

ОБЗОРЫ

© Коллектив авторов, 2021

Э.З. ВАЛИАХМЕТОВА¹, Е.В. КУЛАКОВА¹, Ю.С. СКИБИНА², А.Ю. ГРЯЗНОВ²,
А.П. СЫСОЕВА¹, Н.П. МАКАРОВА¹, Е.А. КАЛИНИНА¹

НЕИНВАЗИВНОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ ПРЕИМПЛАНТАЦИОННЫХ ЭМБРИОНОВ ЧЕЛОВЕКА IN VITRO КАК СПОСОБ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ИСХОДОВ ПРОГРАММ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОГО ОПЛОДОТВОРЕНИЯ

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия
²ООО НПП «Наноструктурная Технология Стекла» и МНОЦ «Структурная нанобиофотоника», Саратов, Россия

Проведен систематический анализ данных современной литературы о неинвазивных методах диагностики качества эмбриона и его генетического статуса. В обзор включены данные зарубежных и отечественных статей, найденных в Pubmed по данной теме, за последние 3 года. Улучшение показателей исхода программ ЭКО определяется многими факторами, в том числе и качеством эмбриона. Расширение знаний о его развитии и физиологии, во многом благодаря различным современным методам и технологиям обработки данных, позволяет определить не только уровень морфологического развития эмбриона, но и прогнозировать потенциал к дальнейшему развитию. Неинвазивность, безопасность и результативность метода являются главными критериями для современной диагностики потенциала эмбриона. Многочисленные исследования среды культивирования эмбрионов отвечают этим требованиям и представляются перспективными в селекции качественного эмбриона.

Заключение. Исследование молекулярного состава культуральных сред эмбрионов позволяет всесторонне рассмотреть жизненный цикл эмбриона, оценить взаимосвязь клеточного метаболизма с глубинными механизмами регуляции. Развитие омиксных технологий позволило получить представления о молекулярном профиле среды культивирования эмбриона и расширило наши знания о физиологии его развития, выявляя и характеризуя потенциально важные для наступления беременности биомаркеры. Дальнейшее совершенствование методов анализа культуральных сред, обработки данных, а также увеличение масштабов исследования в перспективе могут дать новый, неинвазивный предиктор качества эмбриона и его имплантационного потенциала.

Ключевые слова: вспомогательные репродуктивные технологии, среда культивирования, качество эмбриона, метаболическая активность эмбриона, неинвазивное преимплантационное генетическое тестирование, экстракорпоральное оплодотворение.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии возможных конфликтов интересов.

Вклад авторов. Валиахметова Э.З.: сбор и анализ литературных данных, обработка исходного материала и написание статьи; Кулакова Е.В.: анализ литературных данных, написание рукописи статьи; Скибина Ю.С., Грязнов А.Ю., Сысоева А.П.: редактирование рукописи, критический анализ; Макарова Н.П., Калинина Е.А.: редактирование и утверждение публикации.

Финансирование. Работа проведена без привлечения дополнительного финансирования со стороны третьих лиц.

Для цитирования: Валиахметова Э.З., Кулакова Е.В., Скибина Ю.С., Грязнов А.Ю., Сысоева А.П., Макарова Н.П., Калинина Е.А. Неинвазивное тестирование преимплантационных эмбрионов человека in vitro как способ прогнозирования исходов программ экстракорпорального оплодотворения. *Акушерство и гинекология.* 2021; 5: 5-16
<https://dx.doi.org/10.18565/aig.2021.5.5-16>

©A group of authors, 2021

E.Z. VALIAKHMETOVA¹, E.V. KULAKOVA¹, YU.S. SKIBINA³, A.YU. GRYAZNOV²,
A.P. SYSOEVA¹, N.P. MAKAROVA¹, E.A. KALININA²

NON-INVASIVE TESTING OF HUMAN PREIMPLANTATION EMBRYOS IN VITRO AS A WAY TO PREDICT THE OUTCOMES OF IN VITRO FERTILIZATION PROGRAMS

¹Academician V.I. Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology, and Perinatology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

²Research and Production Enterprise "Nanostructured Glass Technology" and International Research and Education Center "Structure-Mediated al Nanobiophotonics" Saratov, Russia

The data available in the current literature on non-invasive methods for diagnosing the quality of an embryo and its genetic status were systematically analyzed. The review includes data from foreign and Russian articles published

in Pubmed on this topic over the past 3 years. The improvement in the outcome of the IVF program is determined by many factors, including the quality of an embryo. The expansion of knowledge in relation to its development and physiology largely due to various current data processing methods and technologies can determine not only the level of embryonic morphological development, but also to predict the potential for further development. The non-invasiveness, safety, and efficiency of the method are the main criteria for current diagnosis of the potential of the embryo. Numerous studies of the embryo culture medium meet these requirements and seem promising in the selection of high-quality embryos.

Conclusion. The study of the molecular composition of culture media for the embryo makes it possible to comprehensively consider its life cycle, to assess the relationship of cellular metabolism to deep regulatory mechanisms. The development of omix technologies could gain insights into the molecular profile of the embryo culture medium, by identifying and characterizing the biomarkers that are potentially important for the onset of pregnancy. Further improvement of methods for analyzing culture media, processing the data, and increasing the future scope of research can provide a new, non-invasive predictor for the quality of the embryo and its implantation potential.

Keywords: assisted reproductive technologies, culture medium, embryo quality, embryonic metabolic activity, non-invasive pre-implantation genetic testing, in vitro fertilization.

Authors' contributions. Valiakhmetova E.Z.: literary data collection and analysis; initial material processing; writing the article; Kulakova E.V.: literary data analysis; writing the manuscript of the article; Skibina Yu.S., Gryaznov A.Yu., Sysoeva A.P.: editing the manuscript; critical analysis; Makarova N.P., Kalinina E.A.: editing and approving the publication.

Conflicts of interest. The authors declare that there are no possible conflicts of interest.

Financing. The investigation has been conducted without additional funding from third parties.

For citation: Valiakhmetova E.Z., Kulakova E.V., Skibina Yu.S., Gryaznov A.Yu., Sysoeva A.P., Makarova N.P., Kalinina E.A. Non-invasive testing of human preimplantation embryos in vitro as a way to predict the outcomes of in vitro fertilization programs. *Akusherstvo i Ginekologiya/Obstetrics and Gynecology*. 2021; 5: 5-16 (in Russian) <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2021.5.5-16>

Метод экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) является наиболее распространенным в лечении бесплодия различного генеза. Последние десятилетия демонстрируют значительный прогресс развития метода ЭКО, а также увеличение доли успешных исходов. Качество эмбрионов является ключевым фактором, определяющим исход проведения программы ЭКО. При этом показатель частоты имплантации среди перенесенных эмбрионов часто не превышает 40% суммарно по всем возрастным группам пациентов [1]. До настоящего времени нерешенным остается вопрос стандартизации и унификации оценки эмбриона человека, культивируемых *in vitro*. Существующие классификации, в частности Стамбульский консенсус 2011 г., упрощенно оценивают эмбрионы только морфологически без учета генетического, протеомного, метаболомного и других статусов. Именно разработка объективного метода оценки морфологии эмбрионов является задачей особой важности. В некоторых современных публикациях эмбриолога, проводящего визуальный анализ эмбриона, предлагается заменить на искусственный интеллект (ИИ), которому для оценки будут передаваться, например, изображения эмбрионов [2]. Совместно с молекулярными биологами разрабатываются неинвазивные тесты, которые могут дать информацию о метаболических или других параметрах жизнеспособности эмбриона [3, 4]. Именно такой совместный подход фундаментальной науки и клинической практики может дать самую оптимальную систему оценки эмбриона в программах лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ).

В настоящем обзоре проанализированы современные подходы к прогнозированию исходов про-

грамм ВРТ с применением различных неинвазивных молекулярно-биологических, физических и математических методов.

Оценка генетического статуса эмбриона по свободной ДНК в культуральной среде

С появлением преимплантационного генетического тестирования (ПГТ) как дополнительного метода диагностики качества эмбрионов показатели успешных исходов программ ВРТ увеличились. Однако наличие инвазивности метода, клеточного мозаицизма, случаев рождения генетически нормального ребенка после переноса анеуплоидного эмбриона [5] и, вероятно, выраженная способность эмбрионов к самокоррекции генетических ошибок на ранних стадиях развития требуют переоценки значимости ПГТ [6].

Обнаружение свободной внеклеточной ДНК (cfDNA) в среде культивирования эмбрионов стало значимым моментом для неинвазивной диагностики генетического статуса эмбрионов. Как ранее указывалось, ПГТ эмбрионов имеет ряд недостатков, что делает генетический анализ свободной эмбриональной ДНК потенциально полезным для оценки генетической конституции эмбрионов и предлагает альтернативу традиционному ПГТ.

В исследовании Rubio C. et al. на основании изучения 115 образцов культуральной среды эмбрионов и биопсии трофобласта приводятся выводы о потенциале cfDNA в отношении характеристики хромосомного статуса эмбриона [7]. В целом общий коэффициент соответствия пloidности и пола между результатами биопсии трофобласта

и данными cfDNA среды культивирования составил 78,7%, а чувствительность и специфичность – 94,5% и 71,7% соответственно. Значительное увеличение всех данных показателей наблюдалось для образцов 6-го и 7-го дня по сравнению с образцами 5-го дня (общий коэффициент соответствия плоидности и пола составил 84%, а чувствительность и специфичность – 95,2% и 82,1% соответственно). Показатель имплантации эуплоидных эмбрионов по данным биопсии трофэктодермы и cfDNA среды культивирования был в 3 раза выше, чем у эмбрионов, эуплоидных по биопсии, но анеуплоидных по данным анализа cfDNA (52,9% против 16,7% соответственно).

В проспективном исследовании Yeung Q.S.Y. et al., где приводятся самые масштабные сведения по данной теме на сегодняшний день, на основании 48 циклов ПГТ на анеуплоидии (ПГТ-А) и 168 образцов культуральной среды эмбрионов продемонстрирована эффективность применения неинвазивного ПГТ-А (NiPGT-A) в оценке плоидности и пола эмбриона, а также в прогнозировании исхода переноса [8]. По данным ПГТ-А, 49 эмбрионов 5-х суток культивирования были эуплоидными (29,2%) и 119 – анеуплоидными (70,8%). Забор культуральной среды эмбрионов осуществлялся в день биопсии трофэктодермы. После процесса амплификации и фильтрации от образцов с недостаточным содержанием ДНК процессу секвенирования нового поколения подлежали только 116 проб. Показатели соответствия двух сравниваемых методов были рассчитаны с применением критерия χ^2 . Коэффициент полной конкордантности по аутосомам между результатами ПГТ-А и NiPGT-A составил 62,1% (72/116): 27 образцов среды культивирования (23,3%) показали абсолютно идентичные данным ПГТ-А результаты и 45 образцов (38,8%) демонстрировали частичное соответствие, то есть случаи, когда NiPGT-A определяло увеличение/уменьшение экспрессии какой-либо хромосомы или сегмента хромосомы, в то время как ПГТ-А идентифицировало потерю аналогичных хромосомы или сегмента (33 образца (73,3%)) или комплементарных хромосомы или сегмента (12 образцов (26,7%)). Показатель несоответствия между результатами ПГТ-А и NiPGT-A составил 37,9% (44 случая), из них ложноотрицательных (NiPGT-A определяет эмбрион как эуплоидный, в то время как ПГТ-А идентифицирует его анеуплоидный статус) – 16 случаев, ложноположительных (по данным NiPGT-A – анеуплоидия, по данным ПГТ-А – эуплоидия) – 15 случаев и 13 случаев диагностирования анеуплоидии эмбриона по данным ПГТ-А и NiPGT-A, но по совершенно разным хромосомам. Показатель соответствия данных ПГТ-А и NiPGT-A по половой принадлежности составил 82,4% (89/108): мужской генотип (XY) идентифицирован у 43 эмбрионов, женский (XX) – у 42, генотип X0 определен у 4 эмбрионов. Морфологическая оценка эмбрионов также соотносилась с данными NiPGT-A и ПГТ-А. Из 116 образцов среды культивирования 63 (54,3%) соответствовали средам эмбрионов морфологически отличного и хорошего качества, 53 (45,7%) – эмбрионов плохого качества. Показатель соответствия

плоидности и морфологии для эмбрионов отличного/хорошего и плохого качества составил 58,7% против 66,0%. Перенос 14 эуплоидных эмбрионов, по данным ПГТ-А, привел к 3 случаям живорождения, 3 случаям продолжающейся беременности и 5 случаям выкидыша. Очевидно, что к интерпретации результатов NiPGT-A стоит подходить осторожно, т.к. только в 1 из 5 случаев выкидыша было получено генетическое заключение о плоидности эмбриона, частично подтверждающее данные NiPGT-A, а перенос 2 из 7 анеуплоидных эмбрионов, по данным анализа свободной ДНК среды культивирования, привел к рождению здоровых детей. Однако, принимая во внимание феномен клеточного мозаицизма при проведении ПГТ-А, метод вполне претендует на существование, так как потенциально может более полно отразить генетическую конституцию эмбриона, о чем свидетельствуют его чувствительность и специфичность в оценке плоидности и половой принадлежности эмбриона: 81,6% и 48,3% соответственно. Прогностическая ценность положительного результата составила 82,6%, прогностическая ценность отрицательного результата – 46,7%.

В исследовании Jiao J. et al. результат генетического статуса эмбриона, по данным NiPGT, соотносится с результатами образцов биопсии его тканей и трофэктодермы [9]. Для 21 эмбриона от пар с нормальным кариотипом данные ПГТ-А образцов культуральной среды и биопсии трофэктодермы совпадали с результатами ПГТ-А образцов тканей эмбриона в 90% и 86% случаев соответственно, а в 76% случаев наблюдалось полное соответствие кариотипов. Для 41 эмбриона от пар с хромосомными перестройками в кариотипе показатели соответствия данных ПГТ-СП (структурные перестройки) образцов культуральной среды, биопсии трофэктодермы и результатов ПГТ-СП образцов тканей эмбриона составили 90% и 100% соответственно. Исследование выполнено при помощи гибридного линейного метода полногеномной гибридизации, что значительно ускорило процесс создания библиотеки данных и теоретически позволяет осуществлять перенос эмбрионов в стимулированном цикле без криоконсервации эмбрионов.

Прспективное многоцентровое исследование [10], проведенное десятью центрами ВРТ после того, как их эмбриологи прошли обучение и подтвердили свои результаты с использованием NiPGT-A, показало возможность обнаружения мозаицизма в эмбрионе по внеклеточной ДНК в культуральной среде. Согласно данным исследования, эуплоидные бластоцисты были диагностированы в 36,4% (80/220) случаев, анеуплоидия – в 31,3% (69/220) и мозаицизм – в 32,3% (71/220; анеуплоидия $\geq 60\%$). Значения мозаичности варьировались от 29,8% до 33,8% в разных возрастных группах. По отдельности наиболее частой хромосомной аномалией была ХХУ (синдром Клайнфельтера), встречающаяся в 18 случаях, за которой следовала аномалия хромосомы 21 (трисомия/моносомия) в 8 случаях. Данные NiPGT-A показали, что частота анеуплоидных клеток составляет $\geq 60\%$ во всех случаях хромосомного мозаицизма. Это первое сообщение в научной лите-

ратуре, которое связывает хромосомную плоидность в бластоцистах, проанализированную с помощью NiPGT-A, с увеличением возраста пациентов.

Суммарно на сегодняшний день можно говорить об эффективности применения метода NiPGT-A, который демонстрирует высокие показатели соответствия с результатами традиционного ПГТ-A. Однако остается до конца не решенной проблема ложноположительных результатов при контаминации среды культивирования материнской ДНК, а также вызывает опасения недостаточная численность выборки многих исследований.

Необходимо отметить, что даже при использовании NiPGT-A с ПГТ-A нет гарантий, что произойдет имплантация и наступит беременность, которая приведет к рождению здорового ребенка. Именно поэтому сохраняется необходимость в дополнительных подходах, прежде всего неинвазивных, способных рационально оценить не только генетический статус эмбриона, но и его метаболическую активность.

Данные приведенных выше исследований представлены в таблице 1.

Омиксные технологии при исследовании культуральных сред для прогнозирования исходов ЭКО

В связи с достаточно высокой информативностью изучения культуральных сред эмбрионов одним из перспективных направлений в поиске марке-

ров оценки качества эмбрионов с максимальной имплантационной способностью служит изучение молекулярных компонентов культуральных сред. Среда культивирования эмбрионов различных стадий развития – уникальный объект исследования, содержащий информацию об энергетической, метаболической активности и состоянии сигнальных систем конкретного эмбриона [11].

Множество работ было посвящено изучению взаимосвязи уровня митохондриальной ДНК эмбрионов с их качеством и имплантационным прогнозом. Оптимистичные предположения относительно эффективности метода постепенно приняли скептический характер, так как ранее большинство предпринятых попыток оценить потенциал эмбриона к развитию при количественном анализе митохондриальной ДНК эмбриона показали противоречивые результаты [12]. Однако, как показали модели исследования на животных, функционирование эмбриональной митохондрии, главной органеллы энергетического обмена, возможно оценить неинвазивно путем идентификации флавинаденидинуклеотида (FAD) и никотинамидаденинуклеотида (NADH) – коферментов, которые участвуют в многочисленных биохимических реакциях и играют центральную роль в окислительном фосфорилировании [13].

Большого внимания заслуживает изучение обнаруженных в культуральной среде эмбрионов некодирующих белок РНК (ncRNA) и их роли в процессах имплантации эмбриона и его нормального развития в связи с доказанным ранее их многофункциональ-

Таблица 1. Результаты работ по изучению NiPGT-A среды культивирования эмбрионов

Исследование	Rubio C. et al.	Yeung Q.S.Y. et al.	Jiao J. et al.	Vagnini L.D. et al.
Показатель				
Чувствительность, % (плоидность и пол)	94,5 (5-е сутки) 95,2 (6-7-е сутки)	81,6	–	–
Специфичность, % (плоидность и пол)	71,7 (5-е сутки) 82,1 (6-7-е сутки)	48,3	–	–
Корреляция результатов биопсии трофобластической оболочки и NiPGT-A среды, % (плоидность и пол)	78,7 (5-е сутки) 84 (6-7-е сутки)	62,1 (по аутосомам) 82,4 (по полу)	–	–
Корреляция результатов NiPGT-A среды и ПГТ-A тканей эмбриона (нормальный кариотип), %	–	–	90	–
Корреляция результатов PGT-A биопсии трофобластической оболочки и тканей эмбриона (нормальный кариотип), %	–	–	86	–
Корреляция результатов ПГТ-СП среды и тканей эмбриона (структурные перестройки), %	–	–	90	–
Корреляция результатов ПГТ-СП биопсии трофобластической оболочки и тканей эмбриона (структурные перестройки), %	–	–	100	–
Эуплоиды по данным NiPGT-A среды, %	–	–	–	36,4 (80/220)
Анеуплоиды по данным NiPGT-A среды, %	–	–	–	31,3 (69/220)
Мозаицизм эмбрионов по данным NiPGT-A среды, %	–	–	–	32,3 (71/220)
Синдром Клайнфельтера по данным NiPGT-A среды, %	–	–	–	8,2 (18/220)
Трисомия/моносомия по 21-й хромосоме по данным NiPGT-A среды, %	–	–	–	3,6 (8/220)

ным действием на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях регуляции экспрессии генов [14]. В исследовании Ni M. et al. приведены данные о корреляции экспрессии определенных ncRNA с хромосомным статусом эмбриона, ранее установленным при помощи метода NGS. Было показано, что содержание miR-145 и miR-886-3p в средах культивирования эмбрионов с нормальным хромосомным набором было значительно ниже, чем в средах эмбрионов с хромосомными нарушениями [15]. Однако в другом исследовании, также посвященном поиску предиктора плоидности эмбрионов, значимых различий в структуре и количестве ncRNA, обнаруженных методом NGS и подтвержденных полимеразной цепной реакцией (ПЦР), в средах культивирования эуплоидных и анеуплоидных эмбрионов обнаружено не было. Предполагается, что идентифицированные ncRNA имеют неэмбриональное происхождение [16]. Исследование Abu-Halima M. et al. демонстрирует ассоциацию уровня экспрессии определенных ncRNA в средах культивирования эмбрионов и образцах спермы с морфологической оценкой эмбриона и положительным исходом беременности. Идентификация всей совокупности ncRNA в названных средах осуществлялась при помощи количественного профилирования и валидации ПЦР с обратной транскрипцией. Было установлено, что в средах культивирования морул класса G1 содержание miR-320a и miR-15a-5p было значительно выше по сравнению с образцами G2, а miR-21-5p экспрессировалась интенсивнее, чем в средах G3. В средах морул G2 уровень miR-20a-5p был выше, чем в средах G3. Низкое содержание miR-19b-3p как в средах культивирования, так и в образцах спермы коррелировало с успешным исходом беременности [17]. На основании результатов вышеперечисленных и многих других современных исследований вполне смело можно утверждать, что поиск биомаркера качества эмбриона и его имплантационного потенциала на основе транскриптомного анализа сред культивирования является многообещающим для репродуктивной медицины. Однако отсутствие понимания регуляции секреции ncRNA, а также стандартизированной оценки содержания данных молекул в различных средах исследования затрудняет внедрение метода в рутинную практику и требует проведения более масштабных исследований [18].

В настоящий момент активно набирает популярность анализ метаболизма эмбрионов, культивированных в условиях лаборатории, с использованием высокочувствительных методов для установления связи с морфологией, успешной имплантацией, развитием клинической беременности и рождением ребенка [19].

Метаболомика – относительно новая область науки, сочетающая в себе научные основы медицины, биохимии и молекулярной биологии. Данная технология не просто предоставляет качественную и количественную оценку метаболома единичной клетки или целого организма, но и отражает его функционирование и физиологию как результат динамического взаимодействия генома и окружающей среды в данный момент времени [20].

Множество исследований посвящено изучению метаболизма главных субстратов: аминокислот, глюкозы и пирувата при помощи точного обнаружения специфических молекул.

В исследовании Зориной И.М. и соавт. [3] был продемонстрирован профиль аминокислот, глюкозы и глутамата в средах культивирования в зависимости от качества эмбриона, его плоидности и показателей имплантации. Анализ питательных сред эмбрионов 5-х суток культивирования был проведен методом флуоресцентной фотометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии (ВЭЖХ/МС). Часть эмбрионов прошла ПГТ-А. Образцы были разделены на группы в соответствии с морфологической классификацией эмбрионов (по Гарднеру), данными ПГТ-А и результатами имплантации. Сравнительный анализ профилей сред в разных группах не выявил значимых различий между эуплоидными и анеуплоидными эмбрионами. В средах имплантировавшихся эмбрионов было отмечено понижение концентрации L-валина, L-пролина, аланил-глутамина, фенилпирувата и β -L-фукоза-1-фосфата и повышение содержания L-фенилаланина. Потребление глюкозы эмбрионами морфологически отличного качества на 5-е сутки было в 1,75 раза больше, чем у эмбрионов хорошего качества. Показатель потребления глюкозы эуплоидными эмбрионами 2,5 (2,0–3,4) нмоль был определен как предиктор успешной имплантации. В ранее опубликованной работе этих же авторов показано, что качественная оценка профилей отработанных сред культивирования эмбрионов 5-х суток развития свидетельствует о специфических для каждого морфологического класса профилях метаболитов (аминокислоты, пируват, глюкоза) [21].

Благодаря исследованию Ding J., Xu T. также удалось обнаружить, что эмбрионы морфологически высокого качества поглощают из культуральной среды большее количество триптофана, чем эмбрионы визуально плохого качества, что также может служить дополнительным маркером качества эмбриона на этапе селекции для переноса [22].

В 2008 г. в работе Seli E. et al. при анализе 34 образцов культуральных сред эмбрионов 3-х суток культивирования методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) была показана корреляция между содержанием глутамата, коэффициентом соотношения аланина к лактату, пирувата, глюкозы и наступлением беременности [23]. Было обнаружено, что в средах эмбрионов, перенос которых привел к развитию беременности ($n=17$), содержание глутамата было значительно выше, чем в средах эмбрионов, беременность в результате переноса которых не наступила ($n=17$). Использование метода обратной регрессии наименьших квадратов определило коэффициенты содержания глутамата и соотношения аланин/лактат в средах культивирования эмбрионов, успешно имплантировавшихся после переноса. На основании данных коэффициентов (глутамат, аланин/лактат) был рассчитан индекс жизнеспособности для каждого образца среды, который для успешно имплантировавшихся

эмбрионов был достоверно выше (0,6201 и 0,1619 соответственно) по сравнению с теми, которые не смогли имплантироваться (0,3799 и 0,2660 соответственно) ($P < 0,002$). Исследование также сообщает об обнаруженной тенденции к снижению концентрации глюкозы и пирувата к 3-му дню культивирования в средах эмбрионов, перенос которых привел к развитию беременности. Эти данные не имели статистической значимости (ДИ=90%), но согласовывались с результатами предыдущих исследований. В целом, по данным исследования, метаболическое профилирование культуральных сред эмбрионов методом ЯМР имело чувствительность 88,2% и специфичность 88,2% в прогнозировании репродуктивного потенциала эмбриона.

Данные исследования Katz-Jaffe M.G. et al. указывают на существование различий в белковой экспрессии эмбрионов, культивированных до стадии бластоцисты [24]. Морфологически данные эмбрионы характеризовались как прогрессирующие ($n=16$, из которых ранних бластоцист – 6, поздних – 10) и дегенеративные ($n=5$). Анализ культуральной среды эмбрионов методом поверхностно-усиленной лазерной десорбционно-ионизационной время-пролетной масс-спектрометрии (SELDI TOF-MS) и обработка полученных кластеров при помощи непараметрического критерия Манна–Уитни выявили повышенную экспрессию 6 белков ($P < 0,01$) и снижение синтеза еще нескольких ($P \approx 0,05$) в культуральной среде дегенеративных эмбрионов в сравнении с данными протеомного профиля среды культивирования прогрессирующих эмбрионов. При использовании инструментов TagIdent в базе данных Swiss-prot удалось предварительно идентифицировать данные белки и предположить, что в средах эмбрионов, остановившихся в развитии, повышена экспрессия белков-предшественников: гепаринсвязывающего эпидермального фактора роста (HB-EGF), цистатина-9 (CTS-9), каспазы-1 (CASP-1), ферментов – НАДН-дегидрогеназы (NDU), цитохром-С-оксидазы (CCO), белка – β -катенина (CTNNbIP1) и нейропептида – кокаин- и амфетамин-регулируемого транскрипта (CART). Примечательно, что развивающиеся бластоцисты, несмотря на идентичный морфологический статус, экспрессировали различный уровень аналогичных белков. Так, предполагается, что в поздних бластоцистах повышен синтез паратгормоноподобного пептида (PTHrP) и белка-ингибитора роста-1 (ING1) в сравнении с белковым профилем ранних бластоцист ($P < 0,05$). Исследование, несомненно, предлагает новый горизонт знаний о раннем развитии эмбриона и его репродуктивном потенциале, но все же требует подтверждения в виде проведения дополнительных, более масштабных, исследований с большим числом выборки.

В исследовании молекулярного состава культуральной среды эмбрионов человека 5-х суток культивирования Ambrou S.M. et al. показали значимость содержания в среде культивирования эмбрионов β -хорионического гонадотропина человека (hCG β), интерлейкина-8 (IL-8) и фактора некроза опухоли- α (TNF- α) в прогнозировании наступления беремен-

ности [25]. Полученные сведения о концентрациях данных веществ сопоставлялись с морфологической оценкой эмбрионов. При помощи спектрометрии электрохимического импеданса удалось установить, что высокое содержание IL-8 и TNF- α в культуральной среде ассоциировалось с аномальным клеточным делением и гибелью клеток, соответственно. hCG β определялся только в средах эмбрионов высокого качества, но интересным оказалось то, что не все культуральные среды эмбрионов с наилучшей морфологической оценкой содержали hCG β . В дальнейшем у данных эмбрионов (в средах которых не определялся hCG β) было отмечено развитие дефекта трофобласта, что влекло за собой нарушение в синтезе hCG β . В исследовании Huang G. et al. подтверждается важность содержания IL-8 в культуральной среде эмбрионов как предиктора инвазии трофобласта [26].

Большой интерес для репродуктивной медицины представляет изучение растворимого человеческого лейкоцитарного антигена-G (sHLA-G). sHLA-G, продуцируемый клетками трофобласта, играет ключевую роль в формировании иммунологической толерантности на границе мать-плод, контролируя инвазию трофобласта и способствуя сосудистому ремоделированию спиральных артерий путем изменения цитокиновой секреции и супрессии Т-клеточного иммунитета [27]. В недавнем исследовании Díaz R.R. et al. [28] продемонстрирована положительная корреляция между содержанием sHLA-G в среде культивирования и показателем наступления беременности. Данные об уровне sHLA-G в образцах культуральных сред 86 эмбрионов 3-х суток культивирования были получены при помощи иммуоферментного анализа и проанализированы методом регрессионного анализа для группы женщин, у которых в результате переноса эмбрионов наступила беременность, и для женщин с отрицательным результатом переноса. Была обнаружена статистическая значимость между более высокими уровнями секреции sHLA-G и частотой наступления беременности для групп с положительным и отрицательным результатом переноса (28,0 \pm 18,8 ЕД/мл против 19,0 \pm 17,6 ЕД/мл, $P < 0,005$). Применение логистической модели частичного регрессионного анализа позволило определить отношение шансов для общего числа ооцитов – 1,074 (95% ДИ 1,017–1,11; $P = 0,015$) и для числа зрелых ооцитов (MII) – 1,65 (95% ДИ 1,015–1,106; $P = 0,014$). При сравнении полученных данных для группы с положительным и отрицательным результатами переноса отмечалось значительное различие по количеству полученных ооцитов (11 \pm 5 против 7 \pm 3 соответственно, $P = 0,001$), по числу зрелых ооцитов (MII) (10 \pm 4 против 7 \pm 3 соответственно, $P \leq 0,001$). При сравнении данных о качестве перенесенных эмбрионов в группе с положительным и отрицательным результатами переноса не было выявлено значимых различий (1,7 \pm 0,47 против 1,5 \pm 0,48 соответственно; $P = 0,70$). Тем не менее в группе с положительным результатом переноса отмечалось более высокое качество когорты эмбрионов по сравнению с отрицательной группой (3,8 \pm 5 против 2,4 \pm 1,3 соответственно; $P = 0,016$).

Данные метаанализа, представленного Niu Z. et al., также демонстрируют корреляцию между содержанием sHLA-G в культуральной среде эмбрионов и показателями имплантации, клинической беременности, многоплодной беременности и невынашивания беременности [29]. При анализе данных в общей сложности 6170 случаев программ ЭКО/ИКСИ было показано, что перенос эмбрионов, в культуральной среде которых содержался sHLA-G, ассоциировался со значительно более высокими показателями имплантации и клинической беременности по сравнению с теми, в средах культивирования которых sHLA-G не был определен; отношения шансов (ORs) составили 2,66 (95% ДИ 1,75–4,06; $P < 0,00001$), 3,79 (95% ДИ 2,69–5,33; $P < 0,00001$) соответственно. Достоверного различия в частоте многоплодной беременности (ORs 1,87; 95% ДИ 0,55–6,31) и выкидыша (ORs 0,77; 95% ДИ 0,52–1,16) выявлено не было.

Важность исследования протеома культуральных сред эмбрионов человека находит подтверждение в исследовании Lindgren K.E. et al. [30], которые на основании молекулярного анализа образцов сред эмбрионов человека идентифицировали корреляцию между уровнем секретлируемых эмбрионом специфических белков и его способностью к дальнейшему развитию. В исследовании при помощи мультиплексного анализа были оценены и сравнены между собой образцы культуральных сред эмбрионов, остановившихся в развитии, и тех, что благополучно были культивированы до 6-х суток. Данные молекулярного профиля были соотнесены с морфологической оценкой. В культуральной среде на 6-й день развития было обнаружено 9 белков, которые находились в более высокой концентрации, чем фоновые уровни в кондиционированной среде (т.е. в культуральной среде без эмбриона): сосудистый эндотелиальный фактор роста A (VEGF-A), интерлейкин-6 (IL-6), индуктор внеклеточной матриксной металлопротеиназы (EMMPRIN), плацентарный фактор роста (PlGF), цистатин B (CSTB), молекула клеточной адгезии эпителия (EPCAM), каспаза-3 (CASP3), эпидидимальный секреторный белок (HE-4) и интерлейкин-8 (IL-8). Ранее уже сообщалось о возможности использования CASP3 в качестве маркера в прогнозировании качества эмбриона и его имплантационного потенциала [31]. В данном исследовании уровни EMMPRIN и IL-6 были достоверно выше, а содержание CASP3 – ниже у развившихся в бластоцисты эмбрионов по сравнению с остановившимися в развитии ($P = 0,003$, $0,059$, $0,076$ соответственно). В культуральных средах эмбрионов морфологически высокого качества уровень CASP3 был достоверно ниже, а уровень VEGF-A – выше ($P = 0,052$) по сравнению с таковым в средах эмбрионов с низкой оценкой морфологии ($P = 0,043$). Это может свидетельствовать о том, что данные белки можно рассматривать как потенциальные маркеры успешного развития эмбриона. Уровни экспрессии PlGF, CSTB, EPCAM, HE-4 и IL-8 не отличались существенно в средах эмбрионов как с низкой, так и с высокой морфологической оценкой. Тем не менее значимость их в развитии эмбриона

человека известна [32]. Предполагают, что выявленный в данном исследовании PlGF играет аутокринную роль в функции трофобласта на ранних стадиях развития эмбриона, а также паракринную роль в последующем ангиогенезе в ходе имплантации и плацентации.

В настоящее время метаболомика располагает достаточным количеством технологических платформ для разделения и идентификации биомаркеров, но основными являются: газовая хроматография (ГХ-МС), капиллярный электрофорез (КЭ-МС), ВЭЖХ/МС, ЯМР, масс-анализатор ионно-циклотронного резонанса с преобразованием Фурье (МА-ИЦР-МС) [33]. Одним из перспективных методов изучения молекулярного профиля среды является метод фотонно-кристаллических волноводов (ФКВ). Метод уже успешно зарекомендовал себя в определении протеомного состава сложных сред, а полученные результаты продемонстрировали функциональность предложенного подхода [34].

Возможности спектроскопии для оценки метаболического статуса эмбриона человека *in vitro*

Несмотря на использование Рамановской спектроскопии в науке уже более двух десятков лет и значительные возможности в диагностике многих заболеваний, дороговизна метода и низкая чувствительность к малым концентрациям метаболитов долгое время оставались препятствием к широкому внедрению в практику репродуктивной медицины [35].

Недавнее исследование Liang B. et al. [36] продемонстрировало практическую ценность применения Рамановской спектроскопии в определении плоидности эмбрионов. При помощи метода были проанализированы 87 образцов культуральных сред от эмбрионов, которые также прошли ПГТ-А. Полученные данные выявили характерные различия в метаболомном профиле сред эуплоидных и анеуплоидных эмбрионов, спектральные кривые которых отличались по уровню содержания малых РНК и липидов. Показатель соответствия плоидности эмбрионов по данным спектроскопии и данным ПГТ-А составил 95,9%.

В исследовании Baştu E. et al. продемонстрирована возможность применения метода Рамановской спектроскопии в определении имплантационного потенциала эмбриона в дополнение к традиционной морфологической характеристике. При исследовании 31 образца отработанных культуральных сред эмбрионов 3-х суток развития были получены спектральные данные для группы эмбрионов, перенос которых привел к клинической беременности, и группы с отрицательным результатом переноса. В ходе проведения частотного анализа с применением U-критерия Манна–Уитни выяснилось, что диапазон спектральных кривых $890–950 \text{ см}^{-1}$ содержит статистически значимые данные ($P < 0,5$). Данный диапазон был проанализирован с применением метода главных компонент (PCA) и линейного дискриминантного анализа (QDA). Точность полученных дан-

ных была подтверждена применением ROC-кривой, специфичность и чувствительность которой в оценке точности PCA-QDA анализа составили 80,25% и 87,50% соответственно. По итогам проведения программы ЭКО у 15 пациенток из 31 была зафиксирована клиническая беременность, остальные 16 пациенток имели отрицательный результат переноса. При применении Рамановской спектроскопии прогнозирование наступления беременности соответствовало 93% всех положительных результатов (14 из 15), прогнозирование отрицательного результата программы ЭКО соответствовало 65,2% всех отрицательных результатов (10 из 16). Чувствительность и специфичность метода исследования составили 93% и 65,2% соответственно [37].

Многие методы анализа биологической среды, используемые сегодня, сложны в исполнении, требуют длительности по времени и часто не могут обеспечить истинности полученных данных [38]. Следовательно, возникает необходимость в создании и использовании простых, быстрых, но точных технологий. Одним из таких методов является матрично-активированная ионизация лазерной десорбции с применением времяпролетного масс-анализатора (MALDI ToF MS) [39, 40]. Данный метод был применен в оценке секрета среды культивирования и показал быстроту техники и значимость в прогнозировании жизнеспособности эмбриона и наступления беременности после переноса [41]. В данном исследовании было проанализировано 136 образцов культуральной среды эмбрионов 5-х суток культивирования непосредственно перед переносом. Объем каждого образца среды составил 50 мкл, однако в дальнейшем, в ходе непосредственного изучения образцов, потребовалось всего 1 мкл смеси культуральной среды и дитиотреитола (DDT). Исходами в исследовании считался результат переноса: наступление (95 случаев) или отсутствие наступления беременности (41 случай). Исследование образцов методом MALDI ToF MS определило значимый для работы диапазон спектральных данных 2000–17 000 масса/заряд (m/z), при анализе которого было определено 150 пиков по 100 m/z каждый. Средние величины данных пиков, рассчитанные при помощи ROC-кривой, были различны для обеих групп исхода. Для каждого из 150 пиков был рассчитан относительный риск положительного исхода программы (наступление беременности). Затем при помощи многочисленных пиковых комбинаций была определена модель спектральной оценки, включающая 9 пиков с максимальной точностью прогнозирования положительного результата и положительной прогностической ценностью ($P=0,0018$; $PPV=82,9\%$). Примечательно, что исследование образцов сред занимало не более 20 минут и осуществлялось непосредственно перед переносом, что существенно увеличивает шанс для переноса одного эмбриона, обладающего максимальным потенциалом к развитию.

Перечисленные в статье подходы к исследованию сред культивирования эмбрионов в целях идентификации неинвазивного маркера их качества,

имплантационной компетентности и успешного исхода программы ВРТ представлены в таблице 2.

Обработка спектральных характеристик с помощью машинного обучения

Очередным шагом для разработки более точного, безопасного и индивидуализированного предиктора исходов программы ВРТ стало внедрение в репродуктивную медицину технологий машинного обучения. Принцип работы машинного обучения базируется на методах ИИ, когда решение определенной задачи основывается не на прямом выводе, а на оценке библиотеки решений множества подобных задач. Эффективность применения ИИ в прогнозировании успешности исходов программ ВРТ была показана в результатах многих исследований. И, несмотря на определенные пока еще существующие препятствия (проблема «черного ящика», вероятность предвзятости системы), для более широкого внедрения в рутинную практику метод представляется крайне перспективным [42].

Более 20 лет назад Kaufmann S.J. et al. предложили использовать в программах ВРТ программное обеспечение Cortex Pro, созданное на основе нейронных сетей и состоящее только из четырех критериев оценки (число полученных ооцитов, возраст пациентки, число перенесенных эмбрионов, число замороженных эмбрионов). Точность программы составляла 59%. С тех пор был достигнут значительный прогресс в использовании ИИ и машинного обучения в области репродукции человека [43].

Авторы из Японии Miyagi Y. et al. в 2019 г. опубликовали результаты работы по созданию системы, использующей машинное обучение и ИИ, которая с высокой точностью (до 67%) оценивает вероятность положительного исхода беременности по изображению бластоцисты. Они сравнили шесть методов машинного обучения, на основе лучшего из них – логистической регрессии с L2-регуляризацией – создали программу-классификатор, которая показывает вероятность живорождения эуплоидного эмбриона. Для обучения алгоритма использовались по 80 изображений бластоцист, приведших к положительному и отрицательному исходу беременности [2, 44].

Значительный объем данных метаболомного профилирования биологических сред сегодня предоставляют такие аналитические платформы, как масс-спектрометрия и ее вариации (прямая (MS), жидкостная (LC-MS) или газовая (GC-MS)), капиллярный электрофорез (CE-MS), спектроскопия ядерного магнитного резонанса (NMR), рамановская спектроскопия. Для более качественной оценки среды разрабатываются новые многомерные системы разделения (комплексные двумерные GC или LC (GC×GC, LC×LC) или LC в сочетании со спектроскопией подвижности ионов (LC-IMS)). В целях автоматизированной и качественной обработки огромного количества комплексных исходных данных современные исследования, использующие данные методы, нуждаются в раз-

Таблица 2. Современные методы диагностики среды культивирования эмбрионов, идентифицируемые вещества и возможность их применения в целях улучшения исходов программ ЭКО

Биомаркер	Методы определения в среде культивирования	Перспектива внедрения в практику (по мнению авторов)
Свободная внеклеточная ДНК (cfDNA)	NIPGT-A	Метод дает возможность неинвазивно оценивать хромосомный статус и пол эмбриона, что подтверждается результатами многих работ. Однако активное использование в практике требует большего числа выборки исследований. Не решена проблема ложноположительных результатов при контаминации среды культивирования материнской ДНК
Ко-ферменты FAD и NADH	Визуализирующая микроскопия на основе флуоресценции FLIM	Этот новый и потенциально полезный метод оценки энергетического обмена клетки пока реализован в моделях с животными. Требуется дальнейшего изучения в работах с эмбрионами человека
Некодирующие белок РНК (ncRNA)	NGS, ПЦР	Многие работы показали корреляцию экспрессии различных ncRNA с плоидностью эмбриона, его морфологией и исходом программы ЭКО. Однако подход требует дальнейшего изучения ввиду недостаточного знания регуляции секреции ncRNA, возможной неэмбриональной природы изучаемых ncRNA и получения в работах разрозненных результатов
Оценка метаболической активности эмбриона: аминокислоты, глюкоза, пируват и т.д.	Флуоресцентная фотометрия, ВЭЖХ/МС, Рамановская спектроскопия, спектроскопия ЯМР	Подход интересен. Так же, как и предыдущий, демонстрирует ассоциацию уровня метаболизма многих субстратов с визуальной оценкой эмбриона, его хромосомным статусом и перспективой переноса. Но трудоемкость исполнения, дороговизна и недостаточная чувствительность методов исследования затрудняют внедрение в практику
Протеомный профиль среды: цистатин-9 (CTS-9), каспаза-1 (CASP-1), ферменты НАДН-дегидрогеназа (NDU), цитохром-С-оксидаза (ССО), белок β-катенин (CTNBP1), β-ХГЧ (hCGβ), интерлейкин-8 (IL-8), фактор некроза опухоли-α (TNF-α), sHLA-G и т.д.	Поверхностно-усиленная лазерная десорбционно-ионизационная время-пролетная масс-спектрометрия (SELDI TOF-MS), спектрометрия электрохимического импеданса, иммуноферментный анализ, мультиплексный анализ, матрично-активированная ионизация лазерной десорбции с применением времяпролетного масс-анализатора (MALDI ToF MS)	Протеомное профилирование в дальнейшем вполне может стать качественным дополнением к консервативной визуальной оценке морфологии эмбриона, так как демонстрирует любопытные результаты, а также может осуществляться простыми и быстрыми методами. Однако до сих пор не идентифицированы белковый профиль и его концентрация для эмбрионов с наилучшим потенциалом развития, а многие секретируемые молекулы имеют низкую концентрацию и могут не определяться в опытах. Большинство исследований носит пилотный характер и нуждается в подтверждении более масштабными работами

работке и внедрении программного обеспечения с необходимыми этапами анализа спектральных данных. На первом этапе программной обработки спектральных данных происходят конвертирование исходных данных в матрицу открытых данных и их предварительная обработка для последующего анализа (поиск и сравнение/сопоставление спектров/признаков, выравнивание спектров/признаков с последующей сегментацией данных в ячейки или пиковой подгонкой, нормализация размера выборки, проверка одномерных гипотез, многовариантное моделирование и т.д.). Обработка спектральных данных, полученных при применении NMR, включает в себя, помимо перечисленного, элемент фазирования и базовой коррекции спектра. Далее следует этап обработки полученных данных статистическими методами (анализ главных компонент-дискриминантных функций (PC-DFA), метод Random forests, метод опорных векторов, дисперсионный анализ (ANOVA), *t*-критерий Стьюдента и их непараметрические эквиваленты). На третьем этапе осуществляются поиск и идентификация метаболитов в базе данных по физическим характеристикам (обычно недостаточным) – соотношению «масса/заряд», времени удержания, химическому сдвигу, интенсивности. Более точными параметрами поиска являются фрагментация моделей с последующим анализом при помощи вычислительного

алгоритма и установление структуры *de novo* при комбинировании с данными NMR (1D или 2D).

Сегодня существует большое количество пакетов программного обеспечения для реализации исследований современной науки. Часть из них разработана и стандартизирована для решения определенных задач; например, идентификации малых молекул (CASMI (Critical Assessment of Small Molecule Identification, Schymanski and Neumann 2016)) или анализа протеомного состава среды (Ms-utils (ms-utils.org—Software List)), но большинство программ ориентировано на автоматизированную обработку метаболомного профиля биологических сред (MetaboAnalyst 3.0 (Xia et al., 2015), MAVEN (Melamud et al., 2010), MZmine 2 (Pluskal et al., 2010) и т.д.) [45].

Очевидно, что машинное обучение, несмотря на определенные недостатки, имеет огромный потенциал к расширению использования своих возможностей в будущем, предоставляя уже сейчас значительный объем новых научных данных. Кроме того, совершенствование и интеграция элементов ИИ, например, глубоких нейронных сетей, в процесс обработки улучшают качество экспериментальных данных, снижают частоту ложных идентификаций, способствуют постоянному пополнению библиотеки данных и, как следствие, делают машинное обучение более адаптированным к практике

инструментом, предоставляющим обоснованные данные [46].

Заключение

Неудачные попытки ЭКО – это совокупность стечения многих факторов, в том числе и отсутствие точного метода диагностики качества эмбриона. Традиционная морфологическая характеристика эмбрионов, как и проведение ПГТ, демонстрируют ограниченность своих возможностей, инвазивные риски и остаются недостаточными в прогнозировании успешности исхода программы. Изучение молекулярного профиля культуральной среды является актуальным и перспективным направлением для идентификации неинвазивного показателя качества эмбриона.

С развитием омиксных технологий наметился прогресс в оценке качества переносимого эмбриона, а также в определении его репродуктивного потенциала. Исследование метаболома культуральных сред эмбрионов дает представление о процессах синтеза и распада специфических веществ и позволяет установить метаболомный профиль наиболее жизнеспособного эмбриона. Во многих работах подтверждена важность уровня концентрации энергетических субстратов и многочисленных белков, коррелирующих с морфологией эмбриона, его качеством и имплантационным потенциалом. Перспективным в данном вопросе представляется изучение эпигенетических регуляторов дифференцирования, пролиферации и межклеточного контакта – некодирующих белок РНК (ncRNA), а также главных кофакторов энергетического обмена – NADH и FAD.

В перспективе повышение эффективности методов оценки молекулярного профиля культуральной среды эмбриона вкупе с более полной интеграцией полученных данных помогут преодолеть трудности широкого внедрения метода в клиническую практику и позволят повысить продуктивность селекции эмбрионов на этапе переноса. Это в конечном итоге позволит индивидуализировать подход к проведению программы ЭКО и увеличить успешные показатели исходов.

Литература/References

1. *Armstrong S., Bhide P., Jordan V., Pacey A., Farquhar C.* Time-lapse systems for embryo incubation and assessment in assisted reproduction. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2019; (5): CD011320. <https://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD011320.pub4>.
2. *Сысоева А.П., Макарова Н.П., Калинина Е.А., Скибина Ю.С., Занишевская А.А., Янчук Н.О., Грязнов А.Ю.* Повышение эффективности вспомогательных репродуктивных технологий с помощью искусственного интеллекта и машинного обучения на эмбриологическом этапе. *Акушерство и гинекология.* 2020; 7: 28–36. <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2020.7.28-36>. [Sysoeva A.P., Makarova N.P., Kalinina E.A., Skibina Yu.S., Zanishevskaya A.A., Yanchuk N.O., Gryaznov A.Yu. Improving the effectiveness of assisted reproductive technologies using artificial intelligence and machine learning at the embryological stage. *Obstetrics and Gynecology.* 2020; 7: 28–36. (in Russian)]. <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2020.7.28-36>.
3. *Зорина И.М., Смольникова В.Ю., Эльдаров Ч.М., Ярыгина С.А., Горшинова В.К., Макарова Н.П., Калинина Е.А., Бобров М.Ю.* Анализ потребления глюкозы и глутамата в питательных средах как метод оценки качества эмбрионов человека пятых суток развития. *Акушерство и гинекология.* 2018; 5: 64–9. [Zorina I.M., Smolnikova V.Yu., Eldarov Ch.M., Yarygina S.A., Gorshinova V.K., Makarova N.P., Kalinina E.A., Bobrov M.Yu. Analysis of glucose and glutamate consumption in culture media as a method for assessing the quality of human embryos on their fifth day of development. *Obstetrics and Gynecology.* 2018; 5: 64–9. (in Russian)]. <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2018.5.64-69>.
4. *Драпкина Ю.С., Тимофеева А.В., Чаговец В.В., Макарова Н.П., Калинина Е.А.* Прогнозирование результативности программ ВРТ по профилю экспрессии малых некодирующих РНК в культуральной среде эмбриона. *Акушерство и гинекология.* 2020; 4 (Приложение): 82–3. [Drapkina Yu.S., Timofeeva A.V., Chagovets V.V., Makarova N.P., Kalinina E.A. Predicting the effectiveness of ART programs based on the expression profile of small non-coding RNAs in the embryo culture medium. *Obstetrics and Gynecology.* 2020; 4 (Suppl): 82–3. (in Russian)].
5. *Hong B., Hao Y.* The outcome of human mosaic aneuploid blastocysts after intrauterine transfer: A retrospective study. *Medicine (Baltimore).* 2020; 99(9): e18768. <https://dx.doi.org/10.1097/MD.00000000000018768>.
6. *Gleicher N., Orvieto R.J.* Is the hypothesis of preimplantation genetic screening (PGS) still supportable? A review. *J. Ovarian Res.* 2017; 10(1): 21. <https://dx.doi.org/10.1186/s13048-017-0318-3>.
7. *Rubio C., Rienzi L., Navarro-Sánchez L., Cimadomo D., García-Pascual C.M., Albricci L. et al.* Embryonic cell-free DNA versus trophectoderm biopsy for aneuploidy testing: concordance rate and clinical implications. *Fertil. Steril.* 2019; 112(3): 510–9. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.04.038>.
8. *Yeung Q.S.Y., Zhang Y.X., Chung J.P.W., Lui W.T., Kwok Y.K.Y., Gui B. et al.* A prospective study of non-invasive preimplantation genetic testing for aneuploidies (niPGT-A) using next-generation sequencing (NGS) on spent culture media (SCM). *Assist. Reprod. Genet.* 2019; 36(8): 1609–21. <https://dx.doi.org/10.1007/s10815-019-01517-7>.
9. *Jiao J., Shi B., Sagnelli M., Yang D., Yao Y., Li W. et al.* Minimally invasive preimplantation genetic testing using blastocyst culture medium. *Hum. Reprod.* 2019; 34(7): 1369–79. <https://dx.doi.org/10.1093/humrep/dez075>.
10. *Vagnini L.D., Petersen C.G., Renzi A., Dieamant F., Oliveira J.B.A., Olliani A.H. et al.* Relationship between age and blastocyst chromosomal ploidy analyzed by noninvasive preimplantation genetic testing for aneuploidies (niPGT-A). *JBRA Assist. Reprod.* 2020; 24(4): 395–9. <https://dx.doi.org/10.5935/1518-0557.20200061>.
11. *Capalbo A., Ubaldi F.M., Cimadomo D., Noli L., Khalaf Y., Farcomeni A. et al.* MicroRNAs in spent blastocyst culture medium are derived from trophectoderm cells and can be explored for human embryo reproductive competence assessment. *Fertil. Steril.* 2016; 105(1): 225–35. e1–3. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.09.014>.
12. *Cecchino G.N., Garcia-Velasco J.A.* Mitochondrial DNA copy number as a predictor of embryo viability. *Fertil. Steril.* 2019; 111(2): 205–11. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.11.021>.
13. *Sanchez T., Zhang M., Needleman D., Seli E.* Metabolic imaging via fluorescence lifetime imaging microscopy for egg and embryo assessment. *Fertil. Steril.* 2019; 111(2): 212–8. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.12.014>.
14. *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 ВРТ. *Акушерство и гинекология.* 2019; 6: 79–86. [Timofeeva A.V., Kalinina E.A., Drapkina Yu.S., Chagovets V.V., Makarova N.P., Sukhykh G.T. Embryo quality assessment by the expression profile of small non-coding RNA in an embryo culture medium in ART programs. *Obstetrics and Gynecology.* 2019; 6: 79–86. (in Russian)]. <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2019.6.79-86>.
15. *Ni M., Xue Y., Ding J., Yang S., Zheng A., Pu Y. et al.* Correlation between differential expression of microRNA and quality of embryos. *Zhonghua Yi*

- Xue Yi Chuan Xue Za Zhi. 2020; 37(9): 938-41. <https://dx.doi.org/10.3760/cma.j.cn511374-20190516-00244>.
16. *Sánchez-Ribas I, Díaz-Gimeno P, Quñónero A, Ojeda M, Larreategui Z, Ballesteros A, Domínguez F.* NGS analysis of human embryo culture media reveals miRNAs of extra embryonic origin. *Reprod. Sci.* 2019 ; 26(2): 214-22. <https://dx.doi.org/10.1177/1933719118766252>.
 17. *Abu-Halima M., Khaizaran Z.A., Ayesb B.M., Fischer U., Khaizaran S.A., Al-Battah F et al.* MicroRNAs in combined spent culture media and sperm are associated with embryo quality and pregnancy outcome. *Fertil. Steril.* 2020; 113(5): 970-80. e2. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.12.028>.
 18. *Zhou W, Dimitriadis E.* Secreted microRNA to predict embryo implantation outcome: from research to clinical diagnostic application. *Front. Cell Dev. Biol.* 2020; 8: 586510. <https://dx.doi.org/10.3389/fcell.2020.586510>.
 19. *Драпкина Ю.С., Тимофеева А.В., Чаговец В.В., Кононихин А.С., Франкевич В.Е., Калинина Е.А.* Применение омиксных технологий в решении проблем репродуктивной медицины. *Акушерство и гинекология.* 2018; 9: 24-32. [Drapkina Yu.S., Timofeeva A.V., Chagovets V.V., Kononikhin A.S., Frankevich V.E., Kalinina E.A. Use of omix technologies to solve the problems of reproductive medicine. *Obstetrics and gynecology.* 2018; 9: 24-32 (in Russian)]. <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2018.9.24-32>.
 20. *Rinschen M.M., Ivanisevic J., Giera M., Siuzdak G.* Identification of bioactive metabolites using activity metabolomics: A review. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2019; 20(6): 353-67. <https://dx.doi.org/10.1038/s41580-019-0108-4>.
 21. *Зорина И.М., Эльдаров Ч.М., Ярыгина С.А., Макарова Н.П., Трофимов Д.Ю., Смольникова В.Ю., Калинина Е.А., Бобров М.Ю.* Профилирование метаболитов в питательных средах пятидневных эмбрионов человека. *Биомедицинская химия.* 2017; 63(5): 385-91. [Zorina I.M., Eldarov Ch.M., Yarygina S.A., Makarova N.P., Trofimov D.Yu., Smolnikova V.Yu., Kalinina E.A., Bobrov M.Yu. Metabolomic profiling in culture media of day-5 human embryos. *Biomedical Chemistry.* 2017; 63(5): 385-91. (in Russian)]. <https://dx.doi.org/10.18097/PBMC20176305385>.
 22. *Ding J, Xu T, Tan X, Jin H, Shao J, Li H.* Raman spectrum: A potential biomarker for embryo assessment during in vitro fertilization. *Exp. Ther. Med.* 2017; 13(5): 1789-92. <https://dx.doi.org/10.3892/etm.2017.4160>.
 23. *Seli E, Borros L, Sakkas D, Burns D.H.* Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using proton nuclear magnetic resonance correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil. Steril.* 2008; 90(6): 2183-9. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.07.1739>.
 24. *Katz-Jaffe M.G., Gardner D.K., Schoolcraft W.B.* Proteomic analysis of individual human embryos to identify novel biomarkers of development and viability. *Fertil. Steril.* 2006; 85(1): 101-7. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.09.011>.
 25. *Abreu C.M., Thomas V., Knaggs P., Bunkheila A., Cruz A., Teixeira S.R. et al.* Non-invasive molecular assessment of human embryo development and implantation potential. *Biosens. Bioelectron.* 2020; 157: 112144. <https://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2020.112144>.
 26. *Huang G, Zhou C, Wei C.J., Zhao S, Sun F, Zhou H. et al.* Evaluation of in vitro fertilization outcomes using interleukin-8 in culture medium of human preimplantation embryos. *Fertil. Steril.* 2017; 107(3): 649-56. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.11.031>.
 27. *Ferreira L.M.R., Meissner T.B., Tilburgs T., Strominger J.L.* HLA-G: At the interface of maternal-fetal tolerance. *Trends Immunol.* 2017; 38(4): 272-86. <https://dx.doi.org/10.1016/j.it.2017.01.009>.
 28. *Díaz R.R., Blanes Z.R., Sánchez V, González Pérez J., Bethencourt J.C.A.* Embryo sHLA-G secretion is related to pregnancy rate. *Zygote.* 2019; 27(2): 78-81. <https://dx.doi.org/10.1017/S0967199419000054>.
 29. *Niu Z, Wang L, Pang R.T.K., Guo Y, Yeung W.S.B., Yao Y.* A meta-analysis of the impact of human leukocyte antigen-G on the outcomes of IVF/ICSI. *Reprod. Biomed. Online.* 2017; 34(6): 611-8. <https://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2017.03.002>.
 30. *Lindgren K.E., Gülen Yaldir F., Hreinsson J., Holte J., Kårehed K., Sundström-Poromaa I. et al.* Differences in secretome in culture media when comparing blastocysts and arrested embryos using multiplex proximity assay. *Med. Sci.* 2018; 123(3): 143-52. <https://dx.doi.org/10.1080/03009734.2018.1490830>.
 31. *Kaiholta H, Yaldir F.G., Bohlin T, Samir R, Hreinsson J, Åkerud H.* Levels of caspase-3 and histidine-rich glycoprotein in the embryo secretome as biomarkers of good-quality day-2 embryos and high-quality blastocysts. *PLoS One.* 2019; 14(12): e0226419. <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0226419>.
 32. *Castillo J, Jodar M, Oliva R.* The contribution of human sperm proteins to the development and epigenome of the preimplantation embryo. *Hum. Reprod. Update.* 2018; 24(5): 535-55. <https://dx.doi.org/10.1093/humupd/dmy017>.
 33. *Rinschen M.M., Ivanisevic J., Giera M., Siuzdak G.* Identification of bioactive metabolites using activity metabolomics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2019; 20(6): 353-67. <https://dx.doi.org/10.1038/s41580-019-0108-4>.
 34. *Burmistrova N.A., Pidenko P.S., Pidenko S.A., Skibina Yu.S., Monakhova Yu.B.* Simultaneous determination of proteins in microstructured optical fibers supported by chemometric tools. *Anal. Bioanal. Chem.* 2019; 411(27): 7055-9. <https://dx.doi.org/10.1007/s00216-019-02085-6>.
 35. *Cordero E., Latka I., Matthäus C., Schie I., Popp J.J.* In-vivo Raman spectroscopy: from basics to applications. *Biomed. Opt.* 2018; 23(7): 1-23. <https://dx.doi.org/10.1117/1.JBO.23.7.071210>.
 36. *Liang B, Gao Y, Xu J, Song Y, Xuan L, Shi T, et al.* Raman profiling of embryo culture medium to identify aneuploid and euploid embryos. *Fertil. Steril.* 2019; 111(4): 753-62. e1. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.11.036>.
 37. *Baştu E., Parlitan U., Başar G., Yumru H., Bavili N., Sağ F. et al.* Spectroscopic analysis of embryo culture media for predicting reproductive potential in patients undergoing in vitro fertilization. *Turk. J. Obstet. Gynecol.* 2017; 14(3): 145-50. <https://dx.doi.org/10.4274/tjod.92604>.
 38. *Bingol K, Brüscheweiler R.* Knowns and unknowns in metabolomics identified by multidimensional NMR and hybrid MS/NMR methods. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2017; 43: 17-24. <https://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2016.07.006>.
 39. *Gulin A, Nadochenko V, Solodina A, Pogorelova M., Panait A, Pogorelov A.* A novel approach for 3D reconstruction of mice full-grown oocytes by time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 2020; 412(2): 311-9. <https://dx.doi.org/10.1007/s00216-019-02237-8>.
 40. *Gulin A, Nadochenko V, Astafiev A, Pogorelova V, Rtimi S, Pogorelov A.* Correlating microscopy techniques andToF-SIMS analysis of fully grown mammalian oocytes. *Analyst.* 2016; 141(13): 4121-9. <https://dx.doi.org/10.1039/c6an00665e>.
 41. *Iles R.K., Sharara F.I., Zmuidinaite R, Abdo G, Keshavarz S, Butler S.A.* Secretome profile selection of optimal IVF embryos by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2019; 36(6): 1153-60. <https://dx.doi.org/10.1007/s10815-019-01444-7>.
 42. *Curchoe C.L., Bormann C.L.* Artificial intelligence and machine learning for human reproduction and embryology presented at ASRM and ESHRE 2018. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2019; 36(4): 591-600. <https://dx.doi.org/10.1007/s10815-019-01408-x>.
 43. *Kaufmann S.J., Eastaugh J.L., Snowden S., Smye S.W., Sharma V.* The application of neural networks in predicting the outcome of in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.* 1997; 12(7): 1454-7. <https://dx.doi.org/10.1093/humrep/12.7.1454>.
 44. *Miyagi Y, Habara T, Hirata R, Hayashi N.* Feasibility of artificial intelligence for predicting live birth without aneuploidy from a blastocyst image. *Reprod. Med. Biol.* 2019; 18(2): 204-11. <https://dx.doi.org/10.1002/rmb2.12267>.
 45. *Spicer R, Salek R.M., Moreno P, Cañueto D, Steinbeck C.* Navigating freely-available software tools for metabolomics analysis. *Metabolomics.* 2017; 13(9): 106. <https://dx.doi.org/10.1007/s11306-017-1242-7>.
 46. *Gessulat S., Schmidt T, Zolg D.P., Samaras P, Schnatbaum K, Zerweck J, Knaute T. et al.* Prosit: proteome-wide prediction of peptide tandem mass spectra by deep learning. *Nat. Methods.* 2019; 16(6): 509-18. <https://dx.doi.org/10.1038/s41592-019-0426-7>.

Поступила 18.12.2020

Принята в печать 29.04.2021

Received 18.12.2020

Accepted 29.04.2021

Сведения об авторах:

Валихметова Эльвира Зильявировна, аспирант отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. профессора Б.В. Леонова, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» МЗ РФ. E-mail: ibraeva1988@list.ru. 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

Кулакова Елена Владимировна, к.м.н. с.н.с. отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. профессора Б.В. Леонова, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» МЗ РФ. E-mail: e_kulakova@oparina4.ru. 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

Скибина Юлия Сергеевна, к.ф.-м.н., директор ООО НПП «Наноструктурная Технология Стекла» и МНОЦ «Структурная нанобиофотоника», Саратов, Россия. E-mail: director@nano-glass.ru. 410033, Россия, Саратов, проспект 50-летия Октября, д. 101.

Грязнов Алексей Юрьевич, научный сотрудник, ООО НПП «Наноструктурная Технология Стекла» и МНОЦ «Структурная нанобиофотоника», Саратов, Россия. E-mail: director@nano-glass.ru. 410033, Россия, Саратов, проспект 50-летия Октября, д. 101.

Макарова Наталья Петровна, д.б.н., в.н.с. отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. профессора Б.В. Леонова, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» МЗ РФ. E-mail: np_makarova@oparina4.ru. 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

Сысоева Анастасия Павловна, эмбриолог отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. профессора Б.В. Леонова, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» МЗ РФ. E-mail: a_sysoeva@oparina4.ru. 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

Калинина Елена Анатольевна, д.м.н., профессор, заведующая отделением вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. профессора Б.В. Леонова, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» МЗ РФ. E-mail: e_kalinina@oparina4.ru. 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

Authors' information:

Elvira Z. Valikhmetova, postgraduate student at the Department of Assisted Reproductive Technologies in the Treatment of Infertility, Academician V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of the Russian Federation. E-mail: ibraeva1988@list.ru. 117997, Russia, Moscow, Ac. Oparina str., 4.

Elena V. Kulakova, PhD, Senior Researcher at the Department of Assisted Reproductive Technologies in the Treatment of Infertility, Academician V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of the Russian Federation. E-mail: e_kulakova@oparina4.ru. 117997, Russia, Moscow, Ac. Oparina str., 4.

Julia S. Skibina, Ph.D. in physics and mathematics, Director of LLC SPE "Nanostructured Glass Technology" and Deputy Director of International Research and Education Center "Structural Nanobiophotonics". E-mail: director@nano-glass.ru. 410033, Russia, Saratov, pr. 50 let Otyabrya, 101.

Aleksey Yu. Gryaznov, Researcher of LLC SPE "Nanostructured Glass Technology" and International Research and Education Center "Structural Nanobiophotonics". E-mail: director@nano-glass.ru. 410033, Russia, Saratov, pr. 50 let Otyabrya, 101.

Natalya P. Makarova, Dr. Bio. Sci., Leading Researcher at the Department of Assisted Reproductive Technologies in the Treatment of Infertility, Academician V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of the Russian Federation. E-mail: np_makarova@oparina4.ru. 117997, Russia, Moscow, Ac. Oparina str., 4.

Anastasia P. Sysoeva, embryologist at the Department of Assisted Reproductive Technologies in the Treatment of Infertility, Academician V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of the Russian Federation. E-mail: a_sysoeva@oparina4.ru. 117997, Russia, Moscow, Ac. Oparina str., 4.

Elena A. Kalinina, Dr. Med. Sci., Professor, Head of the Department of Assisted Reproductive Technologies in the Treatment of Infertility, Academician V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of the Russian Federation. E-mail: e_kalinina@oparina4.ru. 117997, Russia, Moscow, Ac. Oparina str., 4.