

© Коллектив авторов, 2022

Н.П. МАКАРОВА, О.И. ЛИСИЦЫНА, О.С. НЕПША, А.М. КРАСНЫЙ,
А.А. САДЕКОВА, А.Л. НЕЗЛИНА, Н.В. ДОЛГУШИНА, Б.В. ЗИНГЕРЕНКО, Е.А. КАЛИНИНА

ОСОБЕННОСТИ ПРОФИЛЯ ЭКСПРЕССИИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК В СРЕДЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЭМБРИОНОВ В ПРОГРАММАХ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

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

Цель: Изучить возможность использования количественной оценки копийности гена *MT-ND1* в отработанной культуральной среде как маркера успешной имплантации и качества эмбрионов.

Материалы и методы: Проанализирован уровень копийности гена *MT-ND1* в отработанной культуральной среде в зависимости от качества эмбрионов, возраста матери и исходов переноса эмбриона в полость матки.

Результаты: Всего получено 142 эмбриона: 102 бластоцисты, а также 40 эмбрионов, остановившихся в развитии. Распределение копий мтДНК в указанных группах эмбрионов не имело статистически значимой разницы ($p=0,919$). В зависимости от морфологической оценки все бластоцисты разделили на 2 группы: 1-я группа (отличные и хорошие) – 60 эмбрионов, 2-я группа (средние и плохие) – 42 эмбриона. Распределение копий мтДНК в указанных группах не достигло статистически значимых различий ($p=0,082$). Все бластоцисты разделили на группы в зависимости от возраста пациенток: 1-я группа (до 35 лет) – 63 эмбриона, 2-я группа (после 35 лет) – 39 эмбрионов. Количество копий мтДНК было статистически значимо выше в группе пациенток в возрасте до 35 лет ($p=0,001$). Перенос эмбрионов был произведен у 24 пациенток. В зависимости от исхода переноса эмбрионов пациентки были разделены на группы: 1-я группа (отрицательный результат) – 17 пациенток, 2-я группа (клиническая беременность) – 7 пациенток. Распределение копий мтДНК в указанных группах не имело значимой разницы ($p=0,234$).

Заключение: Культуральная среда является источником мтДНК, которая может быть детектирована и анализирована методом количественной ПЦР. Уровень мтДНК в отработанной культуральной среде – перспективный дополнительный маркер для выбора эмбриона, переносимого в полость матки.

Ключевые слова: внеклеточная ДНК, митохондриальная ДНК, отработанная культуральная среда, ВРТ, морфология эмбрионов, качество эмбрионов, ПЦР.

Вклад авторов: Макарова Н.П., Непша О.С., Лисицына О.И., Долгушина Н.В. – концепция и дизайн исследования; Лисицына О.И., Непша О.С., Макарова Н.П., Долгушина Н.В. – написание и редактирование текста; Лисицына О.И., Непша О.С. – статистическая обработка результатов; Зингеренко Б.В. – сбор биологического материала; Красный А.М., Незлина А.Л., Садекова А.А. – лабораторный этап (анализ мтДНК методом ПЦР); Долгушина Н.В., Калинина Е.А. – утверждение публикации.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа проведена без привлечения дополнительного финансирования третьих лиц.

Одобрение Этического комитета: Исследование одобрено Этическим комитетом при ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Согласие пациентов на публикацию: Пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании и публикацию своих данных.

Обмен исследовательскими данными: Данные, подтверждающие выводы этого исследования, доступны по запросу у автора, ответственного за переписку, после одобрения ведущим исследователем.

Для цитирования: Макарова Н.П., Лисицына О.И., Непша О.С., Красный А.М., Садекова А.А., Незлина А.Л., Долгушина Н.В., Зингеренко Б.В., Калинина Е.А. Особенности профиля экспрессии митохондриальной ДНК в среде культивирования эмбрионов в программах вспомогательных репродуктивных технологий. Акушерство и гинекология. 2022; 3: 89-96 <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2022.3.89-96>

©A group of authors, 2022

N.P. MAKAROVA, O.I. LISITSYNA, O.S. NEPSHA, A.M. KRASNYI,
A.A. SADEKOVA, A.L. NEZLINA, N.V. DOLGUSHINA, B.V. ZINGERENKO, E.A. KALININA**MITOCHONDRIAL DNA EXPRESSION PROFILE IN EMBRYO CULTURE MEDIUM
IN ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY**Academician V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology,
Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia**Objective:** To investigate the feasibility of using quantitative assessment of the MT-ND1 gene copy number in culture medium as a marker of successful implantation and embryo quality.**Materials and methods:** We analyzed the level of MT-ND1 gene copy number in the spent culture medium as a function of embryo quality, maternal age, and the outcome of embryo transfer into the uterine cavity.**Results:** A total of 142 embryos were obtained, including 102 blastocysts and 40 embryos with arrested development. There was no statistically significant difference between these groups in the distribution of mtDNA copies ($p=0.919$). Depending on morphological characteristics, all blastocysts were divided into Group 1 (60 excellent and good embryos) and Group 2 (42 average and poor embryos). The distribution of mtDNA copies in these groups did not differ statistically significantly ($p=0.082$). All blastocysts were divided into groups depending on patient age, including Group 1 (<35 years, 63 embryos) and Group 2 (>35.39 years, embryos). The number of mtDNA copies was statistically significantly higher in the group of patients aged under 35 ($p=0.001$). Embryo transfer was performed in 24 patients. Depending on the embryo transfer outcome, patients were divided into Group 1 (negative result, 17 patients) and Group 2 (clinical pregnancy, seven patients). The distribution of mtDNA copies in these groups had no significant difference ($p=0.234$).**Conclusion:** Spent culture medium contains mtDNA derived from embryos that can be detected and analyzed by quantitative PCR. The level of mtDNA in the spent culture medium might serve as a promising marker for selecting the best embryos for transfer into the uterine cavity.**Keywords:** cell-free DNA, mitochondrial DNA, spent culture medium, HRT, embryo morphology, embryo quality, PCR.**Authors' contributions:** Makarova N.P., Nepsha O.S., Lisitsyna O.I., Dolgushina N.V. – conception and design of the study; Lisitsyna O.I., Nepsha O.S., Makarova N.P., Dolgushina N.V. – manuscript drafting and editing; Lisitsyna O.I., Nepsha O.S. – statistical analysis; Zingerenko B.V. – collection of biological material; Krasny A.M., Nezlina A.L., Sadekova A.A. – laboratory stage (mtDNA analysis by PCR); Dolgushina N.V., Kalinina E.A. – manuscript approval.**Conflicts of interest:** The authors have no conflicts of interest to declare.**Funding:** There was no funding for this study.**Ethical Approval:** The study was reviewed and approved by the Research Ethics Committee of the V.I. Kulakov NMRC for OG&P, Ministry of Health of Russia.**Patient Consent for Publication:** All patients provided informed consent for the publication of their data.**Authors' Data Sharing Statement:** The data supporting the findings of this study are available on request from the corresponding author after approval from the principal investigator.

For citation: Makarova N.P., Lisitsyna O.I., Nepsha O.S., Krasnyi A.M., Sadekova A.A., Nezlina A.L., Dolgushina N.V., Zingerenko B.V., Kalinina E.A. Mitochondrial DNA expression profile in embryo culture medium in assisted reproductive technology. *Akusherstvo i Ginekologiya/Obstetrics and Gynecology*. 2022; 3: 89-96 (in Russian) <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2022.3.89-96>

Главной задачей лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) является помощь в наступлении беременности и рождении здорового ребенка. Повышение частоты имплантации и продолжающейся беременности достигается несколькими путями, основной из которых – отбор эмбриона для переноса в полость матки с высоким потенциалом к имплантации и дальнейшему развитию. Оценка эмбрионов в настоящее время чаще всего проводится на основании морфологических критериев, а также результатов преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии (ПГТ-А). По данным современных исследований, проведение ПГТ-А увеличивает частоту имплантации на перенос, снижает риск потери беременности в I триместре и сокращает время до наступления беременности [1,

2]. При этом проведение ПГТ-А имеет и свои недостатки, главным из которых является инвазивность процедуры. Необходимо выполнение биопсии клеток эмбриона, что может вызывать снижение его имплантационных возможностей.

В настоящее время чрезвычайно актуален поиск методов неинвазивной диагностики преимплантационных эмбрионов человека в программах лечения бесплодия методами ВРТ. В качестве источника ДНК эмбриона исследователи все чаще рассматривают отработанную культуральную среду (собранную после культивирования эмбриона). Показано, что использованная культуральная среда содержит внеклеточную ДНК эмбриона и митохондриальную ДНК (мтДНК), анализ которых имеет высокий потенциал для оценки и отбора эмбрионов, наиболее перспективных для переноса в полость матки.

В ряде научных работ уже прослежено возможное эффективное проведение неинвазивного ПГТ-А с оценкой свободной ДНК эмбриона, детектированной в использованной культуральной среде [3–5]. Оценка мтДНК, выделенной из питательной среды после культивирования, в комбинации с морфологическими методами оценки качества эмбрионов также перспективна для выбора эмбрионов с большим потенциалом к дальнейшему развитию [6–12]. Результаты исследований предполагают возможность проведения неинвазивной оценки содержания эмбриональной мтДНК в культуральной среде. В сочетании с морфологией эмбриона они могут помочь клиническим эмбриологам ранжировать эмбрионы с целью селективного переноса эмбриона, имеющего больший потенциал развития.

Цель исследования: изучить возможность использования количественной оценки копийности гена *MT-ND1* в отработанной культуральной среде как маркера успешной имплантации и качества эмбрионов.

Материалы и методы

Исследование проведено на базе отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия им проф. Б.В. Леонова ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России. Проанализировано 173 образца культуральной среды: 142 образца, содержащих эмбрионы, 31 образец в качестве отрицательного контроля без эмбриона. В исследование включены 53 супружеские пары. У всех пациентов овариальная стимуляция проходила в рамках стандартных протоколов. Через 36 ч после введения триггера производился забор ооцитов с помощью трансвагинальной пункции фолликулов. Оплодотворение ооцитов проводилось методом ИКСИ, после чего оплодотворенные клетки переносили в культуральную среду CSCM (Irvine Sc., США). Все этапы культивирования выполняли в мультигазовых инкубаторах COOK (Ирландия) в каплях по 25 мкл под маслом (Irvine Sc., США). Среду CSCM (Irvine Sc., США) не меняли в течение 5–6 суток культивирования. На 5-е или 6-е сутки после оплодотворения проводилась морфологическая оценка бластоцист согласно классификации D. Gardner et al. (1999) и методическим рекомендациям РАРЧ по оценке ооцитов и эмбрионов в лаборатории ВРТ (2021) (табл. 1).

Всего оценили 142 эмбриона: 102 бластоцисты и 40 эмбрионов, остановившихся на стадии дробления или дегенеративных. В зависимости от мор-

фологической оценки, все бластоцисты разделили на 2 группы: 1-я группа (отличные и хорошие) – 60 эмбрионов, 2-я группа (средние и плохие) – 42 эмбриона. На основании морфологической оценки отобраны эмбрионы, наиболее перспективные для переноса в полость матки. Выполнено 24 селективных переноса эмбрионов 5–6 суток в полость матки в нативном цикле. Перенос эмбрионов в полость матки осуществлялся с помощью мягкого катетера Wallace (Германия) или Cook (Австралия). Перенос эмбрионов был произведен у 24 пациенток. В зависимости от исхода переноса пациентки разделены на группы: 1-я группа (отрицательный результат) – 17 случаев, 2-я группа (клиническая беременность) – 7 случаев.

Кроме того, все бластоцисты разделили на группы в зависимости от возраста пациенток: 1-я группа (до 35 лет) – 63 эмбриона, 2-я группа (после 35 лет) – 39 эмбрионов.

Отрицательным контролем служили капли культуральной среды (31 образец), находящиеся в тех же условиях культивирования, но не содержащие эмбрионы. После завершения культивирования эмбрионов все образцы культуральной среды (содержащие и не содержащие эмбрионы) собирались и криоконсервировались.

Определение абсолютного числа копий гена Mitochondrially Encoded NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit 1 (*MT-ND1*) мтДНК осуществляли с помощью метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). Ген *MT-ND1* кодирует белок NADH-убихинон-оксидоредуктазную цепь 1, который является субъединицей NADH-дегидрогеназы, расположенной во внутренней мембране митохондрий, и крупнейшим из пяти комплексов цепи переноса электронов. Для этого в стерильных условиях собирали среду культивирования. Весь объем (10 мкл) полученной среды использовали для проведения ПЦР (общий объем смеси – 50 мкл). Для подсчета копий мтДНК проводили ПЦР-РВ с использованием праймеров зонда к митохондриальному гену субъединицы 1 NAD H-дегидрогеназы (NADH dehydrogenase, subunit 1) (прямой праймер: CCACATCTACCATCACCCCTC; обратный праймер: TAGAATAAATAGGAGGCCTAGGTT; зонд: R6G ATC ACC GCC CCG ACC TTA GCT CTC A BHQ1). Для получения результата ПЦР в виде абсолютного числа копий гена субъединицы 1 NADH дегидрогеназы во время каждого запуска использовали калибровочные растворы плазмид (30 копий/10 мкл, 125 копий/10 мкл, 250 копий/10 мкл) с заключенным соответствующим ампликоном.

Таблица 1. Адаптированная классификация D. Gardner et al. (1999)

Эмбрионы	Качество
Отличные	Больше, чем 3AA
Хорошие	3-6 AB, 3-6 BA, 1-2 AA
Средние	3-6 BB, 3-6 AC, 3-6 CA, 1-2 AB, 1-2 BA
Плохие	1-6 BC, 1-6 CB, 1-6 CC, 1-2 BB

Реакцию проводили в амплификаторе Real-Time PCR Detection System CFX96 (BioRad, США) с набором для ПЦР (M-428, Синтол, Россия) по следующей программе: 95°C – 5 мин, (95°C – 10 с, 60°C – 20 с) 50 циклов. Детекцию флуоресценции осуществляли в канале, соответствующем флуорохрому зонда (R6G). Полученные данные флуоресценции были пересчитаны в абсолютное количество копий с помощью программного обеспечения амплификатора CFX96 BioRad.

Статистический анализ

Статистический анализ проводился в программе Jamovi. Оценена связь между морфологическим качеством эмбрионов, возрастом пациенток, исходами переносов и профилем мтДНК в культуральной среде. Для описания категориальных бинарных данных использовали абсолютные значения и процентные доли от общего числа в группе. Непрерывные переменные были представлены в виде медианы (Me) и межквартильных значений (Q1; Q3). Качество бластоцисты, возраст до и после 35 лет и исход переноса эмбрионов соответствовали категориальным переменным, копияность мтДНК – непрерывным. С целью определения статистической значимости различий мтДНК в исследуемых группах был выбран непараметрический критерий Манна–Уитни. Анализ качественных признаков проводили с помощью Хи-квадрата (χ^2) Пирсона. Величину порогового уровня значимости p принимали равной 0,05.

Результаты

В исследование включено 173 образца культуральной среды: 142 образца, содержащих эмбрион, от 53 супружеских пар и 31 образец – в качестве контроля. Распределение копий мтДНК в среде, содержащей эмбрионы, находилось в диапазоне от 0 до 8623 копий. Медиана распределения составила 156 копий (58,6;349). В контрольной культуральной среде – от 0 до 2831 копий, медиана – 7,1 копий (1;14,6), что было статистически значимо меньше, чем в исследуемых (содержащих эмбрионы) образцах, ($p < 0,001$) (рис. 1).

На 5–6-е сутки культивирования получено 142 эмбриона: 102 бластоцисты различного качества, 40 эмбрионов оценены как дробящиеся или подверг-

нутые атрезии. Распределение копий мтДНК в среде эмбрионов, достигших стадии бластоцисты, находилось в диапазоне от 0 до 8623 копий. Медиана распределения составила 160 копий (59,4;309). В среде эмбрионов, дробящихся или подвергшихся атрезии, – от 3,8 до 6677 копий, Me – 138 копий (54,8;486), что не имело статистически значимой разницы ($p = 0,919$).

В зависимости от морфологической оценки все бластоцисты разделили на 2 группы: 1-я группа (отличные и хорошие) – 60 эмбрионов, 2-я группа (средние и плохие) – 42 эмбриона. В 1-й группе (отличные и хорошие бластоцисты) медиана распределения копий мтДНК составила 120 копий (35,5;311), во 2-й группе (средние и плохие) медиана мтДНК составила 198 копий (93,5;304), что не достигло статистически значимых различий ($p = 0,082$).

Все бластоцисты разделили на группы в зависимости от возраста пациенток: 1-я группа (до 35 лет) – 63 эмбриона, 2-я группа (после 35 лет) – 39 эмбрионов. В 1-й группе (до 35 лет) медиана мтДНК составила 196 копий (103;366), во 2-й группе (после 35 лет) медиана мтДНК составила 58,5 копий (24,5;294). Количество копий мтДНК статистически было значимо выше в группе пациенток в возрасте до 35 лет ($p = 0,001$) (рис. 2).

В зависимости от исхода переноса эмбрионов пациентки разделены на группы: 1-я группа (отрицательный результат) – 17 пациенток, 2-я группа (клиническая беременность) – 7 пациенток. В 1-й группе (отрицательный результат) – медиана мтДНК составила 106 копий (39,6;168), во 2-й группе (клиническая беременность) – медиана мтДНК составила 299 копий (83,6;680), что не имело статистически значимой разницы ($p = 0,234$).

С целью оценки качественных различий (морфология эмбриона) в группах сравнения (возраст до и после 35 лет) использовали Хи-квадрат (χ^2) Пирсона и таблицу сопряженности (табл. 2). Статистически значимой разницы между группами не было ($p = 0,093$).

Дополнительно отдельно сравнивали уровень копияности мтДНК в зависимости от качества (1-ю и 2-ю группу) среди пациенток до и после 35 лет, p -уровень составил 0,195 и 0,425 соответственно, что не имело статистически значимой разницы (табл. 3).

Рис. 1. Бокс-плоты уровня копияности мтДНК в культуральной среде: 0 – не содержащей эмбрион, 1 – содержащей эмбрион

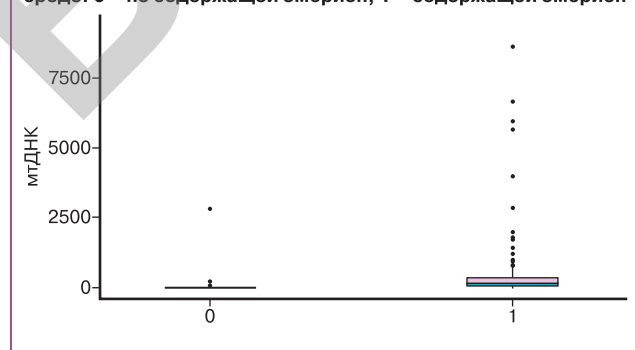


Рис. 2. Бокс-плоты уровня копияности мтДНК в культуральной среде в зависимости от возраста

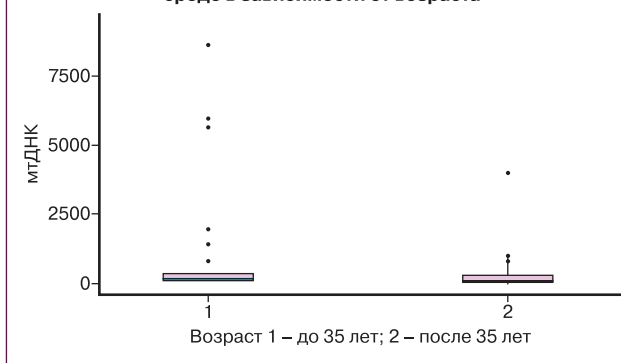


Таблица 2. Таблица сопряженности для бластоцист различного качества среди пациенток в возрасте до и после 35 лет

Возраст	Качество бластоцист			χ^2, p – уровень значимости
	1 – отличные + хорошие	2 – средние + плохие	Всего	
1 – до 35 лет	33 (32,4%)	30 (29,4%)	63 (61,8%)	$p=0,093$
2 – после 35 лет	27 (26,5%)	12 (11,8%)	39 (38,2%)	
Всего	60 (58,8%)	42 (41,2%)	102 (100%)	

Таблица 3. Количество мтДНК в исследуемых группах в виде Me (Q1; Q3)

Качество Возраст	1 – отличные + хорошие	2 – средние + плохие	U-критерий Манна–Уитни, p – уровень значимости
	1 – до 35 лет	162 (80,8; 378)	
2 – после 35 лет	47,6 (22,6; 294)	72,1 (31,3; 289)	$p=0,425$
U-критерий Манна–Уитни, p – уровень значимости	$p=0,034$	$p=0,042$	

Кроме того, дополнительно отдельно оценивали уровень копийности мтДНК в зависимости от возраста (группы до и после 35 лет) среди бластоцист 1-й и 2-й групп. Количество копий мтДНК было статистически значимо выше в группе пациенток в возрасте до 35 лет: для бластоцист 1-й и 2-й группы p -уровень составил 0,034 и 0,042 соответственно (табл. 3).

Обсуждение

Для ВРТ одним из главных вопросов был и остается выбор эмбриона для переноса. В настоящее время морфологическая оценка остается первичным методом селекции эмбрионов. Однако эмбрионы высокого качества с точки зрения морфологии также могут иметь анеуплоидный набор хромосом и/или низкий потенциал к имплантации и рождению здорового ребенка.

В связи с этим в области репродуктивной медицины значительное внимание уделяется разработке новых неинвазивных методов оценки эмбриона на преимплантационном этапе. Интенсивно развиваются несколько направлений: методы микроскопии в сочетании с искусственным интеллектом, протеомный и метаболомный анализ культуральной среды, а также анализ внеклеточной ДНК (в обработанной культуральной среде и полости бластоцисты) [13–17].

Известно, что митохондрии играют важнейшую роль в клеточном метаболизме и функционировании, снабжая клетки необходимой энергией. Отечественными и зарубежными авторами проведено значительное количество работ, посвященных изучению митохондрий и мтДНК в фолликулярной жидкости, половых клетках, клетках эмбриона и жидкости полости бластоцисты [18–21]. Однако результаты исследований остаются противоречивыми, и ни один из методов в настоящее время не рекомендован к применению в рутинной клиниче-

ской практике. Кроме того, данные методы предполагают инвазивное вмешательство. Перспективным инновационным методом оценки преимплантационных эмбрионов считают анализ внеклеточной ДНК в культуральной среде, в том числе и мтДНК. Исследователи предполагают роль мтДНК как потенциального маркера успешности имплантации. Однако исследования, посвященные изучению мтДНК в культуральной среде, в мировой литературе крайне немногочисленны.

В нашем исследовании мы изучали связь между морфологическим качеством эмбрионов, возрастом пациенток, исходами переносов и профилем мтДНК в культуральной среде. Кроме того, в качестве контроля изучался уровень копийности мтДНК в культуральной среде, не содержащей эмбрионы и находившейся в тех же условиях.

Полученные данные подтверждают то, что культуральная среда является источником мтДНК, которая может быть детектирована и анализирована методом количественной ПЦР. Что согласуется с данными других исследователей, заявляющих о возможности детекции мтДНК в культуральной среде методом ПЦР в 99% случаев [9].

Согласно полученным данным, уровень копийности мтДНК в культуральной среде значительно выше в группе пациенток до 35 лет. Следует отметить, что статистически значимая разница отмечалась как при сравнении всех бластоцист (в группах по возрасту матери до и после 35 лет), так и при отдельном сравнении бластоцист различного качества. Указанные результаты согласуются с выводами исследования 2019 г. S. Stigliani et al. [11]. По данным других исследований, противоположно, количество мтДНК выше для пациенток старшего репродуктивного возраста [9, 12]. Ряд авторов отмечают отсутствие какой-либо связи между уровнем мтДНК в культуральной среде и возрастом матери [6, 8].

Также мы получили, что уровень копийности мтДНК в среде культивирования не связан с уров-

нем развития эмбриона на 5–6-е сутки, с морфологической оценкой бластоцисты и частотой успешной имплантации. Схожие данные также отмечают исследователи некоторых работ [6, 8]. Кроме того, в литературе описывают и другого рода результаты.

Команда авторов под руководством S. Stigliani в 2013 г. сделала вывод, что большая концентрация мтДНК в культуральной среде на 2–3-и сутки культивирования ассоциирована со степенью фрагментации эмбриона, а также со старшим репродуктивным возрастом пациенток (35 лет и старше) [9]. В более позднем исследовании 2014 г. те же авторы проанализировали 605 образцов культуральной среды на 3-и сутки и получили обратные результаты: большая концентрация мтДНК выступала предиктором успешной бластуляции эмбрионов хорошего качества с незначительной (mild) степенью фрагментации. Кроме того, высокая концентрация мтДНК ассоциирована с частотой успешной имплантации при переносе эмбриона 3-х суток [10]. Авторы анализировали уже не только уровень копийности мтДНК, но соотношение мтДНК и геномной ДНК в культуральной среде. В 2019 г. исследователи дополнили свое исследование и попытались разработать комбинированный подход к выбору эмбрионов [11]. Авторы подчеркнули, что уровень мтДНК значительно выше для эмбрионов, которые достигали стадии бластоцисты, в сравнении с теми, что остановились в развитии. Кроме того, количество мтДНК в культуральной среде было выше среди женщин до 35 лет. Таким образом, исследователи заключили, что соотношение мт/геномной ДНК на 3-и сутки (пороговое значение ≥ 184) в сочетании с морфологической оценкой улучшает эффективность прогнозирования бластуляции, вне зависимости от характеристик пациента и цикла (чувствительность – 95%, специфичность – 65%).

Другая команда авторов определила, что количество мтДНК в отработанной культуральной среде имеет положительную корреляционную связь с количеством мтДНК в клетках бластоцисты (исследовали материал всей бластоцисты), а также с возрастом матери и качеством эмбриона [12].

В исследованиях показано, что концентрация мтДНК в культуральной среде значительно превышает концентрацию геномной ДНК [9, 18]. Одни исследователи отмечают, что уровень копийности мтДНК в культуральной среде выше на 5-е сутки, в сравнении с 3-ми сутками культивирования [7]. Другие авторы подчеркивают отсутствие связи между уровнем мтДНК в культуральной среде и плоидностью эмбриона [6, 12]. Согласно исследованиям Kobayashi M. et al., копийность мтДНК в культуральной среде выше для бластоцист, испытывающих коллапсы (blastocyst collapse), и имеет положительную корреляционную связь с их количеством [8]. Известно, что перенос бластоцисты, испытывающей эпизоды коллапса («сжатия»), сопряжен со снижением частоты успешной имплантации с 48,5 до 35,1% [22]. Те же авторы замечают, что длительность между стартом бластуляции и формированием полной бластоцисты имеет значительную

положительную корреляцию с количеством мтДНК в культуральной среде [8].

Учитывая полученные нами данные, а также результаты других аналогичных работ, вопрос о возможном использовании показателя копийности мтДНК в культуральной среде в качестве неинвазивного маркера выбора эмбриона для переноса в полость матки остается открытым и требует проведения дополнительных исследований.

Данные, опубликованные к настоящему времени в мировой литературе, крайне противоречивы, что может быть связано с целым рядом факторов. Главные из них – это малое количество работ, посвященных изучению мтДНК в культуральной среде, небольшой объем выборок, разные дизайны исследований, разные методы анализа мтДНК (ПЦР, NGS), выбор разных фрагментов с целью детекции мтДНК. Кроме того, часть исследований выполнялась в условиях одной клиники (как в нашем случае), часть – в нескольких. Влияние на полученные результаты могли оказать такие факторы, как условия и длительность культивирования эмбриона, а также тип среды культивирования и время (сутки) ее коллекции. Помимо прочего, следует отметить, что морфологическая оценка эмбрионов проводится эмбриологом и носит субъективный характер, что также может отражаться на конечных результатах исследования.

В то же время наличие единичных результатов анализа контрольной культуральной среды, содержащих высокие уровни мтДНК, свидетельствует о возможной внешней контаминации во время сбора, транспортировки или анализа материала. Общими причинами контаминации могут выступать: белковые компоненты культуральной среды, материнская или отцовская контаминация (клетками кумулюса, полярными тельцами или сперматозоидами), а также внешняя контаминация во время периода культивирования [18].

Наше исследование выполнено как пилотный проект и было ограничено небольшой выборкой, что, вероятно, повлияло на результат. Тем не менее в данной работе показано, что уровень копийности мтДНК в культуральной среде эмбрионов выше для пациенток до 35 лет в сравнении с пациентками старшего репродуктивного возраста. Уровень копийности мтДНК не связан со степенью развития эмбриона на 5–6-е сутки культивирования, морфологической оценкой бластоцисты или частотой успешной имплантации.

Необходимо проведение дополнительных крупных унифицированных многоцентровых исследований с использованием единого дизайна, метода анализа мтДНК, нескольких вариантов контролей (пустая культуральная среда на 0, 3 и 5-е сутки культивирования), фильтров при работе с материалом, а также нескольких фрагментов (праймеров) с целью детекции мтДНК.

Заключение

Культуральная среда является источником мтДНК, которая может быть детектирована и анализирована

методом количественной ПЦР. Уровень мтДНК в культуральной среде — перспективный дополнительный маркер для выбора эмбриона, переносимого в полость матки. Требуется дополнительные исследования с целью разработки единого подхода к методам детекции мтДНК, а также протоколам культивирования и определения возможности их использования в клинической практике.

Литература/References

1. Shi W.H., Jiang Z.R., Zhou Z.Y., Ye M.J., Qin N.X., Huang H.F. et al. Different strategies of preimplantation genetic testing for aneuploidies in women of advanced maternal age: A systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Med.* 2021; 10(17): 3895. <https://dx.doi.org/10.3390/jcm10173895>.
2. Bhatt S.J., Marchetto N.M., Roy J., Morelli S.S., McGovern P.G. Pregnancy outcomes following in vitro fertilization frozen embryo transfer (IVF-FET) with or without preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A) in women with recurrent pregnancy loss (RPL): a SART-CORS study. *Hum. Reprod.* 2021; 36(8): 2339-44. <https://dx.doi.org/10.1093/humrep/deab117>.
3. Brouillet S., Martinez G., Coutton C., Hamamah S. Is cell-free DNA in spent embryo culture medium an alternative to embryo biopsy for preimplantation genetic testing? A systematic review. *Reprod. Biomed. Online.* 2020; 40(6): 779-96. <https://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2020.02.002>.
4. Chen L., Sun Q., Xu J., Fu H., Liu Y., Yaxin Yao Y. et al. A non-invasive chromosome screening strategy for prioritizing in vitro fertilization embryos for implantation. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021; 9: 708322. <https://dx.doi.org/10.3389/fcell.2021.708322>.
5. Rubio C., Racowsky C., Barad D.H., Scott R.T., Simon C. Noninvasive preimplantation genetic testing for aneuploidy in spent culture medium as a substitute for trophectoderm biopsy. *Fertil. Steril.* 2021; 115(4): 841-9. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2021.02.045>.
6. Zhang X., Sun Y., Dong X., Zhou J., Sun F., Han T. et al. Mitochondrial DNA and genomic DNA ratio in embryo culture medium is not a reliable predictor for in vitro fertilization outcome. *Sci. Rep.* 2019; 9(1): 5378. <https://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-41801-1>.
7. Hammond E., McGillivray B., Wicker S., Peek J.C., Shelling A.N., Stone P. et al. Characterizing nuclear and mitochondrial DNA in spent embryo culture media: genetic contamination identified. *Fertil. Steril.* 2017; 107(1): 220-8. e5. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.10.015>.
8. Kobayashi M., Kobayashi J., Shirasuna K., Iwata H. Abundance of cell-free mitochondrial DNA in spent culture medium associated with morphokinetics and blastocyst collapse of expanded blastocysts. *Reprod. Med. Biol.* 2020; 19(4): 404-14. <https://dx.doi.org/10.1002/rmb2.12344>.
9. Stigliani S., Anserini P., Venturini P., Scaruffi P. Mitochondrial DNA content in embryo culture medium is significantly associated with human embryo fragmentation. *Hum. Reprod.* 2013; 28(10): 2652-60. <https://dx.doi.org/10.1093/humrep/det314>.
10. Stigliani S., Persico L., Lagazio C., Anserini P., Venturini P., Scaruffi P. Mitochondrial DNA in Day 3 embryo culture medium is a novel, non-invasive biomarker of blastocyst potential and implantation outcome. *Mol. Hum. Reprod.* 2014; 20(12): 1238-46. <https://dx.doi.org/10.1093/molehr/gau086>.
11. Stigliani S., Orlando G., Massarotti C., Casciano I., Bovis F., Anserini P. et al. Non-invasive mitochondrial DNA quantification on Day 3 predicts blastocyst development: a prospective, blinded, multi-centric study. *Mol. Hum. Reprod.* 2019; 25(9): 527-37. <https://dx.doi.org/10.1093/molehr/gaz032>.
12. Zhang J., Xia H., Chen H., Yao C., Feng L., Song X., Bai X. Less-invasive chromosome screening of embryos and embryo assessment by genetic studies of DNA in embryo culture medium. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2019; 36(12): 2505-13. <https://dx.doi.org/10.1007/s10815-019-01603-w>.
13. Zmuidinaite R., Sharara F.I., Iles R.K. Current advancements in noninvasive profiling of the embryo culture media secretome. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22(5): 2513. <https://dx.doi.org/10.3390/ijms22052513>.
14. Валиахметова Э.Э., 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. [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. *Obstetrics and Gynecology.* 2021; 5: 5-16. (in Russian)]. <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2021.5.5-16>.
15. Ярыгина С.А., Смольникова В.Ю., Калинина Е.А., Эльдаров Ч.М., Гамисония А.М., Макарова Н.П., Бобров М.Ю. Анализ метаболитов в различных средах культивирования эмбрионов человека. *Акушерство и гинекология.* 2020; 11: 114-23. [Yarygina S.A., Smolnikova V.Yu., Kalinina E.A., Eldarov Ch.M., Gamisonia A.M., Makarova N.P., Bobrov M.Yu. Analysis of human embryo culture medium metabolites. *Obstetrics and Gynecology.* 2020; 11: 114-23. (in Russian)]. <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2020.11.114-123>.
16. 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. [Sysoeva A.P., Makarova N.P., Kalinina E.A., Skibina Yu.S., Zanishevskaya A.A., Yanchuk N.O., Gryaznov A.Yu. Enhancing the efficiency 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>.
17. Тимофеева А.В., Калинина Е.А., Драккина Ю.С., Чаговец В.В., Макарова Н.П., Суух 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., Sukhikh G.T. Embryo quality assessment by the small noncoding RNA expression profile in an embryo culture medium in assisted reproductive technology programs. *Obstetrics and Gynecology.* 2019; 6: 79-86. (in Russian)]. <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2019.6.79-86>.
18. Hammond E, Shelling A, Cree L. Nuclear and mitochondrial DNA in blastocoele fluid and embryo culture medium: evidence and potential clinical use. *Hum. Reprod.* 2016; 31(8): 1653-61. <https://dx.doi.org/10.1093/humrep/dew132>.
19. Королькова А.И., Мишьева Н.Г., Мартазанова Б.А., Бурменская О.В., Екимов А.Н., Трофимов Д.Ю., Веюкова М.А., Кириллова А.О., Абубакирова А.Н. Повышение эффективности программ ЭКО на основании определения копийности митохондриальной ДНК в трофэктодерме эмбрионов. *Акушерство и гинекология.* 2019; 3: 98-104. [Korolkova A.I., Mishieva N.G., Martazanova B.A., Bourmenskaya O.V., Ekimov A.N., Trofimov D.Yu., Veyukova M.A., Kirillova A.O., Abubakirov A.N. Increasing the effectiveness of IVF programs by determining mitochondrial DNA copy number in embryonic trophectoderm. *Obstetrics and Gynecology.* 2019; 3: 98-104. (in Russian)]. <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2019.3.98-104>.
20. Перминова С.Г., Митюрин Е.В., Селимова Ф.Н., Бурменская О.В., Козырина Н.В., Кравченко А.В. Копийность митохондриальной ДНК в эякуляте ВИЧ-инфицированных мужчин, принимающих антиретровирусную терапию. *Акушерство и гинекология.* 2020; 4: 120-6. [Perminova S.G., Mityurina E.V., Selimova F.N., Burmenskaya O.V., Kozyrina N.V., Kravchenko A.V. Mitochondrial DNA copy number in sperm of HIV-infected men receiving antiretroviral therapy. *Obstetrics and Gynecology.* 2020; 4: 120-6. (in Russian)]. <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2020.3.120-126>.
21. Непша О.С., Кулакова Е.В., Екимов А.Н., Драккина Ю.С., Макарова Н.П., Краевая Е.Е., Калинина Е.А. Использование митохондриальной ДНК эмбрионов в качестве предиктора эффективности программ вспомога-

- тельных репродуктивных технологий. *Акушерство и гинекология*. 2021; 11: 125-34. [Nepsha O.S., Kulakova E.V., Ekimov A.N., Drapkina Yu.S., Makarova N.P., Kraevaya E.E., Kalinina E.A. Value of embryonic mitochondrial DNA in predicting the effectiveness of assisted reproductive technologies. *Obstetrics and Gynecology*. 2021; 11: 125-34. (in Russian)].
22. *Marcos J., Pérez-Albalá S., Mifsud A., Molla M., Landeras J., Meseguer M.* Collapse of blastocysts is strongly related to lower implantation success: a time-lapse study. *Hum. Reprod.* 2015; 30(11): 2501-8. <https://dx.doi.org/10.1093/humrep/dev216>.

Поступила 18.01.2022

Принята в печать 24.02.2022

Received 18.01.2022

Accepted 24.02.2022

Сведения об авторах:

Макарова Наталья Петровна, д.б.н., в.н.с. отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. проф. Б.В. Леонова, Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, pr_makarova@oparina4.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1396-7272>, 17997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

Лисицына Ольга Изобовна, аспирант, Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова Министерства здравоохранения Российской Федерации, o_yazykova@inbox.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7775-3508>, 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

Непша Оксана Сергеевна, н.с. отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. проф. Б.В. Леонова, Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова Министерства здравоохранения Российской Федерации, o_nepsha@oparina4.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9988-2810>, 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

Красный Алексей Михайлович, к.б.н., заведующий лабораторией цитологии, Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова Министерства здравоохранения Российской Федерации, a_krasnyi@oparina4.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7883-2702>, 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

Садекова Алсу Амировна, к.б.н., научный сотрудник лаборатории цитологии, Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова Министерства здравоохранения Российской Федерации, salsad@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-4726-7477>, 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

Незлина Александра Леонидовна, м.н.с. лаборатории цитологии, Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова Министерства здравоохранения Российской Федерации, nezlina@vk.com, 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

Долгушина Наталья Витальевна, д.м.н., профессор, заместитель директора – руководитель департамента организации научной деятельности, Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова Министерства здравоохранения Российской Федерации, n_dolgushina@oparina4.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1116-138X>; 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

Зингеренко Борис Владимирович, м.н.с. отделения вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. проф. Б.В. Леонова, Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова Министерства здравоохранения Российской Федерации, regniz@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8784-5502>, 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

Калинина Елена Анатольевна, д.м.н., профессор, заведующая отделением вспомогательных технологий в лечении бесплодия им. проф. Б.В. Леонова, Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова Министерства здравоохранения Российской Федерации, e_kalinina@oparina4.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8922-2878>, 117997, Россия, Москва, ул. Академика Опарина, д. 4.

Authors' information:

Nataliya P. Makarova, Dr. Bio. Sci., Dr. Bio. Sci., Leading Researcher at at the B.V. Leonov Department of Assisted Technologies for the Treatment of Infertility, Academician V.I. Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of the Russian Federation, pr_makarova@oparina4.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1396-7272>, 4 Oparina str., Moscow, 117997, Russia.

Olga I. Lisitsyna, Postgraduate Student, Academician V.I. Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of the Russian Federation, o_yazykova@inbox.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7775-3508>, 4 Oparina str., Moscow, 117997, Russia.

Oksana S. Nepsha, Ph.D., Researcher at the B.V. Leonov Department of Assisted Technologies for the Treatment of Infertility, Academician V.I. Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of the Russian Federation, o_nepsha@oparina4.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9988-2810>, 4 Oparina str., Moscow, 117997, Russia.

Aleksey M. Krasnyi, Ph.D. (Bio. Sci.), Head of the Cytology Laboratory, Academician V.I. Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of the Russian Federation, alexred@list.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7883-2702>, 4 Oparina str., Moscow, 117997, Russia.

Alsu A. Sadekova, PhD (Bio), Researcher of the Cytology Laboratory, Academician V.I. Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of the Russian Federation, salsad@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-4726-7477>, 4 Oparina str., Moscow, 117997, Russia.

Alexandra L. Nezlina, Junior Researcher at the Cytology Laboratory, Academician V.I. Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of the Russian Federation, nezlina@vk.com, 4 Oparina str., Moscow, 117997, Russia.

Nataliya V. Dolgushina, Dr. Med. Sci., Professor, Deputy Director – Head of the Department of Research Administration, Academician V.I. Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of the Russian Federation, n_dolgushina@oparina4.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1116-138X>, 4 Oparina str., Moscow, 117997, Russia.

Boris V. Zingerenko, Researcher at the B.V. Leonov Department of Assisted Technologies for the Treatment of Infertility, Academician V.I. Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of the Russian Federation, regniz@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8784-5502>, 4 Oparina str., Moscow, 117997, Russia.

Elena A. Kalinina, Dr. Med. Sci., Professor, Head of the B.V. Leonov Department of Assisted Technologies for the Treatment of Infertility, Academician V.I. Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of the Russian Federation, e_kalinina@oparina4.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8922-2878>, 4 Oparina str., Moscow, 117997, Russia.