

УДК 576.32/.36:576.385.5

DOI: 10.7868/S3034606126010049

АНАЛИЗ ТРАНСКРИПЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК КУМУЛЮСА ООЦИТОВ ДОНОРОВ И ПАЦИЕНТОК С РАЗЛИЧНЫМ ИСХОДОМ ЦИКЛА ЭКО

Н. И. Енукашвили^{1, *}, А. Р. Смольянинова¹, Д. И. Остромышенский¹, А. И. Соловьева¹,
Ю. А. Татищева², И. А. Бабенчук², А. С. Калугина^{2, 3}

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, Российская Федерация

² Клиника «Скайферт», Санкт-Петербург, 191186, Российская Федерация

³ Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И. П. Павлова, Санкт-Петербург, 197022, Российская Федерация

* E-mail: n.enukashvily@incras.ru

Аннотация. Обоснование работы. Стратегия селективного переноса одного эмбриона предъявляет повышенные требования к отбору эмбрионов с максимальным потенциалом к развитию. Качество эмбриона во многом зависит от качества использованных для его получения гамет, что важно как при использовании собственных, так и донорских ооцитов. В связи с этим актуален поиск неинвазивных маркеров компетентности ооцита, не нарушающих целостность гаметы. Перспективным объектом для такого анализа являются окружающие ооцит клетки кумулюса, которые могут быть получены в процессе подготовки ооцита к оплодотворению. **Цель работы.** оценить взаимосвязь между уровнем экспрессии генов *AREG*, *SDC4*, *SCD5* и длинных некодирующих РНК (lncRNA) *NEAT1*, *VIM-AS1*, *MALAT1*, *ANXA2P2* в клетках кумулюса с исходом цикла ЭКО, а также провести пилотное транскриптомное исследование клеток кумулюса для поиска новых маркеров. **Материал и методика.** В исследовании приняли участие 8 доноров и 18 пациенток, группы которых не различались по основным параметрам клинического анамнеза (возраст, индекс массы тела, уровень антимюллерова гормона, параметры стимуляции). Из клеток кумулюса выделяли polyA-РНК с последующим проведением количественной ПЦР. Для статистического анализа корреляций использовали критерий Спирмена. Транскриптомный анализ (секвенирование на платформе G400, BGI, Китай) выполнен на образцах кумулюса от донорских ооцитов, разделенных по качеству полученных из них blastocyst (шкала Гарднера). Анализ включал в себя визуализацию данных, ORA (Over-Representation Analysis) и GSEA (Gene Set Enrichment Analysis). **Результаты.** Выявлена корреляция количества в клетках кумулюса lncRNA *NEAT1* ($r = -0.74$), *VIM-AS1* ($r = 0.57$) и *AREG* мРНК ($r = 0.21$) с исходом ЭКО. Построена логистическая регрессионная модель для предсказания исхода с использованием в качестве предикторов уровня РНК *NEAT1* и *AREG* ($b_0 = 4.0$; $b_1 = -2.489$; $b_2 = 1.602$). Транскриптомный анализ показал значимое обогащение путей, связанных с созреванием ооцита и формированием щелевых контактов в клетках кумулюса от ооцитов, давших blastocyst более высокого качества. Среди наиболее частых генов в обогащенных путях были идентифицированы ооцит-специфичные транскрипты (*MOS*, *TUBB8*, *WASHC5*, *SPDYE16*, *CCNBI*), что может свидетельствовать об их попадании в кумулюсные клетки в ходе коммуникации ооцита и окружающих соматических клеток. **Заключение.** Полученные данные углубляют понимание процессов созревания ооцита. На основе транскриптомного анализа предложены новые потенциальные неинвазивные маркеры для оценки компетентности ооцита. Обнаружение мРНК *MOS*, *TUBB8*, *WASHC5*, *CCNBI* в клетках кумулюса открывает новые перспективы исследований в области взаимодействия гаметы и соматических клеток в ооцит-кумуляном комплексе.

Ключевые слова: оогенез, созревание ооцита, амфирегулин, *NEAT1*, качество ооцита, компетентность ооцита

Принятые сокращения: ВРТ — вспомогательные репродуктивные технологии, ГнРГ — гонадотропин-рилизинг гормон, ФСГ — фолликуллостимулирующий гормон, ЭКО — экстракорпоральное оплодотворение, GO — база данных Gene Ontology, FDR (false discovery rate) — частота ложных обнаружений, FC — fold change (кратность изменения экспрессии), FE (fold enrichment) — кратность обогащения.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 24-24-00533).

Соблюдение этических стандартов. Все образцы получены от здоровых доноров и пациенток с повторными неудачами имплантации. Забор образцов осуществляли в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (Этические принципы медицинских исследований с участием человека, включая поправки, принятые на 64-й Генеральной ассамблее ВМА в Форталезе, Бразилия, октябрь 2013 г.). От каждой пациентки, участвовавшей в исследовании, было получено письменное информированное согласие. Проведение работы было одобрено этическим комитетом клиники ВРТ, в которой собирали материал (протокол № 11 от 22.12.2016).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Ограничение исследования. Ограничениями исследования являются малая выборка доноров и пациенток ($n = 26$), а также малое количество образцов для транскриптомного секвенирования. Изоформа lncRNA *NEAT1_2* могла быть недопредставлена в образцах кДНК ввиду использованных протоколов получения РНК и кДНК.

Ссылка для цитирования: Енукашвили Н. И., Смольянинова А. Р., Остромышенский Д. И., Соловьева А. И., Татищева Ю. А., Бабенчук И. А., Калугина А. С. Анализ транскрипционной активности клеток кумулюса ооцитов доноров и пациенток с различным исходом цикла ЭКО. Цитология / Cell and Tiss. Biol., 2026, том 68, № 1, с. 48. doi: 10.7868/S3034606126010049

Поступила в редакцию: 02.12.2025

После доработки 02.12.2025

Принята к публикации 10.12.2025

DOI: 10.7868/S3034606126010049

Transcriptional Analysis of Cumulus Cells Derived from Cumulus-Oocyte Complexes of Donors and IVF Patients with Different Outcomes

N. I. Eukashvily^{1, *}, A. R. Smolyaninova¹, D. I. Ostromyshenskii¹, A. I. Solovyeva¹,
Yu. A. Tatishcheva², I. A. Babenchuk², A. S. Kalugina^{2, 3}

¹ Institute of Cytology RAS, Saint Petersburg, 194064, Russian Federation

² Assisted Reproductive Technology Clinic “Skyfert”, Saint Petersburg, 191186, Russian Federation

³ I. P. Pavlov First St. Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, 197022, Russian Federation

* E-mail: n.eukashvily@incras.ru

Abstract. Objective: Selective single embryo transfer strategy necessitates the identification of embryos with the highest developmental potential. Embryo quality is largely determined by the quality of the gametes used, which is critical for both autologous and donor oocytes. Consequently, there is a significant need to identify non-invasive markers of oocyte competence that do not compromise gamete integrity. The cumulus cells surrounding the oocyte represent a promising target for such analysis, as they can be obtained during routine oocyte preparation for fertilization. **The aim:** To assess the correlation between the expression levels of the *AREG*, *SDC4*, and *SCD5* genes, as well as long non-coding RNAs (lncRNAs) *NEATI*, *VIM-AS1*, *MALAT1*, and *ANXA2P2* in cumulus cells and the outcome of the IVF cycle, and to conduct a pilot transcriptomic study to identify novel markers. **Material and methods.** Eight donors and 18 IVF patients were enrolled in the study. The donor and patient groups did not differ significantly in key clinical parameters: age, body mass index (BMI), serum anti-Müllerian hormone (AMH) level, and stimulation protocol parameters. PolyA RNA was isolated from cumulus cells, reversely transcribed and used for quantitative PCR (qPCR). Spearman’s rank correlation coefficient was used for the statistical analysis of correlations. Transcriptomic analysis (sequencing on the G400 platform, BGI, China) was performed on cumulus cell samples from donor oocytes, which were grouped according to the quality of the resulting blastocysts (Gardner scale). The transcriptomic analysis included data visualization, Over-Representation Analysis (ORA), and Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). **Results:** A correlation was found between the levels of lncRNA *NEATI* ($r = -0.74$), *VIM-AS1* ($r = 0.57$), and *AREG* mRNA ($r = 0.21$) in cumulus cells and IVF outcome. A logistic regression model for outcome prediction was applied using *NEATI* and *AREG* RNA levels as predictors ($b_0 = 4.0$; $b_1 = -2.489$; $b_2 = 1.602$). Transcriptomic analysis revealed a significant enrichment of pathways related to oocyte maturation and gap junction assembly in cumulus cells from oocytes that resulted in higher-quality blastocysts. Among the most frequent genes in the enriched pathways, oocyte-specific transcripts (*MOS*, *TUBB8*, *WASHC5*, *SPDYE16*, *CCNB1*) were identified, which may indicate their transfer into cumulus cells during oocyte-somatic cell communication. **Conclusions:** The obtained data deepen the understanding of oocyte maturation processes and suggest novel potential non-invasive markers for assessing oocyte. The detection of *MOS*, *TUBB8*, *WASHC5*, and *CCNB1* mRNAs in cumulus cells opens new research perspectives in the field of gamete-somatic cell interaction within the cumulus-oocyte complex.

Keywords: oogenesis, oocyte maturation, amphiregulin, *NEATI*, oocyte quality, oocyte competence

Funding. This work was supported by the Russian Scientific Foundation (project ID: 24-24-00533).

Ethics approval and consent to participate. All samples were obtained from healthy donors and patients with repeated implantation failure. Sample collection was conducted in accordance with the World Medical Association Declaration of Helsinki (Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, including amendments adopted at the 64th WMA General Assembly in Fortaleza, Brazil, October 2013). Written informed consent was obtained from each patient participating in the study. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the ART clinic where the material was collected (protocol no. 11, dated December 22, 2016).

Conflict of interest. The authors of this work declare that they have no conflicts of interest.

Limitation of the study. The primary limitations of this study are the limited sample size of donors and patients ($n = 26$) and the small number of samples subjected to transcriptomic sequencing. Additionally, the *NEATI_2* isoform of the lncRNA may have been underrepresented in the cDNA libraries due to the specific RNA isolation and cDNA synthesis protocols utilized.

For citation: Eukashvily N. I., Smolyaninova A. R., Ostromyshenskii D. I., Solovyeva A. I., Tatishcheva Yu. A., Babenchuk I. A., Kalugina A. S. Transcriptional analysis of cumulus cells derived from cumulus-oocyte complexes of donors and IVF patients with different outcomes. *Tsitologiya / Cell and Tiss. Biol.*, 2026, vol. 69, no. 1, p. 48. doi: 10.7868/S3034606126010049

Received December 02, 2025

Revised December 02, 2025

Accepted December 10, 2025

По данным Всемирной организации здравоохранения, 17.5 % взрослого населения страдает от бесплодия (Сох et al., 2022). Вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ) являются наиболее эффективным методом лечения бесплодия. Первоначально данные технологии предполагали перенос нескольких эмбрионов, что значительно повышало риск осложнений, связанных с многоплодной беременностью (Габараева и др., 2015). Стратегия селективного переноса одного эмбриона в ВРТ снижает риск таких осложнений. Согласно существующим клиническим рекомендациям, такая стратегия показана женщинам моложе 35 лет в 1–2-м цикле ЭКО при наличии минимум одного эмбриона хорошего качества (Корсак, 2021). Однако при переносе одного эмбриона методы оценки их качества играют существенно более важную роль, так как необходимо выбрать эмбрион с наивысшим имплантационным потенциалом. Существующие методы оценки качества бластоцисты по Гарднеру (Gardner, Schoolcraft 1999) не всегда позволяют надежно прогнозировать успешность развития эмбриона.

Качество эмбриона зависит от качества половых клеток, участвующих в оплодотворении. Следовательно, существует необходимость в разработке неинвазивных методов оценки качества ооцитов. При созревании в фолликуле ооцит окружен соматическими клетками, формируя так называемый ооцит-кумуляусный комплекс (Yokoo, Sato, 2004). Клетки кумулюса взаимодействуют друг с другом и с ооцитом посредством щелевых контактов. Такие контакты необходимы для блокировки развития ооцита на стадии профазы I мейоза, а затем, наоборот — для возобновления мейоза в конце созревания фолликула (Yokoo, Sato, 2004; Turathum et al., 2021). Первый этап возобновления мейоза запускается гонадотропинами, которые активируют окружающие ооцит кумулюсные клетки (Turathum et al., 2021). У млекопитающих действие лютеинового (ЛГ) и фолликулостимулирующего (ФСГ) гормонов на возобновление мейоза ооцитов опосредовано увеличением выработки сАМР через активацию MAP-киназ. Последние способствуют увеличению уровня сАМР в гранулезе и его снижению — в ооците за счет снижения проницаемости щелевых контактов между клетками кумулюса и ооцитом. Это приводит к возобновлению мейоза, а также экспансии кумулюса в ходе подготовки к овуляции и оплодотворению (Okudaira et al., 2017; Turathum et al., 2021). Таким образом, клетки кумулюса обеспечивают синхронизацию созревания цитоплазмы и ядра ооцита.

Тесная связь и постоянный обмен нутриентами и сигнальными молекулами между клетками кумулюса и ооцита привели к предположению о возможности использования клеток кумулюса для неинвазивной оценки качества (т. е. имплантационного потенциала) ооцита (McKenzie et al., 2004; Feuerstein et al., 2007; Anderson et al., 2009; Wathlet et al., 2011; Safronova et al., 2016). Клетки кумулюса являются удобным материалом для такой диагностики, поскольку избыточные клетки кумулюса часто удаляют при получении ооцит-кумуляусных комплексов, и в этом

случае оставляется лишь несколько слоев клеток вокруг ооцита для дальнейших манипуляций. Удаленные клетки кумулюса доступны для исследования.

Ранее мы показали изменения в паттерне экспрессии некоторых генов и длинных некодирующих РНК (lncRNA) в клетках кумулюса у пациенток с неудачей ЭКО (Smolyaninova et al., 2024; Erukashvily et al., 2025). По нашим данным, высокий уровень экспрессии lncRNA *NEAT1* и низкий у *VIM-AS1* коррелирует с неудачей ЭКО. Кроме того, в клетках кумулюса пациенток с повторяющейся неудачей ЭКО повышена активность экспрессии генов *AREG*, кодирующего белок амфирегулин и *SDC4* (синдекан 4). Снижение уровня экспрессии lncRNA *ANXA2P2* и *MALAT1* характерно для клеток кумулюса пациенток с успешным исходом цикла ЭКО (Smolyaninova et al., 2024). Уровни *AREG* и *SCD5* коррелируют с уровнем антимюллерова гормона в крови пациентки (Бабенчук и др., 2025). Однако в предыдущих исследованиях мы использовали пулированный материал от разных ооцит-кумуляусных комплексов одного пациента или донора и проводили сравнения между группами пациентов и доноров. Анализ транскриптома кумулюсных комплексов отдельных ооцитов одной женщины и сопоставление результатов с качеством полученных бластоцист позволит выявить дополнительные потенциальные маркеры имплантационного потенциала ооцита, поскольку в данном случае анализируемые образцы кумулюсов разных ооцитов однородны с точки зрения генетического материала

Цель нашей работы — оценить взаимосвязь количества в клетках кумулюса РНК генов *AREG*, *SDC4*, *SCD5*, lncRNA *NEAT1*, *VIM-AS1*, *MALAT1*, *ANXA2P2* и исхода цикла ЭКО, а также провести пилотное исследование транскриптомов соматических клеток ооцит кумулюсных комплексов, из ооцитов которых были получены бластоцисты различного качества при оценке их по Гарднеру.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Пациенты и доноры. В исследование были включены 18 пациенток с повторными неудачами имплантации (критерии включения: ≥ 2 неудачных ЭКО, возраст 18–40 лет, нормальный овариальный резерв) и 8 доноров ооцитов в группе сравнения. Критериями исключения служили хронические заболевания, препятствующие имплантации, и получение оперативным доступом сперматозоидов для оплодотворения. Данные о пациентах и донорах приведены в табл. 1. Основная (пациенты) и контрольная (доноры) группы не различались статистически достоверно между собой по возрасту, индексу массы тела, дозе гормонов, уровню антимюллерова гормона и ФСГ (табл. 1).

Стимуляция овуляции и получение клеток кумулюса. У всех участниц исследования контролировали овариальную стимуляцию препаратами ФСГ с антагонистами гонадотропин-рилизинг-гормона (ГнРГ). В качестве триггера финального созревания ооцитов использовали рекомбинантный хорионический гонадотропин (250 мкг)

Таблица 1. Данные о пациентах Р и донорах D, участвующих в исследовании

№	Возраст, лет	АМГ, нг/мл	ФСГ, МЕ/мл	ИМТ	ЧБ	ЧР	Дз-Гор, сут, МЕ	Сумма Дз, сут, МЕ	Триггер	Лютеиновая поддержка, мг	ДлСт, сут	Ооциты							
												Всего	Зрелые						
P1	33	1.08	6.3	18.9	3	1	262.5	3150	Овитрель	Ипрожин 600, тромбо асс100	12	3	2						
P2	38	2.72	8.64	31.6	1	0	200	1500		Утрожестан 600, тромбо асс 100	9	9	5						
P3	27	4.6	7	23.2	3	1	150	1350		ЗАМ	10	27							
P5	34	1.09	9.7	19.6	2	0			175	1650	Утрожестан 600, тромбо асс 100	11	11						
P6	31	14.9	8.11	22.2	1		150	1350			Декапептил	ЗАМ	11	20	19				
P7	32	16.9	7.05	25	0				225	1600		Утрожестан 600	10	13	11				
P8	33	1.9	7.04	31			0	2025			2025		9	8	7				
P9	36	0.91	12.5	16.6	0	1			225/200	2400		Овитрель	Утрожестан 600, дуфастон 20, кардиомагнил 75, метипред 4	11	16				
P11	36	6.18	5.93	24			2 ЗБ	175			2275	Декапептил	ЗАМ	13	33	31			
P13	28	4.16	4.8	20.7			0	150			1650	Овитрель		11	17	12			
P14	34	1.9	4.41	21.5			6	200			2725	Декапептил		13	12				
P15	39	2.75	5.08	21.5			1	250			2750			11	7				
P16	29	3.7	4	23			0	250			2250	Овитрель	Утрожестан 600	9	17	16			
P17	40	2.36	7.5	26			1 ТБ	225			2350	0.25	Утрожестан 600, тромбо асс 100	11	20	12			
P19	42	1.33	16.3	16.6			0	0			160	1925	Декапептил	ЗАМ	12	6	4		
P11	35	2.7	5.93	20									250		2250	Овитрель	9	17	15
P18	37	20	11.8	29									150		1550	Декапептил	Остановка развития	11	26
X ± SD	34.6 ± 4.0	4.9 ± 5.7	7.6 ± 3.2	21.3 ± 2.6	-		192.9 ± 44.2	1965.7 ± 556.0	-		Me 11 [10; 11]	15.7 ± 8.9	13.3 ± 7.7						
D1	23	4.3	Н/д	21.7	Н/д	1	250	2500	Декапептил	Ипрожин 600, тромбо асс 100	10	27	22						
D2	25	5.23		18.3		1	150	1800		Утрожестан 600, тромбо асс 100		18	8						
D3	28	5		23		1	156.8	1725		ЗАМ		28	22						
D4	30	10		23.3		1	200	2000		Утрожестан 600, тромбо асс 100		31	29						
D5	28	1.16		19.8		1	225	2100		ЗАМ		12	11	9					
D6	22	6.09		21		1	225	2245				10	49	42					
D7	24	8.27		18		1	250	2825		Утрожестан 600		12	16	14					
D8	21	5.85		25.4		1	212	2125				10	28	22					
X ± SD	25.1 ± 3.28	5.7 ± 2.6	-	22.6 ± 4.5	-		208.6 ± 38.1	2165.0 ± 361.4	-		Me 10 [10; 11.5]	26.0 ± 11.6	21.0 ± 11.1						

Примечание. АМГ — антимуллеров гормон, ФСГ — фолликулостимулирующий гормон, ИМТ — индекс массы тела, ЧБ — число беременностей, ЧР — число родов (до анализируемого цикла ЭКО), Дз-Гор — доза (Дз) гормонов (Гор) за 1 сут; ДлСт — длительность стимуляции, ЗАМ — все эмбрионы заморожены, н/у — не указано, X — среднее арифметическое, SD — стандартное отклонение, Me [Q1; Q3] — медиана (Me) и квартили Q1 (первый) и Q3 (третий) параметра, для которого показано отсутствие нормальности распределения (длительность стимуляции). Различия между группами доноров и пациенток недостоверны по всем проанализированным параметрам (ANOVA для всех параметров, кроме ДлСт; сравнение по параметру ДлСт проводили с использованием критерия Манна—Уитни). Н/д — нет данных.

(Овитрель; Merck Serono, S.p.A., Италия) или 0.1 мг агониста ГнРГ (Декапептил; FERRING, GmbH, Германия) по стандартному протоколу (продолжительность стимуляции и использованные препараты указаны для каждого пациента и донора в табл. 1). Через 36 ч проводили трансвагинальную пункцию фолликулов. Фолликулярная жидкость с ооцит-кумулюсными комплексами поступала эмбриологу, который отделял часть кумулюсных клеток с помощью препаративных игл. Полученные клетки помещали в культуральную среду Flushing Medium (Origio, США). В день забора клетки кумулюса помещали в питательную среду при температуре 37 °С и доставлялись в лабораторию для выделения РНК.

Выделение РНК, синтез кДНК. Выделение РНК из клеток кумулюса выполняли с помощью набора реагентов RNA-solo («Евроген», Россия), как описано нами ранее (Bashendjieva et al., 2024; Erukashvily et al., 2025). Образцы с концентрацией РНК ≥ 15 нг/мкл замораживали при -80 °С и использовали для последующих экспериментов. Синтез кДНК проводили с использованием набора MMLV RT и праймеров олиго(dT)16 по протоколу производителя («Евроген», Россия). Ревертирование с использованием олиго(dT)-последовательностей было выбрано для лучшего сопоставления полученных результатов с результатами других авторов, исследовавших транскрипцию *NEAT1* в фолликулярных клетках и ее влияние на оогенез (Xu et al., 2015; Vouckenheimer et al., 2018).

Количественная ПЦР. Для проведения количественной ПЦР (кПЦР) использовали следующий протокол: 95 °С — 3 мин, далее 39 циклов: 95 °С — 10 с и 58 °С — 35 с; детекция флуоресценции проводили после стадии отжига. Далее анализировали кривую плавления. Кратное изменение уровня экспрессии мРНК рассчитывали с использованием метода $2^{-\Delta\Delta C_t}$. В качестве референсных генов использовали *GAPDH* и *B2M*. Выбор этой пары референсных генов был основан на расчете эффективности ПЦР, значений коэффициента детерминации R^2 , значения угла наклона стандартной калибровочной кривой, а также анализе стабильности их экспрессии по таким параметрам, как коэффициент вариации (CV) и значение стабильности (M-value) (Bashendjieva et al., 2024).

Олигонуклеотиды, использованные в работе, приведены в табл. 2. Гены *GAPDH* и *B2M* использовали в качестве референсных, и их мРНК количественно определяли с помощью праймеров, подобранных нами ранее с учетом оптимальных значений M-value и коэффициента вариации (CV) (Bashendjieva et al., 2024).

Секвенирование транскриптомов клеток кумулюса. Клетки кумулюса изолировали как описано выше, однако клетки, полученные из каждого ооцит-кумулюсного комплекса одного донора не смешивали между собой. РНК из каждого ооцит-кумулюсного комплекса выделяли отдельно с помощью реагента ExtractRNA, согласно протоколу производителя («Евроген», Россия). Из 12 образцов, подходящих для секвенирования нового поколения (NGS) по концентрации РНК, было

три. Данные эмбриологической карты, включая оценку blastocисты по Гарднеру (Gardner, Schoolcraft, 1999) представлены в табл. 3. Сравнивали данные транскриптомов кумулюса ооцита 1 (группа 1, табл. 3) и кумулюсов ооцита 2 и 3 (группа 2, табл. 3). Для проведения исследования транскриптомов методом секвенирования NGS, использовали методики обогащения препарата тотальной РНК мРНК, построение библиотек с использованием полученной мРНК.

Для извлечения мРНК из тотальной РНК применяли метод иммобилизации мРНК на поли-А-сорбент, с последующей отмывкой и элюцией мРНК [VAHTS mRNA Capture Beads (Vasyme, Китай)]. Построение библиотек проводили с использованием набора VAHTS Universal V8 RNA-seq Library Kit (Vasyme, Китай), VAHTS RNA Adapters Set 8 (Vasyme, Китай). Процедура включала в себя следующие этапы: фрагментация мРНК, построение 1-й цепи кДНК, построение 2-й цепи кДНК, лигирование уникальных адаптеров, очистка и выделение индексированных фрагментов целевой длины (400 bp), накопление продуктов лигирования методом ПЦР, очистка полученных продуктов, составление конечного пула полученных библиотек, секвенирование на платформе G400 BGI (ООО «Сербалаб», Санкт-Петербург, Россия).

Контроль качества прочтений RNA-seq выполняли с использованием программы FASTQC версии 0.12.1. (Andrews, 2010). Затем проведена обработка прочтений, включающая удаление адаптеров и фильтрацию по качеству, с помощью программы Trimmomatic версии 0.39 (Bolger et al., 2014) со следующими параметрами: ILLUMINACLIP: TruSeq3-PE.fa:2:30:10 LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:20 MINLEN:140. Очищенные прочтения были картированы на референсный геном человека T2T-CHM13 (сборка GCF_009914755.1_T2T-CHM13v2.0) с использованием программы HISAT2 версии 2.2.1 (Kim et al., 2019) в режиме очень чувствительного поиска (very-sensitive). Формирование таблицы числа прочтений (read counts), ассоциированных с геномными аннотациями, проведено с помощью утилиты featureCounts версии 2.0.8 (Liao et al., 2014). Для нормализации числа прочтений и сравнения образцов использовали метрику Counts Per Million (CPM).

Анализ дифференциально экспрессированных генов. Сравнивали данные транскриптома кумулюса ооцита blastocисты лучшего качества (табл. 3, ооцит 1, blastocиста 4AA по Гарднеру) и кумулюсов двух ооцитов, из которых были получены blastocисты более низкого качества (3BA и 2BA). Анализ дифференциальной экспрессии при отсутствии повторностей затруднен, однако метод ее оценки возможен с использованием программы edgeR. Для этого, согласно руководству программы (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/vignettes/edgeR/inst/doc/edgeRUsersGuide.pdf>), проведен пермутационный тест (exact test) с параметром bcv (квадратный корень дисперсии, square-root-dispersion) 0.4.

Функциональный анализ проводили в три этапа: визуализация, анализ статистического обогащения

Таблица 2. Олигонуклеотиды, использованные в работе

Праймер	Мишень	Последовательность	Ампликон*	Источник
<i>V4SallF</i>		TGTAATTGGCTGTCCSACATT	>chr10:17233801—17234761 DNA 961bp	
<i>V4SallR</i>	VIM-AS1 (VIM antisense RNA1): все транскрипты, стык экзонов 3, 4; 2,3; или 1, 2 (в зависимости от изоформы транскрипта)	CGACGGTGTGTCCTGATGGA	>ENST00000741284.1_1__VIM-AS1:102+260 cDNA 158 bp >ENST00000741283.1_1__VIM-AS1:118+276 cDNA 159bp >ENST00000741282.1_1__VIM-AS1:162+320 cDNA 159bp >ENST00000741279.1_1__VIM-AS1:190+348 cDNA 159bp >ENST00000664157.4_6__VIM-AS1:156+314 cDNA 159bp >ENST00000437232.5_3__VIM-AS1:169+327 cDNA 159bp >ENST00000605833.3_6__VIM-AS1:737+895 cDNA 159bp	(Erukashvily et al., 2025)
<i>NEATF</i>	NEAT1 transcripts 1, 2 (ранее MENpsilon, MENbeta)	TAGTAAGAGAGCCCTGAGGTGG	>chr11:65418159+65418395 DNA 237bp NR_028272.1 cDNA 237	
<i>ANXA2P2F</i>	annexin A2	GGATCTCTATGACCGTGGAGTG	>chr9:33643368+33643578 DNA 211bp	
<i>ANXA2P2R</i>	pseudogene 2	CTTGTTCTGAATGCGCTGGAC	NR_003573.1 cDNA 211 bp	
<i>MALAT1F</i>	Metastasis-associated lung	CAGGTGCTACACAGAAGTGGAT	>chr11:65493700+65493828 DNA 129bp	
<i>MALAT1R</i>		CCTATCTTCAACCACGAACCTGCT	NR_002819.4	(Feuerstein et al., 2007)
<i>AREGF</i>	Амфигреулин	TGGACCTCAATGACACCTACTCTG	>ENST00000502307.1 cDNA 251 bp	
<i>AREGR</i>		GGCCTTAACTACCTGTTCAACTCTG		
<i>SCD5F</i>	стеароил-КоА-дегидрогеназа (SCD) 5	TGACCTGCTTGTGATCCCTGTG	>ENST00000319540.9	(Smolyaninova et al., 2024)
<i>SCD5R</i>		TGAGTGAGATGGTATAGCGGAGAATAG	cDNA 167 bp	
<i>SDC4F</i>	Синдекан 4	CCTAGAAGGCCGATACTTCTCC	NM_002999.4	
<i>SDC4R</i>		TGGTTATCTAGAGGCCACCAAGG	ENST00000372733.3	

Таблица 3. Данные эмбриологической карты ооцит-кумулюсных комплексов, использованных при NGS-секвенировании

Группа	№ ооцита	Оценка бластоцисты по: Gardner, Schoolcraft, 1999	Эмбрион
1	1	4AA	ЗАМ
2	2	2BA	
	3	3BA	

Примечание. Все эмбрионы, полученные из ооцитов, чьи кумулюсы использованы для транскриптомного анализа, были криоконсервированы (ЗАМ)

(Over-Representation Analysis, ORA) и анализ обогащения наборов генов (GSEA). Для первичной визуализации и оценки биологических функций использовали онлайн-инструмент KEGG Mapper — Search and Color Pathway (<https://www.kegg.jp/kegg/mapper.html>, дата обращения: 10.11.2025) (Kanehisa et al., 2023). На карты путей наносили гены, удовлетворявшие пороговым значениям дифференциальной экспрессии ($|\text{Log}_2\text{FC}| \geq 2$, $\text{FDR} < 0.05$). Из выявленных путей были отобраны пути, связанные с созреванием ооцитов. Данные анализа представлены в виде тепловой карты, отображающей профиль экспрессии генов, входящих в отобранные KEGG-пути.

Далее для определения статистически значимого обогащения биологических категорий использовали интегративную платформу DAVID Bioinformatics Resources (<https://david.ncifcrf.gov/>, версия 2021) (Huang et al., 2009; Sherman et al., 2022). Анализ проводили для списка официальных символов генов (Official gene symbols) на фоне всего генома человека (*Homo sapiens*) по следующим базам данных: Gene ontology (GO), KEGG Pathways, Reactome и UniProt Keywords. Порог предварительного отбора устанавливали как EASE Score < 0.1 . Категории считали значимыми при FDR (поправка Беньямини-Хохберга) < 0.05 . Категории с пограничной значимостью ($0.05 < P\text{-value} < 0.1$), но высоким уровнем обогащения ($\text{FE} > 5$) и четкой биологической релевантностью рассматривали отдельно.

Анализ обогащения наборов генов (GSEA) был выполнен с использованием программного обеспечения GSEA v.4.4.0 (Subramanian et al., 2005) с целью выявления функциональных категорий и метаболических путей, демонстрирующих статистически значимые различия в активности между исследуемыми группами образцов клеток кумулюса. В качестве входных данных использовали нормализованные количества прочтений транскриптов, полученные после обработки данных RNA-Seq в пакете edgeR. Анализ проводили для сравнения группы 2 (табл. 3) и группы 1 (табл. 3). В качестве референсных наборов генов применяли аннотированные коллекции из базы данных MSigDB (Molecular signatures database), загруженные с портала Broad Institute (Liberzon et al., 2015).

Статистическая обработка. В исследовании использовали образцы от 18 пациенток и 8 доноров. Все эксперименты выполняли в трех технических и трех биологических повторностях (РНК каждого донора и пациентки выделяли трижды, начиная с этапа синтеза кДНК). Для расчета среднего значения (M), стандартного отклонения (SD), медианы и доверительных интервалов, а также для оценки нормальности распределения количественных данных с помощью критерия Шапиро–Уилка, расчета коэффициента корреляции Спирмена и параметров бинарной логистической регрессии использовали программное обеспечение GraphPad Prism.

Для каждого количественного параметра с нормальным распределением (все данные табл. 1 за исключением длительности стимуляции) определяли $M \pm SD$ и отображали на диаграммах вместе с индивидуальными значениями (которые представляли собой медианы для повторностей каждой пациентки) (показаны точками). Для распределений, отличных от нормального, данные представляли в виде медианы (Me) и квартилей [первого Q1 и третьего Q3]. Для категориальных данных (исход ЭКО) неудачу ЭКО принимали за 0, а успешный цикл ЭКО (беременность, завершившаяся родами живого ребенка) — за 1.

Нормальность распределения количественных переменных оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилка. В связи с отклонением распределений от нормального, при анализе экспрессии генов для сравнения двух независимых групп применяли непараметрический критерий Манна–Уитни. Статистически значимыми считали различия при $P < 0.05$. Учитывая проведение множественных статистических сравнений, для контроля над вероятностью ложноположительных результатов использовали поправку Бенджамини–Хохберга, устанавливая допустимый уровень частоты ложных открытий (false discovery rate, FDR) равным 2% ($q < 0.02$). Для значений с нормальным распределением (большинство данных анамнеза пациенток) использовали критерий ANOVA, применяя поправку Шидака. Статистически значимым считали уровень статистической значимости $P < 0.05$.

Бинарную логистическую регрессию применяли для оценки влияния независимых переменных (уровень экспрессии lncRNA и исследуемых генов) на бинарную целевую переменную — исход процедуры ЭКО. Успешным исходом (значение 1) считали наступление беременности, завершившейся родами живого ребенка. Качество модели оценивали на основе анализа доверительных интервалов и уровня статистической значимости ($P\text{-value}$) для коэффициентов регрессии, расчета площади (area under curve, AUC) под кривой ROC (receiver operating characteristic) с доверительными интервалами, а также с использованием теста Хосмера–Лемешоу и теста отношения правдоподобий (Likelihood Ratio Test).

Поскольку критерий Шапиро–Уилка показал, что распределение большинства анализируемых параметров при анализе экспрессии генов отличалось

от нормального, для оценки статистической зависимости между параметрами использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Корреляцию считали очень сильной при значении коэффициента r в диапазоне от 0.9 до 1.0, сильной — от 0.7 до 0.9, умеренной — от 0.4 до 0.69, слабой — от 0.1 до 0.39 и незначительной — от 0 до 0.09 (Schober, Schwarte, 2018).

Профили экспрессии lncRNA визуализировали с помощью тепловых карт.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка связи профиля экспрессии исследуемых транскриптов с клиническим исходом ВРТ. Анализ профилей экспрессии генов *AREG*, *SDC4*, *SCD5*, *NEAT1*, *MALAT1*, *ANXA2P2* и *VIM-AS1* в клетках кумулюса выявил различия между пациентками с успешным и неудачным исходом цикла ЭКО (рис. 1а). У женщин с неудачным исходом ЭКО наблюдали тенденцию к повышению количества РНК *NEAT1*, *SDC4*: экспрессия lncRNA *NEAT1* была

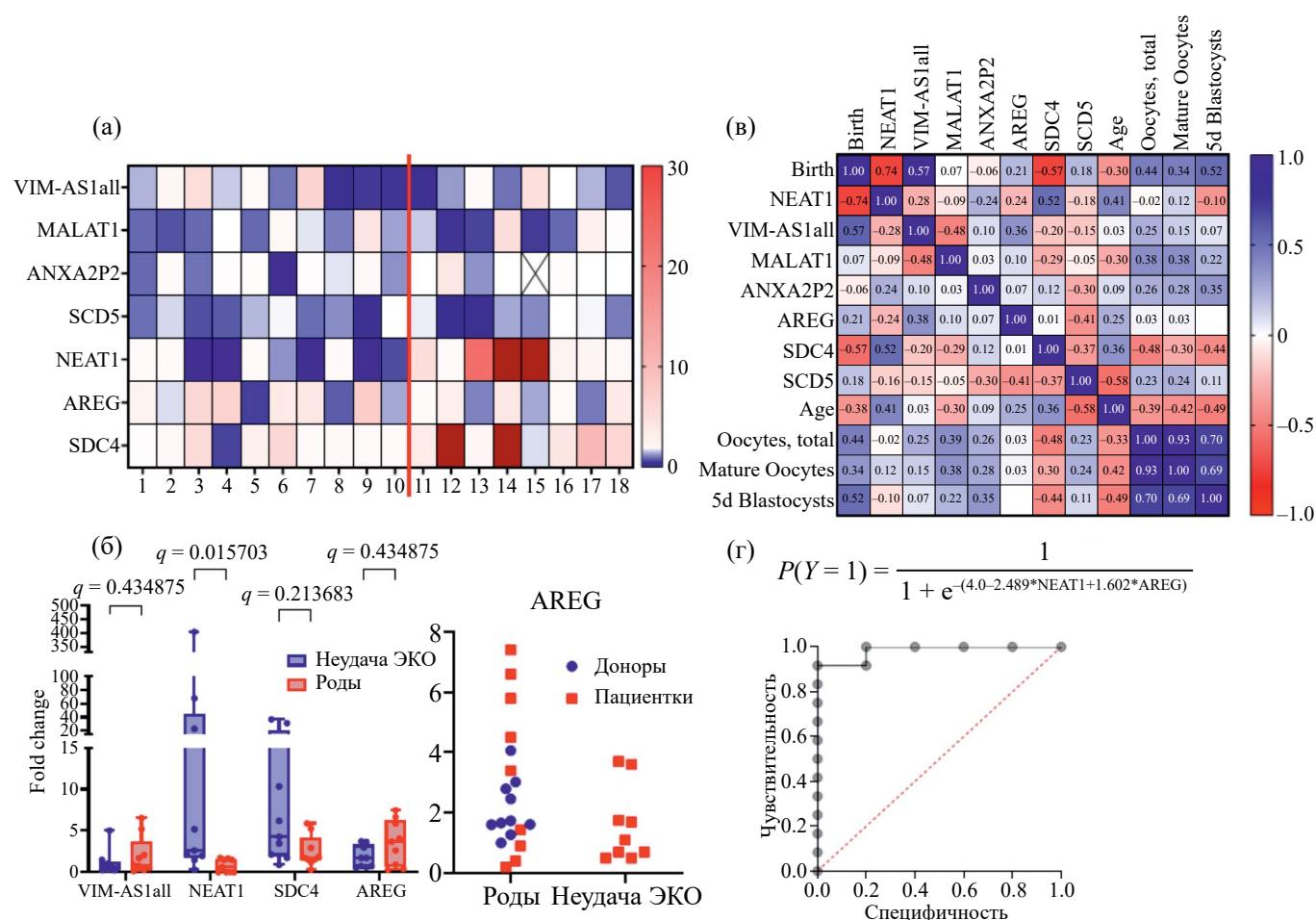


Рис. 1. Анализ экспрессии генов *AREG*, *SCD5*, *SDC4*, *NEAT1*, *MALAT1*, *ANXA2P2* и *VIM-AS1* в клетках кумулюса в зависимости от исхода ЭКО. *a* — Тепловая карта профиля экспрессии: результаты для пациенток с успешным исходом ЭКО (столбцы 1—10) и с неудачей цикла (столбцы 11—18) разделены красной линией; цветовая кодировка уровня экспрессии (кратность изменений относительно группы доноров, данные нормированы на референсные гены *B2M* и *GAPDH*) отображена в цветовой шкале справа. Перечеркнутая ячейка — отсутствие данных. *b* — Уровень экспрессии наиболее информативных транскриптов (*VIM-AS1*, *NEAT1*, *SDC4*, *AREG*); на левом графике данные представлены в виде диаграммы размаха: границы ящика — первый (Q1) и третий (Q3) квантили, внутренняя линия — медиана (Me); вертикальные отрезки — минимальное и максимальное значения в группе; отдельные точки соответствуют индивидуальным значениям для каждой пациентки, которые, в свою очередь, являются усредненными данными по трем техническим и трем биологическим повторностям для каждой пациентки (донора); на графике справа представлены индивидуальные данные по уровню мРНК *AREG* для каждой пациентки и донора. *в* — Корреляционный анализ по Спирмену, представленный в виде тепловой карты, цветовая шкала указана справа; в ячейках карты указаны значения коэффициента корреляции. *г* — Логистическая регрессия и ROC-кривая для построенной модели. По оси *X* — специфичность, по оси *Y* — чувствительность модели

выше (Me: 2.64 [25-й; 75-й процентиля: 1.73; 45.53]), чем в группе с успешным циклом ЭКО (0.64 [0.00; 1.61]). Аналогичная тенденция отмечена для гена *SDC4* (4.30 [1.94; 20.83] против 1.77 [1.38; 4.11]).

Напротив, экспрессия гена *AREG* и lncRNA *VIM-ASI* демонстрировала противоположную динамику. Уровень *AREG* в группе с успешным исходом был выше (3.70 [0.65; 6.28]), чем в группе с неудачей ЭКО (1.74 [0.65; 3.33]). Среди пациенток, в целом, зарегистрирован более широкий разброс значений для гена *AREG* по сравнению с донорами (рис. 1б). Для lncRNA *VIM-ASI* в группе с родами также отмечали более высокий уровень экспрессии (0.84 [0.39; 3.65]) по сравнению с группой с неудачей ЭКО (0.67 [0.31; 1.28]). Однако несмотря на выявленные тенденции, статистически достоверные различия между группами ($P < 0.05$, $q < 0.02$, критерий Манна–Уитни) были зарегистрированы только для lncRNA *NEAT1* (рис. 1б).

Несмотря на отсутствие достоверных различий при анализе групп пациенток с различным исходом ЭКО, корреляционный анализ по Спирману с учетом данных контрольной группы выявил статистически значимые связи между уровнем экспрессии ряда генов и исходом ЭКО. Были обнаружены достоверные корреляции с исходом родов для следующих последовательностей: сильная положительная — для *NEAT1* ($r = 0.74$, $P = 0.006$), умеренные — положительная для *VIM-ASI* ($r = 0.57$, $P = 0.0067$) и отрицательная для *SDC4* ($r = -0.57$, $P = 0.005$), а также слабая положительная — для *AREG* ($r = 0.21$, $p = 0.02$) (рис. 1в).

Поскольку корреляционный анализ выявил значимые связи между экспрессией некоторых из исследуемых последовательностей и исходом ЭКО, для прогнозирования результата был применен метод бинарной логистической регрессии, что обусловлено категориальным характером зависимой переменной (исход цикла ЭКО). Успешным исходом, принятым за единицу, считали беременность, завершившуюся родами живого ребенка. Учет всех переменных (*AREG*, *SCD5*, *SDC4*, *NEAT1*, *MALAT1*, *ANXA2P2* и *VIM-ASI*) в одной модели не представлялся возможным из-за взаимозависимости части из них.

Среди исследованных комбинаций наиболее сильной оказалась модель, учитывающая экспрессию двух последовательностей: *NEAT1* и *AREG*, уравнение регрессии и ROC-кривая которой приведены на рис. 1г. Качество модели оценивали на основе анализа доверительных интервалов и уровня значимости коэффициентов регрессии, площади под ROC-кривой (AUC) с доверительными интервалами, а также с использованием теста Хосмера–Лемешоу и теста отношения правдоподобия. Несмотря на то, что ни одна из независимых переменных сама по себе не достигла стандартного уровня статистической значимости, сама модель была хорошо откалибрована (тест Хосмера–Лемешоу, $P = 0.98$), а комбинация предикторов статистически значимо улучшала предсказание исхода (тест отношения правдоподобия, $P = 0.001$). Площадь под ROC-кривой составила 0.98 (95 %-ный доверительный интервал: 0.93–1.00, $P = 0.023$). Модель

продемонстрировала высокую точность классификации: чувствительность составила 100, а специфичность — 92.3 %, положительная предсказательная ценность составляла 92.3, а отрицательная предсказательная ценность — 100 %.

Таким образом, несмотря на слабую предсказательную силу каждой из независимых переменных в отдельности, что вероятно обусловлено малым объемом выборки ($n = 22$), выявленная нами комбинация биомаркеров *NEAT1* и *AREG*, возможно, будет иметь хорошую общую предсказательную силу, однако она нуждается в дальнейшей валидации на независимой выборке большего размера.

Анализ секвенирования транскриптомов. Методом секвенирования нового поколения охарактеризован транскриптомный профиль трех эмбрионов (4AA, 3BA, 2BA), полученных из ооцитов, для которых были доступны соответствующие образцы клеток кумулюса (табл. 3). Анализ дифференциальной экспрессии выявил 24 881 транскрипт (гены и lncRNA), уровень экспрессии которых достоверно различался ($|\log_2FC| > 2$) между ооцитом № 1, давшим бластоцисту наивысшего качества (4AA), и ооцитами № 2 и № 3 (эмбрионы 3BA и 2BA). Выявлены 10 наиболее дифференциально экспрессирующихся генов: *WDR44*, *TTL*, *RASA4B*, *ATF7IP2*, *FAM153A* (с повышенной экспрессией) и *ABCBI*, *HDAC8*, *EPHA4*, *SLC25A33*, *LAMA1* (с пониженной экспрессией) (рис. 2).

При работе с малыми выборками (в т. ч. состоящими из одного образца), пакет edgeR применяет специальные методы коррекции. Несмотря на это, полученные результаты следует интерпретировать как предварительные. В данном исследовании они были использованы для предварительного определения для дальнейших исследований метаболических путей, потенциально ассоциированных с высоким имплантационным потенциалом ооцитов.

В соответствии с этой целью 3422 гена со статистически значимо повышенным уровнем транскрипции (q -value < 0.05) были отобраны для последующего анализа с использованием базы данных KEGG (рис. 2). Анализ обогащения KEGG-путями для 3422 генов с повышенной экспрессией выявил значительное число путей, связанных с фундаментальными клеточными процессами, такими как общий метаболизм, передача сигналов и регуляция клеточного цикла (например: Metabolic pathways, Pathways in cancer, PI3K-Akt signaling pathway), что отражает общую транскрипционную активность исследуемых клеток. При этом особый интерес представляют пути, непосредственно ассоциированные с оогенезом и фолликулогенезом: контроль стероидогенеза (ovarian steroidogenesis, steroid hormone biosynthesis), сигналинга ключевых репродуктивных гормонов (estrogen signaling pathway, progesterone-mediated oocyte maturation), метаболизма арахидоновой кислоты — предшественника простагландинов, а также пути, регулирующие ангиогенез (VEGF signaling pathway) и взаимодействие с внеклеточным матриксом (ECM-receptor interaction). Обогащение именно этих путей согласуется с предполагаемой ролью исследуемых

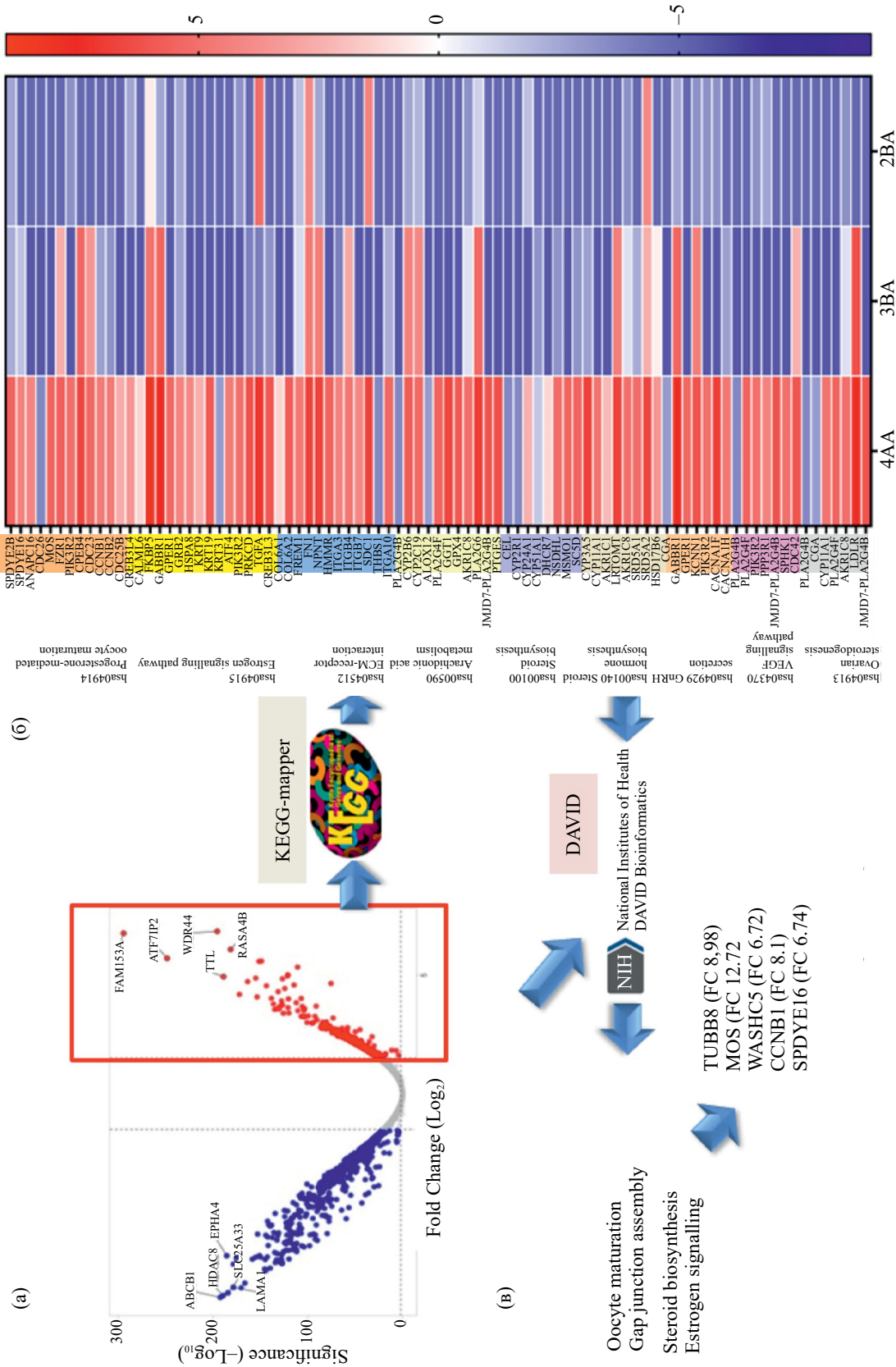


Рис. 2. Анализ дифференциальной экспрессии и функциональное обогащение в клетках кумулюса. *a* — Диаграмма Volcano Plot дифференциальной экспрессии генов при сравнении клеток кумулюса ооцита, сформированного blastocystu высокого качества (4AA по: Gardner, Schoolcraft, 1999) с клетками от ооцитов, давших эмбрионы более низкого качества (3BA, 2BA, см. табл. 3); гены, удовлетворяющие критериям $\log_2FC > 2$ и $FDR < 0.05$, выделены красным прямоугольником. *b* — Тепловая карта (цветовая шкала — справа), отображающая уровень экспрессии (\log_2CPM) генов из панели рис. *a*, которые входят в биологически релевантные KEGG-пути. Для каждого гена указан принадлежащий ему KEGG-путь. *в* — Результаты статистического анализа обогащения (over-representation analysis, ORA) для генов с повышенной экспрессией (красный прямоугольник на панели *a*), выполненного на платформе DAVID; размер шрифта (в названии процесса) отражает статистическую значимость (красный прямоугольник: увеличенный размер шрифта — пути с P -value < 0.05 , уменьшенный — с P -value > 0.05 ; гены — предполагаемая по результатам анализа статистического обогащения (молекулярная сигнатура клеток кумулюса), ассоциированные с высоким имплантационным потенциалом ооцита

клеток кумулюса в поддержке ооцита с высоким имплантационным потенциалом и указывает на потенциальные мишени для дальнейшего изучения.

Однако при анализе обогащения с поправкой Бенъямини–Хохберга ($FDR < 0.05$) с помощью платформы DAVID ни один KEGG-путь не достиг статистической значимости как при анализе всех 3422 генов, так и отобранных 1525 генов, демонстрирующих наиболее значимые изменения экспрессии ($P < 0.02$ и $\log_2 FC > 3$). Их функциональное обогащение анализировали с использованием баз DAVID и REACTOME. Наиболее релевантным результатом из статистически значимых было обогащение

биологического процесса «Созревание ооцита» (oocyte maturation GO: 0001556, $P = 0.0056$, FE: 6.9), что напрямую подтверждает связь выявленных транскрипционных изменений с конечными этапами оогенеза (табл. 4). Кроме того, выявлено значимое обогащение процессов, связанных со сборкой щелевых контактов (gap junction assembly, REACTOME, $P = 0.0038$, FE: 5.7) (табл. 4). Это согласуется с известной ролью щелевых контактов между клетками кумулюса и ооцитом в транспорте питательных веществ и сигнальных молекул.

Третья группа обогащенных категорий в клетках кумулюса ооцита, из которого получена бластоциста 4AA,

Таблица 4. Результаты анализа обогащения путей (ORA)

Категория (биологическая функция)	База данных	ID	<i>P</i> -value	FDR (Benjamini)	Fold Enrichment	Белки	Статус (по <i>P</i> -value)
Oocyte maturation (Созревание ооцита)	Gene Ontology (GO)	GO: 0001556	0.0056	1.00	6.9	MOS, REC8, WASHC5, TUBB8	Значимо ($P < 0.05$)
Gap junction assembly (Сборка щелевых контактов)	Reactome	R-HSA-190861	0.0038	0.995	5.7	GJA1, GJB5, TUBA3D, TUBB4D, TUBB8	
Polar body extrusion after meiotic divisions (Экструзия полярного тельца после мейотических делений)	GO	GO: 0040038	0.045	1.0	8.45	WASHC5, ORC4, SPIRE2	
Sterol biosynthesis (Биосинтез стеролов)	UniProt Keywords (UP_KW)	KW-0756	0.029	0.992	5.9	CYB5R1, MSMO1, SC5D	Тренд ($P < 0.1$)
Gap junction trafficking/regulation (Регуляция щелевых контактов)	Reactome	R-HSA-157858	0.011	1.00	4.5	GJA1, GJB5, TUBA3D, TUBB4D, TUBB8	
Steroid biosynthesis (Биосинтез стероидов)	KEGG Pathways	hsa00100	0.089		6.0	NCDHL, MSMO1, SC5D	
Gap junction (Функция щелевых контактов)		hsa04540	0.081		2.6	GJA1, PDGFRA, PDGFRB, TUBA3D, TUBB4D, TUBB8	
Progesterone-mediated oocyte maturation (Созревание ооцита, опосредованное прогестероном)		hsa04914	0.09		1.4	MOS, ANAPC16, CDC23, CCNB1, FZR1, PIK3R2, SPDYE16	
Estrogen signaling Pathway (Эстрогеновый сигналинг)	KEGG Pathways	hsa04915	0.237		1.47	FKBP5, GPER1, ATF4, CREB3L3, CREB3L4, GABBR1, HSPA8, KRT19, KRT9, PIK3R2, PRKCD, TGFA	Не значимо

связана с метаболизмом липидов и стероидов: «биосинтез стеролов» (KW: sterol biosynthesis, $P = 0.029$, FE = 5/9) и сходный с ней, хотя и не обогащенный достоверно KEGG-путь «биосинтез стероидов» (KEGG, $P = 0.089$, FE = 5.95) (табл. 4). Эти данные указывают на активный стероидогенез в исследуемых клетках, что является их ключевой эндокринной функцией.

Помимо значимых категорий ($P < 0.05$), мы наблюдали тенденцию к обогащению путей, имеющих важное функциональное значение для исследуемых клеток. В частности, путь «биосинтез стероидов» (KEGG) показал высокий уровень обогащения (FE: = 6.0) при статистической значимости $P = 0.089$. Аналогично KEGG-путь, «функция щелевых контактов» (gap junction function, KEGG), был умеренно обогащен (FE = 2.6, $P = 0.081$) (табл. 4). Несмотря на то, что пути KEGG «биосинтез стероидов» (hsa00100) и «функция щелевых контактов» (hsa04540) не достигли формального порога значимости FDR < 0.05, мы рассматриваем их как важные мишени для дальнейшего исследования. Данное предположение основано на их высоких значениях FE (6.0 и 2.6 соответственно), прямой биологической релевантности для функции клеток кумулюса, а также на статистически значимом обогащении родственных процессов по данным базы GO («созревание ооцита», GO: 0001556, $P = 0.0056$; «сборка щелевых контактов», Reactome, $P = 0.0038$; табл. 4)

Анализ генов, входящих в биологические процессы, выявленные с помощью DAVID и KEGG MaPPer, в клетках кумулюса ооцита, из которого получена бластоциста 4AA, показал, что в путях, ассоциированных с созреванием ооцита (как достоверно обогащенных, так и демонстрирующих пограничную значимость), наиболее часто встречаются гены-регуляторы мейоза и клеточного цикла: *MOS* (фактор созревания ооцитов MOS), *TUBB8* (β -тубулин 8), *WASHC5* (субъединица 5 WASH-комплекса), *SPDYE16* (белок семейства SPeedy/RINGO) и *CCNB1* (циклин B1). Среди генов, экспрессия которых в клетках кумулюса ооцита группы 1 (табл. 3) была ниже, чем в группе 2 (ооциты № 2, 3), особый интерес представляют гены, связанные с остановкой мейоза, *ZAR1* ($\log_2FC = -6.5$, $P = 0.006$) и *ZAR1L* ($\log_2FC = -10.5$, $P = 0.002$), а также гены, связанные с экспрессией коллагенов (*COL1A1*, *COL1A2*, *COL2A1*, *COL3A1*, *COL4A5*, *COL9A2*, *COL9A3*, *COL8A2*, *COL11A2*, *COL12A1*) и сериновых протеазных ингибиторов, блокирующих их деградацию (*SERPINA1*, *SERPINA3*, *SERPINA5*, *SERPINB2*, *SERPING1*), причем \log_2FC всех последовательностей < -10, $P < 0.003$. Более низкий уровень экспрессии этих генов в клетках кумулюса ооцита, давшего бластоцисту высокого качества, может отражать более высокую степень зрелости ооцита по сравнению с ооцитами более низкого качества.

Анализ обогащения (ORA) выявил ключевые процессы, связанные с дифференциальной экспрессией в исследуемых клетках, такие как созревание ооцита и метаболизм стероидов. Для получения целостной картины функциональных различий между двумя группами

кумулясных клеток и выявления полных сигнальных путей, находящихся в разном состоянии, был применен анализ обогащения наборов генов (GSEA) (рис. 3). Этот метод чувствителен к слабым, но согласованным изменениям экспрессии многих генов внутри предопределенных наборов.

Несмотря на ограниченное число образцов, с помощью GSEA удалось выявить различные функциональные состояния двух групп кумулюсных клеток. Для группы 1 (табл 3., ооцит 1, усиление транскрипции 128 наборов генов) выявлена выраженная активация катаболизма, включая деградацию макромолекул и интенсивную перестройку транскриптома, а также усиление стресс-ответов и RAS/GTPase-опосредованных сигнальных путей. Такой профиль указывает на состояние клеток, которые переходят к более позднему этапу сопровождения созревающего ооцита: в это время кумулюсные клетки активно перерабатывают накопленные РНК и белки, изменяют межклеточные сигнальные связи и участвуют в подготовке комплекса ооцит–кумуляс к овуляции. Напротив, для



Рис. 3. Тепловая карта 50 наиболее информативных признаков для каждого образца

группы 2 (табл. 3, ооциты 2 и 3, усиление транскрипции 63 наборов генов) продемонстрировано значительное обогащение анаболических и биосинтетических процессов, включая липидный и белковый метаболизм, поддержание ионного и клеточного гомеостаза, а также множество путей, связанных с транскрипцией, ростом и развитием. Такой функциональный профиль характерен для более ранней стадии активности кумулюсных клеток, когда они обеспечивают накопление ресурсов, поддерживают стабильность микроокружения и интенсивно синтезируют компоненты внеклеточного матрикса и мембран.

Таким образом, применение современных омических подходов (RNA-Seq и биоинформатического анализа) позволило, несмотря на ограниченный размер выборки, выявить статистически значимые различия в транскриптомах клеток кумулюса, ассоциированных с ооцитами разного имплантационного потенциала. Получены данные, позволяющие предварительно определить направления дальнейших исследований и поиск новых молекулярных сигнатур ооцитов с высоким потенциалом. В качестве одной из таких перспективных сигнатур может рассматриваться выявленный набор активированных генов-регуляторов мейоза и клеточного цикла: *MOS*, *TUBB8*, *WASHC5*, *SPDYE16* и *CCNB1*. Связь профиля экспрессии *NEAT1*, *AREG* с клиническим исходом ВРТ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Связь профиля экспрессии *NEAT1*, *AREG* с клиническим исходом ВРТ. Взаимодействие между ооцитами и окружающими соматическими фолликулярными клетками являются одним из ключевых механизмов оо- и фолликулогенеза. В ходе фолликулогенеза клетки кумулюса формируют тесную связь с ооцитом, в том числе посредством щелевых контактов. Такое взаимодействие гамет и окружающих клеток необходимо для обмена питательными веществами, паракринными факторами и сигнальными молекулами (Coticchio et al., 2014; Russell et al., 2016; Turathum et al., 2021). Клетки кумулюса, обеспечивают поддержание ооцита в состоянии блока в профазе I мейоза, а впоследствии участвуют в инициации возобновления мейоза ооцита и его созревание (Yokoo, Sato, 2004; Coticchio, Albertini, 2013; Coticchio et al., 2014). Прерывание контакта между соматическими клетками и ооцитом — один из ключевых этапов в завершении созревания ооцита (Dekel et al., 1981). У млекопитающих действие лютеинизирующего гормона и ФСГ на возобновление мейоза ооцитов опосредовано увеличением выработки сАМР за счет активации MAP-киназы (Fan et al., 2009; Conti et al., 2012; Richani, Gilchrist, 2018). Эти киназы способствуют повышению уровня сАМР в клетках гранулезы, а также снижению уровней сАМР и сGMP в самом ооците. Ключевым звеном в этом процессе является нарушение метаболического сопряжения между ооцитом и соматическими клетками, происходящее за счет снижения проницаемости щелевых контактов и фосфорилирования коннексинов (Sela-Abramovich et al., 2006; Dekel et al., 1981). В результате индуцируется

возобновление мейоза и экспансия кумулюса, подготавливающие ооцит к овуляции и оплодотворению (Kidder, Vanderhyden, 2010). Таким образом, кумулюс — своего рода зеркало ооцита.

Исходя из этих представлений, транскриптом клеток кумулюса и гранулезы активно исследуется с целью выявления маркеров, позволяющих спрогнозировать имплантационный потенциал ооцита и полученного с его участием эмбриона (Feuerstein et al., 2007; Anderson et al., 2009; Wathlet et al., 2011; Uyar et al., 2013; Safroanova et al., 2016). Оценка потенциала ооцита важна как на этапе выбора гаметы (в случае использования ооцитов донора), так и на этапе выбора эмбриона для селективного переноса. Однако в настоящее время клинические эмбриологи ограничены преимущественно методами световой микроскопии, оценивая вид ооплазмы, форму полярного тельца, толщину zona Pellucida (блестящей зоны), положение веретена мейоза (Voon, Sawant, 2022).

В проведенной работе мы показали снижение экспрессии гена *AREG* и повышение экспрессии lncRNA *NEAT1* в клетках кумулюса при неудаче ЭКО. Построенная регрессионная модель обладала высокой предсказательной силой, более высокой, чем предложенная нами ранее модель на основе оценки экспрессии *NEAT1* (Enukashvily et al., 2025). Ген *AREG*, кодирующий белок амфирегулин, является одним из ключевых в процессе созревания ооцита, опосредуя ответ клеток гранулезы и ооцита на волну лютеинизирующего гормона (Fang et al., 2023). В ответ на волну гормона белок *AREG* индуцирует возобновление мейоза ооцита за счет снижения выработки сGMP и коммуникации через щелевые контакты между соматическими клетками и ооцитом (Conti et al., 2012; Fang et al., 2023). Помимо этого, *AREG* активно участвует в стероидогенезе, влияя на синтез как эстрогена, так и прогестерона, а также необходим для запуска процесса экспансии кумулюса. Таким образом, положительная (хотя и слабая) корреляция между его уровнем и исходом ЭКО, т. е. качеством эмбриона (рис. 1), является ожидаемой. Рядом исследователей такая связь описана (Huang et al., 2015).

Наряду с этим в ряде публикаций показано снижение экспрессии *AREG* у пациенток с успешным исходом ЭКО (Feuerstein et al., 2007; Kordus et al., 2019). Ранее мы показали возможность использования этого гена в качестве предиктора качества ооцита (Bashendjieva et al., 2024). Однако уровень экспрессии гена *AREG* в нашем предыдущем исследовании был ниже в клетках кумулюса у родивших пациенток, чем у здоровых доноров. У неродивших пациенток, напротив, уровень экспрессии *AREG* был выше, чем в клетках кумулюса ооцитов здоровых доноров. У этих пациенток не наблюдали повышения экспрессии всех остальных исследованных генов. Однако некоторые из исследованных генов (например, *HAS2*, *PTGS2*) располагаются ниже *AREG* в регуляторных каскадах и активируются вслед за ним (Choi et al., 2017; Feuerstein et al., 2007).

Ранее мы предположили, что в клетках кумулюса пациенток есть дисбаланс системы обратных связей и регулирования экспрессии *AREG* (Bashendjieva et al., 2024). Данные текущей работы (рис. 1б) также могут свидетельствовать о дисбалансе в системе регуляции экспрессии данного гена в клетках кумулюса при снижении качества ооцита. Однако в данном исследовании уровень *AREG* у пациенток с успешным исходом ЭКО мог как превышать средние значения для донорской группы, так и быть ниже (рис. 1б). Таким образом, несмотря на общую положительную корреляцию высокого уровня *AREG* с имплантационным потенциалом ооцита, полученные результаты позволяют предположить, что существует оптимальный физиологический диапазон его экспрессии. Такое предположение могло бы объяснить несоответствие результатов различных исследований. Отклонение от этого диапазона (как в сторону недостатка, так и в сторону избытка) может быть ассоциировано со сниженным имплантационным потенциалом ооцита, отражая лежащие в основе нарушения регуляторных механизмов. Однако, согласно выбору ооцита из банка донорских гамет, высокий уровень экспрессии *AREG*, вероятнее всего, будет соответствовать высокому имплантационному потенциалу. При выборе же ооцитов пациенток данный предиктор, скорее всего, будет обладать меньшей силой.

NEAT1, согласно нашим данным (рис. 1), является потенциальным негативным маркером успешности ЭКО. Описано две изоформы lncRNA *NEAT1* — преобладающая, *NEAT1_1* (короткая, ~ 3.7 тыс. п. н.) и минорная, *NEAT1_2* (длинная, ~ 22.7 тыс. п. н.). lncRNA *NEAT1_2* необходима для сборки параспеклов, в то время как транскрипт *NEAT1_1*, по-видимому, выполняет другие функции (Hirose et al., 2019). Праймеры, использованные нами (табл. 2), могут амплифицировать обе формы. Однако мы анализировали полиТ кДНК, взяв за основу протоколы, приведенные в работах, посвященных роли *NEAT1* в созревании ооцита и фолликулогенезе (Xu et al., 2015; Bouckenheimer et al., 2018). Поэтому, вероятнее всего, lncRNA *NEAT1_1* сильнее вовлечена в процессы, связанные с формированием компетентности ооцита. Однако в опубликованных в настоящее время исследованиях эти изоформы не разделялись.

Согласно данным из литературы, lncRNA *NEAT1* участвует в поддержании пролиферации клеток кумулюса в созревающем фолликуле, действуя через P53-зависимые пути, а также связывая микроРНК miR-654 и miR-205, тем самым регулируя каскад MAPK и активность cAMP-зависимого фактора транскрипции CREB1 (Dong et al., 2025b). Снижение экспрессии *NEAT1* приводит к усилению аутофагии в клетках гранулезы и ускоренному старению яичников (Liu et al., 2023). Выступая в роли молекулярной губки, *NEAT1* поглощает miR-204-5P, предотвращая ее нормальное функционирование, и активирует эстрогеновые рецепторы (ESR1), которые, в свою очередь, активируют MAP-киназный каскад (Dong et al., 2025a). Однако увеличение уровня lncRNA *NEAT1*

приводит к повышению чувствительности клеток кумулюса и гранулезы к эстрогену. В этом случае клетки могут реагировать на низкие концентрации гормона так же, как и на высокие. Высокие уровни эстрогена, а также кумулятивное воздействие повышенных его концентраций (например, при медикаментозной блокировке овуляции в цикле ЭКО), могут негативно влиять на успех ЭКО, снижая имплантацию эмбрионов и частоту успешных родов в длинных протоколах с агонистами гонадотропин-рилизинг гормона (Arslan et al., 2007; Aslih et al., 2021; Burdon et al., 2025). Сниженная экспрессия *ESR1* рассматривается как маркер компетентности ооцита, вероятно, коррелирующий с корректной лютеинизацией (Artini et al., 2017). Таким образом, возможно, выявленное в нашей работе увеличение транскрипции *NEAT1* потенциально способно приводить к повышенной активации *ESR1* и снижению компетентности ооцита.

Построенная нами модель логистической регрессии (рис. 1з) обладала высокой предсказательной силой. Важно отметить, что ключевыми предикторами в модели выступили именно транскрипционные маркеры *AREG* и *NEAT1*, что подтверждает их роль в созревании ооцита и, как следствие, определении качества ооцита и исхода ЭКО.

Проведенный корреляционный анализ (рис. 1в) выявил ряд взаимосвязей между ключевыми исследуемыми параметрами. Уровень экспрессии *NEAT1* продемонстрировал ожидаемую сильную положительную корреляцию с успешным исходом (Birth, $r = 0.74$), что полностью согласуется с нашим основным выводом о его роли как негативного предиктора. Кроме того, экспрессия *NEAT1* положительно коррелирует с возрастом пациентки ($r = 0.41$), что позволяет предположить его потенциальную связь с возраст-зависимыми изменениями в ооците. Для экспрессии *AREG* показана слабая положительная корреляция с исходом ($r = 0.21$), но отрицательная — с экспрессией *NEAT1* ($r = -0.24$). Возможно, в клетках кумулюса существуют механизмы антагонистической регуляции этих факторов.

Мы выявили умеренную положительную корреляцию уровня lncRNA *VIM-AS1* с успешным исходом ЭКО ($r = 0.57$). lncRNA *VIM-AS1* является бессмысленным транскриптом гена *VIM* (виментина), и их экспрессия синхронно регулируется через общий гипометилированный промотор. lncRNA *VIM-AS1* формирует R-петлю, обеспечивающую оптимальную пространственную конфигурацию хроматина и доступность промотора для транскрипционных факторов, тем самым усиливая транскрипцию как *VIM-AS1*, так и, вероятно, *VIM* (Voque-Sastre et al., 2015). В клетках гранулезы виментин играет ключевую роль в транспорте холестерина в митохондрии — критическом этапе стероидогенеза (Shen et al., 2012). Таким образом, *VIM-AS1*, регулируя как бессмысленный транскрипт уровень *VIM* мРНК, может опосредованно влиять на продукцию стероидных гормонов в фолликуле. Высокий уровень *VIM-AS1* в клетках кумулюса зрелого фолликула, показанный ранее (Bouckenheimer

et al., 2018), согласуется с выявленной нами корреляцией и подтверждает биологическую значимость этого транскрипта для оо- и фолликулогенеза.

Анализ транскриптомных данных — поиск новых предикторов качества ооцита. При секвенировании транскриптомов в клетках кумулюса ооцита более высокого качества (4AA) выявлено 3422 гена со статистически значимо повышенным относительно кумулюсов других ооцитов уровнем транскрипции ($\log_2 FC > 2$, q -value < 0.05). Из них 102 были ассоциированы с путями, связанными с созреванием ооцита, формированием щелевых контактов, мейозом, синтезом стероидов. В статистически значимо обогащенных путях, ассоциированных с созреванием ооцита, наиболее часто встречались гены-регуляторы мейоза и клеточного цикла: *MOS* (фактор созревания ооцитов *MOS*), *TUBB8* (β -тубулин 8), *WASHC5* (субъединица 5 *WASH*-комплекса), *SPDYE16* (белок семейства *Speedy/RINGO*) и *CCNB1* (циклин B1). Среди генов, дифференциально экспрессируемых в клетках кумулюса ооцитов, давших бластоцисты более низкого качества, выявлены гены, связанные с блокировкой мейоза и синтезом коллагенов, а также с блокировкой протеолитического каскада, приводящего к разрушению внеклеточного матрикса во время экспансии кумулюса. Таким образом, можно сказать, что в клетках кумулюса ооцитов группы 2 (табл. 3), давших бластоцисты более низкого качества, активированы гены, по крайней мере некоторые, характерные для более ранних стадий оогенеза.

MOS (*moloney sarcoma oncogenes*) кодирует серин/треониновую протеинкиназу, которая была впервые идентифицирована как цитостатический фактор, обеспечивающий остановку ооцита в метафазе II (MII) (Sagata et al., 1989; Cairo et al., 2025). При активации *MOS* блокируется деградация циклина B1 (*CCNB1*) через серию промежуточных реакций (Cao et al., 2020). Мутации в гене *MOS* приводят к ранней фрагментации эмбриона, а его инактивация — к митохондриальной дисфункции ооцита (Zhang et al., 2021). Предполагается, что *MOS* участвует в координации сложных процессов организации мейотических делений, а также, помимо остановки ооцита на стадии MII-мейоза, обеспечивает инактивацию транскрипции в овулирующем ооците (Cairo et al., 2025).

Наряду с *MOS*, циклин B1 (*CCNB1*) относится к важнейшим регуляторам мейоза. В сочетании с циклин-зависимой киназой 1 (*CDK1*) *CCNB1* формирует ключевой регуляторный комплекс [М-фазу-промотирующий фактор (*MPF*)], который является главным драйвером и регулятором мейоза в ооците (Yokoo, Sato, 2004; Assou et al., 2006). Уровень циклина B1 и активность *MPF* остаются высокими на протяжении метафазы I, обеспечивая стабильность веретена и удержание гомологичных хромосом. Для перехода к анафазе I (разделению гомологичных хромосом) необходимо резкое падение активности *MPF*. Это достигается путем убиквитин-зависимой деградации циклина B1 (Jones 2008; Pines 2011; Cairo et al., 2025). Снижение уровня *MPF* приводит к анафазе I и образованию

первого полярного тельца. В ходе второго деления мейоза *CCNB1* обеспечивает остановку мейоза на стадии MII вплоть до оплодотворения, после которого циклин B1 быстро разрушается и мейоз завершается. *MOS* участвует в контроле функционирования *CCNB1* (Madgwick, Jones, 2007; Chang et al., 2011).

WASHC5 — это ключевой компонент *WASH*-комплекса (*Wiskott–Aldrich syndrome protein and SCAR homolog*), который регулирует динамику актинового цитоскелета на поверхности эндосом, активируя комплекс *ArP2/3* (Helfer et al., 2013). Его роль в оогенезе млекопитающих практически не изучена. Считается, что у мыши комплекс *WASH* регулирует комплекс *ArP2/3* в ходе актин-опосредованной экстружии первого полярного тельца (Wang et al., 2014). У дрозофилы показана направляющая роль *WASH* комплекса в оогенезе (Verboon et al., 2018).

Белок *SPDYE16* (*Speedy protein 16*) является малоизученным белком семейства *Speedy/RINGO*. Однако для других белков семейства показано участие в оогенезе *Xenopus laevis* и *Mus musculus*. Характерным свойством изученных белков этого семейства (*Spy1/RINGOA/RINGO3*, *RINGO C*, *RINGO E*) является способность регулировать активность *CDK1/CDK2*, минуя циклин-зависимые пути (Gastwirt et al., 2007; Gonzalez, Nebreda, 2020). Особенно хорошо эта функция показана для белка этого семейства *Spy1*, с которым у *SPDYE16* есть два общих мотива (https://www.kegg.jp/ssdb-bin/ssdb_motif?kid=hsa:102723555, 07.12.2025). В базе данных KEGG белок включен в пути *hsa:04114 Oocyte meiosis* и *hsa:04914 Progesterone-mediated oocyte maturation*, где они располагаются в качестве регуляторов *CDK1/CDK2* (https://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa04914).

Ген *TUBB8* кодирует изоформу β -тубулина 8 — специфичный для ооцитов и ранних эмбрионов приматов β -тубулин, формирующий вместе с α -тубулином α/β -гетеродимер, являющийся основным строительным блоком микротрубочек (Feng et al., 2016; Voros et al., 2025). Мутации в этом гене приводят к остановке развития беременности, созревания ооцита, неудаче оплодотворения и встречаются примерно у 30 % женщин, страдающих бесплодием (Huang et al., 2017; Zhao et al., 2025). Тщательные генетические исследования женщин, страдающих бесплодием, приводят к постоянному расширению списка известных мутаций в гене *TUBB8*, вызывающих нарушение репродуктивной функции у женщин (Huang et al., 2017; Ebru et al., 2023; Zhao et al., 2025).

Все перечисленные гены экспрессируются преимущественно в ооците, однако мы выявили их при анализе клеток кумулюса в условиях, когда контаминация материалом ооцита была исключена, так как гаметы были использованы для получения эмбрионов. Возможно, транскрипты выявленных генов попадают в клетки кумулюса из ооцита и их количество невелико относительно уровня этих мРНК в ооците. Выявление транскриптов генов с известной ооцит-специфической экспрессией (таких как *TUBB8* и *MOS*) в клетках кумулюса, при исключенной контаминации ооцитарным

материалом, указывает на возможный активный транспорт или пассивную диффузию этих мРНК из ооцита в окружающие соматические клетки. Однако нельзя исключить возможную транскрипцию этих генов в клетках кумулюса и транспорт синтезированных мРНК в направлении от соматических клеток к ооциту. Хотя уровень этих транскриптов в кумулюсе, несомненно,

на порядки ниже, чем в ооците, их присутствие может быть следствием интенсивного ооцито-соматического обмена не только сигнальными молекулами, но и мРНК. Исследование такого обмена мРНК позволит как улучшить наше понимание процесса созревания ооцита, так и обнаружить новые неинвазивные предикторы компетентности ооцита.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Бабенчук И. А., Пономарцев Н. В., Галлямова В. А., Смольянинова А. Р., Татищева Ю. А., Сломинская Н. А. Кузьминых Н. А., Геркулов Д. А., Енукашвили Н. И., Калугина А. С.* 2025. Оценка экспрессии генов регуляторов созревания ооцитов в кумулюсных клетках у пациенток с повторным неудачами имплантации в анамнезе. Эффективная фармакотерапия. Т. 21. № 45. С. 34. (*Babenchuk I. A., Ponomartsev N. V., Gallyamova V. A., Smolyaninova A. R., Tatishcheva Yu. A., Slominskaya N. A., Kuzminykh N. A., Gerculov D. A., Yenukashvili N. I., Kalugina A. S.* 2025. Evaluation of the Expression of Genes Regulating Oocyte Maturation in Cumulus Cells in Patients with a History of Repeated Implantation Failures. Effective pharmacotherapy. V. 21. No. 45. P. 34.)
<https://doi.org/10.33978/2307-3586-2025-21-45-34-39>
2. *Габараева В. В., Калугина А. С.* 2015. Возможности использования селективного переноса одного эмбриона в программах донорства ооцитов. Журнал акушерства и женских болезней. Т. 64. № 1. С. 15. (*Gabaraeva V. V., Kalugina A. S.* 2015. The possibility of using selective embryo transfer in the oocyte donation programmes. J. Obstet. woman Dis. V. 64. P. 15.)
<https://doi.org/10.17816/jowd64115-22>
3. *Корсак В. С., Адамян Л. В., Серов В. Н.* (под ред). 2019. Вспомогательные репродуктивные технологии и искусственная инсеминация: клинические рекомендации (протоколы лечения). Утв. письмом Минздрава России от 05.03.2019 № 15-4/и/2-1908. Москва. 34 с. (*Korsak V. S., Adamyan L. V., Serov V. N.* (Eds.). 2019. Assisted reproductive technologies and artificial insemination: clinical guidelines (treatment protocols). Moscow: Ministry of Health of the Russian Federation. 34 p.)
4. *Anderson R. A., Sciorio R., Kinnell H., Bayne R. A., Thong K. J., de Sousa P. A.* 2009. Cumulus gene expression as a predictor of human oocyte fertilisation, embryo development and competence to establish a pregnancy. Reproduction. V. 138. P. 629.
<https://doi.org/10.1530/REP-09-0144>
5. *Andrews S.* 2010. FastQC: A Quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
6. *Arslan M., Bocca S., Arslan E. O., Duran H. E., Stadtmauer L., Oehninger S.* 2007. Cumulative exposure to high estradiol levels during the follicular phase of IVF cycles negatively affects implantation. J. Assist. Reprod. Genet. V. 24. P. 111.
<https://doi.org/10.1007/s10815-006-9101-x>
7. *Artini P. G., Tatone C., Sperduti S., D'Aurora M., Franchi S., Di Emidio G., Ciriminna R., Vento M., Di Pietro C., Stuppia L., Gatta V.* 2017. Cumulus cells surrounding oocytes with high developmental competence exhibit down-regulation of phosphoinositol 1.3 kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) signalling genes involved in proliferation and survival. Hum. Reprod. V. 32. P. 2474.
<https://doi.org/10.1093/humrep/dex320>
8. *Aslih N., Michaeli M., Mashenko D., Ellenbogen A., Lebovitz O., Atzmon Y., Shalom-Paz E.* 2021. More is not always better—lower estradiol to mature oocyte ratio improved IVF outcomes. Endocr. Connect. V. 10. P. 146.
<https://doi.org/10.1530/EC-20-0435>
9. *Assou S., Anahory T., Pantesco V., Le Carrour T., Pellestor F., Klein B., Reyftmann L., Dechaud H., De Vos J., Hamamah S.* 2006. The human cumulus—oocyte complex gene-expression profile. Hum. Reprod. V. 21. P. 1705.
<https://doi.org/10.1093/humrep/del065>
10. *Bashendjieva E. O., Barashkova E. A., Tatishcheva J. A., Kalugina A. S., Enuakashvily N. I.* 2024. AREG expression in cumulus cells as a prognostic marker of oocyte quality. Transl. Med. V. 11. P. 407.
<https://doi.org/10.18705/2311-4495-2024-11-5-407-418>
11. *Bolger A. M., Lohse M., Usadel B.* 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics. V. 30. P. 2114.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>

12. *Boque-Sastre R., Soler M., Oliveira-Mateos C., Portela A., Moutinho C., Sayols S., Villanueva A., Esteller M., Guil S.* 2015. Head-to-head antisense transcription and R-loop formation promotes transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 112. P. 5785.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1421197112>
13. *Bouckenheimer J., Fauque P., Lecellier C. H., Bruno C., Commes T., Lemaître J. M., De Vos J., Assou S.* 2018. Differential long non-coding RNA expression profiles in human oocytes and cumulus cells. *Sci. Rep.* V. 8. P. 2202.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-20727-0>
14. *Bourdon M., Maignien C., Ouazana M., Kefelian F., Marcellin L., Patrat C., Pocate-Cheriet K., Chapron C., Santulli P.* 2025. Estradiol and reproductive outcomes in ART: when too much of a good thing hurts. *Reprod. Biomed. Online.* V. Art. ID: 105131.
<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2025.105131>
15. *Cairo G., Kholod O., Palmer O., Meytin S., Goods B. A., Lacefield S.* 2025. Disrupted MOS signaling alters meiotic cell cycle regulation and the egg transcriptome. *Reproduction.* V. 170. P. 139.
<https://doi.org/10.1530/REP-25-0156>
16. *Cao L. R., Jiang J. C., Fan H. Y.* 2020. Positive feedback stimulation of Ccnb1 and Mos mRNA translation by MAPK cascade during mouse oocyte maturation. *Front. Cell Dev. Biol.* V. 8. Art. ID: 609430.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2020.609430>
17. *Chang H. Y., Jennings P. C., Stewart J., Verrills N. M., Jones K. T.* 2011. Essential role of protein phosphatase 2A in metaphase II arrest and activation of mouse eggs shown by okadaic acid, dominant negative protein phosphatase 2A, and FTY720. *J. Biol. Chem.* V. 286. P. 14705.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.193227>
18. *Choi Y., Wilson K., Hannon P. R., Rosewell K. L., Brännström M., Akin J. W., Curry T. E. Jr., Jo M.* 2017. Coordinated regulation among progesterone, prostaglandins, and EGF-like factors in human ovulatory follicles. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* V. 102. P. 19712.
<https://doi.org/10.1210/jc.2016-3153>
19. *Conti M., Hsieh M., Musa Zamah A., Oh J. S.* 2012. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Mol. Cell. Endocrinol.* V. 356. P. 65–73.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.11.002>
20. *Coticchio G., Dal Canto M., Mignini Renzini M., Guglielmo M. C., Brambillasca F., Turchi D., Novara P. V., Fadini R.* 2014. Oocyte maturation: Gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization. *Hum. Reprod. Update.* V. 21. P. 427.
<https://doi.org/10.1093/humupd/dmv011>
21. *Coticchio G., Albertini D. F.* 2013. *Oogenesis.* London: Springer London.
<https://doi.org/10.1007/978-0-85729-826-3>
22. *Cox C. M., Thoma M. E., Tchangalova N., Mburu G., Bornstein M. J., Johnson C. L., Kiarie J.* 2022. Infertility prevalence and the methods of estimation from 1990 to 2021: a systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod. Open.* V. 2022. Art. ID: hoac051.
<https://doi.org/10.1093/hropen/hoac051>
23. *Dekel N., Lawrence T. S., Gilula N. B., Beers W. H.* 1981. Modulation of cell-to-cell communication in the cumulus-oocyte complex and the regulation of oocyte maturation by LH. *Dev. Biol.* V. 86. P. 356.
[https://doi.org/10.1016/0012-1606\(81\)90193-7](https://doi.org/10.1016/0012-1606(81)90193-7)
24. *Dong L., Wu H., Qi F., Chen W., Xu Y., Li M., Wang Y., Yan R., Cai P.* 2025a. LncRNA NEAT1 participates in diminished ovarian reserve by affecting granulosa cell apoptosis and estradiol synthesis via the miR-204-5p/ESR1 axis. *J. Ovarian Res.* V. 18. P. 36.
<https://doi.org/10.1186/s13048-025-01683-6>
25. *Dong L., Wu H., Qi F., Xu Y., Chen W., Wang Y., Cai P.* 2025b. Non-coding RNA-mediated granulosa cell dysfunction during ovarian aging: from mechanisms to potential interventions. *Non-coding RNA Res.* V. 12. P. 102.
<https://doi.org/10.1016/j.ncrna.2025.03.001>
26. *Ebru H., Dahan M. H., Sezer O., Başbuğ A., Kaan H., Güngör N. D., Baltacı V., Tan S. L., Şafak H.* 2023. TUBB8 mutations as a cause of oocyte maturation abnormalities: presentation of oocyte and embryo profiles and novel mutations. *Reprod. Biomed. Online.* V. 47. Art. ID: 103261.
<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2023.06.012>

27. *Enukashvily N. I., Smolyaninova A. R., Babenchuk I. A., Gallyamova V. A., Bashendjieva K. O., Ponomartsev N. V., Tatishcheva J. A., Kalugina A. S.* 2025. Transcription of long non-coding RNAs in cumulus cells of the cumulus-oocyte complex from women with in vitro fertilization failure. *Russ. J. Bioorganic Chem.* V. 51. P. 2852.
<https://doi.org/10.1134/S1068162025604653>
28. *Fan H. Y., Liu Z., Shimada M., Sterneck E., Johnson P. F., Hedrick S. M., Richards J. S.* 2009. MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility. *Science.* V. 324. P. 938.
<https://doi.org/10.1126/science.1171396>
29. *Fang L., Sun Y. P., Cheng J. C.* 2023. The role of amphiregulin in ovarian function and disease. *Cell. Mol. Life Sci.* V. 80. P. 121.
<https://doi.org/10.1007/s00018-023-04709-8>
30. *Feng R., Yan Z., Li B., Yu M., Sang Q., Tian G., Xu Y., Chen B., Qu R., Sun Z., Sun X., Jin L., He L., Kuang Y., Cowan N. J., Wang L.* 2016. Mutations in TUBB8 cause a multiplicity of phenotypes in human oocytes and early embryos. *J. Med. Genet.* V. 53. P. 662.
<https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2016-103891>
31. *Feuerstein P., Cadoret V., Dalbies-Tran R., Guerif F., Bidault R., Royere D.* 2007. Gene expression in human cumulus cells: one approach to oocyte competence. *Hum. Reprod.* V. 22. P. 3069.
<https://doi.org/10.1093/humrep/dem336>
32. *Gardner D. K., Schoolcraft W. B.* 1999. Culture and transfer of human blastocysts. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* V. 11. P. 307.
<https://doi.org/10.1097/00001703-199906000-00013>
33. *Gastwirt R. F., McAndrew C. W., Donoghue D. J.* 2007. Speedy/RINGO regulation of CDKs in cell cycle, checkpoint activation and apoptosis. *Cell Cycle.* V. 6. P. 1188.
<https://doi.org/10.4161/cc.6.10.4252>
34. *Gonzalez L., Nebreda A. R.* 2020. RINGO/Speedy proteins, a family of non-canonical activators of CDK1 and CDK2. *Semin. Cell Dev. Biol.* V. 107. P. 21.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.03.010>
35. *Helper E., Harbour M. E., Henriot V., Lakisic G., Sousa-Blin C., Volceanov L., Seaman M. N. J., Gautreau A.* 2013. Endosomal recruitment of the WASH complex: Active sequences and mutations impairing interaction with the retromer. *Biol. Cell.* V. 105. P. 1917.
<https://doi.org/10.1111/boc.201200038>
36. *Hirose T., Yamazaki T., Nakagawa S.* 2019. Molecular anatomy of the architectural NEAT1 noncoding RNA: The domains, interactors, and biogenesis pathway required to build phase-separated nuclear paraspeckles. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* V. 10. Art. ID: e1545.
<https://doi.org/10.1002/wrna.1545>
37. *Huang D. W., Sherman B. T., Lempicki R. A.* 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* V. 4. P. 44.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211>
38. *Huang L., Tong X., Luo L., Zheng S., Jin R., Fu Y., Zhou G., Li D., Liu Y.* 2017. Mutation analysis of the TUBB8 gene in nine infertile women with oocyte maturation arrest. *Reprod. Biomed. Online.* V. 35. P. 305.
<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2017.05.017>
39. *Huang Y., Zhao Y., Yu Y., Li R., Lin S., Zhang C., Liu P., Qiao J.* 2015. Altered amphiregulin expression induced by diverse luteinizing hormone receptor reactivity in granulosa cells affects IVF outcomes. *Reprod. Biomed. Online.* V. 30. P. 593.
<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.03.001>
40. *Jones K. T.* 2008. Meiosis in oocytes: predisposition to aneuploidy and its increased incidence with age. *Hum. Reprod. Update.* V. 14. P. 143.
<https://doi.org/10.1093/humupd/dmm043>
41. *Kanehisa M., Furumichi M., Sato Y., Kawashima M., Ishiguro-Watanabe M.* 2023. KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes. *Nucleic Acids Res.* V. 51. P. D587.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkac963>
42. *Kidder G. M., Vanderhyden B. C.* 2010. Bidirectional communication between oocytes and follicle cells: ensuring oocyte developmental competence. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* V. 88. P. 399.
<https://doi.org/10.1139/Y10-009>
43. *Kim D., Paggi J. M., Park C., Bennett C., Salzberg S. L.* 2019. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nat. Biotechnol.* V. 37. P. 907.
<https://doi.org/10.1038/s41587-019-0201-4>

44. *Kordus R. J., Hossain A., Corso M. C., Chakraborty H., Whitman-Elia G.F., LaVoie H.A.* 2019. Cumulus cell pappalysin-1, luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor, amphiregulin and hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 1 mRNA levels associate with oocyte developmental competence and embryo outcomes. *J. Assist. Reprod. Genet.* V. 36. P. 1457.
<https://doi.org/10.1007/s10815-019-01489-8>
45. *Liao Y., Smyth G. K., Shi W.* 2014. FeatureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics.* V. 30. P. 923.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656>
46. *Liberzon A., Birger C., Thorvaldsdóttir H., Ghandi M., Mesirov J.P., Tamayo P.* 2015. The Molecular signatures database hallmark gene set collection. *Cell Syst.* V. 1. P. 417.
<https://doi.org/10.1016/j.cels.2015.12.004>
47. *Liu Y.-xi, Ke Y., Qiu P., Gao J., Deng G.-pi.* 2023. LncRNA NEAT1 inhibits apoptosis and autophagy of ovarian granulosa cells through miR-654/STC2-mediated MAPK signaling pathway. *Exp. Cell Res.* V. 424. Art. ID: 113473.
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2023.113473>
48. *Madgwick S., Jones K. T.* 2007. How eggs arrest at metaphase II: MPF stabilisation plus APC/C inhibition equals cytostatic factor. *Cell Div.* V. 2. P. 4.
<https://doi.org/10.1186/1747-1028-2-4>
49. *McKenzie L.J., Pangas S.A., Carson S.A., Kovanci E., Cisneros P., Buster J.E., Amato P., Matzuk M. M.* 2004. Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. *Hum. Reprod.* V. 19. P. 2869.
<https://doi.org/10.1093/humrep/deh535>
50. *Okudaira Y., Wakai T., Funahashi H.* 2017. Levels of cyclic-AMP and cyclic-GMP in porcine oocyte-cumulus complexes and cumulus-free oocytes derived from small and middle follicles during the first 24-hour period of in vitro maturation. *J. Reprod. Dev.* V. 63. P. 191.
<https://doi.org/10.1262/jrd.2016-156>
51. *Pines J.* 2011. Cubism and the cell cycle: the many faces of the APC/C. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* V. 12. P. 427.
<https://doi.org/10.1038/nrm3132>
52. *Richani D., Gilchrist R. B.* 2018. The epidermal growth factor network: Role in oocyte growth, maturation and developmental competence. *Hum. Reprod. Update.* V. 24. P. 1.
<https://doi.org/10.1093/humupd/dmx029>
53. *Russell D. L., Gilchrist R. B., Brown H. M., Thompson J. G.* 2016. Bidirectional communication between cumulus cells and the oocyte: Old hands and new players? *Theriogenology.* V. 86. P. 62.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.019>
54. *Safronova N. A., Kalinina E. A., Donnikov A. E., Burmenskaya O. V., Makarova N. P., Zobova A. V., Alieva K. U., Gorshinova V. K., Trofimov D. Yu., Sukhikh G. T.* 2016. Association of cumulus cell gene expression with embryological indicators in assisted reproductive technology programs. *Akush. Ginekol. (Sofia).* V. 7_2016. P. 60.
<https://doi.org/10.18565/aig.2016.7.60-66>
55. *Sagata N., Watanabe N., Vande Woude G. F., Ikawa Y.* 1989. The c-Mos proto-oncogene product is a cytostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs. *Nature.* V. 342. P. 512.
<https://doi.org/10.1038/342512a0>
56. *Schober P., Schwarte L. A.* 2018. Correlation coefficients: appropriate use and interpretation. *Anesth. Analg.* V. 126. P. 1763.
<https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000002864>
57. *Sela-Abramovich S., Edry I., Galiani D., Nevo N., Dekel N.* 2006. Disruption of gap junctional communication within the ovarian follicle induces oocyte maturation. *Endocrinol.* V. 147. P. 2280.
<https://doi.org/10.1210/en.2005-1011>
58. *Shen W.J., Zaidi S. K., Patel S., Cortez Y., Ueno M., Azhar R., Azhar S., Kraemer F. B.* 2012. Ablation of vimentin results in defective steroidogenesis. *Endocrinol.* V. 153. P. 3249.
<https://doi.org/10.1210/en.2012-1048>
59. *Sherman B. T., Hao M., Qiu J., Jiao X., Baseler M. W., Lane H. C., Imamichi T., Chang W.* 2022. DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic Acids Res.* V. 50. P. W216.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkac194>

60. Smolyaninova A. R., Bashendjieva E. O., Ponomartsev N. V., Ostromyshenskii D. I., Tatishcheva J. A., Kalugina A. S., Enukashvily N. I. 2024. Molecular biological approaches to human oocyte developmental competence prognosis. *Russ. J. Bioorganic Chem.* V. 50. P. 2499.
<https://doi.org/10.1134/S1068162024090012>
61. Subramanian A., Tamayo P., Mootha V. K., Mukherjee S., Ebert B. L., Gillette M. A., Paulovich A., Pomeroy S. L., Golub T. R., Lander E. S., Mesirov J. P. 2005. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* V. 102. P. 15545.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102>
62. Turathum B., Gao E. M., Chian R. C. 2021. The function of cumulus cells in oocyte growth and maturation and in subsequent ovulation and fertilization. *Cells.* V. 10. Art. ID: 2292.
<https://doi.org/10.3390/cells10092292>
63. Uyar A., Torrealday S., Seli E. 2013. Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. *Fertil. Steril.* V. 99. P. 979.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.01.129>
64. Verboon J. M., Decker J. R., Nakamura M., Parkhurst S. M. 2018. Wash exhibits context-dependent phenotypes and, along with the WASH regulatory complex, regulates *Drosophila* oogenesis. *J. Cell Sci.* V. 131. Art. ID: jcs211573.
<https://doi.org/10.1242/jcs.211573>
65. Voon C. M., Sawant S. 2022. Markers of oocyte quality. *J. Reprod. Biotechnol. Fertil. (now: J. Reprod. Biotechnol. Biomed. Sci.)*. V. 11. P. 96.
<https://www.ivf-hub.net/wp-content/uploads/2022/12/Chiang-and-Sawant-OM-Final-Article-no.11.pdf>
66. Voros C., Sapantzoglou I., Athanasiou D., Varthaliti A., Mavrogianni D., Bananis K., Athanasiou A., Athanasiou A., Papadimas G., Gkirgkinoudis A., Papapanagioutou I., Migklis K., Vaitis D., Koulakmanidis A. M., Mazis Kourakos D., Ivanidou S., Daskalaki M. A., Theodora M., Antsaklis P., Loutradis D., Daskalakis G. 2025. Molecular guardians of oocyte maturation: a systematic review on TUBB8, KIF11, and CKAP5 in IVF outcomes. *Int. J. Mol. Sci.* V. 26. Art. ID: 6390.
<https://doi.org/10.3390/ijms26136390>
67. Wang F., Zhang L., Zhang G. L., Wang Z. B., Cui X. S., Kim N. H., Sun S. C. 2014. WASH complex regulates Arp2/3 complex for actin-based polar body extrusion in mouse oocytes. *Sci. Rep.* V. 4. Art. ID: 5596.
<https://doi.org/10.1038/srep05596>
68. Wathlet S., Adriaenssens T., Segers I., Verheyen G., Van de Velde H., Coucke W., Ron El. R., Devroey P., Smits J. 2011. Cumulus cell gene expression predicts better cleavage-stage embryo or blastocyst development and pregnancy for ICSI patients. *Hum. Reprod.* V. 26. P. 1035.
<https://doi.org/10.1093/humrep/der036>
69. Xu X. F., Li J., Cao Y. X., Chen D. W., Zhang Z. G., He X. J., Ji D. M., Chen B. L. 2015. Differential expression of long noncoding RNAs in human cumulus cells related to embryo developmental potential: a microarray analysis. *Reprod. Sci.* V. 22. P. 672.
<https://doi.org/10.1177/1933719114561562>
70. Yokoo M., Sato E. 2004. Cumulus — oocyte complex interactions during oocyte maturation. *Int. Rev Cytol.* V. 235. P. 251.
[https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(04\)35006-0](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)35006-0)
71. Zhang Y.-L., Zheng W., Ren P., Hu H., Tong X., Zhang S. P., Li X., Wang H., Jiang J. C., Jin J., Yang W., Cao L., He Y., Ma Y., Zhang Y., Gu Y., Hu L., Luo K., Gong F., Lu G. X., Lin G., Fan H. Y., Zhang S. 2021. Biallelic mutations in MOS cause female infertility characterized by human early embryonic arrest and fragmentation. *EMBO Mol. Med.* V. 13. Art. ID: e14887.
<https://doi.org/10.15252/emmm.202114887>
72. Zhao H., Ouyang N., Ou S., Lin H., Liao Z., Liu W., Chen H., Yuan P. 2025. Identification of novel variants and expansion of the phenotypic spectrum in PATL2, WEE2, and TUBB8 associated with human early embryonic arrest. *J. Assist. Reprod. Genet.* V. 42. P. 1961.
<https://doi.org/10.1007/s10815-025-03501-w>