

© Коллектив авторов, 2019

А.В. ТИМОФЕЕВА, Е.А. КАЛИНИНА, Ю.С. ДРАПКИНА,  
В.В. ЧАГОВЕЦ, Н.П. МАКАРОВА, Г.Т. СУХИХ

## ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ЭМБРИОНА ПО ПРОФИЛЮ ЭКСПРЕССИИ МАЛЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК В КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЕ ЭМБРИОНА В ПРОГРАММАХ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии  
имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва

**Цель исследования.** Изучение профиля малых некодирующих РНК (*microRNA* и *piwiRNA*) в культуральной среде эмбриона на 4-е сутки культивирования для идентификации потенциальных биомаркеров качества эмбриона.

**Материалы и методы.** Применен метод глубокого секвенирования для идентификации спектра малых некодирующих РНК (мнРНК), присутствующих в полости бластоцисты и в культуральной среде эмбриона, количественная оценка которых в 48 образцах культуральной среды эмбрионов, перенесенных в полость матки, была проведена методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени.

**Результаты.** С помощью дискриминантного анализа методом частных наименьших квадратов (PLS-DA) был проанализирован вклад шести мнРНК в определение качества эмбриона, характеризуемый значением параметра важности переменной в проекции (*variable importance in projection* - VIP). В результате анализа было выявлено, что наибольший вклад имеют четыре мнРНК: *piR020401* (VIP=1,46027), *let-7c-5p* (VIP=1,17416), *let-7b-5p* (VIP=0,994657), *let-7i-5p* (VIP=0,942665), а наименьший: *miR-143-5p* (VIP=0,623108) и *miR-92a-3p* (VIP=0,471951). Методом ранговой корреляции по Спирмену выявлена статистически значимая корреляция между уровнем экспрессии мнРНК (*hsa-let-7b-5p*, *hsa-let-7c-5p*, *hsa-piR020401*) в среде культивирования и качеством переносимого в полость матки эмбриона. Использование непараметрического критерия Манна—Уитни выявило статистически значимые отличия уровня экспрессии *piR020401* и *miR-92a-3p* в среде культивирования эмбрионов, формирующих группы по морфофункциональным параметрам.

**Заключение:** мнРНК (*let-7c-5p*, *let-7b-5p*, *piR020401*), обнаруженные в культуральной среде, статистически значимо коррелируют с морфофункциональными характеристиками эмбриона на 4 сутки после оплодотворения, среди которых наибольший вклад в определение качества эмбриона вносит *piR020401*. Уровень экспрессии *miR-92a-3p* и *piR020401* в культуральной среде зависит от стадии развития эмбриона, дифференцируя стадию морулы и бластоцисты. Учитывая, что отставание в скорости развития эмбриона к пятым суткам культивирования не всегда предопределяло отсутствие имплантации эмбриона в матку, ориентироваться исключительно на морфологические параметры эмбриона при выборе кандидата на перенос в полость матки нецелесообразно, а рекомендуется дополнительно оценивать профиль экспрессии *let-7c-5p*, *let-7b-5p*, *miR-92a-3p*, *piR020401* на 4 сутки культивирования эмбриона. Таким образом, полученные данные позволяют оптимизировать выбор эмбриона и проведение программы вспомогательных репродуктивных технологий.

**Ключевые слова:** мнРНК, *piwiRNA*, *microRNA*, культуральная среда, эмбрионы, ВРТ, беременность, имплантация, качество эмбриона, ЭКО.

**Вклад авторов.** Калинина Е.А., Тимофеева А.В.: концепция и дизайн исследования; Драпкина Ю.С., Макарова Н.П.: сбор материала и создание клинической базы образцов - Тимофеева А.В., Драпкина Ю.С.: получение экспериментальных данных; Чаговец В.В.: статистическая обработка данных; Тимофеева А.В., Драпкина Ю.С., Чаговец В.В.: написание текста; Калинина Е.А.: редактирование; Сухих Г.Т.: обсуждение результатов.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии возможных конфликтов интересов.

**Финансирование.** Работа выполнена по государственному заданию «Совершенствование программ вспомогательных репродуктивных технологий при применении инновационных высокотехнологических методов (эмбриологических, клеточных, иммунологических, молекулярно-генетических), регистрационный номер: АААА-А18-118053190022-8.

Для цитирования: Тимофеева А.В., Калинина Е.А., Драпкина Ю.С., Чаговец В.В., Макарова Н.П., Сухих Г.Т. Оценка качества эмбриона по профилю экспрессии малых некодирующих РНК в культуральной среде эмбриона в программах вспомогательных репродуктивных технологий. Акушерство и гинекология. 2019;6:79-86.  
<https://dx.doi.org/10.18565/aig.2019.6.79-86>

A.V. TIMOFEEVA, E.A. KALININA, YU.S. DRAPKINA,  
 V.V. CHAGOVETS, N.P. MAKAROVA, G.T. SUKHIKH

## EMBRYO QUALITY ASSESSMENT BY THE SMALL NONCODING RNA EXPRESSION PROFILE IN AN EMBRYO CULTURE MEDIUM IN ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY PROGRAMS

Academician V.I. Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology, and Perinatology,  
 Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

**Objective.** To investigate of the small noncoding RNA (sncRNA) (microRNA and piwiRNA) profile in an embryo culture medium on day 4 of cultivation to identify the potential biomarkers for embryo quality.

**Materials and methods.** The deep sequencing method was used to identify the spectrum of sncRNAs present in the blastocyst cavity and embryo culture medium, which were quantified using a real-time reverse-transcription polymerase chain reaction assay in 48 samples of the culture medium of embryos transferred into the uterine cavity.

**Results.** Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) was used to analyze the contribution of six sncRNAs to determining the embryo quality, which was characterized by the variable importance in projection (VIP) values. The analysis showed that the greatest contribution was made by four sncRNAs: piR020401 (VIP = 1.46027), let-7c-5p (VIP = 1.17416), let-7b-5p (VIP = 0.994657), and let-7i-5p (VIP = 0.942665), and the smallest contribution was by miR-143-5p (VIP = 0.623108) and miR-92a-3p (VIP = 0.471951). The Spearman rank correlation method was used to reveal a statistically significant correlation between the expression level of sncRNA (hsa-let-7b-5p, hsa-let-7c-5p, and hsa-piR020401) in the culture medium and the quality of the embryo transferred to the uterine cavity. The Mann-Whitney non-parametric test revealed statistically significant differences in the expression level of piR020401 and miR-92a-3p in the culture medium of embryos forming groups according to morphofunctional parameters.

**Conclusion.** The sncRNAs (let-7c-5p, let-7b-5p, piR020401) found in the culture medium statistically significantly correlate with embryo morphofunctional characteristics on day 4 after fertilization, among which piR020401 makes the greatest contribution to determining the embryo quality. The expression level of miR-92a-3p and piR020401 in the culture medium depends on the stage of embryonic development, differentiating the morula and blastocyst stage. Considering that the lag in the embryonic development rate by day 5 of cultivation did not always predetermine the absence of embryo implantation into the uterus, it is not advisable to focus exclusively on embryo morphological parameters when choosing a candidate for transfer to the uterus, and it is recommended that the expression profile of let-7c-5p, let-7b-5p, miR-92a-3p, and piR020401 should be additionally estimated on day 4 of embryo cultivation. Thus, the findings make it possible to optimize the choice of an embryo and to implement an assisted reproductive technology program.

**Keywords:** sncRNA, piwiRNA, microRNA, culture medium, embryos, ART, pregnancy, implantation, embryo quality, IVF.

**Author contributions.** E.A. Kalinina, A.V. Timofeeva: conception and design of the investigation; Yu.S. Drapkina, N.P. Makarova: material collection and creating a clinical base of samples; A.V. Timofeeva, Yu.S. Drapkina: obtaining experimental data; V.V. Chagovets: statistical data processing; A.V. Timofeeva, Yu.S. Drapkina, V.V. Chagovets: writing the text; E.A. Kalinina: editing; G.T. Sukhikh: discussion of the results.

**Conflict of interests.** The authors declare that there are no possible conflicts of interest.

**Financing.** The investigation was conducted according to the state task "Improving the assisted reproductive technology programs in the application of innovative high-tech (embryological, cellular, immunological, molecular genetic) techniques. Registration Number: AAAA-A18-118053190022-8.

For citations: A.V. Timofeeva, E.A. Kalinina, Yu.S. Drapkina, V.V. Chagovets, N.P. Makarova, G.T. Sukhikh Embryo quality assessment by the small noncoding RNA expression profile in an embryo culture medium in assisted reproductive technology programs. *Akusherstvo i Ginekologiya/Obstetrics and Gynecology*. 2019; (6):79-86 (in Russian). <http://dx.doi.org/10.18565/aig.2019.6.79-86>

Стремительное развитие вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) обусловлено все еще высоким уровнем бесплодия в современном обществе [1]. Несмотря на многие успешные попытки улучшить демографическую ситуацию, доля бесплодных браков на территории России колеблется от 8 до 17,5% и в настоящее время не имеет тенденции к снижению [2]. На сегодняшний день ВРТ занимают ведущее место среди современных методов лечения бесплодия.

Для наступления беременности в программах ВРТ одна из важнейших задач — выбор наиболее качествен-

ного и жизнеспособного эмбриона для переноса в полость матки. Селекция таких эмбрионов, как правило, осуществляется на основании оценки их морфологических свойств. Общепринятый стандарт оценки качества blastocyst, предложенный Gardner et al [3], приведен в табл. 1.

Однако критерии качества, предложенные Gardner et al, являются субъективными, а точность такого метода отбора эмбрионов остается недостаточно высокой. Более того, не все эмбрионы «хорошего» и «отличного» качества, с точки зрения

морфологических критериев, при переносе в нормальный эндометрий полости матки приводят к беременности [4]. Таким образом, возникает необходимость внедрения дополнительных неинвазивных технологий селективного выбора эмбриона с максимальным имплантационным потенциалом.

Таблица 1. Классификация бластоцист по качеству [3]

Качество бластоцисты	Морфологическая характеристика бластоцисты
Отличное	Больше, чем 3АА
Хорошее	3-6 АВ, 3-6 ВА, 1-2 АА
Среднее	3-6 ВВ, 3-6 АС, 3-6 СА, 1-2 АВ, 1-2 ВА
Плохое	1-6 ВС, 1-6 СВ, 1-6 СС, 1-2 ВВ

За последние годы было изучено значительное число потенциальных биомаркеров качества эмбрионов и их имплантационной способности. Многообещающим методом выступает преимплантационное генетическое тестирование, так как хромосомная патология у переносимых эмбрионов может быть основной причиной неудачных результатов лечения бесплодия. Однако, наряду с бесспорной ценностью, данный метод имеет ограничения для применения в повседневной практике за счет его высокой стоимости, а также необходимости инвазивных вмешательств на эмбрионе [5].

Представление об энергетической, метаболической активности и состоянии сигнальных систем конкретного эмбриона без использования инвазивных методик позволяет получить среда культивирования эмбрионов на различных стадиях развития [6]. Значительным диагностическим и прогностическим потенциалом в отношении качества эмбриона и его имплантационной способности обладают малые некодирующие РНК (мнРНК) при определении уровня их экспрессии в культуральной среде эмбриона [7]. мнРНК действуют на эпигенетическом, транскрипционном и посттранскрипционном уровнях регуляции экспрессии генов. Именно эти взаимодействия определяют различный фенотип и функции клеток организма [8]. Влиянием на фенотип и функцию клеток в большей степени обладают такие мнРНК, как microRNA и piwiRNA [9]. Было доказано, что определение экспрессии данных молекул в культуральной среде эмбриона позволяет прогнозировать его имплантационный потенциал и более точно оценить качество эмбриона [10]. В 2014 г. McCallie et al. [11] впервые выявили, что бластоцисты у пациентов, страдающих бесплодием на фоне СПКЯ, имеют атипичный профиль microRNA (miR-19a, miR-19b, miR-24, miR-92, miR-93 и т.д.), а в 2016 г. Capalbo et al. [12] показали, что внутриклеточная экспрессия microRNA различается у euploidных и анеупloidных эмбрионов. В исследовании Liang et al. [13] было продемонстрировано, что повышенная экспрессия miR-24 в культуральную среду ассоциирована с остановкой бластоцисты в развитии и коррелирует с качеством эмбриона. Таким образом,

наличие взаимосвязи между качеством эмбриона и конкретными мнРНК в культуральной среде данных эмбрионов — перспективный и современный метод оптимизации выбора эмбриона при проведении ВРТ.

## Материалы и методы

49 образцов культуральной среды были собраны на 4-е сутки после оплодотворения от эмбрионов класса А, В и С, согласно морфофункциональной классификации бластоцист, предложенной Gardner et al, а также от эмбрионов на стадии морулы и кавернозной морулы. От эмбрионов класса А было получено 27 образцов культуральной среды, 8 образцов — от эмбрионов класса В, 4 образца — от эмбрионов класса С; оставшиеся 10 образцов соответствовали среде культивирования, полученной от 7 морул и от 3 кавернозных морул. Из собранных образцов были выделены РНК колоночным способом с использованием набора «miRNeasy Serum/Plasma Kit» (Qiagen). Идентификация всех имеющихся мнРНК в среде культивирования эмбриона была осуществлена методом глубокого секвенирования с использованием набора по синтезу кДНК-библиотек NEBNext® Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina® (Set11, New England Biolab®, Germany) на платформе NextSeq 500 platform (Illumina, USA). Относительный уровень экспрессии кДНК оценивали по кратности изменения (КИ) методом  $\Delta\Delta Ct$ .

$$M_{0s1} / M_{0s2} = 2^{-\Delta\Delta Ct},$$

где  $M_{0s1}$  и  $M_{0s2}$  — исходные количества кДНК в образцах s1 и s2,  $\Delta\Delta Ct = (Ct_{s1} - Ct_{norm1}) - (Ct_{s2} - Ct_{norm2})$ ,  $Ct$  — значение цикла амплификации в точке пересечения кинетической кривой накопления продукта амплификации с линией порогового уровня флуоресценции, который определяется автоматически программным обеспечением амплификатора StepOnePlus;  $Ct_{s1}$  и  $Ct_{s2}$  — значение порогового цикла амплификации кДНК анализируемой мнРНК в двух сравниваемых образцах s1 и s2;  $Ctnorm1$  и  $Ctnorm2$  — значение порогового цикла амплификации кДНК нормировочной эндогенной мнРНК в двух сравниваемых образцах s1 и s2. Образцом сравнения служила среда культивирования без эмбриона; для нормировки данных полимеразной цепной реакции анализируемых мнРНК была выбрана hsa-piR023338|gb|DQ601914 ввиду стабильной экспрессии во всех образцах ( $n=49$ ).

Все образцы культуральной среды, включенные в исследование, были получены от 39 пациенток с трубно-перитонеальным фактором бесплодия, проходящих программу ИКСИ (35 пациенток) и программу ЭКО (4 пациентки) по стандартному протоколу овариальной стимуляции со 2—3 дня менструального цикла с препаратами антагониста гонадотропин-рилизинг гормона и гонадотропинами. У пациенток, включенных в исследование, были проанализированы данные анамнеза, параметры клинического и гормонального статуса, а также исходы программ ВРТ (отсутствие/наступление

беременности). Всем женщинам проведено обследование в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации №107н.

Критерии включения пациенток в исследование:

- возраст пациенток от 20 до 37 лет с нормальным овариальным резервом;
- женское бесплодие трубно-перитонеального происхождения;
- фертильная и субфертильная сперма партнера;
- регулярный менструальный цикл;
- информированное согласие на участие в исследовании.

В исследование не были включены пациентки с противопоказаниями для проведения ЭКО или ИКСИ в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации №107н.

В зависимости от исхода программы ЭКО или ИКСИ все пациентки были разделены на три группы:

- 1-я группа: 25 пациенток, проходивших лечение со стимуляцией суперовуляции и переносом эмбрионов в стимулированном цикле, с отрицательным результатом имплантации.
- 2-я группа: 14 пациенток, проходивших лечение со стимуляцией суперовуляции и переносом эмбрионов в стимулированном цикле, с положительным результатом имплантации.
- 3-я группа: 4 пациентки, у которых беременность не наступила в стимулированном цикле (из 1-й группы) и лечение продолжилось методом пере-

носа криоконсервированных/размороженных эмбрионов в последующем цикле, с положительным результатом имплантации. В этих случаях эмбрионы витрифицировали на стадии blastocysts. Подготовка эндометрия осуществлялась препаратом эстрадиола валерата с 5–6-го дня менструального цикла. Дозу препарата подбирали индивидуально (4–6 мг/сут). Перенос эмбриона произведен на 19–20 день менструального цикла. Толщина эндометрия в день переноса размороженного эмбриона составляла 9–12 мм.

Оценка возрастных и антропометрических характеристик пациенток в исследуемых группах не выявила статистически значимых различий (табл. 2). Группы были сопоставимы по данным параметрам. Все пациенты были подобраны таким образом, чтобы минимизировать влияние вмешивающихся факторов на результаты программ ВРТ. При анализе особенностей менструального цикла, овариального резерва, репродуктивного анамнеза и структуры перенесенных гинекологических заболеваний в группах статистически значимых различий также не выявлено.

В стимулированных циклах у пациенток из 1-й и 2-й групп в качестве триггера овуляции был использован гонадотропин хорионический. Триггер вводился при наличии в яичниках фолликулов диаметром  $\geq 17$  мм. Пункция яичников проводилась через 36 ч после введения триггера

Таблица 2. Клинико-демографические характеристики пациенток

Исследуемые параметры	1-я группа (отрицательный результат имплантации), n=25	2-я группа (положительный результат имплантации) n=14	3-я группа (положительный результат имплантации в криопротоколе) n= 4	p
Индекс массы тела (кг/м <sup>2</sup> )*	22,1 (2,0)	22,2 (1,4)	22,0 (1,8)	> 0,05
Продолжительность менструального цикла (дней)*	29,9 (1,6)	28,4 (0,9)	29,0 (2,7)	> 0,05
Средний возраст (лет)*	32,3 (3,5)	32,0 (3,1)	30,0 (2,4)	> 0,05
Концентрация ФСГ на 2-3-й день менструального цикла (МЕ/мл)*	7,8 (1,4)	7,2 (1,4)	5,8 (0,5)	> 0,05
Концентрация АМГ (нг/мл)*	2,4 (1,0)	2,4 (0,7)	2,8 (0,5)	> 0,05
Количество антральных фолликулов на 2-3 день менструального цикла*	8,2 (1,6)	7,8 (1,5)	8,3 (1,0)	> 0,05
Наличие мужского фактора**	18 (64%) имели мужской фактор бесплодия	14 (78%) имели мужской фактор бесплодия	2 (50%) имели мужской фактор бесплодия	> 0,05
Бесплодие первичное**	13 (46%) имели первичное бесплодие	8 (44%) имели первичное бесплодие	2 (50%) имели первичное бесплодие	> 0,05
Наличие хэтчинга**	У 20 (71%) выполнен хэтчинг	У 10 (56%) выполнен хэтчинг	2 (50%) выполнен хэтчинг	> 0,05
Число ооцитов, полученных во время пункции*	7,8 (3,7)	7,4 (4,5)	8,0 (3,7)	> 0,05
Число полученных blastocysts*	1,4 (1,3)	1,4 (1,2)	2,8 (2,0)	> 0,05

\* данные представлены как среднее арифметическое (M) и стандартное отклонение (SD) в формате M (SD) с указанием значимости отличий при использовании ANOVA теста; \*\* данные представлены как абсолютные числа N и процентные доли от общего числа пациенток в группе P в формате N(P%) с указанием значимости отличий при использовании  $\chi^2$ -тест; Комментарий: 3-я группа (положительный результат имплантации в криопротоколе) совпадает с 1-й группой (отрицательный результат имплантации в стимулированном цикле), так как в 3-ю группу попали пациентки из 1-й группы после неудачной попытки ЭКО.

овуляции. Оплодотворение ооцитов было методом ЭКО (у 4 пациенток) или ИКСИ (у 35 пациенток). Поддержка лютеиновой фазы цикла у пациенток в стимулированном цикле и в цикле переноса криоконсервированных/размороженных эмбрионов выполнена препаратами дидрогестерона или прогестерона микронизированного, начиная со дня пункции фолликулов.

Культивирование эмбрионов, включенных в исследование, происходило в индивидуальных каплях с последующим переносом в полость матки эмбрионов под ультразвуковым контролем на 5-е сутки после трансвагинальной пункции.

Статистический анализ. Для статистической обработки результатов использовали скрипты, написанные на языке R [14], и программу RStudio [15]. Соответствие анализируемых параметров закону нормального распределения оценивали по значениям теста Шапиро—Уилка. Статистический анализ проводили с помощью  $\chi^2$ -теста для сравнения категориальных данных, метода ANOVA при анализе трех групп и нормальном распределении исследуемой величины или теста Манна—Уитни при парном сравнении в случае, когда распределение не соответствовало закону нормального распределения. Для описания категориальных бинарных данных использовали абсолютные числа N и процентные доли от общего числа пациенток в группе P в формате N (P%). Для описания количественных данных, имеющих нормальное распределение, использовали среднее арифметическое (M) и стандартное отклонение (SD) в формате M (SD). При распределении признаков с распределением, отличающимся от нормального, их описывали в виде медианы (Me) и квартилей Q1 и Q3 в формате Me (Q1; Q3). Поскольку анализировали как количественные, так и качественные признаки, то корреляционный анализ проводили с использованием непараметрического корреляционного критерия Спирмена. 95% доверительный интервал для коэффициента корреляции определяли с помощью преобразования Фишера. Величину порогового уровня значимости p принимали равной 0,05. Если значение p было меньше 0,001, то p указывали в формате  $p < 0,001$ . Кроме того, морфологическую характеристику эмбрионов и полученные экспериментальные данные анализировали с помощью дискриминантного анализа методом частных наименьших квадратов [16].

## Результаты и обсуждение

На первом этапе работы методом глубокого секвенирования были идентифицированы microRNA и piwiRNA в полости бластоцисты и в среде ее культивирования на 4-е сутки после оплодотворения. Было обнаружено, что среди молекул, идентифицированных в полости бластоцисты и в культуральной среде, наиболее представленными оказались piwiRNA (132 и 128 видов piwiRNA, присутствующих в полости бластоцисты и в культуральной среде, соответственно) по сравнению с microRNA (49 и 36 видов microRNA в полости бластоцисты и в культуральной среде соответственно). Среди молекул каждого класса мнРНК 73,5% microRNA и 34,7%

piwiRNA присутствовали, как в полости бластоцисты, так и в культуральной среде. Все microRNA, секретлируемые эмбрионом в культуральную среду, были обнаружены в полости бластоцисты. PiwiRNA имели отличный от microRNA паттерн секреции, заключающийся в том, что 33,7% piwiRNA присутствовали исключительно в полости бластоцисты, 31,6% — только в культуральной среде, 34,7% — в культуральной среде и в полости бластоцисты. Для анализа microRNA и piwiRNA методом количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) были отобраны молекулы с числом прочтения не менее 25. В пилотном эксперименте на 24 образцах были оптимизированы условия реакции ОТ-ПЦР с использованием праймеров, специфичных для выбранных microRNA и piwiRNA. Значимые сигналы ( $Ct < 35$  циклов) и специфичные продукты реакции были получены для 5 microRNA и 2 piwiRNA (hsa-let-7b-5p, hsa-let-7i-5p, hsa-let-7c-5p, hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-143-3p, hsa\_piR\_020401|gb|DQ598029|Homo, hsa\_piR\_023338|gb|DQ601914|Homo). Именно эти мнРНК были проанализированы методом количественной ПЦР в реальном времени на всей выборке образцов РНК ( $n=49$ ), выделенных из культуральной среды эмбрионов. Для выявления возможности классификации 49 образцов среды культивирования эмбрионов по их качеству в зависимости от схожести профилей экспрессии microRNA и piwiRNA был использован метод PLS-DA. Образцы были ранжированы в порядке возрастания качества эмбриона: ряд «морула-кавернозная морула-бластоциста плохого качества, бластоциста среднего качества, бластоциста хорошего качества, бластоциста отличного качества» был преобразован в ряд «0, 1, 2, 3, 4, 5». Модель PLS-DA строили на основании данных ОТ-ПЦР в виде  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  для каждой из исследуемых мнРНК в образце. На рис. 1 представлены графики счетов, построенные по результатам PLS-DA анализа. Точки, соответствующие эмбрионам отличного, хорошего и среднего качества сгруппировались вместе, преимущественно в первом и четвертом квадранте графика, а большая часть точек, соответствующих моруле и кавернозной моруле, образовали кластер в третьем квадранте (рис. 1а). Таким образом, исходя из профиля экспрессии мнРНК, можно оценивать стадию развития эмбриона.

Вклад шести мнРНК в возможность классификации эмбрионов по качеству характеризуют значения параметра важности переменной в проекции (variable importance in projection - VIP). Наибольшее значение этого параметра имеют четыре мнРНК: piR020401 (VIP=1,46027), let-7c-5p (VIP=1,17416), let-7b-5p (VIP=0,994657), let-7i-5p (VIP=0,942665), а наименьшее — miR-143-5p (VIP=0,623108) и miR-92a-3p (VIP=0,471951).

Вклад piR020401, let-7c-5p и let-7b-5p в определение качества эмбриона подтверждают результаты анализа непараметрическим методом ранговой корреляции по Спирмену. Ранжирование 49 образцов было выполнено также, как при построении модели PLS-DA (см. выше). Обнаружена статистически достоверная корреляция между уровнем экс-



ливо прослеживаются различия между группами сравнения в зависимости от вида мнРНК. Анализ уровня экспрессии мнРНК в сравниваемых группах методом Манна—Уитни выявил ряд статистически значимых отличий (табл. 4).

При наложении информации о результатах имплантации на модель, построенную для классификации эмбрионов по их качеству, отсутствует заметная кластеризация точек, соответствующих отрицательному и положительному результату имплантации (рис. 16).

Рис. 2. Бокс-диаграмма КИ мнРНК в группах эмбрионов, отличающихся по морфофункциональным характеристикам. Границами бокса 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

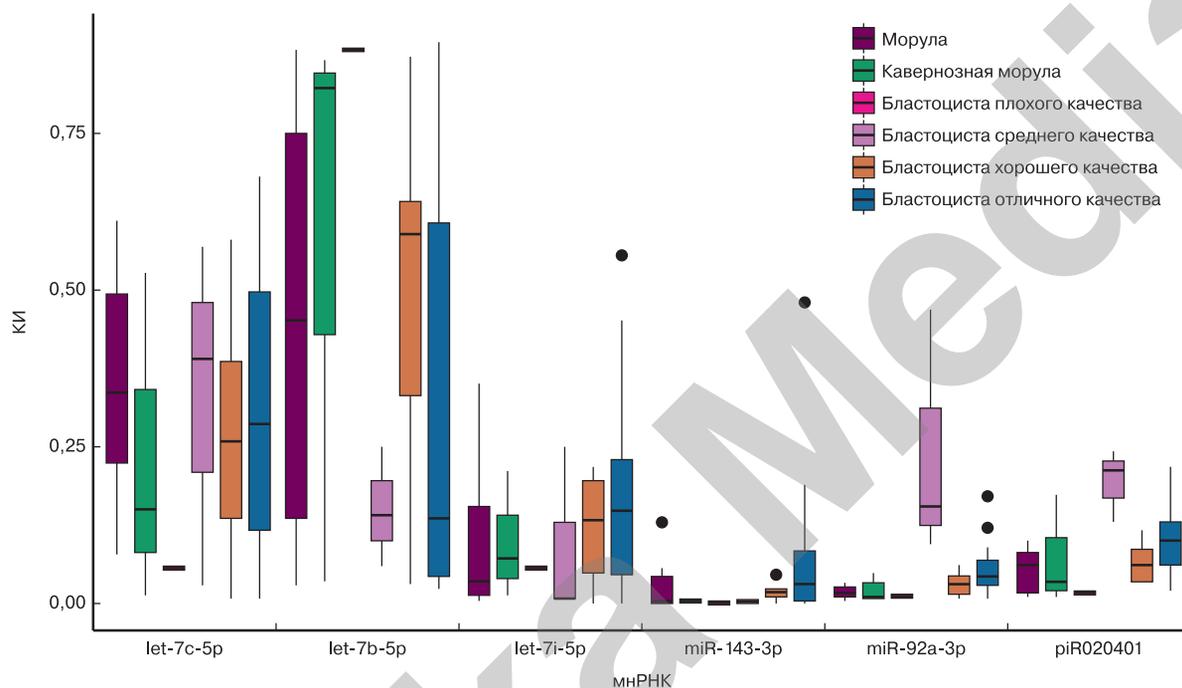


Таблица 4. Парное сравнение КИ уровня экспрессии мнРНК в группах образцов, представленных на рис. 2

мнРНК	Качество эмбриона	Me (Q1, Q3)	p
miR-92a-3p	Блостоциста среднего качества	0,15 (0,12, 0,31)	0,02
	Морула	0,02 (0,01, 0,03)	
	Блостоциста отличного качества	0,04 (0,03, 0,07)	0,005
	Морула	0,02 (0,01, 0,03)	
	Блостоциста хорошего качества	0,03 (0,01, 0,04)	0,01
	Блостоциста среднего качества	0,15 (0,12, 0,31)	
piR020401	Блостоциста отличного качества	0,04 (0,03, 0,07)	0,004
	Блостоциста среднего качества	0,15 (0,12, 0,31)	
	Блостоциста среднего качества	0,21 (0,17, 0,23)	0,02
	Морула	0,06 (0,02, 0,08)	
	Блостоциста отличного качества	0,10 (0,06, 0,13)	0,02
	Морула	0,06 (0,02, 0,08)	
	Блостоциста хорошего качества	0,06 (0,03, 0,08)	0,01
	Блостоциста среднего качества	0,21 (0,17, 0,23)	
Блостоциста отличного качества	0,10 (0,06, 0,13)	0,02	
Блостоциста среднего качества	0,21 (0,17, 0,23)		

Это подтверждает тот факт, что имплантационный потенциал эмбриона зависит, как от качества гамет, так и от ряда «материнских» факторов. Согласно данным некоторых исследований, пациентки с трубно-перитонеальным фактором бесплодия могут иметь сниженное количество и меньшую чувствительность рецепторов эстрогенов и прогестерона в эндометрии [17]. В результате этого нарушается рецептивность эндометрия, что может выступать причиной неудач циклов ВРТ. Стоит отметить, что неадекватная рецептивность и восприимчивость эндометрия ответственна приблизительно за две трети неудач имплантации [18].

Кроме этого, согласно данным Американского общества по репродуктивной медицине (ASRM) у пациенток в криопротоколе отмечена более высокая частота имплантации, наступления беременности и рождения живого ребенка [19]. Поэтому обращает на себя внимание тот факт, что в данном исследовании у 8% пациенток беременность наступила не в стимулированном цикле (№ эмбрионов 51, 97, 44) а в криопротоколе (№ эмбрионов 56, 94, 68) (рис. 1). Успехи, достигнутые в технологии криоконсервации эмбрионов, позволяют сохранять качество витрифицированных эмбрионов, а их потенциал для имплантации остается аналогичным нативным эмбрионам [20]. С каждым годом появляется все больше данных в пользу криоконсервации эмбрионов и их переноса в следующем цикле без гормональной стимуляции и воздействия на эндометрий. Эта стратегия может быть оправдана, так как сегментация цикла позволяет проводить профилактику синдрома гиперстимуляции яичников и переносить эмбрионы в более физиологичную внутриматочную среду, без возможного отрицательного влияния гормональной стимуляции на рецептивность эндометрия [21]. Показано, что преждевременный подъем уровня прогестерона на фоне мультифолликулярного роста при гонадотропной стимуляции сопровождается не только преждевременной секреторной трансформацией эндометрия, но и нарушением экспрессии генов, ответственных за имплантацию (НОХА 10, рецептора лейкомиа-ингибирующего фактора и др.) [22].

Вероятно, именно в связи с этими факторами эмбрионы класса А и В не всегда успешно имплантируются. Кроме этого, на имплантацию влияет и мужской фактор бесплодия, наличие/отсутствие хэтчинга и др. С другой стороны, эмбрионы более низкого класса в ряде случаев могут успешно приводить к наступлению беременности. Таким образом, ориентироваться лишь на морфологические параметры эмбриона при выборе кандидата на перенос в полость матки нецелесообразно и необходимо учитывать множество различных факторов [23].

## Заключение

В последние годы пристальное внимание ученых обращено к изучению роли мнРНК, выделенных из культуральной среды в процессе эмбриогенеза. В ходе настоящей исследовательской работы было показано, что данные молекулы позволяют дифференцировать стадии развития эмбриона. Для понимания вклада данных мнРНК в потенциал

развития и имплантации эмбриона необходимо дальнейшие исследования по анализу профиля экспрессии мнРНК на стадии морулы, а именно: 1) ее дифференцировки в бластоцисту; 2) дегенерации; 3) остановки в развитии на 5-е сутки после оплодотворения. Таким образом, может быть оптимизирован алгоритм наблюдения за эмбрионами разных стадий развития. Изучение профиля экспрессии идентифицированных piR020401, let-7c-5p, let-7b-5p и miR-92a-3p в культуральной среде эмбриона — неинвазивный и информативный метод выбора оптимального эмбриона и сочетается в себе все основные критерии, предъявляемые к наиболее перспективным способам современной диагностики, а также оптимизации программ ВРТ с учетом сопутствующих факторов.

Благодарность: работа выполнена за счет финансирования по госзаданию «Совершенствование программ вспомогательных репродуктивных технологий при применении инновационных высокотехнологических методик (эмбриологических, клеточных, иммунологических, молекулярно-генетических), регистрационный номер: АААА-А18-118053190022-8

## Литература/References

1. Сухих Г.Т., Назаренко Т.А., ред. Бесплодный брак. Современные подходы к диагностике и лечению. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2010 518с. [Sukhikh, G.T., Nazarenko, T.A., ed. Infertile marriage. Modern approaches to diagnosis and treatment. M.: GEOTAR-Media; 2010 518с. (in Russian)]
2. Корсак В.С., Смирнова А.А., Шурыгина О.В. ВРТ в России. Отчет за 2013 год. Регистр ВРТ. СПб.: Российская Ассоциация Репродукции Человека; 2015: 26-9. [Korsak V. S., Smirnova A. A., Shurygina O. V. ART in Russia. Report for 2013. ART Register: Russian Association of Human Reproduction; 2015: 26-9.(in Russian)]
3. Gardner D.K., Balaban B. Assessment of human embryo development using morphological criteria in an era of time-lapse, algorithms and 'OMICS': is looking good still important? Mol. Hum. Reprod. 2016; 22(10): 704-18.
4. Rocha J.C., Passalia F., Matos F.D., Maserati M.P. Jr., Alves M.F., Almeida T.G. et al. Methods for assessing the quality of mammalian embryos: How far we are from the gold standard? JBRA Assist. Reprod. 2016; 20(3): 150-8.
5. Кулакова Е.В., Калинина Е.А., Трофимов Д.Ю., Макарова Н.П., Хечумян Л.Р., Дударова А.Х. Вспомогательные репродуктивные технологии у супружеских пар с высоким риском генетических нарушений. Преимплантационный генетический скрининг. Акушерство и гинекология. 2017; 8: 21-7. [Kulakova E. V., Kalinina E. A., Trofimov D. Yu., Makarova N. P., Khechumyan L. R., Dudarova, A. H. Assisted reproductive technologies for married couples with a high risk of genetic disorders. Preimplantation genetic screening. Obstetrics and gynecology. 2017; 8: 21-7. (in Russian)]
6. Дранкина Ю.С., Тимофеева А.В., Чаговец В.В., Кононихин А.С., Франкевич В.Е., Калинина Е.А. Применение омических технологий в решении проблем репродуктивной медицины. Акушерство и гинекология. 2018; 9: 24-32. [Drapkina J. S., Timofeev A. V., Chagovets V. V., Kononikhin A. S., She, V. E., Kalinina E. A. The use of omics technologies in reproductive medicine. Obstetrics and gynecology. 2018; 9: 24-32. (in Russian)]
7. Kropp J., Salih S., Khatib H. Expression of microRNAs in bovine and human pre-implantation embryo culture media. Front. Genet. 2014; 5: 91.
8. Gilchrist G., Tscherner A., Nalpathamkalam T., Merico D., LaMarre J. MicroRNA expression during bovine oocyte maturation and fertilization. Int. J. Mol. Sci. 2016; 17(3): 396.

9. Houwing S., Kamminga L., Berezikov E., Cronembold D., Girard A., Elst H. et al. A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in Zebrafish. *Cell*. 2007; 129(1): 69-82.
10. Rosenbluth E., Shelton D., Sparks A., Devor E., Christenson L., Van Voorhis B. MicroRNA expression in the human blastocyst. *Fertil. Steril.* 2013; 99(3): 855-61. e3.
11. Roth L.W., McCallie B., Alvero R., Schoolcraft W.B., Minjarez D., Katz-Jaffe M. Altered microRNA and gene expression in the follicular fluid of women with polycystic ovary syndrome. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2014; 31(3): 355-62.
12. Capalbo A., Ubaldi F.M., Cimadomo D., Noli L., Khalaf Y., Farcomeni A. et al. MicroRNAs in spent blastocyst culture medium are derived from trophoblast cells and can be explored for human embryo reproductive competence assessment. *Fertil. Steril.* 2016; 105(1): 225-35. e1-3.
13. Liang J., Wang S., Wang Z. Role of microRNAs in embryo implantation. *Reprod Biol. Endocrinol.* 2017; 15(1): 90.
14. R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2018. Available at: <https://www.R-project.org/> и программу RStudio
15. RStudio Team. RStudio: Integrated development for R. RStudio. Boston, MA: RStudio Inc.; 2016. Available at: <http://www.rstudio.com/>
16. Wold S., Sjöröm M., Eriksson L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 2001; 58(2): 109-30.
17. Ruiz-Alonso M., Blesa D., Díaz-Gimeno P., Gómez E., Fernández-Sánchez M., Carranza F. et al. The endometrial receptivity array for diagnosis and personalized embryo transfer as a treatment for patients with repeated implantation failure. *Fertil. Steril.* 2013; 100(3): 818-24.
18. Altmäe S., Koel M., Vösa U., Adler P., Suhorutšenko M., Laisk-Podar T. et al. Meta-signature of human endometrial receptivity: a meta-analysis and validation study of transcriptomic biomarkers. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 10077.
19. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Performing the embryo transfer: a guideline. 2013.
20. Evans J., Hannan N.J., Edgell T.A., Vollenhoven B.J., Lutjen P.J., Osianlis T. et al. Fresh versus frozen embryo transfer: backing clinical decisions with scientific and clinical evidence. *Hum. Reprod. Update.* 2014; 20(6): 808-21.
21. Roque M., Valle M., Guimarães F., Sampaio M., Geber S. Freeze-all policy: fresh vs. frozen-thawed embryo transfer. *Fertil. Steril.* 2015; 103(5): 1190-3.
22. Bashiri A., Halper K.I., Orvieto R. Recurrent implantation failure—update overview on etiology, diagnosis, treatment and future directions. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2018; 16(1): 121.
23. Смольникова В.Ю., Калинина Е.А., Красношочка О.Е., Донников А.Е., Бурменская О.В., Трофимов Д.Ю., Сухих Г.Т. Возможности неинвазивной оценки состояния ооцита и эмбриона при проведении программ ВРТ по профилю экспрессии мРНК факторов роста в фолликулярной жидкости. *Акушерство и гинекология.* 2014; 9: 36-43. [Smolnikova V.Yu., Kalinina E.A., Krasnoshchoka O.E., Donnikov A.E., Burmenskaya O.E., Trofimov D.Yu., Sukhikh G.T. Possibilities for noninvasive oocyte and embryo evaluation when implementing assisted reproductive technology programs for follicular-fluid growth factor mRNA expression. *Obstetrics and gynecology.* 2014; 9: 36-43. (in Russian)]

Поступила 20.01.2019

Принята в печать 22.02.2019

Received 20.01.2019

Accepted 22.02.2019

**Сведения об авторах:**

**Тимофеева Анжелика Владимировна**, к.б.н., заведующая лабораторией прикладной транскриптомики отдела системной биологии в репродукции ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России Адрес: 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. Телефон: +7(495) 438-13-41 E-mail: avtimoreeva28@gmail.com

**Калинина Елена Анатольевна**, д.м.н., доцент, заведующая отделением вспомогательных репродуктивных технологий в лечении бесплодия им. профессора Б.В. Леонова ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России Адрес: 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. Телефон: +7(495) 438-13-41. E-mail: e\_kalinina@oparina4.ru

**Драпкина Юлия Сергеевна**, аспирант отделения вспомогательных репродуктивных технологий в лечении бесплодия им. профессора Б.В. Леонова ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России. Адрес: 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. Телефон: +79169500745 E-mail: julia.drapkina@gmail.com

**Чазовец Виталий Викторович**, к.ф.-м.н., старший научный сотрудник лаборатории протеомики и метаболомики репродукции человека отдела системной биологии в репродукции ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России Адрес: 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. Телефон: 8 (926) 562-65-90. E-mail: vvchagovets@gmail.com

**Макарова Наталья Петровна**. — к.б.н., старший эмбриолог отделения вспомогательных репродуктивных технологий в лечении бесплодия им. профессора Б.В. Леонова ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России. Адрес: 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. Телефон: + 7(495) 438-13-41. E-mail: npmakarova@gmail.com

**Сухих Геннадий Тихонович** - д.м.н., профессор, академик РАН, директор ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России Телефон: +7(495) 438-18-00 E-mail: gtsukhikh@mail.ru

**About the authors:**

**Timofeeva Angelika Vladimirovna**, PhD, Chief of the Laboratory of Transcriptomic at the Department of Systems Biology in Reproduction Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology, and Perinatology, Ministry of Health of Russia. 117997, Russia, Moscow, Ac. Oparina 4. Tel. +7(495) 438-13-41. E-mail avtimoreeva28@gmail.com

**Kalinina Elena Anatolievna**, MD, Associate Professor, Chief of the Department of Reproductive Health named after professor Leonov Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology, and Perinatology, Ministry of Health of Russia. 117997, Russia, Moscow, Ac. Oparina 4. Tel. +7(495) 438-13-41 E-mail: e\_kalinina@oparina4.ru

**Drapkina Yulia Sergeevna**, PhD student at the Department of Reproductive Health named after professor Leonov Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology, and Perinatology, Ministry of Health of Russia. 117997, Russia, Moscow, Ac. Oparina 4. Tel. +79169500745 E-mail: julia.drapkina@gmail.com

**Chagovets Vitaliy Viktorovich**, PhD, Senior Researcher of the Laboratory of Proteomics and Metabolomics in Human Reproduction at the Department of Systems Biology in Reproduction Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology, and Perinatology, Ministry of Health of Russia. 117997, Russia, Moscow, Ac. Oparina 4. Tel. 8 (926) 562-65-90. E-mail: vvchagovets@gmail.com

**Makarova Nataliya Petrovna**, PhD, senior embryologist at the Department of Reproductive Health named after professor Leonov Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology, and Perinatology, Ministry of Health of Russia. 117997, Russia, Moscow, Ac. Oparina 4. Tel. + 7(495) 438-13-41. E-mail: npmakarova@gmail.com

**Sukhikh Gennady Tikhonovich**, MD, PhD, Professor, Academician of Russian Academy of Sciences, Director of Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology, and Perinatology, Ministry of Health of Russia 17997, Russia, Moscow, Ac. Oparina 4. Tel. +7(495) 438-18-00. E-mail: gtsukhikh@mail.ru