистическими величинами считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

С целью уменьшения ошибки репрезентативности были использованы строгие критерии отбора пациентов в исследование. Для минимизации системной ошибки выборки при проведении исследования для всех пациенток использовались одни и те же методы диагностики на базе одной лаборатории. Оценка воздействующего фактора и исхода также была одинакова для всех пациентов.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В соответствии с поставленными целями и задачами исследования были обследованы 108 бесплодных пар, обратившихся для проведения программы ЭКО/ИКСИ и ПЭ по поводу бесплодия, при этом каждая из супружеских пар соответствовала критериям включения/невключения. Однако в последствии на этапе анализа исходов программ ВРТ согласно критериям исключения из исследования было исключено 7 пациенток, из них: отмена переноса эмбриона в связи с риском СГЯ (n=4); отмена переноса эмбриона в связи с неудовлетворительным качеством полученных эмбрионов (n=3). Исследование молекулярно-биологического профиля фолликулярной жидкости, семенной плазмы и культуральной среды эмбриона было проведено у 52 пар. Всего было получено 103 образца фолликулярной жидкости, 52 образца эякулята и 135 образцов среды культивирования бластоцист различного качества и отправлено на молекулярно-биологический анализ в лабораторию прикладной транскриптомики отдела системной биологии в репродукции института трансляционной медицины ФГБУ «НМИЦ АГП им.В.И.Кулакова» Минздрава России.

3.1. Клинико-anamнестическая характеристика включенных в исследование пациенток

Проанализированы клинико-anamнестические данные бесплодных пар, включенных в данное исследование. В зависимости от исхода программы ЭКО/ИКСИ все пары были разделены на две группы:

I группа: 41 бесплодная пара, проходившая лечение бесплодия методом ЭКО/ИКСИ с овариальной стимуляцией и последующим наступлением беременности после переноса эмбриона в полость матки.

II группа: 67 бесплодных пар, проходивших лечение бесплодия методом ЭКО/ИКСИ с овариальной стимуляцией и отсутствием наступления беременности после переноса эмбриона в полость матки.

При анализе возраста пациенток, включенных в исследование, статистически значимых различий выявлено не было. Средний возраст пациенток, включенных в I группу, составил 31 год (26 – 37 лет), а во II группу – 32 года (23 – 37 лет). Медиана возраста партнеров в I группе составила 33 года (27 – 42 года), во II группе – 34 года (25 – 45 лет).

Таблица 5 - Возрастная характеристика бесплодных пар, включенных в исследование

Параметры	Группа I (наступление беременности) (n = 41) ¹	Группа II (отсутствие беременности) (n = 67) ¹	p - уровень значимости ¹
Средний возраст пациенток (лет)	M = 31; (30 ; 34)	M = 32.5; (30 ; 35)	0.338
Средний возраст партнеров (лет)	M = 33; (31 ; 36)	M = 34.5; (32 ; 38)	0.133

¹ Данные представлены в виде медианы (Me) и квартилей Q1 и Q3 в формате Me (Q1;Q3) с указанием статистической значимости (p) по критерию Манна-Уитни

ИМТ пациенток, включенных в исследование, значимо не различался. Медиана ИМТ пациенток в I группе составила 21,2 (20,3 - 22), а во II группе – 21,3 (20,1 – 22,1), что соответствует нормальным показателям ИМТ.

Таблица 6 - Характеристика антропометрических показателей в исследуемых группах пациенток

Параметры	Группа I (наступление беременности) (n = 41) ¹	Группа II (отсутствие беременности) (n = 67) ¹	p - уровень значимости ¹
Рост (см)	M = 166; (163.75 ; 171.25)	M = 166.5; (164 ; 171.75)	0.958
Вес (кг)	M = 59.35; (55.2 ; 63.9)	M = 59.35; (54.1 ; 65.65)	0.915
ИМТ	M = 21.2; (20.3 ; 22)	M = 21.3; (20.12; 22.1)	0.994

¹ Данные представлены в виде медианы (Me) и квартилей Q1 и Q3 в формате Me (Q1;Q3) с указанием статистической значимости (p) по критерию Манна-Уитни

У пациенток, включенных в исследование, были проанализированы клинические параметры менструальной и репродуктивной функций.

Таблица 7 - Характеристика менструальной и репродуктивной функций пациенток, включенных в исследование

Параметры	Группа I (наступление беременности) (n = 41) ¹	Группа II (отсутствие беременности) (n = 67) ¹	p - уровень значимости ¹
Менархе (лет)	M = 13; (13 ; 14)	M = 13; (13 ; 14)	0.939
Продолжительность менструального цикла (дни)	M = 28; (28 ; 29)	M = 29; (28 ; 30)	0.277
Продолжительность менструального кровотечения (дни)	M = 4; (4 ; 5)	M = 5; (4 ; 5)	0.399

¹ Данные представлены в виде медианы (Me) и квартилей Q1 и Q3 в формате Me (Q1;Q3) с указанием статистической значимости (p) по критерию Манна-Уитни

Исходя из данных, представленных в таблице, исследуемые группы статистически не различались по параметрам менструальной и репродуктивной функций. Средний возраст менархе среди пациенток, включенных в данное исследование, составлял 13 лет в обеих группах. Продолжительность менструального цикла пациенток в I группе составила 28 дней, во II группе - 29 дней. Продолжительность менструального кровотечения в I группе – 4 дня, во II группе – 5 дней.

При анализе акушерского анамнеза пациенток, включенных в исследование, определили, что в группе пациенток с положительной имплантацией эмбриона в полости матки преобладало вторичное бесплодие. В группе пациенток с отсутствием имплантации эмбриона в данном стимулированном цикле также было выявлено преобладание вторичного бесплодия.

При анализе исходов беременностей пациенток, включенных в исследование, выявлено преобладание внематочных беременностей в I и II группах. При этом исходы беременностей не соответствуют количеству пациентов в группе, так как у одной пациентки могло быть несколько беременностей с соответствующим исходом.

Таблица 8 - Характеристика акушерского анамнеза пациенток, включенных в исследование

Параметры	Группа I (наступление беременности) (n = 41) ¹	Группа II (отсутствие беременности) (n = 67) ¹	p - уровень значимости ¹
Отсутствие беременности в анамнезе	17 (41%)	31 (46%)	0.278
Наличие беременности в анамнезе	24 (59%)	36 (54%)	0.133
Количество беременностей	2	2	0.502
Роды	11 (23%)	8 (12%)	0.398
Самопроизвольный выкидыш	8 (17%)	13 (19%)	0.476
Неразвивающаяся беременность	8 (17%)	14 (21%)	0.237
Внематочная беременность	16 (33%)	26 (39%)	0.129
Аборт	5 (10%)	6 (9%)	0.743

¹ Данные представлены как доли пациенток в % и абсолютное число пациенток с указанием статистической значимости (p)

При анализе анамнеза бесплодия у супружеских пар, включенных в данное исследование, выявили, что в I группе преобладал мужской фактор бесплодия (16 супружеских пар), в то время как во II группе – трубно-перитонеальный и сочетанный факторы (по 23 супружеские пары). Изолированный трубно-перитонеальный фактор в I группе был выявлен у 11 пар. Изолированный мужской фактор был выявлен у 21 супружеской пары во II группе. Сочетанный фактор бесплодия был диагностирован у 14 супружеских пар из I группы. Наружный генитальный эндометриоз был выявлен у 9 супружеских пар в I группе и у 12 супружеских пар во II группе. Медиана продолжительности бесплодия в обеих группах составила 4 года.

Таблица 9 - Характеристика бесплодия у супружеских пар, включенных в исследование

Параметры	Группа I (наступление беременности) (n = 41) ¹	Группа II (отсутствие беременности) (n = 67) ¹	p - уровень значимости ¹
Первичное бесплодие	17 (41%)	31 (46%)	0.278

Вторичное бесплодие	24 (59%)	36 (54%)	0.133
Продолжительность бесплодия (лет)	4 (1 – 16)	4 (1 – 10)	0.756
Трубно-перитонеальный фактор	11 (27%)	23 (34%)	0.187
Мужской фактор	16 (39%)	21 (32%)	0.438
Сочетанный фактор	14 (34%)	23 (34%)	0.126
НГЭ	9 (23%)	12 (17%)	0.354

¹ Данные представлены как доли пациенток в % и абсолютное число пациенток с указанием статистической значимости (p)

В соответствии с критериями включения, в данное исследование были включены бесплодные пары, у которых было ранее проведено 2 и более попыток ВРТ. При этом в группе I: 34 (83%) имели 2 попытки, 6 (15%) – 3 попытки ЭКО, у 1 (2%) пациенток было 4 и более попыток ЭКО в анамнезе. Во II группе у 55 (82%) пациенток были 2 попытки ЭКО, у 10 (15%) пациенток – 3 попытки ЭКО, у 2 пациенток (3%) было 4 и более попыток ЭКО в анамнезе.

Таблица 10 - Характеристика ранее проведенных циклов ЭКО у пациенток, включенных в исследование

Параметры	Группа I (наступление беременности) (n = 41) ¹	Группа II (отсутствие беременности) (n = 67) ¹	p - уровень значимости ¹
2 попытки ЭКО	34 (83%)	55 (82%)	0.436
3 попытки ЭКО	6 (15%)	10 (15%)	0.586
4 и более попыток ЭКО	1 (2%)	2 (3%)	0.872

¹ Данные представлены как доли пациенток в % и абсолютное число пациенток с указанием статистической значимости (p)

Перед вступлением в программу ВРТ у всех пациенток оценивался гормональный статус в период ранней фолликулярной фазы (2–4 день менструального цикла) не ранее, чем за 6 месяцев до цикла стимуляции суперовуляции. Уровень гормонов в сыворотке крови пациенток в обеих группах находился в пределах референсных значений, принятых в лаборатории, выполнившей данный анализ.

Таблица 11 - Гормональный статус пациенток, включенных в исследование

Гормоны Крови	Группа I (наступление беременности) (n = 41) ¹	Группа II (отсутствие беременности) (n = 67) ¹	p - уровень значимости ¹
ФСГ, мЕд/мл	M = 6.98; (6.26 ; 8.54)	M = 7.6; (6.32 ; 8.88)	0.238
ЛГ, мЕд/мл	M = 5.45; (4.38 ; 6.53)	M = 5.78; (4.43 ; 6.9)	0.285
АМГ, нг/мл	M = 2.7; (1.85 ; 3.24)	M = 2.2; (1.52 ; 2.89)	0.127
Эстрадиол, пмоль/л	M = 163.85; (105.69 ; 217.25)	M = 154.5; (100.63 ; 207.55)	0.688
Прогестерон, нмоль/л (лютеиновая фаза цикла)	M = 29.1; (21.53 ; 42.5)	M = 27.95; (19.27 ; 47)	0.713
Пролактин, мМЕ/л	M = 278.94; (187.78 ; 338)	M = 303; (203.32 ; 367.75)	0.112
Кортизол, нмоль/л	M = 304; (226.05 ; 377.55)	M = 318.5; (257 ; 378.75)	0.765
Тестостерон, нмоль/л	M = 1.64; (0.89 ; 1.9)	M = 1.54; (1.22 ; 2)	0.288
ТТГ, мМЕ/л	M = 1.55; (1 ; 2.08)	M = 1.78; (1.17 ; 2.67)	0.245
Т4, пмоль/л	M = 16.15; (12.52 ; 18.54)	M = 14.62; (12.17 ; 17.8)	0.297
ДГЭА-С, мкмоль/сут	M = 4.35; (2.48 ; 7.9)	M = 5.46; (3.12 ; 7.6)	0.353
17-ОП, нмоль/л	M = 1.48; (1.17 ; 1.92)	M = 1.46; (1.01 ; 1.9)	0.976

¹ Данные представлены в виде медианы (Me) и квартилей Q1 и Q3 в формате Me (Q1;Q3) с указанием статистической значимости (p) по критерию Манна-Уитни

3.2 Характеристика циклов ВРТ

Овариальная стимуляция у всех пар, включенных в исследование, проводилась по протоколу с использованием препаратов антГнРГ и р-ФСГ. Для предотвращения паразитарного пика ЛГ всем пациенткам, включенным в исследование, назначался препарат антГнРГ в дозе 0,25 мг/сут п/к при достижении фолликулом диаметра $\geq 13-14$ мм. Для финального созревания ооцитов назначался чХГ в дозе 8000 - 10000 МЕ/сут однократно внутримышечно

в качестве триггера овуляции. Дозы вводимых препаратов, а также длительность стимулированного цикла статистически не отличались между двумя группами.

Таблица 12 - Характеристика стимулированных циклов пациенток, включенных в исследование

Параметры	Группа I (наступление беременности) (n = 41) ¹	Группа II (отсутствие беременности) (n = 67) ¹	p - уровень значимости ¹
Суммарная доза препарата, МЕ/сут	M = 1575; (1200 ; 1800)	M = 1725; (1350 ; 1931.25)	0.376
Длительность стимуляции, Дни	M = 9; (8; 10)	M = 9; (8; 10)	0.913

¹ Данные представлены в виде медианы (Me) и квартилей Q1 и Q3 в формате Me (Q1;Q3) с указанием статистической значимости (p) по критерию Манна-Уитни

3.3 Характеристика эмбриологического этапа

Фолликулогенез, оогенез, сперматогенез и ранний эмбриогенез оценивались по следующим параметрам: количество фолликулов в день проведения трансвагинальной пункции фолликулов, количество полученных ооцит-кумулюсных комплексов (ОКК), количество зрелых ооцитов (МП), параметры эякулята в день ТВП, количество полученных эмбрионов на стадии двух пронуклеусов (2PN), количество морул и бластоцист. Оплодотворение полученных ооцитов было выполнено методом ИКСИ у всех пациенток обеих групп. Криоконсервация эмбрионов проведена в I группе у 19 (49%) супружеских пар и во II группе у 33 (48%) супружеских пар.

Таблица 13 - Характеристика эмбриологического этапа у пациенток, включенных в исследование

Параметры	Группа I (наступление беременности) (n = 39) ¹	Группа II (отсутствие беременности) (n = 69) ¹	p - уровень значимости ¹
Количество фолликулов в день ТВП	M = 8; (4 ; 10.5)	M = 8; (6 ; 11)	0.545
Количество полученных ОКК	M = 7; (4 ; 12)	M = 7.5; (5 ; 12)	0.736
Количество ооцитов	M = 6;	M = 6;	0.432

МП	(3 ; 8)	(4 ; 9.75)	
% морфологическ и нормальных сперматозоидо в в день ТВП	M = 2; (2 ; 3)	M = 2; (2 ; 3)	0.936
% прогрессивно подвижных сперматозоидо в	M = 57; (50.5 ; 67)	M = 56; (43 ; 67.5)	0.743
Общая концентрация сперматозоидо в в 1 мл эякулята	M = 69; (36 ; 97)	M = 59; (31.25 ; 109.75)	0.953
Количество эмбрионов 2PN	M = 5; (2 ; 7.25)	M = 6; (3 ; 8)	0.286
Количество бластоцист	M = 1.5; (1 ; 3.25)	M = 1; (1 ; 3)	0.482

¹ Данные представлены в виде медианы (Me) и квартилей Q1 и Q3 в формате Me (Q1;Q3) с указанием статистической значимости (p) по критерию Манна-Уитни

Исходя из данных, полученных в таблице, параметры фолликулогенеза, оогенеза, а также эмбриологического этапа у пациентов, включенных в исследование, достоверно не отличались между группами.

3.4 Исходы программы ВРТ у пациенток, включенных в исследование

Из 108 пар, включенных в исследование, из дальнейшего исследования 7 пациенток были исключены в связи с критериями исключения. Соответственно, была обследована 101 пациентка, которой был произведен перенос эмбриона в полость матки, беременность наступила у 41 (41%) женщины, у 60 пациенток (59 %) результат программы ЭКО был отрицательным. У 2 пациенток после проведения УЗИ органов малого таза через 21 день после переноса эмбриона в полость матки плодное яйцо не визуализировалось, что свидетельствовало о биохимической беременности. Полный самопроизвольный выкидыш произошел у 4 пациенток, а неразвивающаяся беременность была диагностирована у 7 пациенток. Пациенткам с диагностированной неразвивающейся беременностью

была выполнена вакуум-аспирация или инструментальное удаление плодного яйца с последующим выскабливанием стенок полости матки. В одном случае наступила внематочная беременность, в связи с чем была произведена последующая тубэктомия. У 27 женщин беременность после лечебного цикла ЭКО завершилась своевременными родами с рождением живых здоровых детей.

Таблица 14 - Исходы программы ЭКО у пациенток из группы I

Параметры	Группа I (наступление беременности) (n = 41) ¹
Частота биохимической беременности	2 (5%)
Частота самопроизвольного выкидыша	4 (10%)
Частота неразвивающейся беременности	7 (17%)
Частота внематочной беременности	1 (2%)
Частота родов	27 (66%)

¹ Данные представлены как доли пациенток в % и абсолютное число пациенток

3.5 Корреляционный анализ данных клинико-инструментальных методов исследования супружеских пар

При построении корреляционной матрицы с использованием метода ранговой корреляции Спирмена по данным клинико-инструментальных методов исследования супружеских пар было обнаружено, что возраст пациенток статистически значимо коррелировал с количеством попыток ЭКО в анамнезе ($p = 0,0001$, коэффициент корреляции $r = 0,75$). При этом длительность бесплодия у супружеских пар 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 стимуляции суперовуляции у данных пациенток положительно коррелировала с суммарной дозой гонадотропинов ($p = 0,008594$, $r = 0,77$), используемой в протоколе ВРТ. При этом доза гонадотропинов, в свою очередь, положительно коррелировала с ИМТ пациенток ($p = 0,0104$, $r = 0,53$) и имела обратную корреляцию с уровнем АМГ ($p = 0,0461$, $r = - 0,43$). Кроме этого, уровень АМГ положительно коррелировал с

количеством фолликулов в день назначения триггера овуляции ($p = 0,0168$, $r = 0,5$). Количество полученных зрелых ооцитов (МII) статистически значимо коррелировало с количеством попыток ЭКО в анамнезе ($p = 0,0302$, $r = - 0,46$). Стоит отметить, что общее количество blastocysts, полученных в цикле ЭКО, 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 7).

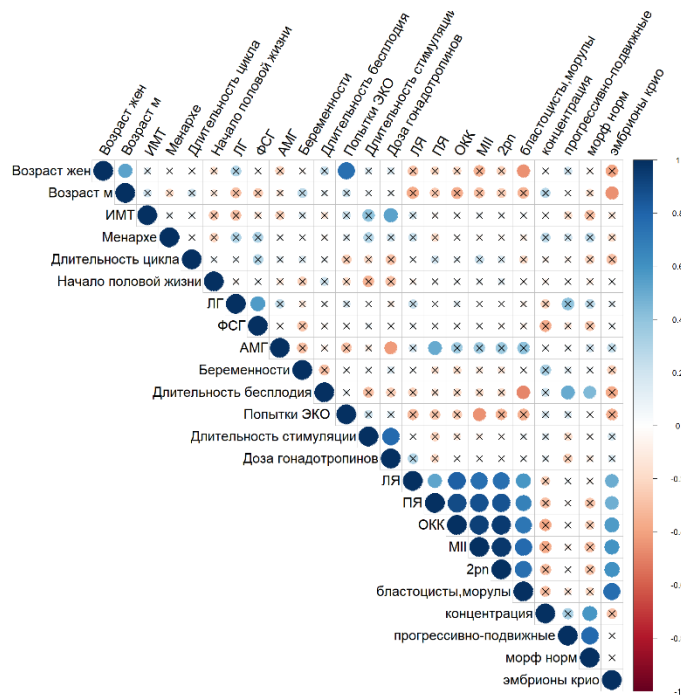


Рисунок 7. Корреляционная матрица клинико-анамнестических данных пациенток, включенных в исследование, параметров стимулированного цикла и характеристик эмбриогенеза

3.6 Роль малых некодирующих РНК в имплантационном потенциале эмбриона на стадии бластоцисты

Из 135 образцов культуральных сред бластоцист различного качества, был отобран 31 образец питательных сред бластоцист хорошего/отличного качества с разным имплантационным потенциалом после переноса в полость матки (без имплантации — 16, с имплантацией — 15). Глубокое секвенирование проводили

на четырех образцах культуральных сред бластоцист отличного качества (4АА) на 5-е сутки с наличием имплантации ($n = 3$ из 16) и ее отсутствием ($n = 1$ из 15) после их переноса в полость матки. Сравнительный анализ чисел прочтения микроРНК и пивиРНК в образцах с отсутствием имплантации (№4, №24, №34) и наличием имплантации бластоцисты (№8) представлены в Таблице 15.

Таблица 15 - Данные глубокого секвенирования мнкРНК в культуральной среде бластоцист

мнкРНК	Среднее число прочтения, данные NGS				Кратность изменения уровня экспрессии мнкРНК		
	№4	№34	№24	№8	№34/ №8	№4/№8	№24/№8
hsa-let-7a-5p	3835	443	1541	7783	0.057	0.493	0.198
hsa-let-7b-5p	20737	254	1834	26297	0.010	0.789	0.070
hsa-let-7i-5p	3465	90	1055	4072	0.022	0.851	0.259
hsa-miR-381-3p	120	1	83	475	0.002	0.253	0.175
hsa_piR_008113	173	153	93	652	0.235	0.265	0.143
hsa_piR_001312	486	486	549	2151	0.226	0.226	0.255
hsa_piR_000765	8850	7248	2004	15162	0.478	0.584	0.132
hsa_piR_016735	26	118	81	347	0.340	0.075	0.233
hsa_piR_015249	175	625	580	280	2.232	0.625	2.071
hsa_piR_020497	163	596	562	181	3.293	0.901	3.105
hsa_piR_016240	54	126	108	1	126.000	54.000	108.000
hsa_piR_016742	65	120	150	30	4.000	2.167	5.000
hsa_piR_020485	2429	1841	1876	952	1.934	2.551	1.971
hsa_piR_020388	448	499	546	386	1.293	1.161	1.415

Для валидации данных секвенирования методом количественной ОТ-ПЦР на всей коллекции образцов культуральной среды бластоцист хорошего/отличного качества с различными исходами после переноса в полость матки ($n = 31$) были отобраны мнкРНК, уровень экспрессии которых отличался не менее чем в два раза как минимум в двух из трех образцов культуральной среды бластоцист без имплантации относительно образцов культуральной среды бластоцист с имплантацией (Таблица 15). ПивиРНК hsa_piR_020388 была выбрана в качестве референсной РНК ввиду отсутствия вариабельности уровня экспрессии во всех проанализированных образцах.

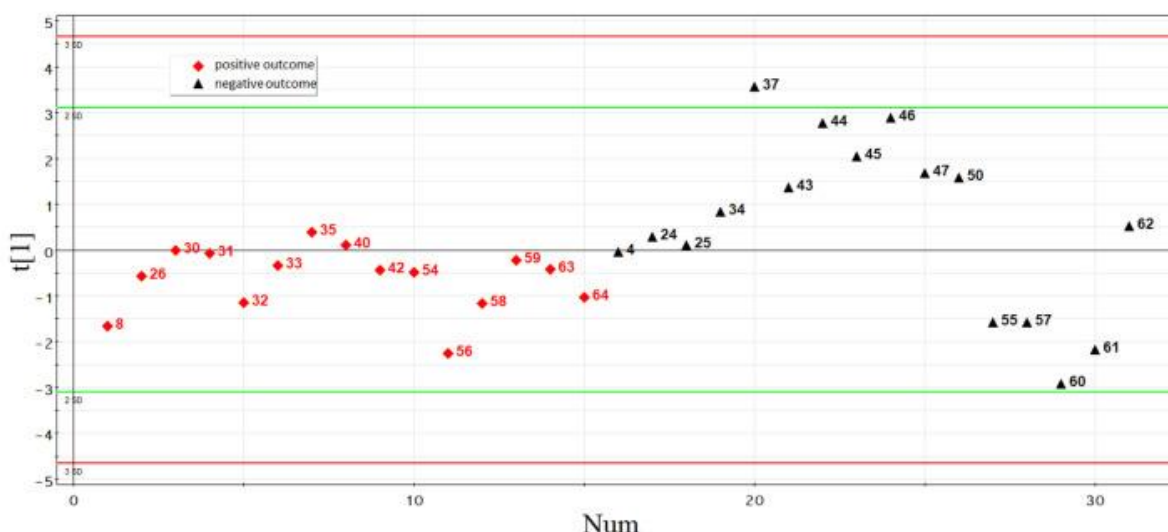


Рисунок 8. График распределения образцов культуральной среды от бластоцист по уровню экспрессии мнкРНК при использовании метода анализа главных КОМПОНЕНТ

На данном рисунке показано, что образцы культуральной среды эмбрионов с имплантационным потенциалом (обозначены красными квадратами) образуют отдельный кластер и отличаются от большинства (62,5%) образцов культуральной среды эмбрионов без имплантационного потенциала (обозначены черными треугольниками) по профилю экспрессии мнкРНК. Образцы № 4, № 25, № 55, № 55, № 57, № 60 и № 61 из группы бластоцист без имплантации были исключены из дальнейшего анализа из-за сходства их профиля экспрессии мнкРНК культуральной среды с профилем культуральной среды бластоцист с имплантацией и возможного негативного влияния других причин, в том числе отсутствия рецептивности эндометрия, на исход программы ВРТ. Например, у пациентки №4 диагностировано вторичное бесплодие в течение 4 лет, два самопроизвольных выкидыша, отдельное диагностическое выскабливание полости матки и полипэктомия. У пациентки №25 диагностировано вторичное бесплодие в течение двух лет, две внематочные беременности с последующим образованием спаечного процесса в малом тазу, один самопроизвольный выкидыш; ей была выполнена односторонняя тубэктомия и отдельное диагностическое выскабливание полости матки и полипэктомия. У пациентки № 55 было диагностировано первичное бесплодие в течение 4 лет, спаечный процесс

в малом тазу в связи с проведенным ранее оперативным вмешательством на органах брюшной полости и раздельное диагностическое выскабливание полости матки. У пациентки №57 диагностировано первичное бесплодие в течение 7 лет, наружный генитальный эндометриоз, который был выявлен при проведении лапароскопии с коагуляцией очагов эндометриоза, раздельное диагностическое выскабливание, одна программа ЭКО/ИКСИ без положительного эффекта. У пациентки №60 диагностировано вторичное бесплодие в течение 6 лет, проведено раздельное диагностическое выскабливание, самопроизвольный выкидыш на раннем сроке, тубэктомия по поводу внематочной беременности с последующим развитием спаечного процесса в малом тазу, аденомиоз, две программы ЭКО/ИКСИ без положительного эффекта. У пациентки №61 в течение 2 лет диагностировано первичное бесплодие. После исключения из рассмотрения упомянутых выше образцов была построена модель дискриминантного анализа с частичной регрессией наименьших квадратов (PLS-DA) по уровню экспрессии мнкРНК в среде культивирования бластоцист, измеренному методом количественной ОТ-ПЦР (Рисунок 9). На Рисунке 9 можно видеть два четко сформированных кластера. Первый кластер (выделен красным цветом) имеет абсциссу менее 0,1 и представляет образцы культуральной среды из-под хороших/отличных бластоцист, имплантировавшихся после переноса их в полость матки. Вторым кластер (выделен черным) имеет абсциссу более 0,1 и представляет собой образцы культуральной среды из-под хороших/отличных бластоцист, не имплантировавшихся после переноса их в полость матки.

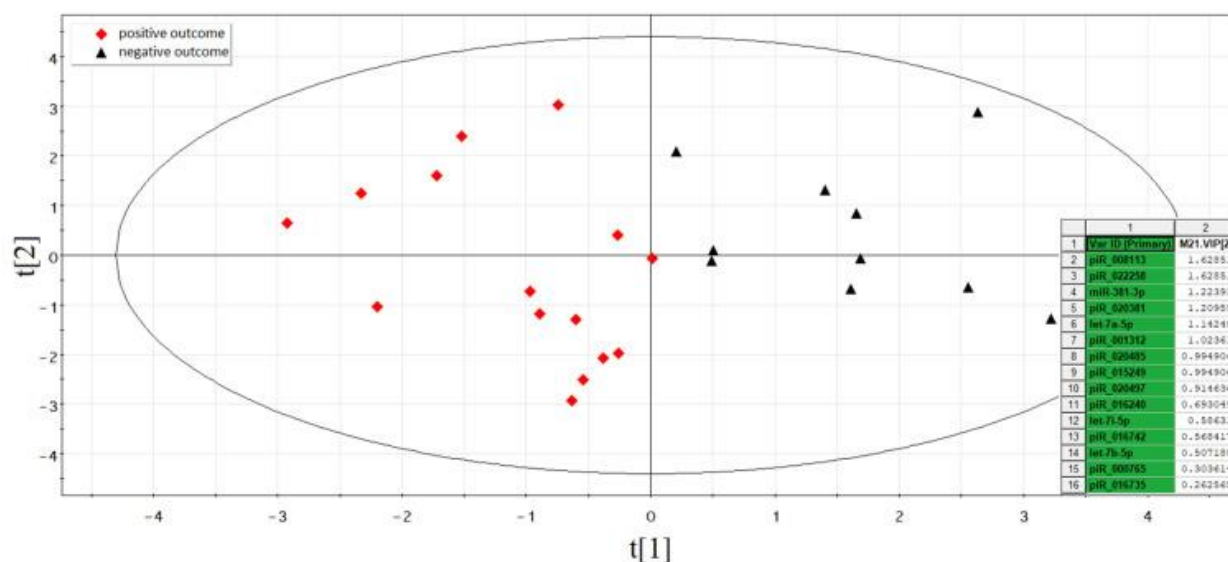


Рисунок 9. Модель PLS-DA для образцов культуральной среды бластоцист

Вклад мнкРНК в распределение точек данных на графике разработанной модели PLS-DA оценивали по значениям Variable Importance in Projection (VIP) для групп эмбрионов с имплантацией и ее отсутствием. Значения VIP представлены в виде вставки в правой части графика (Рисунок 9). МнкРНК с $VIP \geq 1$ и наибольшим влиянием на различия между имплантированными и неимплантированными эмбрионами были следующими: hsa_piR_008113 ($VIP = 1.63$), hsa_piR_022258 ($VIP = 1.63$), hsa-miR-381 ($VIP = 1.22$), hsa_piR_020381 ($VIP = 1.21$), hsa-let-7a-5p ($VIP = 1.14$), hsa_piR_001312 ($VIP = 1.02$), hsa_piR_020485 ($VIP = 0.99$) и hsa_piR_015249 ($VIP = 0.99$).

На основании значений ($-\Delta\Delta Ct$) мнкРНК в культуральной среде бластоцист, полученных от супружеских пар с отрицательными и положительными результатами программы ВРТ, были разработаны различные варианты модели логистической регрессии для расчета вероятности имплантации эмбриона (Рисунок 10).

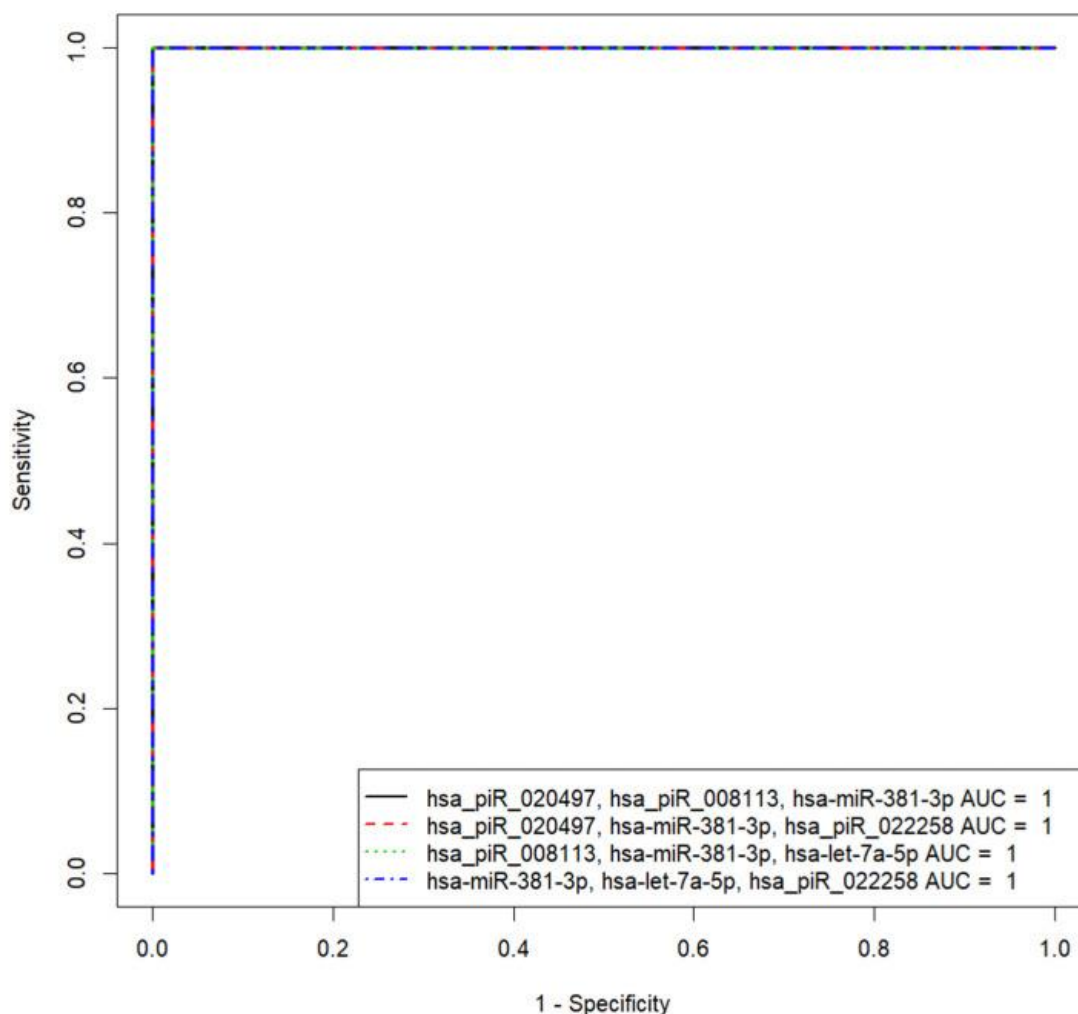


Рисунок 10. ROC-кривые модели логистической регрессии для прогнозирования имплантационного потенциала эмбриона на стадии бластоцисты

Характеристики построенных моделей логистической регрессии представлены в Таблице 16 и 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 «- $\Delta\Delta Ct$ » для каждой из мнкРНК

Исходя из полученных данных обнаружено, что прогностическая точность моделей при оценке уровня экспрессии мнкРНК в любой комбинации, представленной на Рисунке 9 и в Таблице 16, составила 100 % (AUC = 1, чувствительность — 100 %, специфичность — 100 %, частота истинно

положительных результатов — 1, частота ложноположительных результатов — 0).

Таблица 16 - Параметры разработанной логистической регрессионной модели

мнкРНК	AUC	Sp, %	Se, %	Уровень отсечки	I	K
hsa_piR_020497, hsa_piR_008113, hsa-miR-381-3p	1	100	100	0.5	1860.371618	-1999.768215, 33.45.749357, -98.52044368
hsa_piR_020497, hsa-miR-381-3p, hsa_piR_022258	1	100	100	0.5	1860.371618	-1999.768215, -98.52044368, -3345.749357
hsa_piR_008113, hsa-miR-381-3p, hsa-let-7a-5p	1	100	100	0.5	-6233.293319	6761.631563, -516.0692614, -369.5848655
hsa-miR-381-3p, hsa-let-7a-5p, hsa_piR_022258	1	100	100	0.5	-6233.293319	-516.0692614, -369.5848655, -6761.631563

Для определения потенциальных мРНК-мишеней микроРНК hsa-let-7a-5p, hsa-let-7b-5p, hsa-let-7i-5p и hsa-miR-381-3p была использована электронная база данных miRtargetlink (<https://ccb-web.cs.uni-saarland.de/mirtargetlink/>), а для поиска потенциальных мишеней пивирНК hsa_piR_020497, hsa_piR_008113, hsa_piR_022258 был использован алгоритм miRanda для сопоставления с последовательностями транскриптов RefSeq базы данных GRCh38 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/>) при бальной оценке выравнивания $sc \geq 170$ и энергии связи $en \leq -20,0$ ккал моль⁻¹ как описано в статье Тимофеевой А.В. и др. [121]. С целью оценки функциональной значимости генов-мишеней, ассоциированных с имплантационным потенциалом мнкРНК был проведен анализ обогащения белков, кодируемых этими генами, в Metascape с использованием баз данных Gene Ontology и Reactome как показано на Рисунке 11.

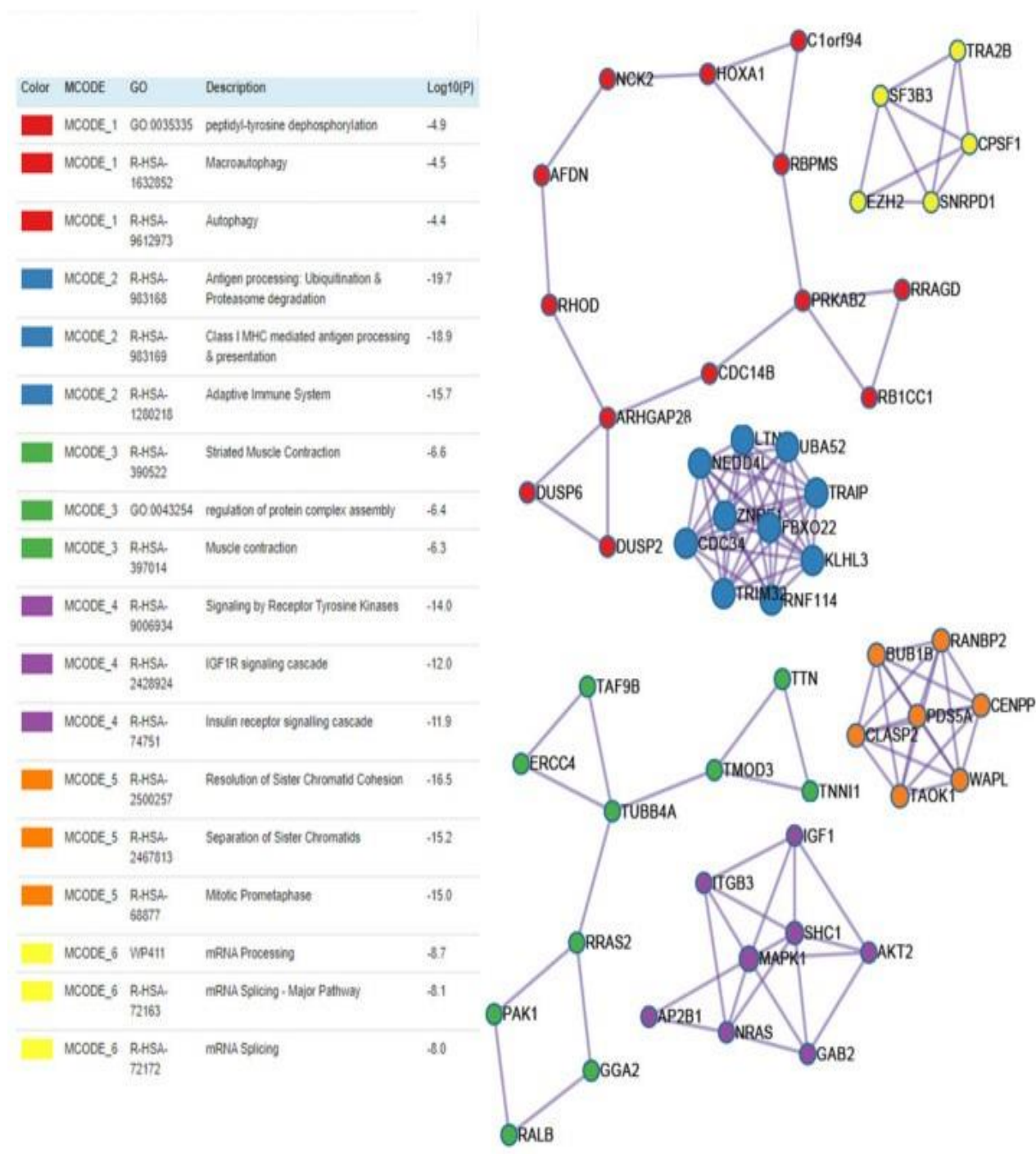


Рисунок 11. Участие белковых продуктов генов-мишеней мнкРНК, ассоциированных с имплантационным потенциалом бластоцисты, в биологических процессах по данным электронной базы Metascape

На данном рисунке показано, что белковые продукты генов-мишеней мнкРНК, ассоциированных с имплантационным потенциалом бластоцисты, участвуют в процессах убиквитинирования, протеасомной деградации, аутофагии,

в процессинге мРНК и разделении сестринских хроматид во время митоза – основных процессах раннего эмбриогенеза, четкая координация которых в клеточном пространстве и времени обеспечивает правильное развитие зародыша. Полученные данные позволяют оптимизировать алгоритм выбора эмбриона с наибольшим имплантационным потенциалом в программах ВРТ, а также прогнозировать исходы данных программ.

3.7 Роль малых некодирующих РНК в оогенезе и последующем эмбриогенезе

На данном этапе исследования производилась оценка уровня экспрессии мнкРНК в 103 образцах фолликулярной жидкости правого и левого яичников 52 пациенток. Оценивали уровень экспрессии мнкРНК не в одной фолликуле, а суммарно во всех фолликулах каждого яичника. С целью получения усредненного профиля экспрессии мнкРНК фолликулярной жидкости каждой пациентки на этапе глубокого секвенирования, были объединены образцы фолликулярной жидкости из левого и правого яичника. Для шести пациенток с различным качеством ооцитов по морфометрическим показателям, их способности к оплодотворению и формированию бластоцист хорошего/отличного качества, в зависимости от результата программы ВРТ (Таблица 17) были получены шесть профилей мнкРНК.

Таблица 17 – Характеристика эмбриологического этапа и исхода программы ВРТ у пациенток с различным качеством ооцитов

Пациентка супружеской пары	МШ/ОКК	2pn/МШ	Бластоцисты/2pn	Результат программы ВРТ
1	1	1	0,8	отрицательный
2	0,8	1	0,3	отрицательный
3 (низкое качество)	0,4	1	0	отрицательный

ооцитов)				
4 (низкое качество ооцитов)	0,4	1	0	отрицательный
5	1	0,6	0	отрицательный
6	0,8	1	1	положительный

Для валидации данных секвенирования методом количественной ПЦР в реальном времени в 103 образцах были выбраны 22 мкРНК и 19 пивирНК, дифференцирующие как минимум образцы пациенток 3 и 4 от контрольного образца пациентки 6. Наибольший вклад в распределение 103 образцов фолликулярной жидкости внесли молекулы piR_020497, piR_020500 и let-7f-5p с формированием следующих кластеров образцов как показано на Рисунке 12: кластер «А» образцов с профилем экспрессии мнкРНК, одинаковым в обоих яичниках у каждой пациентки с положительным результатом программы ВРТ; кластер «В» образцов с профилем экспрессии мнкРНК, одинаковым в обоих яичниках у каждой пациентки с отрицательным результатом программы ВРТ; кластер «С» образцов с профилем экспрессии мнкРНК в одном из яичников пациентки как в кластере В, а в другом из яичников этой же пациентки как в кластере А, при этом результат программы ВРТ мог быть либо положительным, либо отрицательным. То есть вероятно, что в случае образцов кластера «С» беременность наступала, если для переноса в полость матки отбирали эмбрион, полученный в результате оплодотворения ооцита из того яичника, где профиль экспрессии мнкРНК фолликулярной жидкости был подобен профилю кластеру «А», но не «В». Могла быть обратная ситуация в случае образцов кластера «С»: отрицательный результат программы ВРТ мог быть вследствие переноса в полость матки эмбриона, полученного в результате оплодотворения ооцита из

яичника с профилем экспрессии мнкРНК фолликулярной жидкости, подобным кластеру «В», но не «А».

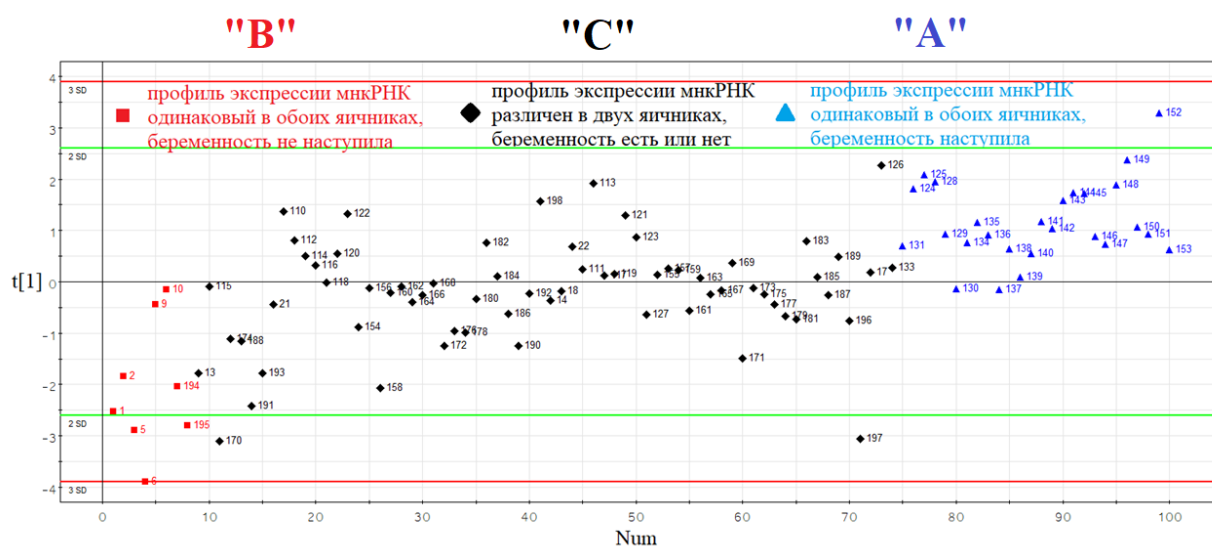


Рисунок 12. График распределения образцов фолликулярной жидкости левого и правого яичников по уровню экспрессии мнкРНК при использовании метода анализа главных компонент

В построении модели логистической регрессии прогнозирования качества ооцита, ассоциированного с дальнейшим наступлением беременности после переноса эмбриона в полость матки, участвовали образцы кластера «А» и «В» Рисунок 12. Характеристики построенных моделей логистической регрессии и формула расчета вероятности наличия качественного ооцита в фолликулярной жидкости яичника представлены на Рисунке 13.

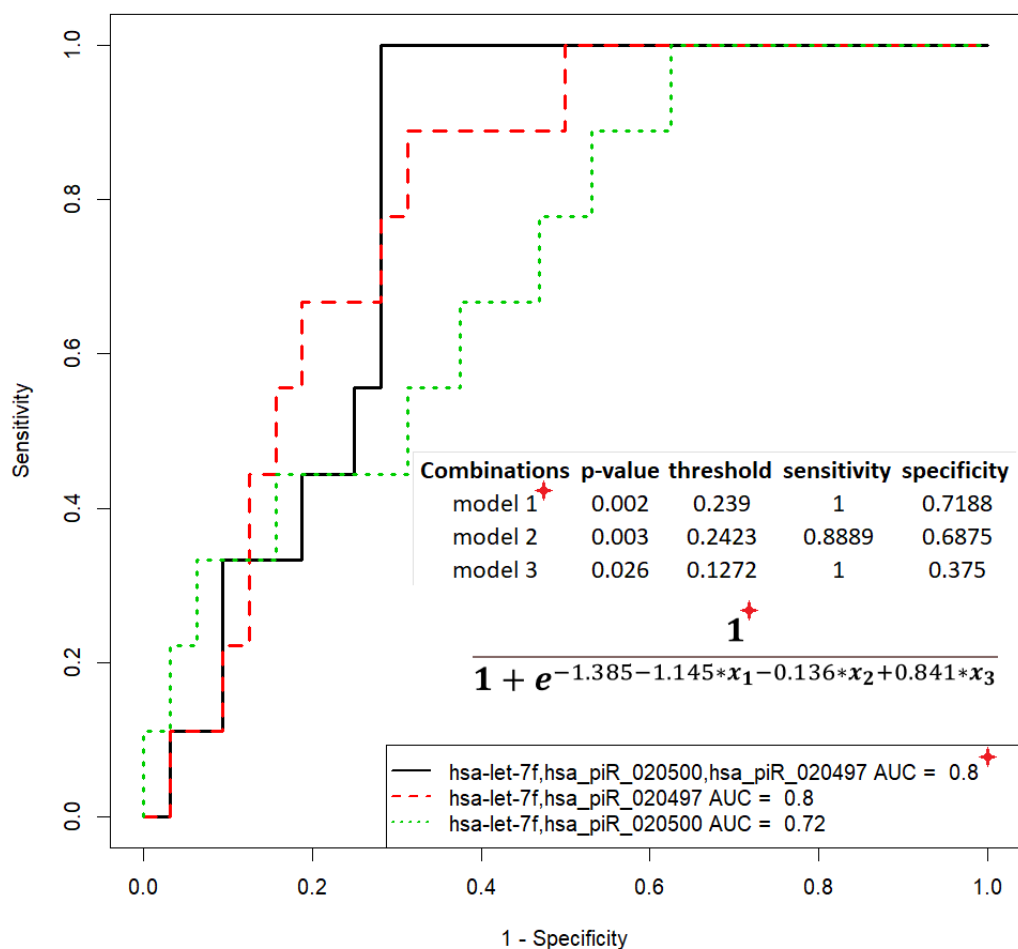


Рисунок 13. Модель логистической регрессии оценки качества ооцита по профилю экспрессии мнкРНК в фолликулярной жидкости. Формула оценки качества ооцита представлена для модели 1, отмеченной звездочкой, и включает в себя параметры x_1 , x_2 , x_3 – значения «- $\Delta\Delta Ct$ » для каждой из трех мнкРНК

При оценке взаимосвязи качества ооцитов и получаемых эмбрионов у одной и той же пациентки были найдены корреляции медианы уровня экспрессии мнкРНК фолликулярной жидкости левого и правого яичника с уровнем экспрессии мнкРНК в среде культивирования получаемой бластоцисты, перенесенной в полость матки. Корреляционная матрица представлена на Рисунке 14.

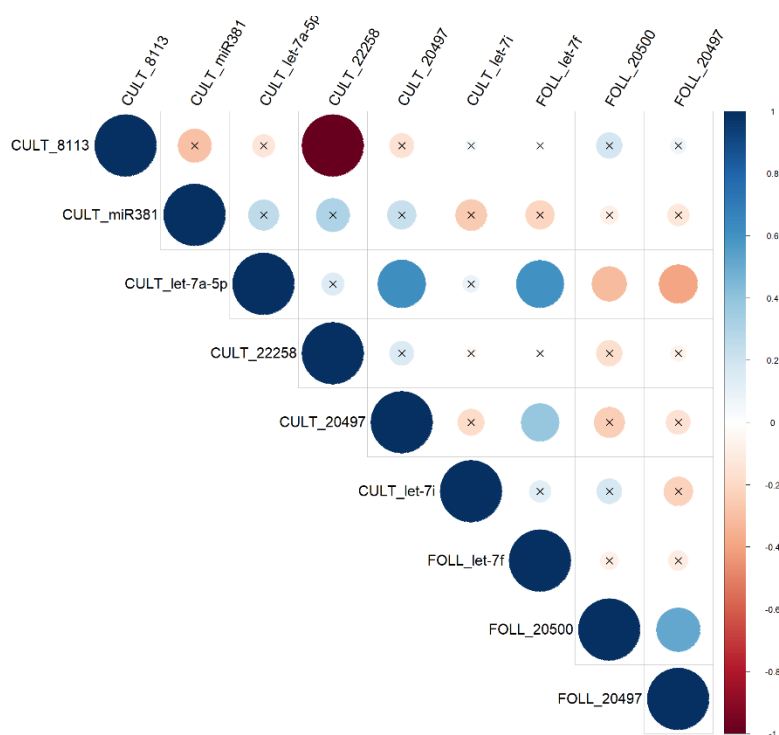


Рисунок 14. Корреляционная матрица уровня экспрессии мнкРНК в фолликулярной жидкости и среде культивирования эмбриона по результатам непараметрического метода ранговой корреляции Спирмена. Значимые ($p < 0,05$) корреляции отмечены точкой, незначимые корреляции отмечены крестиком, положительные корреляции отмечены синим цветом, а отрицательные корреляции красным цветом — чем значительнее корреляция, тем больше размер точки

Были выявлены статистически значимые корреляции уровня экспрессии *hsa-let-7a-5p* в среде культивирования бластоцисты хорошего/отличного качества с уровнем экспрессии *hsa-let-7f-5p* ($r=0,6$, $p=0,0022$), *hsa_piR_020500* ($r=-0,32$, $p=0,05$) и *hsa_piR_020497* ($r=-0,4$, $p=0,05$) в фолликулярной жидкости, а также уровня экспрессии *hsa_piR_020497* в среде культивирования бластоцисты с уровнем экспрессии *hsa-let-7f-5p* ($r=0,38$, $p=0,05$) в фолликулярной жидкости. Выявленные статистически значимые корреляции между уровнем экспрессии мнкРНК, ассоциированных с качеством ооцита, и уровнем экспрессии мнкРНК, определяющих имплантационный потенциал получаемой бластоцисты, отображают влияние молекулярно-биологических свойств оплодотворяемого ооцита на потенциал развития получаемого эмбриона, переносимого в полость матки в программах ВРТ.

Таким образом, найдена наилучшая комбинация мнкРНК (piR_020497, piR_020500 и let-7f-5p), по уровню экспрессии которых построена модель, статистически значимо ($p=0,002$) прогнозирующая со 100 % чувствительностью и 72 % специфичностью наличие качественного ооцита в фолликулярной жидкости яичника, способного к оплодотворению и образованию бластоцисты хорошего/отличного качества с высоким имплантационным потенциалом.

3.8 Анализ взаимосвязи прегравидарной подготовки, качества ооцитов и уровня экспрессии мнкРНК в фолликулярной жидкости яичников.

Из 52 супружеских пар, включенных в исследование, 3 супружеским парам с отрицательным исходом программы ЭКО была назначена прегравидарная подготовка перед проведением повторного лечения. Данные супружеские пары были включены в дальнейшее исследование с целью определения влияния прегравидарной подготовки на качество ооцитов на основании оценки профиля мнкРНК в фолликулярной жидкости. Характеристика эмбриологического этапа данных трех пациенток до прегравидарной подготовки указана в Таблице 18.

Таблица 18 - Характеристика эмбриологического этапа супружеских пар до прегравидарной подготовки

Параметр		Супружеская пара I	Супружеская пара II	Супружеская пара III
Количество фолликулов в день проведения ТВП	Левый яичник	4	4	5
	Правый яичник	6	4	4
Количество полученных ОКК		7	6	7
Количество ооцитов МII		3	5	5
Количество MI ооцитов		2	0	1
Количество GV		2	1	0
Количество дегенеративных ооцитов		0	0	1
Количество 2PN		4	5	3
Количество бластоцист		0	1 (4AA)	1 (4AA)
Количество криоконсервированных эмбрионов		0	0	0

Количество эмбрионов неудовлетворительного качества	4 (5в, 8в, 8в, 3с)	4 (7с, 2СС, 8с, 4с)	2 (3с, 6в)
% морфологически нормальных сперматозоидов в день ТВП	2%	2%	3%
% прогрессивно подвижных Сперматозоидов в день ТВП	72%	55%	55%
Общая концентрация сперматозоидов в 1 мл эякулята	68	69	120

При морфологической оценке качества полученных ооцитов у пациентки супружеской пары I было обнаружено низкое качество ооцитов, которое характеризовалось гранулярностью цитоплазмы, наличием вакуолей в цитоплазме, а также темной цитоплазмой. В связи с отсутствием эмбриона удовлетворительного качества, пригодного к переносу в полость матки, этап переноса эмбриона был отменен.

У II и III супружеских пар на 5-е сутки после проведения трансвагинальной пункции фолликулов в асептических условиях под УЗ-контролем был произведен перенос 1 эмбриона в полость матки. Через 14 дней после проведения переноса эмбриона в полость матки пациенткам было произведено определение концентрации β -ХГЧ в сыворотке крови. У пациентки II супружеской пары было диагностировано повышение уровня β -ХГ, что свидетельствовало о положительном тесте на беременность, в то время как у пациентки III супружеской пары тест на беременность был отрицательным. Через 21 день после переноса эмбриона в полость матки пациентке II супружеской пары было произведено УЗИ органов малого таза, по результатам которого была подтверждена клиническая беременность. У данной пациентки на сроке беременности 8 недель при проведении УЗ-исследования была диагностирована неразвивающаяся беременность, в связи с чем была выполнена вакуум-аспирация плода. При проведении цитогенетического исследования определен кариотип абортуса – 46XX.

Учитывая неудовлетворительные исходы программы ЭКО у данных пациенток, им была назначена прегравидарная подготовка: витамин Д, Омега-3 и

мио-инозитол в сочетании с фолиевой кислотой. Дозировка препаратов, а также кратность и длительность приема данных препаратов, были назначены согласно инструкции к применению.

После проведения прегравидарной подготовки пациентки обратились в отделение с целью проведения повторной программы ЭКО. Стимуляция овуляции у обследуемых женщин проводилась по протоколу, аналогичному предыдущему стимулированному циклу. На эмбриологическом этапе проводили: оценку степени зрелости ооцитов, показателей спермограммы в день ТВП с отбором сперматозоидов, оплодотворение ооцитов и дальнейшее культивирование полученных эмбрионов. Характеристика данных эмбриологических этапов представлена в Таблице 19.

Таблица 19 - Характеристика эмбриологического этапа супружеских пар после прегравидарной подготовки

Параметр		Супружеская пара I	Супружеская пара II	Супружеская пара III
Количество фолликулов в день проведения ТВП	Левый яичник	4	4	10
	Правый яичник	6	5	5
Количество полученных ОКК		9	5	15
Количество ооцитов МП		6	5	8
Количество МI ооцитов		0	0	1
Количество GV		3	0	5
Количество дегенеративных ооцитов		0	0	1
Количество 2PN		6	5	7
Количество бластоцист/морул		3 (4AA, 3BB, 3AB)	1 (морула)	3 (2 морулы на 4 сутки; 2BB на 5 сутки)
Количество криоконсервированных эмбрионов		2	0	1
Количество эмбрионов неудовлетворительного качества		3 (8в, 10в, 8в)	4 (10с, 8с, 7с, 6с)	4 (10с, 10а, 10а, 10с, 10с)
% морфологически нормальных сперматозоидов в день ТВП		3%	3%	3%
% прогрессивно подвижных Сперматозоидов в день ТВП		66%	77%	63%
Общая конц. сперматозоидов в 1 мл эякулята		41	141	61

Через 14 дней после проведения переноса эмбриона в полость матки всем пациенткам было произведено определение концентрации бета-субъединицы хорионического гонадотропина человека (β -ХГЧ) в сыворотке крови. У пациенток I и III супружеских пар было диагностировано повышение уровня β -ХГЧ, что свидетельствовало о положительном тесте на беременность, в то время как у пациентки II супружеской пары тест на беременность был отрицательным. Через 21 день после переноса эмбриона в полость матки пациенткам I и III супружеских пар было произведено УЗИ органов малого таза, по результатам которого была подтверждена клиническая беременность. У пациентки III супружеской пары на сроке беременности 10 недель при проведении УЗ-исследования была диагностирована неразвивающаяся беременность, в связи с чем было произведено инструментальное удаление плодного яйца с последующим выскабливанием полости матки. При проведении цитогенетического исследования определен кариотип абортуса – 46XX. У пациентки I супружеской пары исход данного цикла ВРТ завершился своевременными самопроизвольными родами здоровым плодом.

Образцы фолликулярной жидкости из левого и правого яичников пациенток из 3 супружеских пар, описанных выше, до и после прегравидарной подготовки были сопоставлены со всей выборкой образцов фолликулярной жидкости из левого и правого яичника пациенток, включенных в исследование с отрицательным и положительным результатом программы ВРТ, по уровню экспрессии одной из молекул мнкРНК, детерминирующей качество ооцита, а именно hsa_piR_020497 (смотри выше в разделе 3.7. «Роль малых некодирующих РНК в оогенезе и последующем эмбриогенезе»). Данные сравнительного анализа представлены на Рисунке 15 для пациентки супружеской пары I, на Рисунке 16 – для пациентки супружеской пары II, на Рисунке 17 – для пациентки супружеской пары III).

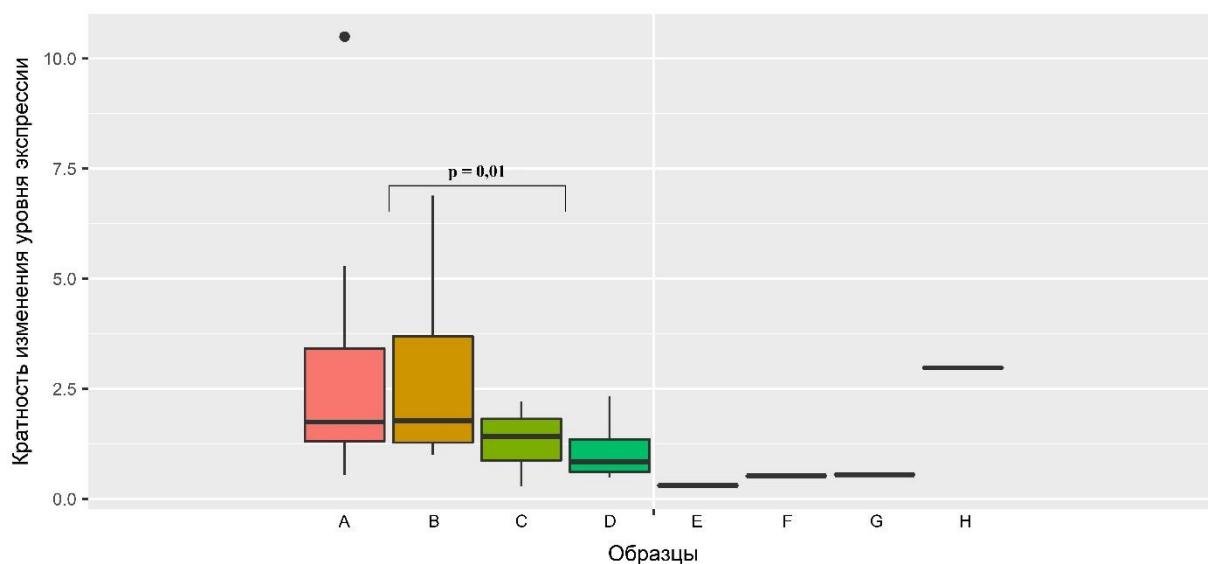


Рисунок 15. Кратность изменения уровня экспрессии пивиРНК hsa_piR_020497 в образцах фолликулярной жидкости левого яичника (А) и правого яичника (В) группы женщин с наступившей беременностью, левого яичника (С) и правого яичника (D) группы женщин с отрицательным результатом программы ВРТ, левого яичника (Е) и правого яичника (F) пациентки супружеской пары I до прегравидарной подготовки, левого яичника (G) и правого яичника (H) пациентки супружеской пары I после прегравидарной подготовки. Границами бокса (A-D) служат первый и третий квартили, линия в середине бокса — медиана; концы усов — разность первого квартиля и полуторной величины межквартильного расстояния, сумма третьего квартиля и полуторной величины межквартильного расстояния

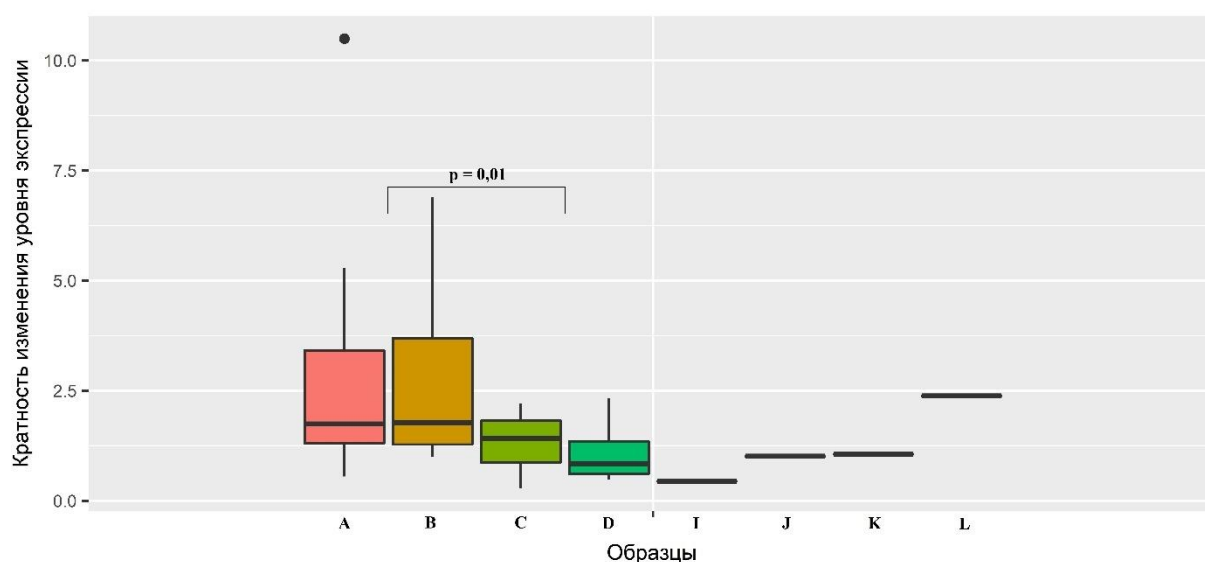


Рисунок 16. Кратность изменения уровня экспрессии пивиРНК hsa_piR_020497 в образцах фолликулярной жидкости левого яичника (А) и правого яичника (В) группы женщин с наступившей беременностью, левого яичника (С) и правого яичника (D) группы женщин с отрицательным результатом программы ВРТ, левого яичника (I) и правого яичника (J) пациентки супружеской пары II до

прегравидарной подготовки, левого яичника (К) и правого яичника (Л) пациентки супружеской пары II после прегравидарной подготовки. Границами бокса (А-Д) служат первый и третий квартили, линия в середине бокса — медиана; концы усов — разность первого квартиля и полуторной величины межквартильного расстояния, сумма третьего квартиля и полуторной величины межквартильного расстояния

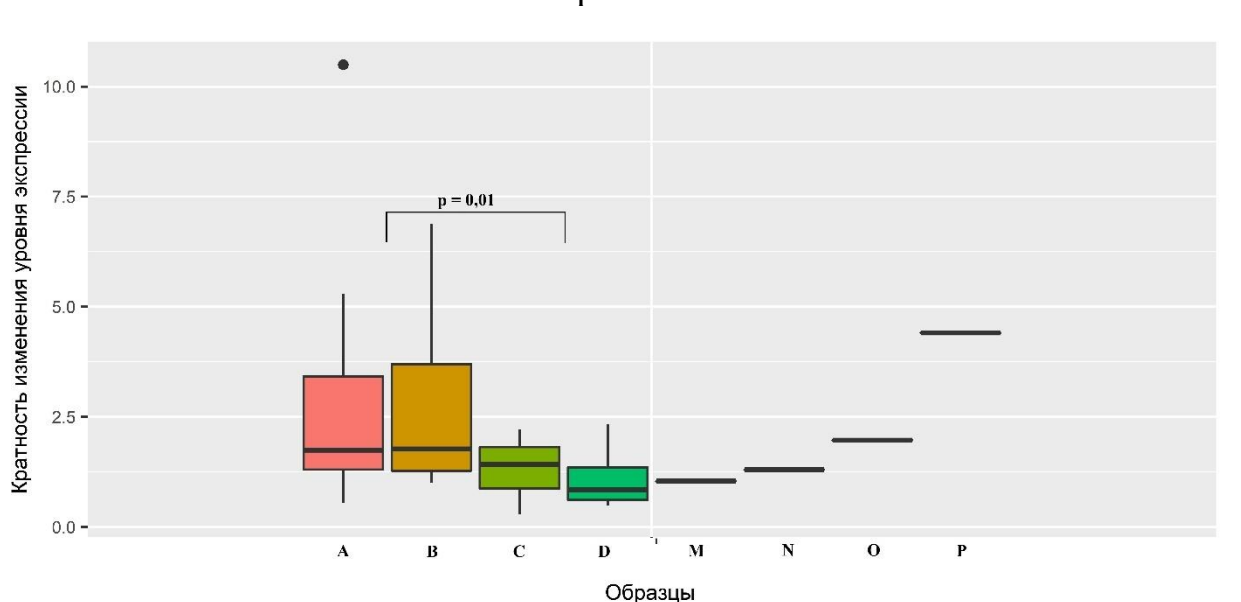


Рисунок 17. Кратность изменения уровня экспрессии пивиРНК hsa_piR_020497 в образцах фолликулярной жидкости левого яичника (А) и правого яичника (В) группы женщин с наступившей беременностью, левого яичника (С) и правого яичника (D) группы женщин с отрицательным результатом программы ВРТ, левого яичника (М) и правого яичника (N) пациентки супружеской пары III до прегравидарной подготовки, левого яичника (О) и правого яичника (Р) пациентки супружеской пары III после прегравидарной подготовки. Границами бокса (А-Д) служат первый и третий квартили, линия в середине бокса — медиана; концы усов — разность первого квартиля и полуторной величины межквартильного расстояния, сумма третьего квартиля и полуторной величины межквартильного расстояния

Выявлено статистически значимое различие ($p = 0,01$) между группой женщин с наступившей беременностью и группой женщин с отсутствием беременности в виде более высокого усредненного уровня экспрессии hsa_piR_020497 в фолликулярной жидкости левого и правого яичника у пациенток с положительным результатом ВРТ ((1,74 (1,3;3,41) и 1,77 (1,28;3,69), соответственно) относительно группы пациенток с отрицательным результатом ВРТ ((1,42(0,87;1,82) и 0,84(0,61;1,35), соответственно)).

У пациентки из супружеской пары I после прегравидарной подготовки обнаружено повышение уровня экспрессии hsa_piR_020497 в фолликулярной жидкости правого яичника ((2,98(2,98;2,98)) до значений уровня экспрессии hsa_piR_020497, характерных для левого и правого яичника группы пациенток с наступившей беременностью (((1,74 (1,3;3,41) и 1,77 (1,28;3,69), соответственно), при сравнении с таковым в фолликулярной жидкости из левого и правого яичника данной пациентки до прегравидарной подготовки ((0,52(0,52; 0,52) и (0,3(0,3;0,3), соответственно) (Рисунок 15). Отсутствие изменений уровня экспрессии hsa_piR_020497 в фолликулярной жидкости из левого яичника после проведенной прегравидарной подготовки ((0,55(0,55;0,55)) может быть связано с наличием эндометриоидной кисты и возможного долгосрочного отрицательного влияния на фолликулогенез в данном яичнике. После проведенной прегравидарной подготовки улучшилось качество полученных ооцитов и, как следствие, всех эмбриологических показателей (Таблица 19). В результате данный цикл ВРТ завершился наступлением беременности и своевременными самопроизвольными родами здоровым плодом.

У пациентки супружеской пары II обнаружено увеличение уровня экспрессии hsa_piR_020497 в фолликулярной жидкости обоих яичников после прегравидарной подготовки с достижением значений уровня экспрессии hsa_piR_020497 в правом яичнике, характерных для группы пациенток с наступившей беременностью (Рисунок 16). Несмотря на изменения спектра мнкРНК в фолликулярной жидкости после проведенной прегравидарной подготовки, беременность у данной пациентки не наступила. Возможной причиной отрицательного исхода программы ВРТ может быть отягощенный акушерско-гинекологический анамнез данной пациентки. В анамнезе у данной пациентки был поздний выкидыш дихориальной триамниотической тройней в результате преждевременной отслойки нормально расположенной плаценты, развитием спаечного процесса в полости малого таза и, как следствие, непроходимости маточных труб.

У пациентки супружеской пары III после прегравидарной подготовки отмечалось улучшение эмбриологических характеристик, а именно: увеличение количества ОКК и числа эмбрионов, пригодных для переноса, по сравнению с предыдущим циклом ВРТ (Таблица 19). При оценке уровня экспрессии hsa_piR_020497 в фолликулярной жидкости обоих яичников было выявлено его значительное увеличение после прегравидарной подготовки (Рисунок 17) с достижением значений уровня экспрессии hsa_piR_020497, характерных для группы пациенток с наступившей беременностью. Исходом данного цикла ВРТ было наступление беременности, но на 10 неделе гестации была диагностирована неразвивающаяся беременность, в связи с чем было произведено инструментальное удаление плодного яйца с последующим выскабливанием полости матки. При проведении цитогенетического исследования определен кариотип абортуса – 46XX.

Далее был проведен анализ потенциальных генов-мишеней hsa_piR_020497. Было выявлено участие данных генов-мишеней в таких биологических процессах как: регуляция метаболизма нуклеиновых кислот (PAX4; JUNB; NHLH1); клеточный рост (SSH1); транспорт веществ (P2RX1); метаболизм белков (TRIM10); метаболических и энергетических процессах в клетке (NADSYN1) (Рисунок 18).

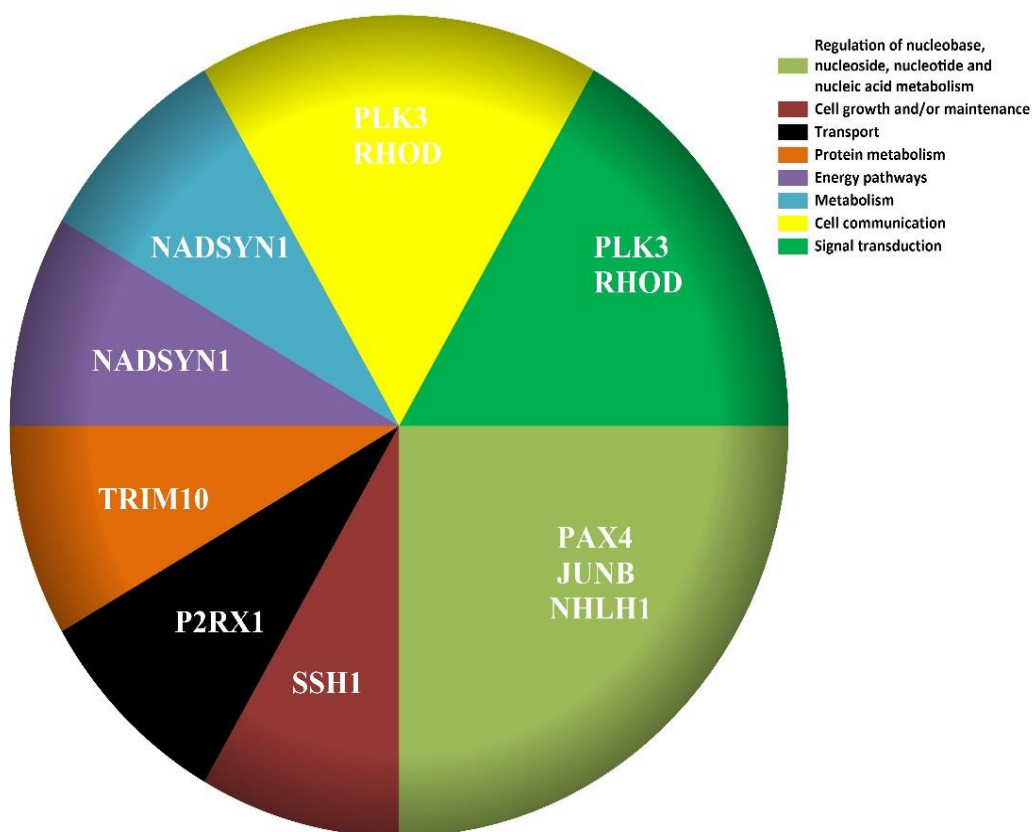


Рисунок 18. Участие белковых продуктов генов-мишеней hsa_piR_020497 в биологических процессах по результатам программы анализа функционального обогащения Finrich

При рассмотрении сигнальных путей, в которых участвуют белковые продукты генов-мишеней hsa_piR_020497 обращает на себя внимание участие JUNB, PLK3, SSH1 в основных сигнальных путях, отвечающих за формирование фолликула и созревание ооцита, а именно: сигнальных путях, опосредованных рецептором к эпидермальному ростовому фактору (ErbB), митоген-активированной протеинкиназой (МАРК), трансформирующим ростовым фактором бета (TGF β), инсулиноподобным ростовым фактором 1 (IGF1), а также фосфатидилинозитол-3-киназном пути, опосредованном действием Акт. Кроме того, белковые продукты других генов-мишеней hsa_piR_020497, P2RX1 и NADSYN1, принимают участие в регуляции концентрации цитозольного кальция и метаболизме витаминов и кофакторов (Рисунок 19).

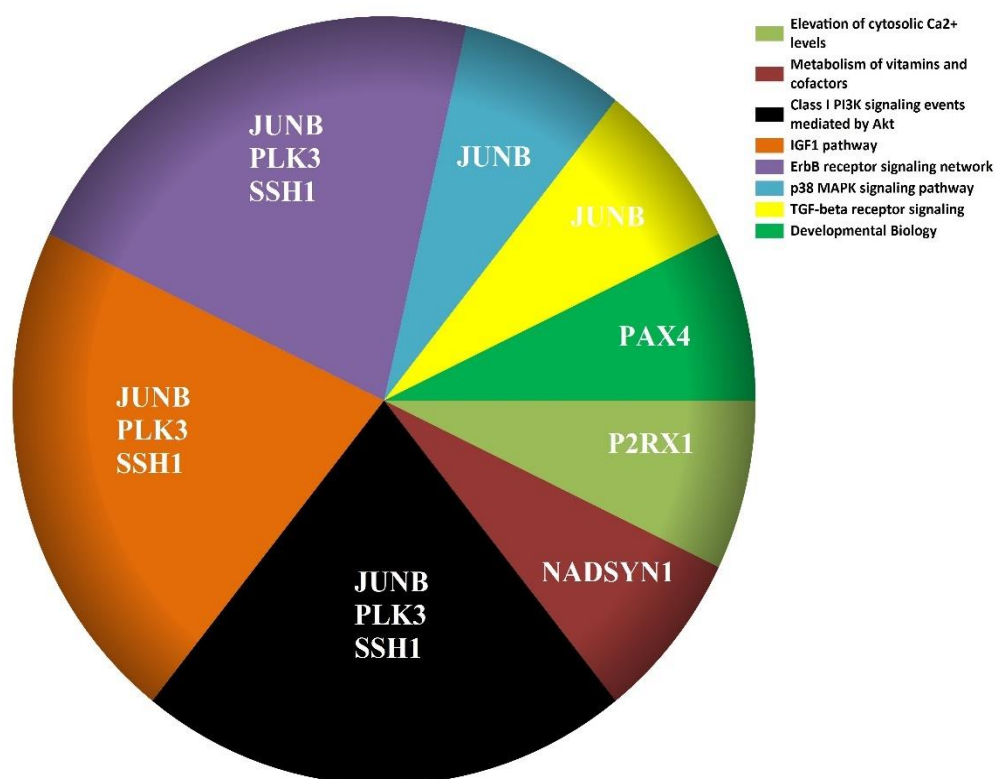


Рисунок 19. Участие белковых продуктов генов-мишеней hsa_piR_020497 в сигнальных путях по результатам программы анализа функционального обогащения Finrich

Таким образом, оценка влияния прегравидарной подготовки на молекулярно-биологический профиль фолликулярной жидкости, а также качество ооцитов, требует дальнейших исследований в связи с малым количеством случаев наблюдения в данной диссертационной работе.

3.9 Анализ профиля экспрессии мнкРНК в семенной плазме

На данном этапе исследования производилась оценка уровня экспрессии мнкРНК в 52 образцах семенной плазмы мужчин супружеских пар, включенных в исследование. Надо отметить, что критерием включения в настоящее исследование была нормозооспермия или мужской фактор бесплодия без выраженной патозооспермии, а критерием исключения были тяжелые формы мужского бесплодия. Из 52 пациентов были отобраны 6 пациентов с различными

характеристиками спермограммы и оплодотворяющей способностью с формированием бластоцист хорошего/отличного качества, в зависимости от результата программы ВРТ (Таблица 20) были получены шесть профилей мнкРНК.

Таблица 20 - Характеристика эмбриологического этапа и исхода программы ВРТ у партнеров с различными показателями спермограммы*

Пациент супружеской пары	Диагноз	2pn/МП	Бластоцисты/2pn	Результат программы ВРТ
1	тератозооспермия	1	0,8	отрицательный
2	Олиготератозооспермия	1	0,3	отрицательный
3	тератозооспермия	1	0	отрицательный
4	тератозооспермия	1	0	отрицательный
5	тератозооспермия	0,6	0	отрицательный
6	нормозооспермия	1	1	положительный

* Примечание: супружеские пары те же, что и при глубоком секвенировании мнкРНК фолликулярной жидкости

Для валидации данных секвенирования методом количественной ПЦР в реальном времени в 52 образцах были выбраны 24 мнкРНК и 23 пивнРНК, дифференцирующие образцы супружеских пар №№ 1-5 от контрольного образца супружеской пары № 6.

При использовании метода регрессии частных наименьших квадратов (PLS) наибольший вклад в распределение 52 образцов семенной плазмы внесли молекулы 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 с формированием трех кластеров образцов (Рисунок 20). «Кластер А» включал в себя образцы

семенной плазмы пациентов с нормозооспермией, в состав «Кластера Б» вошли образцы с тяжелой патозооспермией (2 образца с олиготератозооспермией, 2 образца с астенозооспермией, 2 образца с олигоастенотератозооспермией, 1 образец с криптозооспермией, 1 образец с единичными подвижными сперматозоидами), в состав «Кластера С» вошли образцы семенной плазмы пациентов с тератозооспермией, часть из которых имели профиль экспрессии мнкРНК схожий с профилем «Кластера А», а другая часть образцов имели профиль мнкРНК схожий с профилем «Кластера Б». Таким образом, не все образцы семенной плазмы пациентов с тератозооспермией имеют одинаковый молекулярно-биологический профиль: либо он приближен к норме, либо схож с профилем мнкРНК при выраженной патозооспермии.

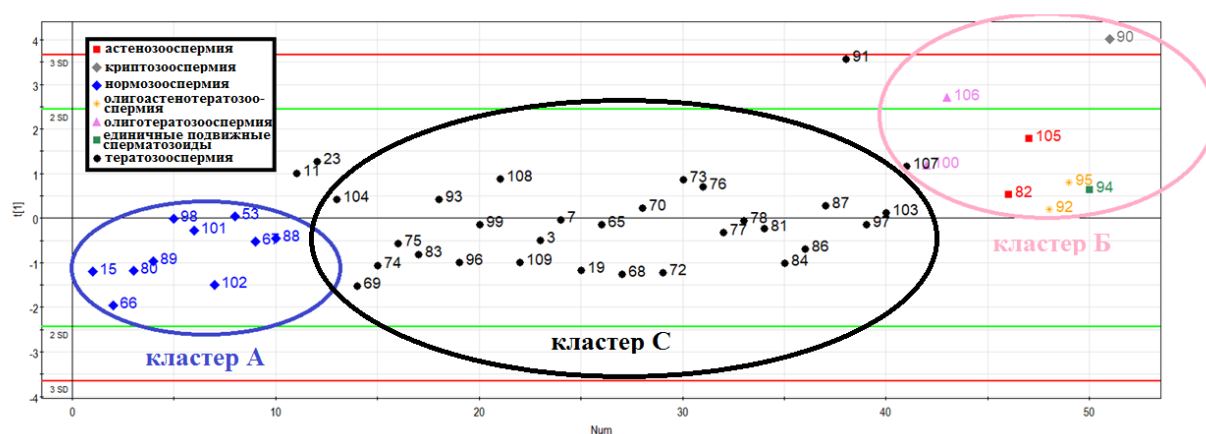


Рисунок 20. График распределения образцов семенной плазмы по уровню экспрессии мнкРНК при использовании метода регрессии частных наименьших квадратов (PLS)

Для классификации образцов полученных кластеров Рисунка 19 в зависимости от уровня экспрессии 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 был использован (PLS-DA), результаты применения которого представлены на Рисунке 21.

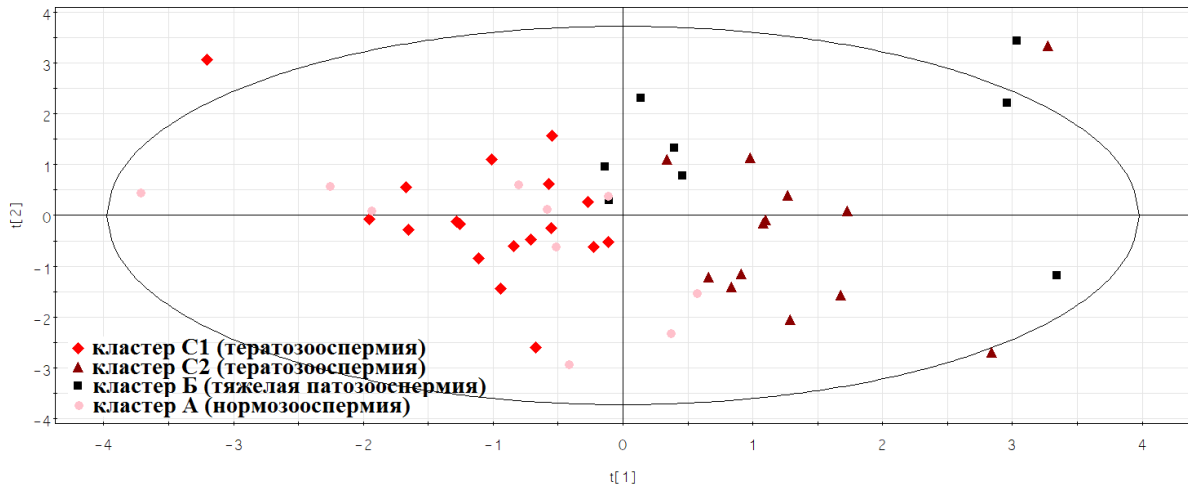


Рисунок 21. Классификация образцов нормозооспермии, тератозооспермии и тяжелой патозооспермии по уровню экспрессии мнкРНК при использовании алгоритма дискриминантного анализа регрессии частных наименьших квадратов (PLS-DA)

На Рисунке 21 наглядно видно пространственное расположение образцов тератозооспермии (кластер С) либо в области кластеризации образцов нормозооспермии (кластер С1, абсцисса меньше 0), либо в области кластеризации образцов тяжелой патозооспермии (кластер С2, абсцисса больше 0).

На основании значений уровня экспрессии 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 мужчин с тератозооспермией были разработаны различные варианты моделей логистической регрессии для оценки фертильности спермы (Рисунок 22).

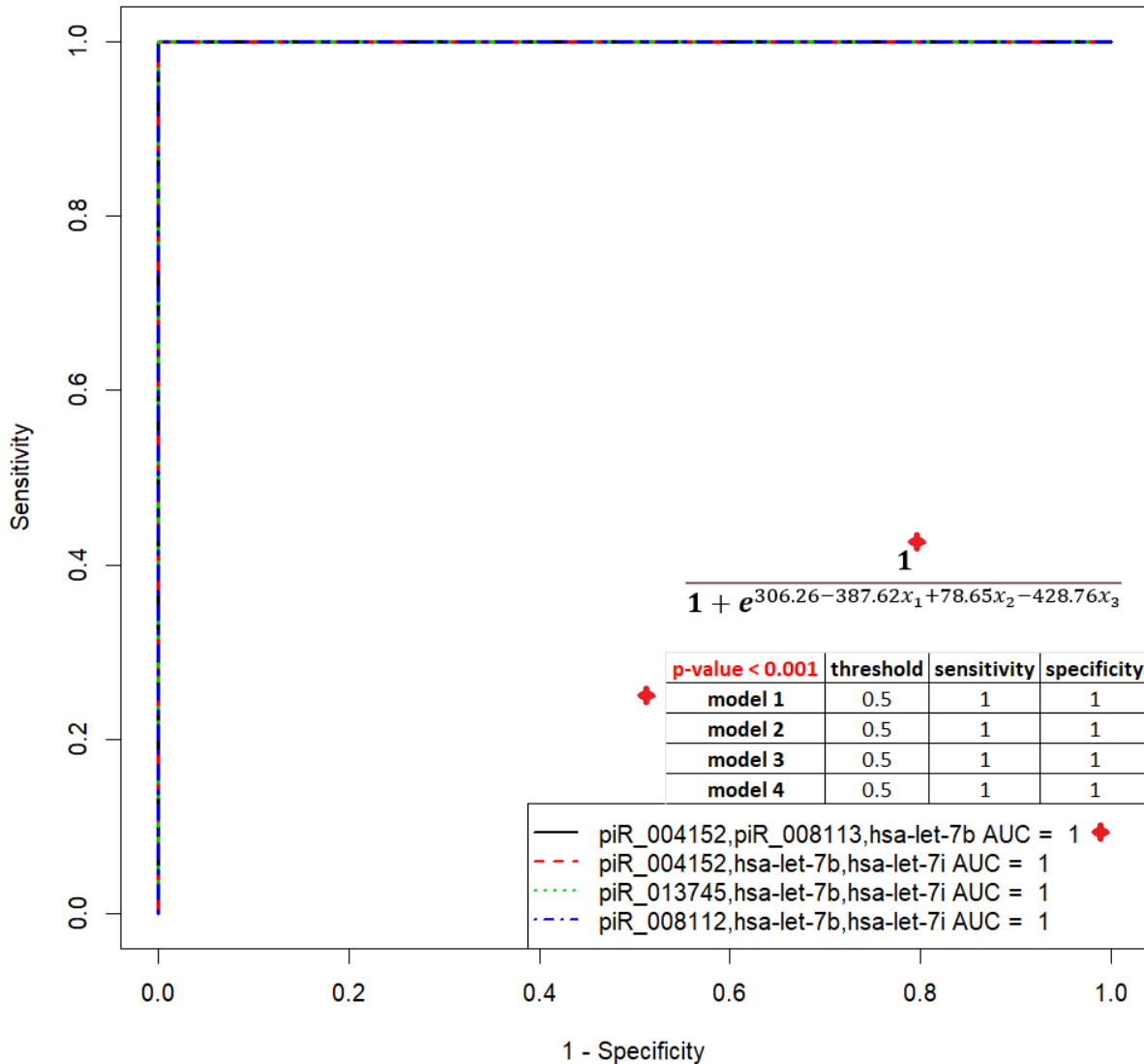


Рисунок 22. Модели логистической регрессии оценки фертильности спермы мужчин с тератозооспермией по профилю экспрессии мнкРНК в семенной плазме. Формула оценки фертильности спермы представлена для модели 1, отмеченной звездочкой, и включает в себя параметры x_1 , x_2 , x_3 – значения « $\Delta\Delta Ct$ » для каждой из трех мнкРНК

Исходя из полученных данных обнаружено, что прогностическая точность моделей при оценке уровня экспрессии мнкРНК в любой комбинации, представленной на Рисунке 22, 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 супружеской пары были найдены корреляции уровня экспрессии мнкРНК семенной плазмы пациента с уровнем экспрессии мнкРНК в среде культивирования получаемой бластоцисты, перенесенной в полость матки. Корреляционная матрица представлена на Рисунке 23.

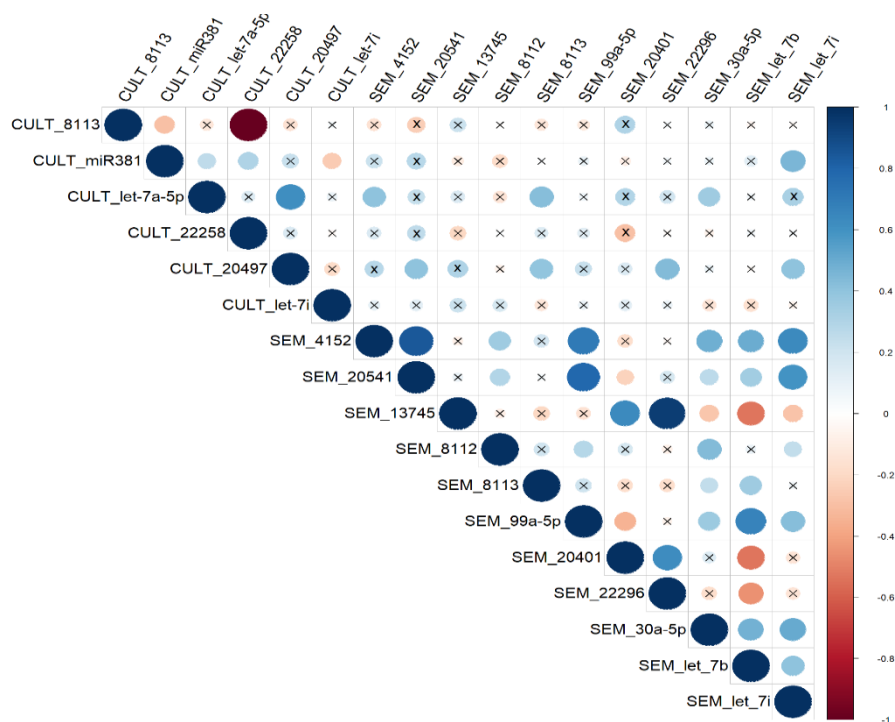


Рисунок 23. Корреляционная матрица уровня экспрессии мнкРНК в семенной плазме и среде культивирования эмбриона по результатам непараметрического метода ранговой корреляции Спирмена. Значимые ($p < 0,05$) корреляции отмечены точкой, незначимые корреляции отмечены крестиком, положительные корреляции отмечены синим цветом, а отрицательные корреляции красным цветом — чем значительнее корреляция, тем больше размер точки

Были выявлены статистически значимые корреляции:

- Уровня экспрессии hsa-miR-381-3p в среде культивирования бластоцисты хорошего/отличного качества с уровнем экспрессии hsa-let-7i-5p ($r=0,45$, $p=0,02$) в семенной плазме
- Уровня экспрессии hsa-let-7a-5p в среде культивирования бластоцисты хорошего/отличного качества с уровнем экспрессии hsa_piR_004152 ($r=0,4$,

p=0,05), hsa_piR_008113 (r=0,42, p=0,04), hsa-miR-30a-5p (r=0,35, p=0,05) в семенной плазме

- Уровня экспрессии hsa_piR_020497 в среде культивирования бластоцисты с уровнем экспрессии hsa_piR_020541 (r=0,4, p=0,05), hsa_piR_008113 (r=0,39, p=0,05), hsa_piR_022296 (r=0,43, p=0,039), hsa-let-7i-5p (r=0,4, p=0,05) в семенной плазме.
- Выявленные статистически значимые корреляции между уровнем экспрессии мнкРНК, ассоциированных с качеством сперматогенеза, и уровнем экспрессии мнкРНК, определяющих имплантационный потенциал получаемой бластоцисты (hsa-miR-381-3p, hsa-let-7a-5p, hsa_piR_020497), отображают влияние мужского фактора на потенциал развития получаемого эмбриона, переносимого в полость матки 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 супружеской пары и статистически значимо коррелирует с уровнем экспрессии молекул мнкРНК, а именно hsa-let-7a-5p и hsa_piR_020497, определяющих имплантационный потенциал бластоцисты хорошего/отличного качества.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Бесплодие (субфертильность) становится все более распространенным заболеванием во всем мире и затрагивает 1/6 супружеских пар репродуктивного возраста [32]. В связи с этим в последние годы наблюдается интенсивное развитие современных методов диагностики и лечения различных форм бесплодия, которое в целом определяют как заболевание, характеризующееся отсутствием наступлением клинической беременности через 12 месяцев регулярной половой жизни без использования методов контрацепции. Несмотря на применение дополнительных методик при проведении программ вспомогательных репродуктивных технологий, частота наступления беременности после первой попытки в среднем не превышает 40%, а частота живорождения не превышает 33,2 % [64]. Основополагающими факторами наступления беременности являются 1) физиологическое течение оогенеза и сперматогенеза с формированием качественных гамет, определяющих имплантационный потенциал эмбриона, образуемого в результате их слияния, 2) синхронизация процессов эмбриогенеза и созревания эндометрия, 3) рецептивность эндометрия.

С точки зрения всего процесса физиологии мужской фертильности, сперматогенез является жизненно важным и сложным процессом [131][119], контролируемым определенным спектром генов [50], в том числе транскрипционными факторами на каждом этапе гаметогенеза [55]. Несмотря на идентификацию ключевых белок-кодирующих генов, ассоциированных с физиологией сперматогенеза, остается открытым вопрос о том, как происходит регуляция данных генов в ходе метилирования геномной ДНК или под действием таких эпигенетических регуляторов как малые некодирующие РНК, в том числе микроРНК и пивиРНК. Известно, что состав мнкРНК спермы яичек по мере прохождения через разные участки придатка яичка динамичным образом меняется под воздействием секрета самого придатка яичка [106]. От качественного и количественного состава данных мнкРНК зависит упаковка хроматина в сперматозоиде, правильное созревание и капацитация

сперматозоида, ранний эмбриогенез и дальнейшее развитие беременности. Их роль в эпигенетическом наследовании была проиллюстрирована Garr K и коллегами, чьи исследования показали, что травматический стресс в раннем возрасте индуцирует изменения в продукции определенных микроРНК и пивиРНК в сперме мышей [60], что сказывалось не только на поведении получаемого потомства, их когнитивных функциях и метаболизме, но данные особенности передавались и последующим поколениям [88]. Исследования профиля микроРНК в сперме мужчин с различными формами бесплодия выявили специфические микроРНК, связанные с подвижностью сперматозоидов (снижение уровня hsa-miR-629-3p), концентрацией сперматозоидов (снижение уровня hsa-miR-335-5p, hsa-miR-885-5p и hsa-miR-152-3p), возрастом (повышение уровня hsa-miR-34b-3p) [102], олигоастенозооспермией (снижение уровня miR-335-5p) [16]. Кроме того, было сформировано несколько пар микроРНК сперме человека, коррелирующих с мужским бесплодием, и предложено их использование в качестве биомаркеров фертильности: hsa-miR-942-5p/hsa-miR-1208 (астенозооспермия), hsa-miR-296-5p/hsa-miR-328-3p (тератозооспермия), hsa-miR-139-5p/hsa-miR-1260a (олигозооспермия) и hsa-miR-34b-3p/hsa-miR-93-3p (идиопатическое бесплодие) [41]. Исследование взаимосвязи между уровнями пивиРНК сперматозоидов и параметрами спермы с оценкой их роли в оплодотворении и развитии эмбриона после ИКСИ выявило снижение уровней piR-31704 и piR-39888 в группе с мужским фактором бесплодия по сравнению с контрольной группой [42].

В отличие от особей мужского пола, обладающих обновляющейся популяцией сперматогониальных клеток, особи женского пола рождаются с конечным числом ооцитов в примордиальных фолликулах, образующих овариальный резерв, который снижается с течением жизни. Количество и качество ооцитов влияют на репродуктивный потенциал женщины [82]. Женщины с клинически значимым снижением овариального резерва имеют пониженную фертильность и чувствительность к экзогенной гормональной стимуляции яичников по сравнению с женщинами того же возраста [82]. Согласно

статистическим данным, десять процентов женщин, обращающихся в клинику по лечению бесплодия в США, имеют диагноз сниженного овариального резерва, и эти женщины имеют значительно более низкие показатели результативности проводимых им программ ВРТ [94]. Возраст, в котором снижение овариального резерва становится клинически значимым, варьируется среди женщин, что затрудняет прогнозирование времени возникновения и в принципе самого появления данного состояния у каждой конкретной женщины. Снижение овариального резерва отличается от преждевременной недостаточности яичников – состояния, ранее называвшегося преждевременной менопаузой, которое также приводит к снижению количества ооцитов и фертильности. При этом сложно диагностировать «скрытую» форму ПНЯ, при которой у женщины на фоне регулярных месячных и нормальном уровне ФСГ снижена фертильность [94]. Что касается физиологии женской репродуктивной системы, то развитие и созревание фолликулов рассматриваются как сложные процессы, включающие межклеточную взаимосвязь между созревающим ооцитом, клетками кумулюса и гранулезы [98], имеющие решающее значение для овуляции высококачественного ооцита и дальнейшего потенциального развития эмбриона. Комплексная и координированная во времени коммуникация между различными типами клеток внутри фолликула яичника опосредована внеклеточными везикулами фолликулярной жидкости [23], содержащими специфичные белки и мнкРНК.

Взаимосвязь мнкРНК с различными доброкачественными гинекологическими патологиями, злокачественными новообразованиями женских репродуктивных органов подтверждается большим количеством научных работ [28][77][66][37]. В связи с этим в последние годы исследователи начали изучать влияние данных молекул на нарушение оогенеза, а также их влияние на последующий эмбриогенез. В одном из исследований было показано, что мнкРНК (hsa-miR-451, miR-563) дифференциально экспрессируются в фолликулярной жидкости у пациенток в зависимости от стадии развития ооцита [86]. При этом другие исследователи также отмечали дифференциальную экспрессию микроРНК

в фолликулярной жидкости пациенток во время мейоза от стадии GV к МII стадии созревания ооцита (miR-15a и miR-20a) [129]. В одном из последних исследований было обнаружено, что в общей сложности 47 микроРНК значительно дифференцированно экспрессировались между группами с высоким и низким качеством ооцитов [133]. Известно, что количество и качество ооцитов напрямую зависит от возраста пациенток, при этом в ходе исследований получены данные, что профиль мнкРНК, так же, как и уровень их экспрессии, зависит от возраста организма. В одном из исследований были выявлены различия в уровне экспрессии miR-181 в фолликулярной жидкости молодых и пожилых особей, в связи с чем ученые пришли к выводу, что miR-181 играют важную роль в фолликулогенезе [111]. В дальнейших исследованиях также были показаны дифференциальные различия в уровнях экспрессии мнкРНК у пациенток старшего репродуктивного возраста и у молодых пациенток, а именно: miR-21-5p, miR-134, miR-190b, miR99b-3p и hsa-miR-424 [46]. Более точный механизм негативного влияния мнкРНК на фолликулогенез (miR-23a и miR-27a) был показан исследователями в 2017 году, который заключался в опосредованном влиянии на апоптоз клеток гранулезы и созревание ооцитов посредством регулирования факторов роста во время развития фолликулов [66]. Исходя из того, что низкое качество ооцитов может оказывать влияние на их оплодотворение и последующий эмбриогенез, были проведены исследования о возможной взаимосвязи между уровнем экспрессии мнкРНК в фолликулярной жидкости. Было установлено, что miR-663b в фолликулярной жидкости определяла дальнейшее формирование и созревание бластоцисты, а также ее морфологическую характеристику [58]. При сравнении результатов различных научных работ полученные профили экспрессии мнкРНК не совпадают, что может быть связано с отличиями в технике выделения мнкРНК из изучаемого образца.

Снижение качества гамет у супружеских пар напрямую связано с планированием беременности и деторождения в более позднем возрасте. Доказано, что возраст женщины оказывает негативное воздействие

непосредственно на качество гамет, что связано в первую очередь с оксидативным стрессом [20]. Возраст мужчины также оказывает влияние на репродуктивный успех супружеской пары. Последние проведенные исследования показывают, что с увеличением возраста мужчины происходит увеличение фрагментации ДНК сперматозоидов, при этом дефектный хроматин оказывает влияние как на оплодотворяющую способность сперматозоидов, так и на дальнейший эмбриогенез [53]. Фертильность супружеской пары, помимо возраста, зависит от множества факторов, а именно: образ жизни; соматическая патология и врожденные аномалии; травматические и ятрогенные воздействия, а также влияние различных экзогенных факторов (прием лекарственных препаратов, ионизирующее и тепловое воздействие и т.д.) [40][59].

В данное исследование были включены супружеские пары, которые были разделены на группы в зависимости от исходов программ ВРТ. Супружеские пары были подобраны таким образом, чтобы минимизировать влияние вмешивающихся факторов на результаты программ ВРТ. При анализе возрастных и антропометрических параметров супружеских пар, включенных в исследование, статистически значимых различий выявлено не было. Возраст супругов также значимо не различался. При оценке менструальной и репродуктивной функций было определено, что исследуемые группы статистически не различались. При анализе акушерского анамнеза пациенток, включенных в исследование, определили, что в обеих группах преобладало вторичное бесплодие, при этом у большинства пар в обеих группах было отмечено преобладание внематочных беременностей в анамнезе. В ходе анализа анамнеза бесплодия у супружеских пар, включенных в данное исследование, статистически значимых различий не было выявлено. У всех пациенток, включенных в данное исследование, оценивался гормональный профиль, при этом было определено, что уровень гормонов в сыворотке крови женщин в обеих группах находился в пределах референсных значений, принятых в лаборатории, выполнившей данный анализ. По гормональному профилю данные группы статистически значимо также не различались. Всем супружеским парам проводилась программа ЭКО по единому

протоколу (овариальная стимуляция; проведение ТВП и дальнейший эмбриологический этап, который включал в себя оплодотворение сперматозоидами ооцитов, полученных во время проведения ТВП, и дальнейшее культивирование эмбриона). Дозы вводимых препаратов, а также длительность стимулированного цикла статистически не отличались между двумя группами. Параметры эмбриологического этапа у супружеских пар, включенных в исследование, достоверно не отличались между группами (количество фолликулов в день проведения ТВП, количество полученных ОКК, количество МП ооцитов, параметры эякулята в день ТВП, количество полученных эмбрионов на стадии 2PN, количество морул и бластоцист). Таким образом, в настоящей работе мы пытались понять молекулярно-биологические причины бесплодия супружеской пары без очевидной патологии репродуктивной системы, что обусловило использование высокотехнологичных методов анализа таких как глубокое секвенирование и количественная ПЦР в реальном времени.

В данной диссертационной работе особое внимание уделено изучению влияния мнкРНК, обнаруженных в биологических средах супружеских пар (фолликулярной жидкости и семенной плазме), на гаметогенез, последующий эмбриогенез и, соответственно, репродуктивные исходы. В данном исследовании были рассмотрены три клинических примера супружеских пар с отрицательным исходом программы ЭКО, которым была назначена прегравидарная подготовка до момента вступления в повторную программу ВРТ. Оценивали эмбриологические параметры и профили мнкРНК в фолликулярной жидкости.

Для достижения поставленной цели в данной работе на первом этапе производилась оценка качества эмбриона и его имплантационного потенциала на основании профиля экспрессии мнкРНК в культуральной среде. В настоящее время оценка качества эмбриона осуществляется на основании визуальной оценки их морфологических свойств. Данный метод исследования является недостаточно эффективным, так как не все эмбрионы хорошего и отличного морфологического качества обладают высоким имплантационным потенциалом. Оценка профиля экспрессии мнкРНК в культуральной среде эмбриона может дополнить

имеющиеся методики оценки качества получаемых эмбрионов и прогнозировать возможные репродуктивные исходы. Исследователями было показано, что мнкРНК регулируют функцию многих генов-мишеней, пониженная или повышенная регуляция которых в свою очередь может определять эмбриогенез [101]. Роль мнкРНК в преимплантационном развитии эмбриона от момента МЗП до образования бластоцисты была подтверждена многочисленными исследованиями, которые указывают на динамический дифференциальный уровень экспрессии мнкРНК во время преимплантационного эмбриогенеза на различных этапах развития [36]. С целью определения профиля экспрессии мнкРНК в культуральной среде эмбрионов на 5 сутки развития от супружеских пар с различными исходами программы ВРТ, было проведено глубокое секвенирование с последующей валидацией полученных данных методом количественной ОТ-ПЦР.

На основании полученных данных впервые в мире нами были разработаны различные варианты моделей логистической регрессии для расчета вероятности имплантации бластоцисты хорошего/отличного качества по профилю экспрессии не только микроРНК, но и пивиРНК: *hsa_piR_000765*, *hsa-let-7i-5p*, *hsa_piR_022258*, *hsa_piR_015249*, *hsa_piR_020485*, *hsa_piR_016735*, *hsa-let-7b-5p*, *hsa_piR_020497*, *hsa_piR_008113*, *hsa-miR-381-3p*, *hsa-let-7a-5p*, *hsa_piR_001312*, *hsa_piR_016240*. При этом прогностическая точность моделей при определении профиля экспрессии любой комбинации вышеперечисленных молекул мнкРНК составляла 100%.

С целью изучения роли данных мнкРНК в эмбриогенезе, были определены 212 их потенциальных белков-мишеней. Согласно электронной базе данных Metascape, эти белки-мишени участвуют в различных биологических процессах и сигнальных путях, таких как формирование межклеточных контактов, интегрин-опосредованная клеточная адгезия, организация актинового цитоскелета, полимеризация или деполимеризация микротрубочек, детерминирование полярности клеток, митотическая сегрегация сестринских хроматид, эмбриональный морфогенез, процессинг мРНК, убиквитин-опосредованный

протеолиз, аутофагия, сигнальные пути, регулирующие плюрипотентность стволовых клеток, сигнальный путь фокальной адгезии-PI3K-Akt-mTOR, Hippo сигнальный путь, опосредованные рецепторными тирозинкиназами и Rho ГТФ-ами сигнальные пути, IGF1R-, EGFR-, Wnt-, FGFR- сигнальные каскады реакций. Хорошо известно, что цитоскелет, состоящий из актиновых филаментов, микротрубочек и промежуточных филаментов, позволяет клеткам передавать внешние сигналы внутренним биохимическим сигнальным путям, что приводит к экспрессии генов и изменениям клеточного поведения. Высокотехнологичные детальные исследования были проведены Hui Yi Grace Lim и Nicolas Plachta [76], чтобы понять, как формируется и растет эмбрион млекопитающих на предимплантационных стадиях развития. Данным коллективом было показано, что начиная с восьмиклеточной стадии, бластомеры поляризуются вдоль своей радиальной оси и подвергаются компактизации за счет реорганизации, перераспределения и апикального расположения микротрубочек, актиновых и кератиновых промежуточных филаментов. После компактизации и поляризации эмбриона происходит первое пространственное разделение клеток на две отдельные популяции: аполярные внутренние клетки, полностью окруженные базолатеральной мембраной и межклеточными контактами, и наружный слой клеток, сохраняющий апикальную поверхность, лишенную межклеточных контактов и подвергающийся воздействию внешней среды. Внутренняя клеточная масса впоследствии дифференцируется, образуя примитивную энтодерму, дающую начало внезародышевым оболочкам, и плюрипотентный эпибласт, из которого формируется собственно зародыш. Наружный слой клеток эмбриона дифференцируются, образуя трофэктодерму, а впоследствии - плаценту. Изменение расположения клеток на 16-клеточной стадии находится под контролем Hippo-сигнального пути, от активности которого зависит правильное развитие и жизнеспособность эмбриона [83]. Спецификация трофэктодермы и внутренней клеточной массы сопровождается морфогенетическими изменениями, включающими формирование межклеточных контактов и образование полости бластоцисты. Эти процессы снова требуют быстрой перестройки и динамических

взаимодействий между всеми тремя основными компонентами цитоскелета. Кроме того, изменения в цитоскелете синхронизируются с изменениями в ядерном скелете через линкер белкового комплекса во внешней и внутренней ядерных мембранах во время многократных раундов клеточных делений эмбриона [113]. Эти связи обеспечивают передачу сигнала от плазматической мембраны к ядру, что может индуцировать последующие изменения в организации хроматина и транскрипционной активности генома эмбриона.

В настоящем исследовании было обнаружено, что некоторые белковые продукты генов-мишеней мнкРНК, ответственных за имплантационный потенциал эмбриона, характеризуются физическими белок-белковыми взаимодействиями с формированием белковых сетей, участвующих в процессах убиквитинирования и протеасомной деградации белков. Эти белковые мишени мнкРНК играют ключевую роль в элиминации материнских факторов после оплодотворения ооцита во время материнско-зиготического перехода и последующих стадиях эмбриогенеза, обеспечивая своевременное ингибирование или стимулирование белковой активности на определенной стадии эмбрионального развития [132].

Таким образом, поскольку все белки, образующие эти сети посредством физического взаимодействия, потенциально регулируются мнкРНК, определяющими имплантационный потенциал эмбриона на стадии бластоцисты, дисбаланс уровня экспрессии этих мнкРНК может привести к нарушению физического взаимодействия соответствующих белков и, таким образом, нарушению биологических процессов, ведущих к формированию качественных эмбрионов.

На втором этапе настоящего исследования были идентифицированы молекулы мнкРНК, определяющие качество ооцита. Методом глубокого секвенирования и последующей количественной ПЦР в реальном времени оценивали усредненный уровень экспрессии мнкРНК суммарно во всех фолликулах каждого яичника пациенток. Разработанная модель логистической регрессии по профилю экспрессии piR_020497, piR_020500 и let-7f-5p

статистически значимо ($p=0,002$) позволяет прогнозирующая со 100 % чувствительностью и 72 % специфичностью наличие качественного ооцита в фолликулярной жидкости яичника, способной к оплодотворению и образованию бластоцисты хорошего/отличного качества с высоким имплантационным потенциалом. Выявленные статистически значимые корреляции уровня экспрессии мнкРНК, ассоциированных с качеством ооцита, с уровнем экспрессии мнкРНК, определяющих имплантационный потенциал получаемой бластоцисты, отображают влияние молекулярно-биологических свойств оплодотворяемого ооцита на потенциал развития получаемого эмбриона, переносимого в полость матки в программах ВРТ. Например, были выявлены статистически значимые корреляции уровня экспрессии *hsa-let-7a-5p* в среде культивирования бластоцисты хорошего/отличного качества с уровнем экспрессии *hsa-let-7f-5p* ($r=0,6$, $p=0,0022$), *hsa_piR_020500* ($r=-0,32$, $p=0,05$) и *hsa_piR_020497* ($r=-0,4$, $p=0,05$) в фолликулярной жидкости, а также уровня экспрессии *hsa_piR_020497* в среде культивирования бластоцисты с уровнем экспрессии *hsa-let-7f-5p* ($r=0,38$, $p=0,05$) в фолликулярной жидкости.

Ввиду найденных взаимосвязей представлялось интересным оценить эффект комбинированной прегравидарной подготовки в виде сочетанного назначения мио-инозитола, фолиевой кислоты, витамина D и Омега-3 трем женщинам с безрезультативными попытками ЭКО. Эффективность лечения оценивали по морфологическим критериям полученных ооцитов и эмбрионов, а также уровню экспрессии *hsa_piR_020497* в фолликулярной жидкости, уровень которой статистически значимо ($p=0,01$) был выше в группе пациенток с положительным результатом программы ВРТ в сравнении с группой пациенток, у которых беременность не наступила в результате проведения программы ВРТ. Несмотря на различия в морфологических показателях ооцитов и полученных эмбрионов у пациенток после проведенной прегравидарной подготовки мио-инозитолом в сочетании с фолиевой кислотой, Омега-3 и витамином D, у всех пациенток было выявлено увеличение уровня экспрессии *hsa_piR_020497* в фолликулярной жидкости из одного или двух яичников до значений уровня

экспрессии hsa_piR_020497, характерных для группы пациенток с наступившей беременностью.

Поскольку белковые продукты генов-мишеней hsa_piR_020497 участвуют в основных сигнальных путях, отвечающих за формирование фолликула и созревании ооцита, то можно говорить о наличии эффекта проведенной терапии. Так, например, при анализе потенциальных генов-мишеней hsa_piR_020497, выявлено их участие в таких биологических процессах как регуляция метаболизма нуклеиновых кислот (PAX4 – транскрипционный фактор, содержащий парный бокс-домен 4; протоонкоген JUNB; NHLH1 – транскрипционный фактор, содержащий спираль-петлю-спираль 1), клеточный рост (белковая фосфатаза SSH1, регулирующая динамические изменения актиновых филаментов), транспорт веществ (пуриnergический рецептор P2RX1, формирующий АТФ-регулируемые ионные каналы, обеспечивая быструю и избирательную проницаемость для катионов), метаболизм белков (TRIM10, являющийся членом E3 убиквитинлигазного комплекса), метаболические и энергетические процессы в клетке (NADSYN1 - синтетаза 1 никотинамид аденин динуклеотида, являющегося коферментом в окислительно-восстановительных реакциях, предшественником для некоторых клеточных сигнальных молекул и субстратом для посттрансляционных модификаций белков). При рассмотрении сигнальных путей, в которых участвуют белковые продукты генов-мишеней hsa_piR_020497 обращает на себя внимание участие JUNB, PLK3, SSH1 в основных сигнальных путях, отвечающих за формирование фолликула и созревании ооцита, а именно: сигнальных путях, опосредованных рецептором к эпидермальному ростовому фактору (ErbB), митоген-активированной протеинкиназой (MAPK), трансформирующим ростовым фактором бета (TGFβ), инсулиноподобным ростовым фактором 1 (IGF1), а также фосфатидилинозитол-3-киназом пути, опосредованном действием Akt [22][107]. Кроме того, участие белковых продуктов других генов-мишеней hsa_piR_020497, P2RX1 и NADSYN1, в регуляции концентрации цитозольного кальция и метаболизме витаминов и кофакторов, соответственно, предполагает взаимное участие мио-инозитола и

hsa_piR_020497 в оогенезе. Известно, что мио-инозитол образуется из глюкозо-1-фосфат в реакции, катализируемой NAD, участвует в фосфоинозитидном сигнальном пути, регулирующем концентрацию внутриклеточного кальция, который играет важную роль в созревании ооцита, оплодотворении и эмбриональном развитии [124][125].

Проведенными ранее исследованиями продемонстрировано, что мио-инозитол в сочетании с фолиевой кислотой, Омега-3 и витамин D оказывают непосредственное влияние на метаболомный, липидомный, протеомный, транскриптомный профили фолликулярной жидкости, изменения которых были выявлены у женщин с пониженной фертильностью [79][95]. Мио-инозитол является важным компонентом фолликулярного микроокружения и играет определяющую роль, как в ядерном, так и в цитоплазматическом развитии ооцитов. Были проведены исследования, в которых было показано, что высокое содержание мио-инозитола в фолликулярной жидкости пациенток во время проведения программ ЭКО коррелировало с высоким качеством ооцитов, в то время как его снижение – с плохим качеством [21]. В связи с этим можно предположить, что добавление мио-инозитола в качестве подготовки к проведению программ ЭКО, а также при планировании самопроизвольной беременности, сможет улучшить качество полученных ооцитов за счет уменьшения количества дегенерированных и незрелых ооцитов, при этом повышая качество полученных после оплодотворения эмбрионов.

В проведенных ранее исследованиях было доказано, что применение фолатов, а также Омега-3 является важным аспектом для нормофизиологического развития плода. Недостаточность фолатов нарушает метилирование ДНК и приводит к функциональному дефициту Омега-3 ПНЖК у беременной, а недостаточность Омега-3 ПНЖК стимулирует нарушения обмена фолатов [5]. Дефицит фолатов также может приводить к нарушению процессов роста и развития клеток и, как следствие, к увеличению частоты пороков развития эмбриона [14]. В 2017 году было опубликовано исследование, в котором показано, что применение миоинозитола в программах подготовки к ЭКО

способно повысить шанс получения зрелых ооцитов за счет обеспечения полноценного мейоза, а также снизить гормональную нагрузку и повысить эффективность программы ЭКО [4]. В 2019 году группа ученых изучала влияние назначения инозитола в сочетании с фолиевой кислотой в качестве прегравидарной подготовки на исходы программы ЭКО у пациенток со сниженным овариальным резервом. Было обнаружено, что у пациенток группы с прегравидарной подготовкой было получено большее количество зрелых ооцитов (5 (0–7) против 2 (0–5); $p=0,049$) и эмбрионов хорошего качества (42,2% против 30,1%; $p=0,049$), чем в группе без предварительного лечения, а также установлена большая частота наступления беременности на перенос эмбриона в полость матки (38,1% против 30,0%; $p=0,041$) [2].

Витамин D играет важную роль в правильном развитии и функционировании организма. Активация рецептора витамина D может прямо или опосредованно регулировать экспрессию очень большого числа генов [93]. В 2018 году был опубликован систематический обзор, в котором было показано, что частота живорождения у женщин с недостаточным уровнем витамина D после проведения программы ЭКО была достоверно ниже, чем у женщин с достаточным уровнем витамина D [RR 0,74, (95% ДИ 0,58-0,90)] [38]. Достоверный эффект от добавления витамина D пациенткам с диагностированным бесплодием еще недостаточно изучен несмотря на то, что в некоторых исследованиях было показано увеличение частоты наступления клинической беременности, а также частоты живорождения у женщин с достаточным уровнем витамина D.

В связи с этим, дальнейшие исследования эффективности применения вышеуказанных препаратов до вступления пациенток в программы ЭКО с целью улучшения результативности стимулированных циклов являются актуальными. Известно, что 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. Продемонстрирована остановка развития эмбриона на преимплантационном этапе в случае нарушенного количественного и

качественного состава микроРНК и малых интерферирующих РНК сперматозоида [78].

В настоящем исследовании была проведена оценка уровня экспрессии мнкРНК во всех образцах семенной плазмы мужчин супружеских пар, включенных в исследование. Несмотря на то, что критерием включения в настоящее исследование была нормозооспермия или мужской фактор бесплодия без выраженной патозооспермии, методом глубокого секвенирования с последующей валидацией полученных данных методом количественной ПЦР в реальном времени впервые в мире удалось продемонстрировать, что не все образцы семенной плазмы пациентов с тератозооспермией имеют одинаковый молекулярно-биологический профиль: либо он приближен к норме, либо схож с профилем мнкРНК при выраженной патозооспермии (олиготератозооспермии, астенозооспермии, олигоастенотератозооспермии, криптозооспермии). Наибольший вклад в такое разделение образцов с тератозооспермией внесли молекулы 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. Кроме того, при оценке взаимосвязи мужского фактора бесплодия и качества получаемых эмбрионов у одной и той же супружеской пары были выявлены статистически значимые корреляции между уровнем экспрессии мнкРНК, ассоциированных с качеством сперматогенеза, и уровнем экспрессии мнкРНК, определяющих имплантационный потенциал получаемой бластоцисты (hsa-miR-381-3p, hsa-let-7a-5p, hsa_piR_020497).

Таким образом, в настоящем исследовании идентифицированы молекулы мнкРНК, уровень экспрессии которых в фолликулярной жидкости и в семенной плазме ассоциирован с качеством гамет супружеской пары и статистически значимо коррелирует с уровнем экспрессии молекул мнкРНК, а именно hsa-let-7a-5p и hsa_piR_020497, определяющих имплантационный потенциал бластоцисты хорошего/отличного качества.

Результаты, полученные в рамках данной диссертационной работы, могут быть использованы в клинической практике специалистов акушеров-гинекологов

для персонализации и оптимизации лечения бесплодия у супружеских пар, проходящих лечение бесплодия в программах ВРТ.

ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В связи с развитием медицинских технологий, а также методов диагностики, вспомогательные репродуктивные технологии помогают большинству бесплодных пар достичь наступления беременности. При этом число пар с неоднократными неудачными попытками ВРТ остается на достаточно высоком уровне. Частыми причинами могут быть генетические и/или эпигенетические изменения. Среди эпигенетических факторов особое место занимают малые некодирующие РНК в связи с их влиянием на общую экспрессию генов посредством посттранскрипционных эффектов. Одним из основополагающих факторов успеха программ ВРТ являются компетентные женские и мужские гаметы, обеспечивающие формирование и развитие качественного эмбриона. При отсутствии влияния вмешивающихся факторов, качество эмбриона определяет вероятность наступления беременности и роды здоровым плодом.

В данной диссертационной работе было определено, что исходы программ ВРТ, а также количество неудачных попыток связано с возрастом пациенток. Известно, что планирование беременности в более позднем возрасте отрицательно влияет на функциональную активность яичников, что характеризуется снижением количества антральных фолликулов в яичниках, а также качеством гамет. Качество сперматогенеза также вносит существенный вклад в развитие бесплодия, его продолжительность и исходы программ ВРТ. Определение качества гамет и эмбриона в рутинной практике производится на основании визуальной оценки их морфологических качеств, что является недостаточным методом диагностики. В связи с этим исследователи занимаются активным поиском маркеров качества гаметогенеза, а также оценкой их влияния на имплантационный потенциал эмбриона и вероятность наступления беременности.

Среди значительного числа потенциальных маркеров, особое внимание уделяют мнкРНК, в частности микроРНК и пивиРНК. В многочисленных

исследованиях было показано их влияние на фертильность пар, в связи с их непосредственным влиянием на протеомный профиль гамет, а также участием во многих клеточных процессах. Изменения уровня экспрессии мнкРНК определены при различных репродуктивных патологиях, как в мужском, так и женском организмах, что в свою очередь может оказывать влияние на гаметогенез и, как следствие, последующих эмбриогенез. Установлено, что мнкРНК в фолликулярной жидкости определяют дальнейшее формирование и созревание бластоцисты. При этом транскрипты, специфичные для сперматозоидов, передаются в ооцит при оплодотворении, контролируя МЗП и экспрессию эмбриональных генов. Также было определено, что уровень экспрессии мнкРНК динамически меняется на всех этапах преимплантационного эмбриогенеза.

В представленном исследовании изучен спектр мнкРНК в биологических средах бесплодных пар (фолликулярная жидкость, семенная плазма, а также культуральная среда бластоцисты) и их взаимосвязь с качеством гамет и имплантационным потенциалом. Полученные данные свидетельствуют о том, что мнкРНК оказывают влияние на основные клеточные процессы, происходящие во время гаметогенеза и раннего эмбрионального развития. 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.

Определение hsa-let-7a-5p, hsa-miR-381-3p, hsa_piR_020497, hsa_piR_008113, hsa_piR_022258 в культуральной среде эмбриона на 5-е сутки развития позволяет определить эмбрион с наибольшим имплантационным потенциалом для последующего переноса в полость матки или отбора эмбрионов для проведения криоконсервации. На основании полученных данных была разработана формула для расчета вероятности имплантации эмбриона в полости матки с прогностической точностью 100%.

Ранее были проведены исследования, направленные на изучение молекулярно-биологического профиля в культуральной среде эмбриона, а именно профиля мнкРНК. В ходе данных исследований было показано, что мнкРНК

дифференциально экспрессировались на различных этапах преимплантационного эмбриогенеза. Также было показано, что регуляция данными молекулами определенных генов-мишеней определяет дальнейший эмбриогенез. Следовательно, изменения профиля мнкРНК приводят к нарушению регуляции белков и, соответственно, формированию качественного эмбриона.

Кроме того, в данной диссертационной работе производилась оценка молекулярно-биологического профиля фолликулярной жидкости. Выявлено, что профиль экспрессии piR_020497, piR_020500, let-7f-5p в фолликулярной жидкости определяет качество ооцита. При этом спектр данных мнкРНК, коррелирует с молекулами, выявленными в культуральной среде эмбриона и определяющими имплантационный потенциал бластоцисты.

Оценка профиля мнкРНК в зависимости от качества ооцитов была проведена в рамках многочисленных исследований. Было отмечено, что различия в уровнях экспрессии ключевых мнкРНК коррелировали со стадиями развития ооцитов, качеством ооцитов, а также с возрастом исследуемых пациенток. В дальнейших исследованиях была показана взаимосвязь спектра мнкРНК в фолликулярной жидкости и дальнейшим формированием и созреванием бластоцисты. Таким образом, изменение профиля экспрессии ключевых молекул мнкРНК может оказывать влияние на оогенез и последующий эмбриогенез.

В связи с тем, что формирование эмбриона зависит не только от качественного оогенеза, но и от правильного сперматогенеза, в данной диссертационной работе также произведена оценка молекулярно-биологического профиля семенной плазмы. Выявлено, что образцы эякулята, схожие по морфологическим качествам, имеют различный молекулярно-биологический профиль, что определяет оплодотворяющую способность сперматозоидов и, как следствие, исход программы ВРТ. В данном исследовании было определено, что наибольший вклад в качество сперматогенеза вносят 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, при этом уровень их экспрессии коррелирует с мнкРНК в культуральной среде бластоцисты, определяющих ее

имплантационный потенциал. На основании полученных данных были проанализированы белки-мишени данных мнкРНК. Определено, что белковые мишени играют ключевую роль в биологических процессах, обеспечивающих формирование качественного эмбриона.

Полученные данные подтверждаются многочисленными исследованиями, в ходе которых было определено, что спектр мнкРНК меняется в зависимости от формы бесплодия. Молекулярно-биологический профиль семенной плазмы мужчин с нарушениями подвижности сперматозоидов, наличием патологических форм в эякуляте или снижением общего количества сперматозоидов отличался в данных образцах, а также от контрольных образцов эякулята с нормальными показателями спермограммы. Особое внимание обращают на себя исследования взаимосвязи профиля мнкРНК в семенной плазме и последующим оплодотворением и развитием эмбриона. Состав мнкРНК влияет на правильное созревание сперматозоидов, ранний эмбриогенез и исход беременности.

Таким образом, подтверждается влияние малых некодирующих РНК на качество гаметогенеза, ранний эмбриогенез и, как следствие, исходы беременности.

Результаты, полученные в данной диссертационной работе, позволят повысить результативность программ ВРТ. Разработанный персонифицированный подход к определению тактики ведения определяет успешность реализации репродуктивной функции бесплодных пар и позволит оптимизировать лечение бесплодия методом ВРТ у пар с неудачными попытками в анамнезе.

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.

6. 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

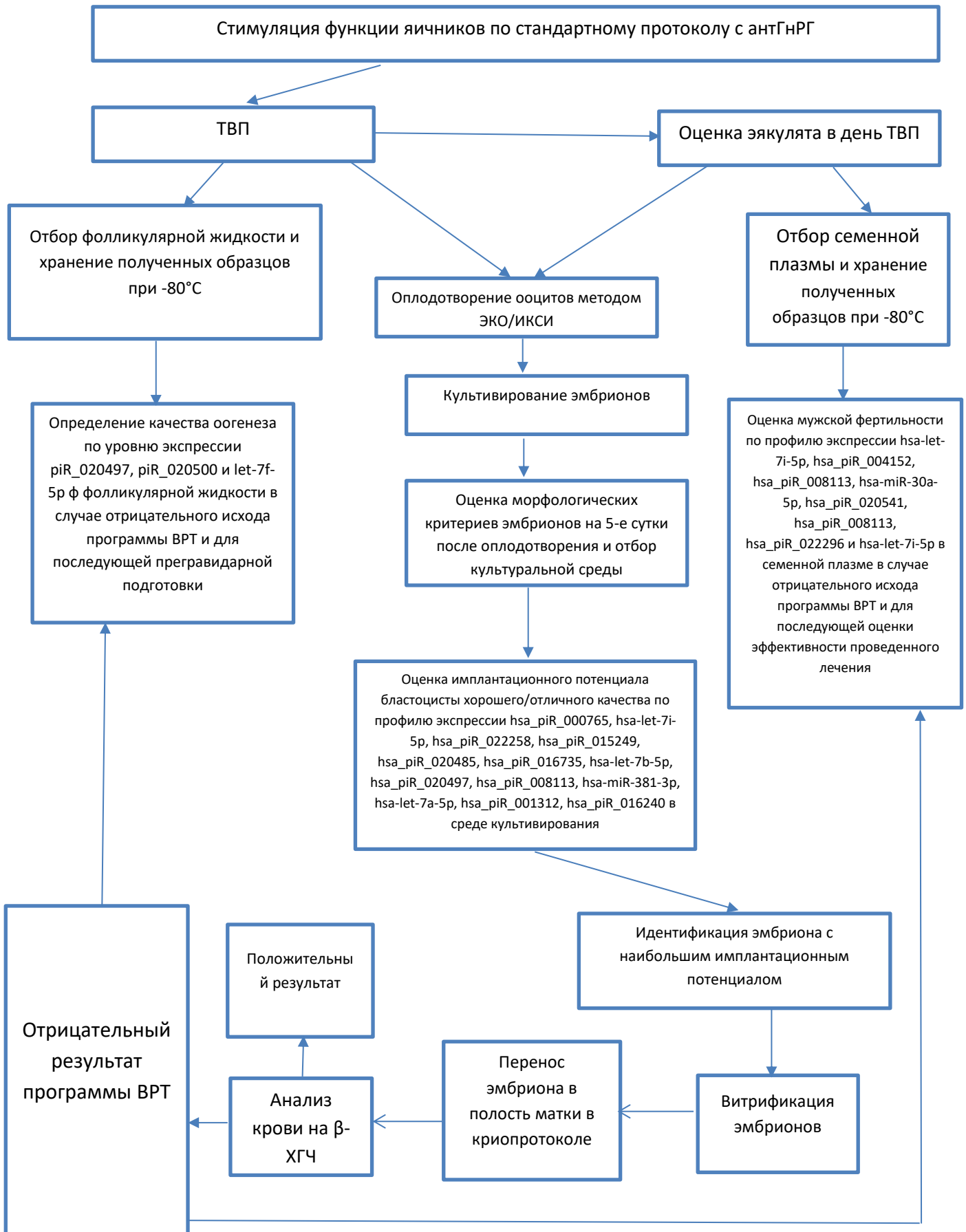
проводить на основании оценки профиля экспрессии мнкРНК hsa-let-7a-5p, hsa-miR-381-3p, hsa_piR_020497, hsa_piR_008113, hsa_piR_022258 в культуральной среде бластоцисты хорошего/отличного качества для оптимизации программ ВРТ.

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.

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



СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

CSCM - Continuous Single Culture- среда культивирования;

ErbB - Epidermal growth factor receptor - рецептор к эпидермальному ростовому фактору;

IGF1R - Insulin-like growth factor 1 receptor - рецептор инсулиноподобного фактора роста 1;

JUNB – Transcription factor jun-B - протоонкоген;

MAPK - Mitogen-activated protein kinase - митоген-активированная протеинкиназа;

MiRNA – microRNA – микроРНК;

NADSYN1 - Nicotinamide adenine dinucleotide synthetase 1 - синтетаза 1 никотинамид аденин динуклеотида;

NGS - Next generation sequencing- высокопроизводительного секвенирования;

NHLH1 – nescient helix-loop-helix 1 - транскрипционный фактор, содержащий спираль-петлю-спираль

P2RX1 - P2X purinoreceptor 1 receptor - пуринергический рецептор, формирующий АТФ-регулируемые ионные каналы;

PAX4 – Paired box gene 4 - транскрипционный фактор, содержащий парный бокс-домен 4;

piRNA - Piwi-interacting RNA - пиви-взаимодействующие РНК (пивиРНК);

SSH1 - Slingshot homolog 1 - белковая фосфатаза, регулирующая динамические изменения актиновых филаментов;

TGFβ – Transforming growth factor beta - трансформирующий ростовой фактор бета;

TRIM10 - Tripartite motif-containing protein 10 - член E3 убиквитинлигазного комплекса;

UBC- Ubiquitin C- убиквитин-конъюгирующий фермент;

UCHL1- Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L1-С-концевая убиквитин-гидролаза;

VIP - Variable importance in projection - важность переменной в проекции;

Endo-siRNAs -Endogenous short interfering RNAs-эндогенные малые интерферирующие РНК;

β-ХГЧ - бета-субъединицы хорионического гонадотропина человека;

АМГ – антимюллеров гормон;

Ант-ГнРГ- антагонистов гонадотропин-рилизинг гормона;

АФК – активные формы кислорода;

ВКМ – внутренняя клеточная масса;

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения;

ВРТ - вспомогательные репродуктивные технологии

ДГЭАС – дегидроэпиандростерон-сульфат;

ДИ – доверительный интервал;

ИИ – искусственная инсеминация;

ИМТ- индекса массы тела;

ИКСИ – от англ. ICSI – intracytoplasmic sperm injection – интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида;

ИМСИ – от англ. IMSI - Intracytoplasmic Morphologically Normal Sperm Injection – интрацитоплазматическая инъекция морфологически нормального сперматозоида;

ИМТ – индекс массы тела;

ИП - имплантационный потенциал эмбриона;

КИ - кратность изменения;

ЛГ – лютеинизирующий гормон;

МЗП – материнско-зиготический переход

МиРНК- малые интерферирующие РНК;

МнкРНК- малые некодирующие РНК;

МРНК – матричная рибонуклеиновая кислота;

МРТ – магнитно-резонансная томография;

МС - масс-спектрометрический анализ;

НЦАГиП – Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии;

ОКК - ооцит-кумулюсный комплекс;

ОТ-ПЦР - обратная транскрипция полимеразная цепная реакция;

ПГТ - предимплантационное генетическое тестирование;

ПивиРНК - пиви-взаимодействующие РНК;

ПНЯ – преждевременная недостаточность яичников

ПРЛ – пролактин;

ПЭ – перенос эмбриона;

р-ФСГ- рекомбинантного фолликулостимулирующего гормона;

СГЯ – синдром гиперстимуляции яичников;

СПКЯ – синдром поликистозных яичников;

Т – тестостерон;

Т3 – трийодтиронин;

Т4св – свободный тироксин;

ТВП- трансвагинальная пункции яичников;

ТТГ – тиреотропный гормон;

ТФЭ – трофэктодерма;

УЗИ - Ультразвуковое исследование

ФСГ – фолликулостимулирующий гормон;

ХГ – хорионический гонадотропин;

чХГ- человеческий хорионический гонадотропин

ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вартамян Э. В. Выбор метода ВРТ при мужском факторе бесплодия и высоком индексе фрагментации ДНК сперматозоидов/ Вартамян Э. В., Маркин А. В., Сэпп О. Н. // XIV Конгресс «Мужское здоровье». Сборник тезисов. Сочи. - 2018. - С. 85–86.
2. Вартамян Э.В. Подготовка к лечению бесплодия методом экстракорпорального оплодотворения при сниженном овариальном резерве / Вартамян Э.В., Цатурова К.А., Девятов Е.А., Михайлюкова А.С., Левин В.А., Сагамонова К.Ю. // Акушерство и гинекология. 2019. - N 8. - С. 134–142.
3. Вартамян Э.В. Роль системной терапии при бесплодии и неудачах реализации репродуктивной функции. / Вартамян Э.В., Девятова Е.А., Цатурова К.А., Аглымова Д.Р. // Акушерство, гинекология и репродукция. - 2018. - N 12. - С. 6–16.
4. Владимирова И.В. Применение миоинозитола в лечении женского бесплодия в программах вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток с высоким риском получения незрелых гамет/ Владимирова И.В., Донников А.Е., Макарова Н.П., Калинина Е.А. // Акушерство и гинекология. 2017. - N 7. - С. 146–149.
5. Громова О.А. Синергизм между фолатами и докозагексаеновой кислотой в рамках отдельного приема микронутриентов во время беременности / Громова О.А., Торшин И.Ю., Тетрашвили Н.К., Рейер И.А. // Акушерство и гинекология. - 2018. - N 7. - С. 12–19.
6. Драпкина Ю.С. Применение омиксных технологий в решении проблем репродуктивной медицины / Драпкина Ю.С., Тимофеева А.В., Чаговец В.В., Кононихин А.С., Франкевич В.Е., Калинина Е.А. // Акушерство и гинекология. - 2018. - N 9 - С. 24–32.
7. Калинина Е.А. «Отсроченное Материнство»: Современные возможности сохранения репродуктивного потенциала / Калинина Е.А., Сыркашева А.Г., Долгушина Н.В. // Акушерство и гинекология. - 2019. - N 1. - С. 56–61.
8. Краснопольская К.В. Экстракорпоральное оплодотворение у женщин с бесплодием и патологией щитовидной железы / Краснопольская К.В., Бурумкулова Ф.Ф., Соколова Е.А., Исакова К.М., Гутуева Ч.Г. // Проблемы репродукции. - 2020. - N 3. - С. 46–52.
9. Кузьмичев Л.Н. Принципы комплексной оценки и подготовки эндометрия у пациенток программ вспомогательных репродуктивных технологий / Кузьмичев Л.Н., Смольникова В.Ю., Калинина Е.А. Дюжева Е.В. // Акушерство и гинекология. - 2010. - N 5. - С. 32–36.
10. Михайлюкова А.С. Современные подходы к оценке качества ооцитов в

программах экстракорпорального оплодотворения / Михайлюкова А.С., Вартанян Э.В., Доброхотова Ю.Э., Цатурова К.А., Девятова Е.А., Кузьмичева В.С. // Проблемы репродукции. - 2021. - N 27 (4). - С. 127-134.

11. Рудакова Е.Б. Материнские факторы риска неудач и дефектов имплантации после ЭКО / Рудакова Е.Б., Стрижова Т.В., Федорова Е.А., Бесман И.В., Замаховская Л.Ю., Шаган О.А. // Медицинский совет - 2020. - N 13. - С. 166–178.

12. Рудакова Е.Б. Неудачи и дефекты имплантации после ЭКО / Рудакова Е.Б., Стрижова Т.В., Федорова Е.А., Замаховская Л.Ю., Бесман И.В., Шаган О.А. // Акушерство и гинекология. - 2020. - N 4. - С. 186.

13. Шамина М.А. Малые некодирующие РНК и их потенциальная роль в оценке фертильности супружеской пары в программах вспомогательных репродуктивных технологий / Шамина М.А., Тимофеева А.В., Калинина Е.А. // Акушерство и гинекология. - 2019. - N 11. - С. 33–39.

14. Ших Е.В. Вопросы выбора формы фолата для коррекции фолатного статуса / Ших Е.В., Махова А.А. // Акушерство и гинекология. - 2018. - N 8. - С. 33–40.

15. Щербакова Л.Н. Эффективность программы ЭКО при бесплодии, обусловленном наружным генитальным эндометриозом / Щербакова Л.Н., Кочурина Д.А., Бугеренко А.Е., Панина О.Б. // Проблемы репродукции. - 2019. - N 4 (25). - С. 77.

16. Abu-Halima M. Altered microRNA expression profiles of human spermatozoa in patients with different spermatogenic impairments / Abu-Halima M, Hammadeh M, Schmitt J, Leidinger P, Keller A, Meese E, Backes C. // Fertility and sterility. - 2013. - N 5 (99). - С. 1249-1255.

17. Abu-Halima M. MicroRNA expression profiles in human testicular tissues of infertile men with different histopathologic patterns. / Abu-Halima M., Backes C., Leidinger P., Keller A., Lubbad A.M., Hammadeh M., Meese E. // Fertility and sterility. - 2014. - N 1 (101). - С. 78-86.

18. Abu-Halima M. Altered micro-ribonucleic acid expression profiles of extracellular microvesicles in the seminal plasma of patients with oligoasthenozoospermia / Abu-Halima M., Ludwig N., Hart M., Leidinger P., Backes C., Keller A., Hammadeh M., Meese E. // Fertility and Sterility. - 2016. - N 5 (106). - С. 1061-1069.

19. Abu-Halima M. Differential expression of miR-23a/b-3p and its target genes in male patients with subfertility / Abu-Halima M., Ayesh B.M., Hart M., Alles J., Fischer U., Hammadeh M., Keller A., Huleihel M., Meese E. // Fertility and Sterility. 2019. - N 2 (112). - С. 323-335.

20. Ahmed T. A. Oocyte Aging: The Role of Cellular and Environmental Factors and Impact on Female Fertility / Ahmed T.A, Ahmed S.M., El-Gammal Z., Shouman S., Ahmed A., Mansour R., El-Badri N. // Advances in experimental medicine and biology.

2020. - N 1247. - C. 109–123.

21. Akbari Sene A. The myo-inositol effect on the oocyte quality and fertilization rate among women with polycystic ovary syndrome undergoing assisted reproductive technology cycles: a randomized clinical trial / Akbari Sene A., Tabatabaie A., Nikniaz H., Alizadeh A., Sheibani K., Mortezapour Alisaraie M., Tabatabaie M., Ashrafi M., Amjadi F. // *Archives of gynecology and obstetrics*. - 2019. - N 6 (299). - C. 1701–1707.
22. Alexandri C. The role of microRNAs in ovarian function and the transition toward novel therapeutic strategies in fertility preservation: from bench to future clinical application / Alexandri C., Daniel A., Bruylants G., Demeestere I. // *Human reproduction update*. - 2020. - N 2 (26). - C. 174–196.
23. Ávila A.C.F.C.M. Role of extracellular vesicles during oocyte maturation and early embryo development. / de Ávila A.C.F.C.M., da Silveira J.C. // *Reproduction, fertility, and development*. - 2019. - N 2 (32). - C. 56–64.
24. Barbu M. G. The Roles of MicroRNAs in Male Infertility. / Barbu M.G., Thompson D.C., Suciu N., Voinea S.C., Cretoiu D., Predescu D.V. // *International journal of molecular sciences*. - 2021. - N 6 (22). - C. 2910.
25. Barceló M. Exosomal microRNAs in seminal plasma are markers of the origin of azoospermia and can predict the presence of sperm in testicular tissue / Barceló M., Mata A., Bassas L., Larriba S. // *Human Reproduction*. - 2018. - N 6 (33). - C. 1087–1098.
26. Barros F. Premature ovarian insufficiency: clinical orientations for genetic testing and genetic counseling / Barros F., Carvalho F., Barros A., Dória S. // *Porto Biomedical Journal*. - 2020. - N 3 (5). - C. 62.
27. Berg D. K. MicroRNA expression in bovine preimplantation embryos / Berg D. K., Pfeffer P. L. // *Reproduction, Fertility and Development*. - 2018. - N 3 (30). - C. 546.
28. Bjorkman S. MicroRNAs in endometriosis: biological function and emerging biomarker candidates / Bjorkman S., Taylor H. S. // *Biology of reproduction*. - 2019. - N 5 (100). - C. 1135–1146.
29. Boellaard W. P. A. Cellular origin of microRNA-371a-3p in healthy males based on systematic urogenital tract tissue evaluation / Boellaard W.P.A, Gillis A.J.M., van Leenders G.J.L.H, Stoop H., van Agthoven T., Dorssers L.C.J., Dinkelman-Smit M., Boormans J.L., Looijenga L.H.J. // *Andrology*. - 2019. - N 4 (7). - C. 463–468.
30. Bosch E. ALWAYS ICSI? A SWOT analysis / Bosch E., Espinós J.J., Fabregues F., Fontes J., García-Velasco J., Llacer J., Requena A., Checa M.A., Bellver J. // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. - 2020. - N 9 (37). - C. 2081–2092.
31. Broi M. G. Da. Influence of follicular fluid and cumulus cells on oocyte quality: clinical implications. / Da Broi M.G., Giorgi V.S.I., Wang F., Keefe D.L., Albertini D.,

- Navarro P.A. // *Journal of assisted reproduction and genetics*. - 2018. - N 5 (35). - C. 735–751.
32. Carson S. A. *Diagnosis and Management of Infertility: A Review*. / Carson S.A., Kallen A.N. // *JAMA*. - 2021. - N 1 (326). - C. 65–76.
33. Chae-Kim J. *Premature Ovarian Insufficiency: Procreative Management and Preventive Strategies* / Chae-Kim J., Gavrilova-Jordan L. // *Biomedicines*. - 2018. - N 1 (7). - C. 2.
34. Chapuis A. *Sperm quality and paternal age: effect on blastocyst formation and pregnancy rates* / Chapuis A., Gala A., Ferrières-Hoa A., Mullet T., Bringer-Deutsch S., Vintejoux E., Torre A., Hamamah S. // *Basic and Clinical Andrology*. - 2017. - N 1 (27). - C. 2.
35. Chen B. *The role of MiRNA in polycystic ovary syndrome (PCOS)*. / Chen B., Xu P., Wang J., Zhang C. // *Gene*. - 2019. - N 706. - C. 91–96.
36. Cheong A.W.Y. *MicroRNA Let-7a and dicer are important in the activation and implantation of delayed implanting mouse embryos* / Cheong A.W., Pang R.T., Liu W.M., Kottawatta K.S., Lee K.F., Yeung W.S. // *Human Reproduction*. - 2014. - N 4 (29). - C. 750–762.
37. Cho S. *Circulating microRNAs as potential biomarkers for endometriosis*. / Cho S., Mutlu L., Grechukhina O., Taylor H.S. // *Fertility and sterility*. - 2015. - N 5 (103). - C. 1252–60.
38. Ciepiela P. *Vitamin D as a follicular marker of human oocyte quality and a serum marker of in vitro fertilization outcome*. / Ciepiela P., Dulęba A.J., Kowaleczko E., Chelstowski K., Kurzawa R. // *Journal of assisted reproduction and genetics*. - 2018. - N 7 (35). - C. 1265–1276.
39. Cioppi F. *Genetics of Azoospermia* / Cioppi F., Rosta V., Krausz C. // *International Journal of Molecular Sciences*. - 2021. - N 6 (22). - C. 3264.
40. Conforti A. *Air pollution and female fertility: a systematic review of literature* / Conforti A., Mascia M., Cioffi G., De Angelis C., Coppola G., De Rosa P., Pivonello R., Alviggi C., De Placido G. // *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. - 2018. - N 1 (16). - C. 117.
41. Corral-Vazquez C. *Sperm microRNA pairs: new perspectives in the search for male fertility biomarkers* / Corral-Vazquez C., Salas-Huetos A., Blanco J., Vidal F., Sarrate Z., Anton E. // *Fertility and sterility*. - 2019. - N 5 (112). - C. 831–841.
42. Cui L. *Spermatozoa Expression of piR-31704, piR-39888, and piR-40349 and Their Correlation to Sperm Concentration and Fertilization Rate After ICSI*. / Cui L., Fang L., Shi B., Qiu S., Ye Y. // *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)*. - 2018. - N 5 (25). - C. 733–739.

43. Daneshmandpour Y. MicroRNAs association with azoospermia, oligospermia, asthenozoospermia, and teratozoospermia: a systematic review. / Daneshmandpour Y., Bahmanpour Z., Hamzeiy H., Mazaheri Moghaddam M., Mazaheri Moghaddam M., Khademi B., Sakhinia E. // *Journal of assisted reproduction and genetics*. - 2020. - N 4 (37). - C. 763–775.
44. Dang Y. MicroRNA-379-5p is associated with biochemical premature ovarian insufficiency through PARP1 and XRCC6 / Dang Y., Wang X., Hao Y., Zhang X., Zhao S., Ma J., Qin Y., Chen Z.J. // *Cell Death & Disease*. - 2018. - N 2 (9). - C. 106.
45. Danis R. B. Sperm Morphology: History, Challenges, and Impact on Natural and Assisted Fertility / Danis R. B., Samplaski M. K. // *Current Urology Reports*. - 2019. - N 8 (20). - C. 43.
46. Diez-Fraile A. Age-associated differential microRNA levels in human follicular fluid reveal pathways potentially determining fertility and success of in vitro fertilization / Diez-Fraile A., Lammens T., Tilleman K., Witkowski W., Verhasselt B., De Sutter P., Benoit Y., Espeel M., D'Herde K. // *Human fertility (Cambridge, England)*. - 2014. - N 2 (17). - C. 90–98.
47. Ding C. Exosomal miRNA-17-5p derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells improves ovarian function in premature ovarian insufficiency by regulating SIRT7 / Ding C., Zhu L., Shen H., Lu J., Zou Q., Huang C., Li H., Huang B. // *Stem Cells*. -2020. - N 9 (38). - C. 1137–1148.
48. Ding N. Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances (PFAS) and their effects on the ovary / Ding N., Harlow S.D., Randolph J.F. Jr., Loch-Caruso R., Park S.K. // *Human reproduction update*. - 2020. - N 5 (26). - C. 724–752.
49. Dong F. Genome-wide miRNA profiling of villus and decidua of recurrent spontaneous abortion patients / Dong F., Zhang Y., Xia F., Yang Y., Xiong S., Jin L., Zhang J. // *Reproduction (Cambridge, England)*. - 2014. - N 1 (148). - C. 33–41.
50. Du L. Novel Gene Regulation in Normal and Abnormal Spermatogenesis / Du L., Chen W., Cheng Z., Wu S., He J., Han L., He Z., Qin W. // *Cells*. - 2021. - N 3 (10). - C. 666.
51. Ejzenberg D. Prognostic factors for pregnancy after intrauterine insemination / Ejzenberg D, Gomes TJO, Monteleone PAA, Serafini PC, Soares-Jr JM, Baracat EC. // *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*. - 2019. - N 1 (147). - C. 65–72.
52. Esfandyari S. Mesenchymal Stem Cells as a Bio Organ for Treatment of Female Infertility / Esfandyari S., Chugh R.M., Park H.S., Hobeika E., Ulin M., Al-Hendy A. // *Cells*. - 2020. - N 10 (9). - C. 2253.
53. Esteves S. C. Interventions to Prevent Sperm DNA Damage Effects on Reproduction / Esteves S. C. // *Advances in experimental medicine and biology*. - 2019.

- N 1166. - C. 119–148.

54. Fainberg J. Recent advances in understanding and managing male infertility / Fainberg J., Kashanian J. A. // *F1000Research*. - 2019. - N 8.

55. Fang F. Transcriptional control of human gametogenesis. / Fang F., Iaquina P.J., Xia N., Liu L., Diao L., Reijo Pera R.A. // *Human reproduction update*. - 2022. - N 3 (28). - C. 313–345.

56. Fang N. MicroRNA profile comparison of testicular tissues derived from successful and unsuccessful microdissection testicular sperm extraction retrieval in non-obstructive azoospermia patients / Fang N., Cao C., Wen Y., Wang X., Yuan S., Huang X. // *Reproduction, fertility, and development*. - 2019. - N 4 (31). - C. 671–682.

57. Filip L. Endometriosis Associated Infertility: A Critical Review and Analysis on Etiopathogenesis and Therapeutic Approaches / Filip L., Duică F., Prădatu A., Crețoiu D., Suci N., Crețoiu S.M., Predescu D.V., Varlas V.N., Voinea S.C. // *Medicina (Kaunas, Lithuania)*. - 2020. - N 9. - C. 56.

58. Fu J. Screening of miRNAs in human follicular fluid reveals an inverse relationship between microRNA-663b expression and blastocyst formation / Fu J., Qu R.G., Zhang Y.J., Gu R.H., Li X., Sun Y.J., Wang L., Sang Q., Sun X.X. // *Reproductive biomedicine online*. - 2018. - N 1 (37). - C. 25–32.

59. Gallo A. Gamete quality in a multistressor environment. / Gallo A., Boni R., Tosti E. // *Environment international*. - 2020. - N 138. - C. 105627.

60. Gapp K. Implication of sperm RNAs in transgenerational inheritance of the effects of early trauma in mice. / Gapp K, Jawaid A, Sarkies P, Bohacek J, Pelczar P, Prados J, Farinelli L, Miska E, Mansuy IM. // *Nature neuroscience*. - 2014. - N 5 (17). - C. 667–669.

61. Ge S.-Q. Epigenetic dynamics and interplay during spermatogenesis and embryogenesis: implications for male fertility and offspring health / Ge S.Q., Lin S.L., Zhao Z.H., Sun Q.Y. // *Oncotarget*. - 2017. - N 32 (8). - C. 53804–53818.

62. Ge W. Establishment and depletion of the ovarian reserve: physiology and impact of environmental chemicals / Ge W., Li .L., Dyce P.W., De Felici M., Shen W. // *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. - 2019. - N 9 (76). - C. 1729–1746.

63. Gebremedhn S. MicroRNA-Mediated Gene Regulatory Mechanisms in Mammalian Female Reproductive Health. / Gebremedhn S., Ali A., Hossain M., Hoelker M., Salilew-Wondim D., Anthony R.V., Tesfaye D. // *International journal of molecular sciences*. - 2021. - N 2 (22). - C. 938.

64. Gleicher N. Worldwide decline of IVF birth rates and its probable causes / Gleicher N., Kushnir V. A., Barad D. H. // *Human reproduction open*. - 2019. - № N 3. - C 17.

65. Goswami G. Can intracytoplasmic morphologically selected spermatozoa injection

- be used as first choice of treatment for severe male factor infertility patients? / Goswami G., Sharma M., Jugga D., Gouri D.M. // *Journal of Human Reproductive Sciences*. - 2018. - N 1 (11). - C. 40.
66. Guo Y. Role of microRNAs in premature ovarian insufficiency. / Guo Y., Sun J., Lai D. // *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. - 2017. - N 1 (15). - C. 38.
67. Hamerezaee M. Assessment of Semen Quality among Workers Exposed to Heat Stress: A Cross-Sectional Study in a Steel Industry / Hamerezaee M., Dehghan S.F., Golbabaee F., Fathi A., Barzegar L., Heidarnejad N. // *Safety and health at work*. - 2018. - N 2 (9). - C. 232–235.
68. Heidary Z. MicroRNA profiling in spermatozoa of men with unexplained asthenozoospermia / Heidary Z., Zaki-Dizaji M., Saliminejad K., Khorram Khorshid H.R.. // *Andrologia*. - 2019. - N 6 (51). - C. 13284.
69. Heidary Z. MiR-4485-3p expression reduced in spermatozoa of men with idiopathic asthenozoospermia / Heidary Z, Zaki-Dizaji M, Saliminejad K, Edalatkhah H, Khorram Khorshid HR. // *Andrologia*. - 2020. - № N 3 (52). - C - 13539.
70. Kamalidehghan B. The Importance of Small Non-Coding RNAs in Human Reproduction: A Review Article / Kamalidehghan B, Habibi M, Afjeh SS, Shoai M, Alidoost S, Almasi Ghale R, Eshghifar N, Pouresmaeili F. // *The application of clinical genetics*. - 2020. - N 13. C. 1–11.
71. Kirshenbaum M. Premature ovarian insufficiency (POI) and autoimmunity-an update appraisal / Kirshenbaum M., Orvieto R. // *Journal of assisted reproduction and genetics*. - 2019. - N 11 (36). - C. 2207–2215.
72. Leslie S. W. Male Infertility. Treasure Island (FL)/ Leslie S.W., Siref L.E., Soon-Sutton T.L., Khan M.A.B. // 2021 N.
73. Li X. MicroRNA-451 is downregulated in the follicular fluid of women with endometriosis and influences mouse and human embryonic potential / Li X., Zhang W., Fu J., Xu Y., Gu R., Qu R., Li L., Sun Y., Sun X. // *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. - 2019. - N 1 (17). - C. 96.
74. Li X. miR-21 and Pellino-1 Expression Profiling in Autoimmune Premature Ovarian Insufficiency / Li X, Xie J, Wang Q, Cai H, Xie C, Fu X. // *Journal of Immunology Research*. - 2020. - C. 1–10.
75. Liao Z. Therapeutic Role of Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles in Female Reproductive Diseases / Liao Z, Liu C, Wang L, Sui C, Zhang H. // *Frontiers in Endocrinology*. - 2021. - N 12.
76. Lim H. Y. G. Cytoskeletal control of early mammalian development / Lim H. Y. G., Plachta N. // *Nature reviews. Molecular cell biology*. - 2021. - N 8 (22). - C. 548–562.
77. Lin L. Identification of differentially expressed microRNAs in the ovary of

- polycystic ovary syndrome with hyperandrogenism and insulin resistance / Lin L, Du T., Huang J., Huang L.L., Yang D.Z.. // Chinese medical journal. - 2015.- N 2 (128). - C. 169–174.
78. Liu W.-M. Sperm-borne microRNA-34c is required for the first cleavage division in mouse / Liu W.M., Pang R.T., Chiu P.C., Wong B.P., Lao K., Lee K.F., Yeung W.S. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. - 2012. - N 2 (109). - C. 490–494.
79. Luti S. Relationship between the metabolic and lipid profile in follicular fluid of women undergoing in vitro fertilization. / Luti S., Fiaschi T., Magherini F., Modesti P.A., Piomboni P., Governini L., Luddi A., Amoresano A., Illiano A., Pinto G., Modesti A., Gamberi T. // Molecular reproduction and development. - 2020. - N 9 (87). - C. 986–997.
80. Machtinger R. Extracellular microRNAs in follicular fluid and their potential association with oocyte fertilization and embryo quality: an exploratory study. / Machtinger R., Rodosthenous R.S., Adir M., Mansour A., Racowsky C., Baccarelli A.A., Hauser R. // Journal of assisted reproduction and genetics. - 2017. - N 4 (34). - C. 525–533.
81. Makri D. Apoptosis triggers the release of microRNA miR-294 in spent culture media of blastocysts / Makri D., Efstathiou P., Michailidou E., Maalouf W.E. // Journal of assisted reproduction and genetics. - 2020. - N 7 (37). - C. 1685–1694.
82. Medicine P. C. of the A.S.for R.M. Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion. / Medicine P. C. of the A.S.for R.M // Fertility and sterility. - 2020. - N 6 (114). - C. 1151–1157.
83. Mihajlović A. I The first cell-fate decision of mouse preimplantation embryo development: integrating cell position and polarity / Mihajlović A. I., Bruce A. W // Open biology. - 2017. - N 11 (7).
84. Minogue A. L. Functional genomic analysis identifies miRNA repertoire regulating *C. elegans* oocyte development. / Minogue A L , Tackett M R , Atabakhsh E , Tejada G , Arur S. // Nature communications. - 2018. - N 1 (9).- C. 5318.
85. Monniaux D. Driving folliculogenesis by the oocyte-somatic cell dialog: Lessons from genetic models / Monniaux D. // Theriogenology. -2016. - N 1 (86). C. 41–53.
86. Moreno J. Follicular fluid and mural granulosa cells microRNA profiles vary in in vitro fertilization patients depending on their age and oocyte maturation stage / Moreno J.M., Núñez M.J., Quiñonero A., Martínez S., de la Orden M., Simón C., Pellicer A., Díaz-García C., Domínguez F. // Fertility and sterility. - 2015. N 4 (104). - C. 1037-1046.
87. Mostafa T. Seminal miRNA Relationship with Apoptotic Markers and Oxidative Stress in Infertile Men with Varicocele / Mostafa T, Rashed LA, Nabil NI, Osman I,

Mostafa R, Farag M. // *BioMed research international*.- 2016. - C. 4302754.

88. Nätt D. Male reproductive health and intergenerational metabolic responses from a small RNA perspective/ Nätt D., Öst A.// *Journal of internal medicine*. - 2020. - N 3 (288). - C. 305–320.

89. Nixon B. Profiling of epididymal small non-protein-coding RNAs / Nixon B., De Iuliis G.N., Dun M.D., Zhou W., Trigg N.A., Eamens A.L.// *Andrology*. - 2019. - N 5 (7). - C. 669–680.

90. Norioun H. Hsa-miR-27a-3p overexpression in men with nonobstructive azoospermia: A case-control study / Norioun H., Motovali-bashi M., Morteza J.S. // *International Journal of Reproductive BioMedicine (IJRM)*. - 2020.

91. Ochoa-Bernal M. A. Physiologic Events of Embryo Implantation and Decidualization in Human and Non-Human Primates. / Ochoa-Bernal M. A., Fazleabas A. T. // *International journal of molecular sciences*. - 2020. - N 6 (21). - C. - 1973.

92. Okada H. Decidualization of the human endometrium / Okada H., Tsuzuki T., Murata H. // *Reproductive medicine and biology*. - 2018. - N 3 (17). - C. 220–227.

93. Paffoni A. Effect of vitamin D supplementation on assisted reproduction technology (ART) outcomes and underlying biological mechanisms: protocol of a randomized clinical controlled trial. The «supplementation of vitamin D and reproductive outcome» (SUNDRO) study / Paffoni A., Somigliana E., Sarais V., Ferrari S., Reschini M., Makieva S., Papaleo E., Viganò P. // *BMC pregnancy and childbirth*. - 2019. - N 1 (19). - C. 395.

94. Pastore L. M. Reproductive ovarian testing and the alphabet soup of diagnoses: DOR, POI, POF, POR, and FOR / Pastore L.M., Christianson M.S., Stelling J., Kearns W.G., Segars J.H. // *Journal of assisted reproduction and genetics*. - 2018. - N 1 (35). - C. 17–23.

95. Pla I. Proteome of fluid from human ovarian small antral follicles reveals insights in folliculogenesis and oocyte maturation. / Pla I., Sanchez A., Pors S.E., Pawlowski K., Appelqvist R., Sahlin K.B., Poulsen L.C., Marko-Varga G., Andersen C.Y., Malm J. // *Human reproduction (Oxford, England)*. - 2021. - N 3 (36). - C. 756–770.

96. Qasemi M. Extracellular microRNA profiling in human follicular fluid: new biomarkers in female reproductive potential. / Qasemi M., Amidi F. // *Journal of assisted reproduction and genetics*. - 2020. - N 8 (37). - C. 1769–1780.

97. Radtke A. Expression of miRNA-371a-3p in seminal plasma and ejaculate is associated with sperm concentration. / Radtke A, Dieckmann KP, Grobelny F, Salzbrunn A, Oing C, Schulze W, Belge G. // *Andrology*. - 2019. - N 4 (7). - C. 469–474.

98. Robker R. L. Coordination of Ovulation and Oocyte Maturation: A Good Egg at the Right Time. / Robker R. L., Hennebold J. D., Russell D. L. // *Endocrinology*. - 2018. -

N 9 (159). - C. 3209–3218.

99. Rodriguez-Martinez H. Seminal Plasma: Relevant for Fertility? / Rodriguez-Martinez H, Martinez EA, Calvete JJ, Peña Vega FJ, Roca J. // International journal of molecular sciences. - 2021.- N 9 (22).

100. Roovers E. F. Piwi proteins and piRNAs in mammalian oocytes and early embryos. / Roovers EF, Rosenkranz D, Mahdipour M, Han CT, He N, Chuva de Sousa Lopes SM, van der Westerlaken LA, Zischler H, Butter F, Roelen BA, Ketting RF.// Cell reports. - 2015. - N 12 (10). - C. 2069–2082.

101. Rosenbluth E. M. Human embryos secrete microRNAs into culture media--a potential biomarker for implantation./ Rosenbluth EM, Shelton DN, Wells LM, Sparks AE, Van Voorhis BJ. // Fertility and sterility. - 2014. - N 5 (101). - C. 1493–1500.

102. Salas-Huetos A. Spermatozoa from patients with seminal alterations exhibit a differential micro-ribonucleic acid profile. / Salas-Huetos A, Blanco J, Vidal F, Godo A, Grossmann M, Pons MC, F-Fernández S, Garrido N, Anton E. // Fertility and sterility. - 2015. - N 3 (104). - C. 591–601.

103. Salilew-Wondim D. The Role of MicroRNAs in Mammalian Fertility: From Gametogenesis to Embryo Implantation / Salilew-Wondim D, Gebremedhn S, Hoelker M, Tholen E, Hailay T, Tesfaye D // International Journal of Molecular Sciences. - 2020. - N 2 (21). - C. 585.

104. Sanchez A. M. Endometriosis as a detrimental condition for granulosa cell steroidogenesis and development: From molecular alterations to clinical impact. Sanchez AM, Somigliana E, Vercellini P, Pagliardini L, Candiani M, Vigano P. // The Journal of steroid biochemistry and molecular biology. - 2016. - N Pt A (155). - C. 35–46.

105. Sang Q. Identification of microRNAs in human follicular fluid: characterization of microRNAs that govern steroidogenesis in vitro and are associated with polycystic ovary syndrome in vivo. / Sang Q, Yao Z, Wang H, Feng R, Wang H, Zhao X, Xing Q, Jin L, He L, Wu L, Wang L.// The Journal of clinical endocrinology and metabolism. - 2013. - N 7 (98). - C. 3068–3079.

106. Santiago J. All you need to know about sperm RNAs./ Santiago J, Silva JV, Howl J, Santos MAS, Fardilha M. // Human reproduction update. - 2021.- N 1 (28). - C. 67–91.

107. Santonocito M. Molecular characterization of exosomes and their microRNA cargo in human follicular fluid: bioinformatic analysis reveals that exosomal microRNAs control pathways involved in follicular maturation./ Santonocito M, Vento M, Guglielmino MR, Battaglia R, Wahlgren J, Ragusa M, Barbagallo D, Borzi P, Rizzari S, Maugeri M, Scollo P, Tatone C, Valadi H, Purrello M, Di Pietro C. // Fertility and sterility./ - 2014. - N 6 (102). - C. 1751–61.

108. Scalici E. [и др.]. Circulating microRNAs in follicular fluid, powerful tools to explore in vitro fertilization process. // S/ Scalici E, Traver S, Mullet T, Molinari N, Ferrières A, Brunet C, Belloc S, Hamamah S. // *Scientific reports*. - 2016. - N 6. - C. 24976.
109. Schulz K. N. Mechanisms regulating zygotic genome activation/ Schulz K. N., Harrison M. M. // *Nature Reviews Genetics*. - 2019. - N 4 (20). - C. 221–234.
110. Shebl O. Oocyte competence in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection patients suffering from endometriosis and its possible association with subsequent treatment outcome: a matched case-control study./ Shebl O, Sifferlinger I, Habelsberger A, Oppelt P, Mayer RB, Petek E, Ebner T. // *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*. - 2017. - N 6 (96). - C. 736–744.
111. Silveira J. C. da. Effects of age on follicular fluid exosomal microRNAs and granulosa cell transforming growth factor- β signalling during follicle development in the mare./ da Silveira JC, Winger QA, Bouma GJ, Carnevale EM. // *Reproduction, fertility, and development*. - 2015. - N 6 (27). - C. 897–905.
112. Silveira J. C. da. Cell-secreted vesicles containing microRNAs as regulators of gamete maturation./ da Silveira JC, de Ávila ACFCM, Garrett HL, Bruemmer JE, Winger QA, Bouma GJ. // *The Journal of endocrinology*. - 2018. - N 1 (236). - C. R15–R27.
113. Simon D. N. The nucleoskeleton as a genome-associated dynamic «network of networks». / Simon D. N., Wilson K. L. // *Nature reviews. Molecular cell biology*. - 2011. - N 11 (12). - C. 695–708.
114. Song W.-Y. Reduced microRNA-188-3p expression contributes to apoptosis of spermatogenic cells in patients with azoospermia./ Song WY, Meng H, Wang XG, Jin HX, Yao GD, Shi SL, Wu L, Zhang XY, Sun YP. // *Cell proliferation*. - 2017. - N 1 (50).
115. Spears N. Ovarian damage from chemotherapy and current approaches to its protection. Spears N, Lopes F, Stefansdottir A, Rossi V, De Felici M, Anderson RA, Klinger FG. // *Human reproduction update*. - 2019. - N 6 (25). - C. 673–693.
116. Spruce T. An Early Developmental Role for miRNAs in the Maintenance of Extraembryonic Stem Cells in the Mouse Embryo / Spruce T, Pernaute B, Di-Gregorio A, Cobb BS, Merckenschlager M, Manzanares M, Rodriguez TA. // *Developmental Cell*. 2010. - N 2 (19). - C. 207–219.
117. Sun B. miR-644-5p carried by bone mesenchymal stem cell-derived exosomes targets regulation of p53 to inhibit ovarian granulosa cell apoptosis / Sun B, Ma Y, Wang F, Hu L, Sun Y. // *Stem Cell Research & Therapy*. - 2019. - N 1 (10). - C. 360.
118. Sun Y.-M. [Advances of the Regulation of microRNAs in Follicular Development]. / Sun YM, Wang XY, Wu D, Wang XN, Pan XY. // *Zhongguo yi xue ke*

- xue yuan xue bao. *Acta Academiae Medicinae Sinicae*. - 2021. - N 5 (43). - C. 815–821.
119. Tao Y. Human sperm vitrification: the state of the art. Tao Y, Sanger E, Saewu A, Leveille MC. // *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. - 2020. - N 1 (18). - C. 17.
120. Tian H. Semen-specific miRNAs: Suitable for the distinction of infertile semen in the body fluid identification? / Tian H, Lv M, Li Z, Peng D, Tan Y, Wang H, Li Q, Li F, Liang W. // *Forensic science international. Genetics*. - 2018. - N 33. - C. 161–167.
121. Timofeeva A. [и др.]. Small Noncoding RNA Signatures for Determining the Developmental Potential of an Embryo at the Morula Stage. // *International journal of molecular sciences*. 2020. № N 24 (21).
122. Timofeeva A. V. Cell-Free, Embryo-Specific sncRNA as a Molecular Biological Bridge between Patient Fertility and IVF Efficiency. / Timofeeva AV, Chagovets VV, Drapkina YS, Makarova NP, Kalinina EA, Sukhikh GT. // *International journal of molecular sciences*. - 2019. - N 12 (20).
123. Vilella F. Hsa-miR-30d, secreted by the human endometrium, is taken up by the pre-implantation embryo and might modify its transcriptome / Vilella F, Moreno-Moya JM, Balaguer N, Grasso A, Herrero M, Martínez S, Marcilla A, Simón C. // *Development*. - 2015. - N 18 (142). - C. 3210–3221.
124. Vitale S. G. How to Achieve High-Quality Oocytes? The Key Role of Myo-Inositol and Melatonin. / Vitale SG, Rossetti P, Corrado F, Rapisarda AM, La Vignera S, Condorelli RA, Valenti G, Sapia F, Laganà AS, Buscema M. // *International journal of endocrinology*. - 2016. - N 2016. - C. 4987436.
125. Wakai T. Ca(2+) Signaling and Homeostasis in Mammalian Oocytes and Eggs. / Wakai T., Mehregan A., Fissore R. A. // *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. - 2019. - N 12 (11).
126. Walser C. B. Transcript clearance during the maternal-to-zygotic transition / Walser C. B., Lipshitz H. D. // *Current Opinion in Genetics & Development*. - 2011. - N 4 (21). - C. 431–443.
127. Wesevich V. Recent advances in understanding primary ovarian insufficiency / Wesevich V., Kellen A. N., Pal L. // *F1000Research*. - 2020. - N 9. - C. 1101.
128. Woolnough B. Does omitting teratospermia as a selection criterion for ICSI change pregnancy rates? / Woolnough B, Shmorgun D, Leveille MC, Sabri E, Gale J. // *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. - 2020. - N 8 (37). - C. 1895–1901.
129. Xu Y.-W. Differentially expressed microRNAs in human oocytes. / Xu YW, Wang B, Ding CH, Li T, Gu F, Zhou C. // *Journal of assisted reproduction and genetics*. - 2011. - N 6 (28). - C. 559–566.
130. Yang M. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomal miR-144-5p

improves rat ovarian function after chemotherapy-induced ovarian failure by targeting PTEN / Yang M, Lin L, Sha C, Li T, Zhao D, Wei H, Chen Q, Liu Y, Chen X, Xu W, Li Y, Zhu X. // *Laboratory Investigation*. - 2020. - N 3 (100). - C. 342–352.

131. Yang T. The dynamics and regulation of microfilament during spermatogenesis. / Yang T, Yang WX. // *Gene*. - 2020. - N 744. - C. 144635.

132. Yang Y. The E3 ubiquitin ligase RNF114 and TAB1 degradation are required for maternal-to-zygotic transition. / Yang Y, Zhou C, Wang Y, Liu W, Liu C, Wang L, Liu Y, Shang Y, Li M, Zhou S, Wang Y, Zeng W, Zhou J, Huo R, Li W. // *EMBO reports*. 2017. - N 2 (18). - C. 205–216.

133. Zhang D. Association of exosomal microRNAs in human ovarian follicular fluid with oocyte quality. / Zhang D, Lv J, Tang R, Feng Y, Zhao Y, Fei X, Chian R, Xie Q. // *Biochemical and biophysical research communications*. - 2021. - N 534. - C. 468–473.

134. Zhang Q. Human Amniotic Epithelial Cell-Derived Exosomes Restore Ovarian Function by Transferring MicroRNAs against Apoptosis / Zhang Q, Sun J, Huang Y, Bu S, Guo Y, Gu T, Li B, Wang C, Lai D. // *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. - 2019. - N 16. - C. 407–418.

135. Zhang R. Emerging roles for noncoding RNAs in female sex steroids and reproductive disease / Zhang R, Wesevich V, Chen Z, Zhang D, Kallen AN. // *Molecular and Cellular Endocrinology*. - 2020. - N 518. - C. 110875.

136. Zhang X. MicroRNA-127-5p impairs function of granulosa cells via HMGB2 gene in premature ovarian insufficiency / Zhang X, Dang Y, Liu R, Zhao S, Ma J, Qin Y. // *Journal of Cellular Physiology*. - 2020. - N 11 (235). - C. 8826–8838.

137. Zhang Y. MicroRNA-184 promotes apoptosis of trophoblast cells via targeting WIG1 and induces early spontaneous abortion. / Zhang Y, Zhou J, Li MQ, Xu J, Zhang JP, Jin LP. // *Cell death & disease*. - 2019. - N 3 (10). - C. 223.

138. Zhou Q. -z. Expressions of miR-525-3p and its target gene SEMG 1 in the spermatozoa of patients with asthenozoospermia / Zhou QZ, Guo XB, Zhang WS, Zhou JH, Yang C, Bian J, Chen MK, Guo WB, Wang P, Qi T, Wang CY, Yang JK, Liu CD. // *Andrology*. - 2019. - N 2 (7). - C. 220–227.

139. Zhou W.-J. Influence of sperm morphology on pregnancy outcome and offspring in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection: a matched case-control study / Zhou WJ, Huang C, Jiang SH, Ji XR, Gong F, Fan LQ, Zhu WB. // *Asian Journal of Andrology*. - 2021. - N 4 (23). - C. 421.

140. Zhou W. Secreted MicroRNA to Predict Embryo Implantation Outcome: From Research to Clinical Diagnostic Application. / Zhou W., Dimitriadis E. // *Frontiers in cell and developmental biology*. - 2020. - N 8. - C. 586510.