



Современные методы оценки имплантационного потенциала эмбрионов в программах вспомогательных репродуктивных технологий

Г.В. Савостина, С.Г. Перминова, А.В. Тимофеева, М.А. Веюкова

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации; Россия, г. Москва

РЕЗЮМЕ

Цель обзора: проанализировать современные методы оценки имплантационного потенциала эмбрионов в программах вспомогательных репродуктивных технологий.

Основные положения. Представлены результаты исследований, посвященных выбору наиболее оптимального эмбриона для переноса на основании результатов визуальных методов оценки качества эмбрионов, преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии, анализа метаболомного, протеомного, транскриптомного профилей культуральных сред и бластоцели эмбрионов. Особое внимание уделено исследованиям малых некодирующих РНК (мнкРНК) в культуральной среде эмбрионов.

Заключение. В связи с высокой чувствительностью, объективностью и устойчивостью биомаркеров к деградации наиболее перспективным неинвазивным методом оценки имплантационного потенциала эмбрионов является анализ профиля мнкРНК в культуральных средах эмбрионов.

Ключевые слова: анеуплоидии, преимплантационное генетическое тестирование, малые некодирующие РНК, протеомный анализ, метаболомный анализ.

Вклад авторов: Савостина Г.В. — поиск и анализ литературы, написание текста; Перминова С.Г., Тимофеева А.В., Веюкова М.А. — редактирование и финальное утверждение рукописи.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии возможных конфликтов интересов.

Финансирование: статья подготовлена без финансовой поддержки.

Для цитирования: Савостина Г.В., Перминова С.Г., Тимофеева А.В., Веюкова М.А. Современные методы оценки имплантационного потенциала эмбрионов в программах вспомогательных репродуктивных технологий. Доктор.Ру. 2021; 20(8): 12–18. DOI: 10.31550/1727-2378-2021-20-8-12-18



Modern Methods for Assessment of the Implantation Potential of Embryos in Assisted Reproductive Programs

G.V. Savostina, S.G. Perminova, A.V. Timofeeva, M.A. Veyukova

V.I. Kulakov National Medical Scientific Centre of Obstetrics, Gynecology and Perinatal Medicine of the Ministry of Health of the Russian Federation; 4 Academician Oparin Str., Moscow, Russian Federation 117997

ABSTRACT

Objective of the Review: To analyse the modern methods for assessment of the implantation potential of embryos in assisted reproductive programs.

Key Points. We present the study results for selection of a most optimal embryo for transfer, using visual assessment of embryo quality, pre-implantation genetic aneuploidy testing, analysis of metabolomic, proteomic, transcriptomic profiles of culture media and embryo blastocoele. We have paid special attention to assessment of small non-coding RNA (sncRNA) in embryo culture medium.

Conclusion. Due to the high sensitivity, objectivity and biomarker resistance to degradation, the most promising non-invasive method to assess the implantation potential of an embryo is analysis of the sncRNA profile in embryo culture media.

Keywords: aneuploidy, pre-implantation genetic testing, small non-coding RNAs, proteomic analysis, metabolomic analysis.

Contributions: Savostina, G.V. — search for references, references analysis, text of the article; Perminova, S.G., Timofeeva, A.V., Veyukova, M.A. — editing and final approval of the manuscript for publication.

Conflict of interest: The authors declare that they do not have any conflict of interests.

Савостина Гузель Венеровна (**автор для переписки**) — аспирант ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. 117997, Россия, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. E-mail: Savostina2324@gmail.com

Перминова Светлана Григорьевна — д. м. н., доцент, ведущий научный сотрудник научно-клинического отделения вспомогательных репродуктивных технологий им. Ф. Паулсена ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. 117997, Россия, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. eLIBRARY.RU SPIN: 4470-5090. E-mail: perisvet@list.ru

Тимофеева Анжелика Владимировна — к. б. н., заведующая лабораторией «прикладной транскриптомики» отдела системной биологии в репродукции ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. 117997, Россия, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. eLIBRARY.RU SPIN: 8817-7793. E-mail: v_timofeeva@oparina4.ru

Веюкова Мария Александровна — к. б. н., заведующая эмбриологической лабораторией научно-клинического отделения вспомогательных репродуктивных технологий им. Ф. Паулсена ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России. 117997, Россия, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. E-mail: veyumary@gmail.com

Source of funding: No financial support has been provided for this article.

For citation: Savostina G.V., Perminova S.G., Timofeeva A.V., Veyukova M.A. Modern Methods for Assessment of the Implantation Potential of Embryos in Assisted Reproductive Programs. Doctor.Ru. 2021; 20(8): 12–18. (in Russian). DOI: 10.31550/1727-2378-2021-20-8-12-18

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на тенденцию к увеличению частоты применения вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), эффективность экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) все еще остается невысокой. Согласно данным регистра Российской Ассоциации Репродукции Человека, в 2018 году частота наступления беременности в программе ЭКО составила 37,4% в расчете на перенос эмбриона, при этом частота ранних репродуктивных потерь среди всех беременностей, наступивших в результате использования ВРТ, достигла 20,6%¹. Известно, что среди множества факторов, влияющих на частоту наступления беременности и родов с помощью ВРТ, основную роль играют качество эмбриона и рецептивность эндометрия [1].

Цель обзора: проанализировать современные методы оценки имплантационного потенциала эмбрионов при использовании ВРТ.

В клинической практике качество эмбрионов определяют на основании визуальной оценки морфологических характеристик эмбриона на стадии морулы (оценивают количество и размер клеток, степень фрагментации, наличие многоядерных/одnojядерных клеток) и на стадии бластоцисты (оценивают степень разрастания и состояние внутренней клеточной массы и трофобластической оболочки) [2]. Однако указанный метод предполагает необходимость извлечения эмбрионов из инкубационных систем, а высокая скорость развития эмбрионов и субъективность оценки снижают прогностическую ценность данного метода [3].

Благодаря внедрению техники непрерывной высокочастотной покадровой съемки (Time-lapse) стало возможным отслеживать динамику развития эмбрионов, не извлекая их из оптимальных условий инкубационных систем. При этом оценку морфологических параметров эмбрионов можно проводить каждые 10–15 минут, что позволяет более точно отследить скорость и особенности развития эмбрионов. Однако в настоящее время доказана слабая корреляция между морфологическими параметрами, скоростью развития эмбрионов и их способностью к имплантации [4].

ПРЕИМПЛАНТАЦИОННОЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ НА АНЕУПОИДИИ

Значительная часть неудач имплантации и ранних репродуктивных потерь ассоциирована с анеуплоидными эмбрионами [5]. При этом частота образования анеуплоидных эмбрионов имеет прямую корреляцию с возрастом женщины. Так, если у женщин в возрасте 26–30 лет частота анеуплоидий составляет 20–27%, то после 40 лет — 85% и более [6].

Известно, что нормальные морфокинетические характеристики эмбриона не исключают наличия хромосомных аномалий. Около 44,5% морфологически нормальных бластоцист анеуплоидны [7].

Внедрение преимплантационного генетического тестирования эмбрионов на анеуплоидии (ПГТ-А) значительно снизило вероятность переноса эмбриона с хромосомными аномалиями в полость матки, а также частоту неудачных попыток имплантации и ранних репродуктивных потерь [8].

По мере развития ПГТ-А разрабатывались различные методы анализа эмбрионального кариотипа, включая флюоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH, fluorescence *in situ* hybridization), матричную сравнительную геномную гибридизацию (aCGH, Comparative genomic hybridization), количественную ПЦР в реальном времени, позволяющую анализировать все хромосомы, и высокопроизводительное секвенирование (NGS, Next-Generation Sequencing) [9]. Наиболее оптимальным из всех существующих в настоящее время методов ПГТ-А является NGS.

Широкое использование данного метода определяется возможностью проведения полногеномного анализа, комплексной оценки анеуплоидий и несбалансированных хромосомных перестроек, а также высокой разрешающей способностью. [10]. На точность результата могут повлиять случайные ошибки полногеномной амплификации, травматизация клеток во время биопсии эмбриона, а также контаминация биопсированного материала чужеродной ДНК. Материал для анализа получают путем биопсии полярных телец ооцитов или эмбрионов с забором 1–2 бластомеров или 5–6 клеток трофобластической оболочки [9].

Образование анеуплоидных эмбрионов наиболее часто ассоциировано с неудачами имплантации и ранними репродуктивными потерями, особенно у женщин старшего репродуктивного возраста и у мужчин с тяжелой патологией сперматогенеза. Учитывая это, проведение ПГТ-А может быть целесообразным у женщин старшего репродуктивного возраста, при повторных неудачах имплантации и привычном невынашивании, а также у супружеских пар с тяжелыми нарушениями сперматогенеза.²

В многоцентровом рандомизированном клиническом исследовании, проведенном С. Rubio и соавт. (2017) [8], было продемонстрировано положительное влияние ПГТ-А при использовании ВРТ у женщин старшего репродуктивного возраста. Отмечено значительное снижение частоты ранних репродуктивных потерь, увеличение частоты живорождений и более короткое время достижения беременности в группе пациентов, которым проводили ПГТ-А, по сравнению с группой пациентов, не проходивших ПГТ-А.

Аналогичные результаты были получены в исследованиях F. Ubaldi (2017) [11], Е.П. Бейк (2018) [12], А. Reig (2020) [13]. При этом, согласно результатам исследования L.A. Murphy и соавт. (2019) [14], ПГТ-А при использовании ВРТ у женщин младше 38 лет не оказывает положительного влияния. Полученные результаты указывают на целесообразность ПГТ-А в программах ВРТ у женщин старшего репродуктивного возраста.

Согласно данным F. Popescu и соавт. (2018), около 67% повторных самопроизвольных выкидышей вызвано хромосомными аномалиями эмбрионов [15]. В нескольких исследованиях была продемонстрирована меньшая частота ранних репродуктивных потерь в программах ЭКО с ПГТ-А по сравнению с естественным зачатием у женщин с привычным невынашиванием беременности в анамнезе. [16].

В исследовании T. Sato и соавт. (2019) [17] супружеским парам с привычным выкидышем в анамнезе проводили ЭКО

¹ Российская Ассоциация Репродукции Человека. Отчет за 2018 год. URL: http://www.rahr.ru/registr_otchet.php

² Адамьян Л.В., ред. Женское бесплодие (современные подходы к диагностике и лечению). Клинические рекомендации (Протокол лечения). М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации; 2019. URL: http://disuria.ru/_ld/5/518_L1913MZ050319.pdf

с ПГТ-А. Было выявлено увеличение частоты живорождений в расчете на перенос эмбриона и снижение частоты ранних репродуктивных потерь в расчете на биохимическую беременность по сравнению с таковыми в программах ЭКО без ПГТ-А. Однако частота живорождений в расчете на пациента не имела значимых различий в обеих группах. Несмотря на то что ПГТ-А не увеличило частоту живорождений в расчете на пациента, оно позволило снизить количество переносов эмбрионов в полость матки, необходимых для достижения числа живорождений аналогичного таковому при естественном зачатии.

Схожие результаты были получены в исследованиях других авторов [17]. В целом проведение программы ЭКО с ПГТ-А не увеличивает частоту живорождений у женщин с привычным невынашиванием беременности, однако снижает частоту выкидышей и уменьшает время достижения беременности. Целесообразность ПГТ-А у данной группы пациентов обсуждается и требует дальнейшего изучения.

В исследовании М. Cozzolino и соавт. (2020) [18], включавшем сравнительный анализ исходов ВРТ у пациенток с повторными неудачами имплантации при ПГТ-А и без него, были получены противоречивые результаты. ПГТ-А увеличивало частоту имплантации и длительность беременности, если в анамнезе было 3 и более неудач при использовании ВРТ. При наличии 5-ти и более неудач ВРТ в анамнезе ПГТ-А не оказывало значимого влияния на исходы программ ВРТ. На сегодняшний день недостаточно данных, свидетельствующих о целесообразности ПГТ-А в данной группе пациентов.

В нескольких исследованиях была выявлена положительная корреляция между частотой образования анеуплоидных эмбрионов и тератозооспермией или олигозооспермией у супруга [19]. В исследовании А. Coates и соавт. (2015) [20] продемонстрировано почти трехкратное увеличение доли анеуплоидных эмбрионов у супружеских пар с олигозооспермией по сравнению с супругами, имевшими нормальные показатели спермы. Результаты были идентичны как среди пациентов, которым проводили ЭКО с использованием донорских ооцитов, так и в группе, где применяли собственные ооциты и средний возраст женщин составлял 35,4 года.

В исследовании К.А. Green и соавт. (2017) [21] было продемонстрировано отсутствие корреляционной зависимости между степенью ДНК-фрагментации сперматозоидов и частотой образования анеуплоидных эмбрионов. По данным N. Tarozzi и соавт. (2019) [22], у пациентов с нарушениями сперматогенеза отмечали значительное увеличение доли мозаичных эмбрионов по сравнению с мужчинами, имевшими нормальные показатели спермограммы. По-видимому, тяжелые нарушения сперматогенеза коррелируют с частотой образования анеуплоидных и мозаичных эмбрионов. ПГТ-А в данной группе пациентов может оказать положительное влияние на исходы программ ВРТ.

Несмотря на полученные в целом оптимистичные результаты, ПГТ-А обладает рядом недостатков: инвазивность, дороговизна, высокая трудоемкость, а также наличие ложноположительных/ложноотрицательных результатов [23]. Последние определяются невозможностью оценить хромосомный набор всего эмбриона на основании анализа нескольких биопсированных клеток и возможными различиями в ploидности клеток трофобласта и внутренней клеточной массы эмбриона. При этом частота встречаемости зуплоидного/анеуплоидного мозаицизма, по данным различных авторов, варьирует от 15% до 71% на стадии морулы

и от 3,9% до 33% на стадии бластоцисты [24]. Также на получение ложноположительных результатов может влиять способность к самокоррекции анеуплоидной бластоцисты [23].

НЕИНВАЗИВНЫЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ИМПЛАНТАЦИОННОГО ПОТЕНЦИАЛА ЭМБРИОНА

Все больше работ, направленных на поиск новых неинвазивных, более информативных, достоверных биомаркеров имплантационного потенциала, проводят с использованием омиксных технологий, которые позволяют анализировать метаболомный, протеомный, транскриптомный статусы фолликулярной жидкости, культуральные среды и самих эмбрионов.

Возможно также проводить неинвазивное ПГТ-А с применением бластоцентаза и анализа культуральной среды эмбриона. Однако частота ошибочных результатов значительно выше по сравнению с ПГТ-А, включающим биопсию трофобласта [25].

ОЦЕНКА ПРОТЕОМНОГО СТАТУСА

Анализ протеомного профиля включает современные высокопроизводительные технологии, позволяющие идентифицировать белки эмбрионального происхождения и дать количественную оценку им, а также их посттрансляционным модификациям и взаимодействиям. Различия в белковом составе эмбриональных транскриптомов могут стать потенциальными биомаркерами их жизнеспособности [26].

Методы анализа протеомного состава базируются на трех основных технологиях: двумерном электрофорезе с последующей масс-спектрометрией, комбинации одномерного электрофореза в полиакриламидном геле с обращенно-фазовой жидкостной хроматографией и масс-спектрометрией, а также на многомерном хроматографическом разделении белков в сочетании с масс-спектрометрической детекцией.

Несмотря на то что подавляющее число исследований протеомного состава проводят с использованием эмбрионов лабораторных животных [27, 28], отмечается увеличение числа работ, направленных на анализ протеомного состава жидкости бластоцелей и культуральных сред эмбрионов человека [29, 26, 30].

В исследовании G. Tedeschi и соавт. (2016) [26] был проведен сравнительный анализ протеомного профиля жидкости бластоцелей у женщин разного возраста. Целью исследования был поиск потенциальных биомаркеров «качества» эмбрионов и уточнение механизмов влияния возраста женщины на фертильность. В результате было выявлено 108 ранее не описанных белков. Дифференциально экспрессированные белки были классифицированы по 6 категориям в зависимости от выполняемых функций: оплодотворение и имплантация эмбриона, эмбриональное развитие, регуляция взаимодействия нуклеиновых кислот, передача сигналов, неохарактеризованные белки, прочие.

Важно отметить, что в группах женщин молодого и старшего репродуктивного возраста различался уровень экспрессии белков, ответственных за оплодотворение и имплантацию эмбриона (12% и 2% соответственно) и регулирующих взаимодействия нуклеиновых кислот (4% и 13% соответственно). Молекулярные функции многих дифференциально экспрессированных белков заключаются в координации динамики гистоновых белков и процессов транскрипции, регулирующих клеточный цикл.

У женщин старшего репродуктивного возраста в жидкости бластоцелей была выявлена повышенная концентрация

убиквитина-2, который участвует в регуляции деградации белка, включая убиквитин-протеасомную систему и аутофагию, неапоптотической гибели клеток посредством остановки клеточного цикла. Изменения уровня экспрессии данных белков могут влиять на имплантационный потенциал эмбриона посредством активации апоптоза и аутофагии.

На основании полученных данных предполагается, что повышенная частота неудач имплантации у пациенток старшего репродуктивного возраста при использовании ВРТ может быть связана с высокой концентрацией проапоптотических белков в бластоцели как следствие резкого нарушения регуляторных механизмов, участвующих в координации убиквитинового комплекса. Несмотря на полученные многообещающие результаты, на сегодняшний день основная сложность при анализе жидкости бластоцели связана с ее ограниченной биодоступностью (1–8 нл), недостаточной для анализа концентрации белков [29].

Н. Kaihola и соавт. (2019) [30] проводили анализ уровня каспазы-3 и гликопротеина, богатого гистидином, в культуральной среде в зависимости от морфологических характеристик эмбрионов и исходов программ ВРТ. Результаты исследования продемонстрировали обратную зависимость между уровнем каспазы-3 и качеством эмбрионов, а также частотой наступления беременности. Выявлена отрицательная корреляция между концентрацией богатого гистидином гликопротеина в культуральных средах эмбрионов и скоростью эмбрионального развития. Несмотря на полученные данные, авторы отмечают необходимость дальнейших исследований, чтобы оценить эффективность данных биомаркеров в клинической практике.

В исследовании С.М. Абрег и соавт. (2020) [31] был проведен сравнительный анализ концентраций β -ХГЧ, ФНО- α и ИЛ-8 в культуральной среде эмбрионов 5-х суток различного качества. В культуральных средах эмбрионов низкого качества (не достигших стадии бластоцисты к 5-м суткам культивирования, имевших повышенную фрагментацию, многоядерность с неравномерным размером клеток) концентрация β -ХГЧ была ниже в сравнении с таковой у эмбрионов хорошего и отличного качества. Концентрация провоспалительных цитокинов в целом была выше в группе эмбрионов низкого качества, однако уровни ФНО- α и ИЛ-8 значительно различались среди эмбрионов с неоптимальными морфологическими характеристиками, что может свидетельствовать о различных механизмах развития аномалий раннего эмбриогенеза.

Концентрация ФНО- α была выше в среде эмбриона с большим количеством неравномерно дробящихся, дегенеративных клеток, что, возможно, указывает на механизм активации апоптоза, который уменьшает количество аномальных бластомеров. Повышенная концентрация ИЛ-8 и сниженная концентрация ФНО- α в среде эмбриона низкого качества, у которого было меньше аномально делящихся клеток, может быть связана с развитием воспалительной реакции на фоне стойкого повреждения ДНК. Однако необходимы дальнейшие исследования на более многочисленной выборке.

Однако анализ протеомного профиля не является оптимальным методом оценки имплантационного потенциала эмбрионов в связи с высокими концентрациями альбумина, трансферрина, пептидов и других веществ, входящих в состав коммерческих культуральных сред, что значительно затрудняет поиск потенциальных биомаркеров, белков эмбрионального происхождения, которые зачастую определяются в чрезвычайно низких концентрациях [32].

ОЦЕНКА МЕТАБОЛОМНОГО СТАТУСА

Метаболическое профилирование — это количественная и качественная оценка конечных и промежуточных продуктов обмена веществ при помощи методов жидкостной хроматографии, газовой хроматографии, масс-спектрометрии, оптической спектрометрии, капиллярного электрофореза [33]. Даже небольшие изменения в экспрессии генов или синтезе белков в развивающемся эмбрионе способны привести к значительным отклонениям в метаболическом статусе, что позволяет более подробно изучить функционирование биологических систем [33].

Известно, что метаболизм углеводов на доимплантационном этапе развития эмбрионов подвергается изменениям в зависимости от стадии их развития. На ранних стадиях эмбриогенеза пируват и лактат, которые окисляются до ацетил-КоА с последующими метаболическими превращениями в цикле Кребса, являются основными источниками энергии. Во время бластуляции эти процессы сменяются гликолизом, который сопровождается возрастающим окислением глюкозы до молекул пировиноградной кислоты и повышением ее концентрации в культуральной среде эмбрионов [34]. Существуют данные, которые свидетельствуют о том, что эмбриону необходимы незаменимые и условно заменимые аминокислоты для трансформации в бластоцисту [35].

М. Motiei и соавт. (2020) [36] исследовали метаболиты (глюкозу, лактат, пируват, аминокислоты) в культуральных средах нормально развивающихся бластоцист и эмбрионов, остановившихся в развитии на стадии морулы. Известно, что для трансформации в бластоцисту 8-клеточный эмбрион нуждается в незаменимых и условно незаменимых аминокислотах. В связи с этим ожидалось значительное снижение концентрации данных аминокислот в культуральных средах эмбрионов на 5-е сутки культивирования.

Однако в результате исследования не было зафиксировано ожидаемого снижения концентрации незаменимых и условно незаменимых аминокислот, и не было выявлено различий между двумя группами. При этом исследователи отмечали значительное снижение концентрации дипептида глицилаланина и увеличение уровней аланина и глицина в культуральных средах эмбрионов, остановившихся в развитии на стадии морулы. Это может объясняться их большей метаболической активностью.

У остановившихся в развитии эмбрионов также было выявлено повышение уровня лактата, снижение концентрации пирувата и отсутствие динамики в уровнях глюкозы. По-видимому, это связано с изменением баланса между митохондриальными и цитоплазматическими процессами окисления углеводов, липидов и аминокислот. Авторы отмечают уникальность метаболомной оценки культуральных сред в качестве неинвазивного метода изучения биологических процессов, протекающих в эмбрионе и определяющих его имплантационный потенциал. Полученные противоречивые данные могут объясняться стохастической погрешностью в измерениях, различиями в составе культуральных сред и стадировании эмбрионального развития.

По результатам Кокрейновского обзора, включавшего 4 рандомизированных контролируемых исследования, в которых оценивали жизнеспособность эмбрионов по метаболомному профилю, на данный момент нет статистически значимых данных, которые бы свидетельствовали о прикладном значении данного метода, используемого с целью повысить частоту живорождений, снизить число выкидышей, многоплодных беременностей, внематочных беременностей

или аномалий плода. На сегодняшний день не существует работ, подтверждающих или опровергающих целесообразность применения метаболомного анализа в качестве метода оценки имплантационного потенциала эмбриона [37].

АНАЛИЗ ПРОФИЛЯ МАЛЫХ НЕКОДИРУЮЩИХ РНК

Согласно последним исследованиям в рамках проекта ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) по анализу генома человека, около 75% генома человека активно транскрибируется, и из 75% лишь 2% кодирует белки, а остальная часть транскриптома выполняет регуляторную функцию и включает в себя некодирующие РНК (нкРНК) [38].

К ним относятся длинные некодирующие РНК (днкРНК), участвующие в эпигенетическом контроле хроматина и промотор-специфичной регуляции экспрессии гена, и малые некодирующие РНК (мнкРНК), среди которых транспортные РНК (тРНК) и рибосомальные РНК (рРНК) участвуют в трансляции, малые ядерные РНК — в сплайсинге, малые ядрышковые РНК — в модификации малых РНК, а за посттранскрипционную регуляцию экспрессии генов отвечают микроРНК, малые интерферирующие РНК (миРНК) и пивиРНК [39]. Ученые активно изучают роль посттранскрипционных регуляторов в оо-, фолликуло- и эмбриогенезе и возможность их использования в качестве биомаркеров имплантационного потенциала эмбрионов [40].

ПивиРНК — самый многочисленный класс мнкРНК. Длина молекулы составляет от 26 до 32 нуклеотидов. ПивиРНК получили свое название благодаря способности связываться с белками семейства PIWI (P-element induced wimpy testis), которые относятся к классу Argonaute. Механизмы образования пивиРНК изучают, известно, что они преимущественно экспрессируются в клетках зародышевой линии с начала профазы I мейотического деления сперматогенеза, а также могут образовываться в соматических клетках [40].

Первичные пивиРНК образуются из длинных транскриптов-предшественников. Они являются антисмысловыми РНК, комплементарными транскриптам транспозонов — мобильным генетическим элементам. Если образуется комплекс с белками PIWI, первичные пивиРНК транспортируются в ядро, где подавляют экспрессию генов транспозонов. Если образуется комплекс с белками класса Aubergine, первичные пивиРНК комплементарно связывают транскрипты транспозонов, а вследствие эндонуклеазной активности Aub образуются два фрагмента РНК, один из которых является вторичной смысловой пивиРНК, не комплементарной транскрипту транспозона.

В комплексе с белком AGO3 вторичная пивиРНК связывается с первичной пивиРНК, образуя фрагмент последней, который либо снижает уровень экспрессии транспозонов, либо пополняет пул смысловых пивиРНК по механизму «пинг-понг». Таким образом, посредством репрессии транспозонов пивиРНК поддерживают целостность генома [40].

МикроРНК — эндогенные, эволюционно консервативные, одноцепочечные молекулы длиной 19–25 нуклеотидов, основной функцией которых также является подавление экспрессии генов за счет РНК-интерференции [40]. У людей микроРНК были обнаружены практически во всех тканях и биологических жидкостях организма, включая кровь, мочу, слюну, слезы, грудное молоко, сперму, околоплодные воды, спинномозговую, перитонеальную и плевральную жидкость.

Обнаружено более 130 микроРНК, экспрессирующихся в эмбрионах на стадии бластоцисты [41]. В исследовании В. McCallie и соавт. (2010) [42] было установлено, что профиль экспрессии микроРНК в культуральных средах эмбрионов у супружеских пар с мужским бесплодием отличается от профиля экспрессии микроРНК у пар с синдромом поликистозных яичников. Позже были выявлены особенности экспрессии микроРНК в зуплоидных и анеуплоидных бластоцистах, а также у эмбрионов разных полов. При анализе микроРНК было обнаружено, что *miR-141*, *miR-27b*, *miR-339-3p* и *miR-345* в более высоких концентрациях экспрессируются в группе зуплоидных эмбрионов по сравнению с анеуплоидными эмбрионами [43].

Выявлены различия в профиле экспрессии мнкРНК в культуральной среде эмбрионов в зависимости от имплантационного потенциала и исходов программ ВРТ [44]. В недавнем исследовании А.В. Тимофеевой и соавт. (2020) [45] выявлено, что уровень секреции и степень обратного захвата определенного спектра мнкРНК меняются в зависимости от стадии развития эмбриона и имплантационного потенциала. Так, повышенная экспрессия *hsa_piR_015462*, *hsa_piR_019675*, *hsa_piR_020381* и *hsa_piR_004880* на стадии морулы отражает активацию процесса материнско-зиготического перехода, который необходим для раннего эмбриогенеза, успешной имплантации и дальнейшего развития беременности.

В другом исследовании изучали зависимость профиля экспрессии микроРНК в семенной плазме пациентов с нормальными показателями сперматогенеза от скорости оплодотворения, количества полученных бластоцист и морфологических характеристик эмбрионов. Выявлена положительная корреляция между экспрессией *hsa-mir-191* в семенной плазме и количеством полученных бластоцист и качеством эмбрионов, а также их морфологическими параметрами [46].

С. Сuman и соавт. (2015) [47] определили уровни микроРНК в среде культивирования бластоцисты и продемонстрировали, что *miR-661* высоко экспрессируется в эмбрионах, неспособных имплантироваться. В исследованиях на первичной культуре эндометрия авторы пришли к выводу, что повышенный уровень секреции *miR-661* бластоцистой негативным образом влияет на адгезию клеток трофобласта к эпителию эндометрия, что приводит к нарушению имплантации эмбриона.

В пилотном исследовании Е. Borges и соавт. (2016) [48] была выявлена повышенная экспрессия *miR-142-3p* в культуральной среде эмбриона в качестве потенциального биомаркера отсутствия имплантационного потенциала у бластоцисты.

Выявлены особенности экспрессии мнкРНК при сравнительном анализе профиля экспрессии мнкРНК в культуральных средах эмбрионов супружеских пар с синдромом поликистозных яичников и мужским фактором бесплодия. Экспрессия *let-7a* и *miR-24* была снижена в обеих группах, однако экспрессия четырех других микроРНК (*miR-92*, *miR-93*, *miR-19a* и *miR-19b*) была снижена только в группе пациенток с синдромом поликистозных яичников [42]. Результаты другого исследования также определили повышенную экспрессию *miR-93* в качестве биомаркера синдрома поликистозных яичников [49].

Известно, что миРНК секретируется как бластоцистой, так и клетками эндометрия и участвует в регуляции активности сигнальных путей, отвечающих за имплантацию эмбриона [39].

Основными характеристиками идеального метода оценки эмбрионального потенциала являются неинвазивность, точность, устойчивость к деградации в течение долгого

времени, простота и высокая скорость анализа. Анализ мнкРНК в культуральной среде эмбрионов соответствует вышеописанным критериям [50]. Высокая стабильность и устойчивость к деградации мнкРНК связаны с их способностью инкапсулироваться в экзосомы, связываться с макромолекулярными комплексами. Таким образом они получают дополнительную защиту от деградирующих ферментов и могут обнаруживаться через длительные промежутки времени [50]. Однако экспрессия мнкРНК достаточно динамична и, вероятно, сильно варьирует в зависимости от этапов эмбрионального развития.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, улучшение существующих методов выбора эмбриона с оптимальным имплантационным потенциалом является важнейшей задачей ВРТ. Ее решение позволит увеличить частоту наступления беременностей и родов, а также снизить число многоплодных беременностей в программах ВРТ. Недостаточная эффективность используемых в настоящее время методов морфологической оценки качества эмбрионов послужила стимулом для разработки новых, более информативных и объективных методов диагностики.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. 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. DOI: 10.1186/s12958-018-0414-2
2. Lundin K., Ahlström A. Quality control and standardization of embryo morphology scoring and viability markers. *Reprod. Biomed. Online.* 2015; 31(4): 459–71. DOI: 10.1016/j.rbmo.2015.06.026
3. Meseguer M., Rubio I., Cruz M. et al. Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: a retrospective cohort study. *Fertil. Steril.* 2012; 98(6): 1481–9.e10. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.08.016
4. Zhang J., Tao W., Liu H. et al. Morphokinetic parameters from a time-lapse monitoring system cannot accurately predict the ploidy of embryos. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2017; 34(9): 1173–8. DOI: 10.1007/s10815-017-0965-8
5. Fesahat F., Montazeri F., Hoseini S.M. Preimplantation genetic testing in assisted reproduction technology. *J. Gynecol. Obstet. Hum. Reprod.* 2020; 49(5): 101723. DOI: 10.1016/j.jogoh.2020.101723
6. Franasiak J.M., Forman E.J., Hong K.H. et al. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: A review of 15,169 consecutive trophoctoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. *Fertil. Steril.* 2013; 101(3): 656–63.e1. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.11.004
7. Minasi M.G., Fiorentino F., Ruberti A. et al. Genetic diseases and aneuploidies can be detected with a single blastocyst biopsy: a successful clinical approach. *Hum. Reprod.* 2017; 32(8): 1770–7. DOI: 10.1093/humrep/dex215
8. Rubio C., Bellver J., Rodrigo L. et al. In vitro fertilization with preimplantation genetic diagnosis for aneuploidies in advanced maternal age: a randomized, controlled study. *Fertil. Steril.* 2017; 107(5): 1122–9. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2017.03.011
9. Schmutzler A.G. Theory and practice of preimplantation genetic screening (PGS). *Eur. J. Med. Genet.* 2019; 62(8): 103670. DOI: 10.1016/j.ejmg.2019.103670
10. Huang J., Yan L., Lu S. et al. Validation of a next-generation sequencing-based protocol for 24-chromosome aneuploidy screening of blastocysts. *Fertil. Steril.* 2016; 105(6): 1532–6. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2016.01.040
11. Ubaldi F.M., Cimadomo D., Capalbo A. et al. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy testing in women older than 44 years: a multicenter experience. *Fertil. Steril.* 2017; 107(5): 1173–80. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2017.03.007
12. Бейк Е.П., Коротченко О.Е., Гвоздева А.Д. и др. Роль преимплантационного генетического скрининга в повышении эффектив-

ПГТ-А позволило значительно снизить вероятность перенос анеуплоидного эмбриона, благодаря чему увеличилась частота наступления беременности при высоком риске образования анеуплоидных бластоцист. Однако недостатками ПГТ-А являются инвазивность и ложноположительные/ложноотрицательные результаты, связанные с мозаицизмом. В связи с этим поиск идеальных биомаркеров имплантационного потенциала эмбрионов продолжается.

Исследования в области омиксных технологий позволили более подробно изучить особенности развития эмбриона на протеомном, метаболомном, транскриптомном и геномном уровнях. Наиболее эффективны диагностические и прогностические тест-системы, основанные на анализе профиля экспрессии мнкРНК в культуральных средах эмбрионов. МнкРНК — главные регуляторы клеточного метаболизма, и любые изменения уровня их экспрессии отражаются на метаболическом статусе эмбриона, а значит, на его качестве и жизнеспособности. Высокая чувствительность, объективность, неинвазивность и устойчивость биомаркеров к деградации позволяют рассматривать данную технологию в качестве одного из наиболее перспективных методов оценки качества и имплантационного потенциала эмбрионов.

- ности программ вспомогательных репродуктивных технологий у пациенток позднего репродуктивного возраста. *Акушерство и Гинекология.* 2018; 4: 78–84. [Beik E.P., Korotchenko O.E., Gvozdeva A.D. et al. Role of preimplantation genetic screening in enhancing the effectiveness of assisted reproductive technology programs in late reproductive-aged patients. *Obstetrics and Gynecology.* 2018; 4: 78–84. (In Russian)]. DOI: 10.18565/aig.2018.4.78-84
13. Reig A., Franasiak J., Scott R.T. Jr. et al. The impact of age beyond ploidy: outcome data from 8175 euploid single embryo transfers. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2020; 37(3): 595–602. DOI: 10.1007/s10815-020-01739-0
 14. Murphy L.A., Seidler E.A., Vaughan D.A. et al. To test or not to test? A framework for counselling patients on preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A). *Hum. Reprod.* 2019; 34(2): 268–75. DOI: 10.1093/humrep/dey346
 15. Popescu F., Jaslow C.R., Kutteh W.H. Recurrent pregnancy loss evaluation combined with 24-chromosome microarray of miscarriage tissue provides a probable or definite cause of pregnancy loss in over 90% of patients. *Hum. Reprod.* 2018; 33(4): 579–87. DOI: 10.1093/humrep/dey021
 16. El Hachem H., Crepau V., May-Panloup P. et al. Recurrent pregnancy loss: current perspectives. *Int. J. Womens Health.* 2017; 9: 331–45. DOI: 10.2147/IJWH.S100817
 17. Sato T., Sugiura-Ogasawara M., Ozawa F. et al. Preimplantation genetic testing for aneuploidy: a comparison of live birth rates in patients with recurrent pregnancy loss due to embryonic aneuploidy or recurrent implantation failure. *Hum. Reprod.* 2019; 34(12): 2340–8. DOI: 10.1093/humrep/dez229
 18. Cozzolino M., Diaz-Gimeno P., Pellicer A. et al. Evaluation of the endometrial receptivity assay and the preimplantation genetic test for aneuploidy in overcoming recurrent implantation failure. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2020; 37(12): 2989–97. DOI: 10.1007/s10815-020-01948-7
 19. Petousis S., Prapas Y., Papatheodorou A. et al. Fluorescence in situ hybridisation sperm examination is significantly impaired in all categories of male infertility. *Andrologia.* 2018; 50(2). DOI: 10.1111/and.12847
 20. Coates A., Hesla J.S., Hurliman A. et al. Use of suboptimal sperm increases the risk of aneuploidy of the sex chromosomes in preimplantation blastocyst embryos. *Fertil. Steril.* 2015; 104(4): 866–72. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.06.033
 21. Green K.A., Patounakis G., Dougherty M.P. et al. Sperm DNA fragmentation on the day of fertilization is not associated with embryologic or clinical outcomes after IVF/ICSI. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2020; 37: 71–6. DOI: 10.1007/s10815-019-01632-5

22. Tarozzi N., Nadalini M., Lagalla C. et al. Male factor infertility impacts the rate of mosaic blastocysts in cycles of preimplantation genetic testing for aneuploidy. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2019; 36: 2047–55. DOI: 10.1007/s10815-019-01584-w
23. Gleicher N., Patrizio P., Brivanlou A. Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy — a Castle Built on Sand. *Trends Mol. Med.* 2021; 27(8): 731–42. DOI: 10.1016/j.molmed.2020.11.009
24. Babariya D., Fragouli E., Alfarawati S. et al. The incidence and origin of segmental aneuploidy in human oocytes and preimplantation embryos. *Hum. Reprod.* 2017; 32(12): 2549–60. DOI: 10.1093/humrep/dex324
25. Handyside A.H. Noninvasive preimplantation genetic testing: dream or reality? *Fertil. Steril.* 2016; 106(6): 1324–5. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2016.08.046
26. Tedeschi G., Albani E., Borroni E.M. et al. Proteomic profile of maternal-aged blastocoel fluid suggests a novel role for ubiquitin system in blastocyst quality. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2017; 34(2): 225–38. DOI: 10.1007/s10815-016-0842-x
27. Sanchez D.J.D., Vasconcelos F.R., Teles-Filho A.C.A. et al. Proteomic profile of pre-implantational ovine embryos produced in vivo. *Reprod. Domest. Anim.* 2021; 56(4): 586–603. DOI: 10.1111/rda.13897
28. Jensen P.L., Beck H.C., Petersen T.S. et al. Proteomic analysis of the early bovine yolk sac fluid and cells from the day 13 ovoid and elongated preimplantation embryos. *Theriogenology.* 2014; 82(5): 657–67. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2014.04.028
29. Jensen P.L., Beck H.C., Petersen J. et al. Proteomic analysis of human blastocoel fluid and blastocyst cells. *Stem. Cells Dev.* 2013; 22(7): 1126–35. DOI: 10.1089/scd.2012.0239
30. Kaihola H., Yaldir F.G., Bohlin T. et al. Levels of caspase-3 and histidine-rich glycoprotein in the embryo secretome as biomarkers of good-quality day-2 embryos and high-quality blastocysts. *PLoS One.* 2019; 14(12): e0226419. DOI: 10.1371/journal.pone.0226419
31. Abreu C.M., Thomas V., Knaggs P. et al. Non-invasive molecular assessment of human embryo development and implantation potential. *Biosens Bioelectron.* 2020; 157: 112144. DOI: 10.1016/j.bios.2020.112144
32. Poli M., Ori A., Child T. et al. Characterization and quantification of proteins secreted by single human embryos prior to implantation. *EMBO Mol. Med.* 2015; 7(11): 1465–79. DOI: 10.15252/emmm.201505344
33. Uyar A., Seli E. Metabolomic assessment of embryo viability. *Semin. Reprod. Med.* 2014; 32(2): 141–52. DOI: 10.1055/s-0033-1363556
34. Egea R.R., Puchalt N.G., Escrivá M.M. et al. OMICS: Current and future perspectives in reproductive medicine and technology. *J. Hum. Reprod. Sci.* 2014; 7(2): 73–92. DOI: 10.4103/0974-1208.138857
35. Sturmey R.G., Brison D.R., Leese H.J. Symposium: innovative techniques in human embryo viability assessment. Assessing embryo viability by measurement of amino acid turnover. *Reprod. Biomed. Online.* 2008; 17(4): 486–96. DOI: 10.1016/s1472-6483(10)60234-9
36. Motiei M., Vaculikova K., Cela A. Non-Invasive Human Embryo Metabolic Assessment as a Developmental Criterion. *J. Clin. Med.* 2020; 9(12): 4094. DOI: 10.3390/jcm9124094
37. Siristatidis C.S., Sertedaki E., Vaidakis D. et al. Metabolomics for improving pregnancy outcomes in women undergoing assisted reproductive technologies. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2018; 3(3): CD011872. DOI: 10.1002/14651858.CD011872.pub3
38. ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature.* 2012; 489(7414): 57–74. DOI: 10.1038/nature11247
39. Fu X.-D. Non-coding RNA: a new frontier in regulatory biology. *Natl. Sci. Rev.* 2014; 1(2): 190–204. DOI: 10.1093/nsr/nwu008
40. Czech B., Munafò M., Ciabrelli F. et al. piRNA-Guided Genome Defense: From Biogenesis to Silencing. *Ann. Rev. Genet.* 2018; 52: 131–57. DOI: 10.1146/annurev-genet-120417-031441
41. Mouillet J.-F., Ouyang Y., Coyne C.B. et al. MicroRNAs in placental health and disease. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2015; 213(4 Suppl): S163–72. DOI: 10.1016/j.ajog.2015.05.057
42. McCallie B., Schoolcraft W.B., Katz-Jaffe M.G. Aberration of blastocyst microRNA expression is associated with human infertility. *Fertil. Steril.* 2010; 93(7): 2374–82. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2009.01.069
43. Rosenbluth E.M., Shelton D.N., Sparks A.E.T. et al. MicroRNA expression in the human blastocyst. *Fertil. Steril.* 2013; 99(3): 855–61.e3. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.11.001
44. Rosenbluth E.M., Shelton D.N., Wells L.M. et al. Human embryos secrete microRNAs into culture media—a potential biomarker for implantation. *Fertil. Steril.* 2014; 101(5): 1493–500. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2014.01.058
45. Timofeeva A., Drapkina Y., Fedorov I. et al. Small Noncoding RNA Signatures for Determining the Developmental Potential of an Embryo at the Morula Stage. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(24): 9399. DOI: 10.3390/ijms21249399
46. Xu H., Wang X., Wang Z. et al. MicroRNA expression profile analysis in sperm reveals hsa-mir-191 as an auspicious omen of in vitro fertilization. *BMC Genomics.* 2020; 21(1): 165. DOI: 10.1186/s12864-020-6570-8
47. Cuman C., Van Sinderen M., Gantier M.P. et al. Human Blastocyst Secreted microRNA Regulate Endometrial Epithelial Cell Adhesion. *EBioMedicine.* 2015; 2(10): 1528–35. DOI: 10.1016/j.ebiom.2015.09.003
48. Borges E. Jr., Setti A.S., Braga D.P.A.F. et al. miR-142-3p as a biomarker of blastocyst implantation failure — A pilot study. *JBRA Assist. Reprod.* 2016; 20(4): 200–5. DOI: 10.5935/1518-0557.20160039
49. Sathyapalan T., David R., Gooderham N.J. et al. Increased expression of circulating miRNA-93 in women with polycystic ovary syndrome may represent a novel, non-invasive biomarker for diagnosis. *Sci. Rep.* 2015; 5: 16890. DOI: 10.1038/srep16890
50. Boon R.A., Vickers K.C. Intercellular transport of microRNAs. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2013; 33(2): 186–92. DOI: 10.1161/ATVBAHA.112.300139

Поступила / Received: 01.06.2021

Принята к публикации / Accepted: 13.07.2021