



АКУШЕРСТВО И ГИНЕКОЛОГИЯ OBSTETRICS AND GYNECOLOGY

DOI: 10.22363/2313-0245-2024-28-3-390-402
EDN: EXOEGJ

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ORIGINAL RESEARCH

Уровень копийности митохондриальной ДНК в культуральной среде эмбрионов человека как фактор прогноза наступления и пролонгирования беременности

О.И. Лисицына  , Н.П. Макарова , А.М. Красный ,
А.Н. Екимов , А.Ю. Романов , Н.В. Долгушина 

Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии
имени академика В.И. Кулакова Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва, Российская Федерация
 o_yazykova@inbox.ru

Аннотация. *Актуальность.* Ключевой фактор, оказывающий влияние на эффективность программ вспомогательных репродуктивных технологий — это качество эмбриона, переносимого в полость матки. Цель — изучение возможности использования количественной оценки уровня геномной (гДНК), митохондриальной ДНК (мтДНК) в отработанной культуральной среде (ОКС) и мтДНК в трофэктодерме (ТФЭ) как маркера успешной имплантации и продолжающейся более 12 недель беременности. Материалы и методы. В исследование включены 195 образцов ОКС от 93 пар с бесплодием. Перенос размороженного эмбриона произведен у 43 пациенток. Проанализирован уровень гДНК, мтДНК в ОКС методом ПЦР в реальном времени и мтДНК в ТФЭ методом NGS в зависимости от хромосомного статуса эмбрионов и исходов переносов размороженного эмбриона (ПРЭ) в полость матки. Статистический анализ

© Лисицына О.И., Макарова Н.П., Красный А.М., Екимов А.Н., Романов А.Ю., Долгушина Н.В., 2024



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/legalcode>

проводился в программе Jamovi. Результаты и обсуждение. В зависимости от исхода переноса пациентки были разделены на группы: 1 группа — отрицательный результат, n=18; 2 группа — продолжающаяся более 12 недель беременность, n=25. мтДНК и гДНК в ОКС были статистически значимо ниже в группе 2 по сравнению с группой 1 (p=0,007 и p=0,01, соответственно). При уровне мтДНК в ОКС < 95 копий шансы наступления и сохранения беременности повышались в 3,2 раза (95 % ДИ=1,1–31,6). Предложены формулы прогноза вероятности продолжающейся беременности после ПРЭ для непрерывных показателей (Se модели составила 67,0 %, Sp — 91 %, площадь под кривой (AUC — 90,0 %) и бинарных показателей (Se модели составила 75,0 %, Sp — 70 %, AUC — 83,8 %). Таким образом, уровень копийности гДНК и мтДНК в культуральной среде эмбрионов является значимым прогностическим фактором наступления и пролонгирования беременности в программах ВРТ. В зависимости от плоидности blastocyst был проанализирован уровень мтДНК в ТФЭ, гДНК и мтДНК в ОКС эмбрионов в группах 1.1. (эуплоидные, n=98) и 2.1. (анеуплоидные, n=97). Не было выявлено каких-либо отличий в сравниваемых группах. Выводы. Оценка уровня гДНК и мтДНК в ОКС может быть дополнительным неинвазивным маркером для отбора эуплоидного эмбриона, наиболее перспективного для переноса в полость матки.

Ключевые слова: внеклеточная ДНК, митохондриальная ДНК, отработанная культуральная среда, ОКС, трофэктодерма, ВРТ, качество эмбрионов

Информация о финансировании. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования.

Вклад авторов. Концепция и дизайн исследования — О.И. Лисицына, Н.П. Макарова, Н.В. Долгушина. Сбор и обработка материала — О.И. Лисицына, А.М. Красный, А.Н. Екимов. Анализ данных — О.И. Лисицына, Н.В. Долгушина, А.Ю. Романов. Написание текста и оформление статьи — О.И. Лисицына. Редактирование — О.И. Лисицына, Н.П. Макарова

Информация о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Исследование одобрено Этическим комитетом при ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации от 28.10.2021 года. Протокол № 10.

Благодарности — неприменимо.

Информированное согласие на публикацию. Все участники исследования добровольно подписали информированное согласие на участие в исследовании и обработку персональных данных согласно Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (WMA Declaration of Helsinki — Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013).

Поступила 04.03.2024. Принята 16.04.2024.

Для цитирования: Лисицына О.И., Макарова Н.П., Красный А.М., Екимов А.Н., Романов А.Ю., Долгушина Н.В. Уровень копийности митохондриальной ДНК в культуральной среде эмбрионов человека как фактор прогноза наступления и пролонгирования беременности // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2024. Т. 28. № 3. С. 390–402. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-3-390-402. EDN: EXOEGJ.

Mitochondrial DNA copy number level in the culture medium of human embryos as a factor in predicting the onset and prolongation of pregnancy

Olga I. Lisitsyna  , Nataliya P. Makarova , Aleksey M. Krasnyi ,
Alexey N. Ekimov , Andrey Yu. Romanov , Nataliya V. Dolgushina 

Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russian Federation
 o_yazykova@inbox.ru

Abstract. Relevance. A key factor influencing the effectiveness of assisted reproductive technology programmes is the quality of the embryo transferred into the uterine cavity. The aim is to investigate the possibility of using quantitative assessment of genomic (gDNA), mitochondrial DNA (mtDNA) levels in spent culture medium (SCM) and mtDNA in the trophoctoderm (TE) as a marker of successful implantation and pregnancy lasting more than 12 weeks. **Materials and Methods.** The study included 195 SCM samples from 93 couples with infertility. Frozen embryo transfer (FET) was performed in 43 patients. The level of gDNA, mtDNA in SCM by real-time PCR and mtDNA in TE by NGS was analysed depending on the chromosomal status of embryos and the outcome of FET. Statistical analyses were performed in Jamovi software. **Results and Discussion.** Depending on the outcome of transfer, the patients were divided into groups: Group 1 — negative result, n=18; Group 2 — pregnancy continuing for more than 12 weeks, n=25. mtDNA and gDNA in SCM were statistically significantly lower in group 2 compared to group 1 ($p=0.007$ and $p=0.01$, respectively). When mtDNA levels in SCM were <95 copies, the odds of pregnancy rate and ongoing pregnancy were increased 3.2-fold (95 % CI=1.1–31.6). Prediction formulas for the probability of ongoing pregnancy after FET were proposed for continuous (sensitivity was 67.0 %, specificity was 91 %, area under the curve (AUC) was 90.0 %) and binary (sensitivity was 75.0 %, specificity was 70 %, AUC was 83.8 %). Thus, the level of gDNA and mtDNA copy number in the embryo culture medium is a significant prognostic factor for the onset and prolongation of pregnancy in ART programmes. Depending on the ploidy of the blastocysts, we analysed the level of mtDNA in TE, gDNA and mtDNA in the SCM of embryos in groups 1.1. (euploid, n=98) and 2.1. (aneuploid, n=97). No differences were detected in the compared groups. **Conclusion.** Assessment of gDNA and mtDNA levels in SCM may be an additional non-invasive marker for selection of the most promising euploid embryo for transfer into the uterine cavity.

Keywords: extracellular DNA, mitochondrial DNA, spent culture medium, SCM, trophoctoderm, ART, embryo quality

Funding. The authors received no financial support for the research.

Author contributions. Conceptualisation — O.I. Lisitsyna, N.P. Makarova, N.V. Dolgushina. Data collection — O.I. Lisitsyna, A.M. Krasnyi, A.N. Ekimov. Data analysis — O.I. Lisitsyna, N.V. Dolgushina, A. Yu. Romanov. Writing — original draft and visualization — O.I. Lisitsyna. Editing — O.I. Lisitsyna, N.P. Makarova.

Conflict of interest statement. The authors declare that there is no conflict of interest.

Ethics approval. The study was approved by the Ethics Committee of the Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology (protocol № 10 of 28 October 2021). The patients submitted the informed consent to study participation.

Acknowledgements — not applicable.

Consent for publication. All study participants signed informed consent to participate in the study to participate in the study in accordance with the Declaration of Helsinki of the World Medical Association (WMA Declaration of Helsinki — Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013), the processing of personal data and consent to publication.

Received 04.03.2024. Accepted 16.04.2024.

For citation: Lisitsyna OI, Makarova NP, Krasnyi AM, Ekimov AN, Romanov AYu, Dolgushina NV. Mitochondrial DNA copy number level in the culture medium of human embryos as a factor in predicting the onset and prolongation of pregnancy. *RUDN Journal of Medicine*. 2024;28(3):390–402. doi: 10.22363/2313-0245-2024-28-3-390-402. EDN: EXOEGJ.

Введение

Главной задачей лечения бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) является помощь в наступлении беременности и рождении здорового ребенка [1, 2]. Качество эмбриона, переносимого в полость матки, является одним из важнейших факторов, влияющих на успех проводимой программы. В качестве косвенных показателей имплантационного потенциала эмбрионов в клинической практике оценивают качество эмбрионов по морфологии и их хромосомный статус (эуплоидный/анеуплоидный). Однако отличное качество эмбрионов по морфологии не исключает наличия у них анеуплоидий, а для проведения генетического анализа (преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии (ПГТ-А)) всегда требуется инвазивное вмешательство (наиболее часто — биопсия трофэктодермы), требующее дополнительных временных и технических затрат, и, возможно, отрицательно влияющее на имплантационные возможности эмбриона. Более того, отбор только эуплоидных эмбрионов отличного качества также не гарантирует успешный исход программы ВРТ. Учитывая вышесказанное, особую актуальность в настоящее время приобретает поиск новых неинвазивных подходов к селекции эмбрионов с наивысшим имплантационным потенциалом.

Так, в качестве одной из возможных дополнительных методик исследователи изучают внеклеточную мтДНК в отработанной культуральной среде (ОКС). Известно, что митохондрии в клетке ответственны за производство энергии, принимают участие в поддержании кальциевого гомеостаза, процессах окисления жирных кислот и апоптозе [3]. Предполагается, что уровень мтДНК может отражать энергетическую нагрузку, уровень окислительного стресса, а также компенсаторные возможности клеток. Цель исследования — изучить возможность

использования количественной оценки уровня геномной (гДНК), митохондриальной ДНК (мтДНК) в отработанной культуральной среде (ОКС) и мтДНК в трофэктодерме (ТФЭ) как маркера успешной имплантации и продолжающейся более 12 недель беременности.

Материалы и методы

Проанализировано 195 образцов отработанных культуральных сред (ОКС) от 93 супружеских пар с бесплодием, обратившихся для проведения цикла ВРТ с ПГТ-А в период с января 2023 года по март 2024 года. Исследование одобрено Этическим Комитетом при ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава РФ от 28.10.2021 года. Протокол № 10. Пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

В качестве лабораторного контроля использовали 16 образцов культуральной среды, находящихся в аналогичных условиях культивирования, но не содержащие эмбрионы. Все образцы культуральной среды подвергались криоконсервации после сбора.

Овариальная стимуляция, трансвагинальная пункция яичников проводились по стандартной методике. Оплодотворение ооцитов во всех случаях осуществляли методом интрацитоплазматической инъекции в сперматозоид (ИКСИ) [4]. Все этапы культивирования эмбрионов и морфологическая оценка бластоцист, а также сбор ОКС проводились по ранее описанной методике [4]. В исследование включены образцы ОКС бластоцист, которым была выполнена биопсия трофэктодермы (ТФЭ) и преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии по ранее описанной методике [5].

По результатам ПГТ-А через несколько менструальных циклов 43 пациенткам был выполнен

перенос одного размороженного зуплоидного эмбриона (ПРЭ) в полость матки. ПРЭ и ведение посттрансферного периода осуществлялось согласно принятым в клинической практике протоколам.

В зависимости от исхода ПРЭ пациенты были разделены на группы: группа 1 — пациентки, у которых беременность наступила и продолжалась > 12 недель гестации (n=18), группа 2 — пациентки, у которых беременность не наступила или прервалась до 12 недель гестации (n=25). В сравниваемых группах были проанализированы клиничко-анамнестические данные, особенности фолликулогенеза, оогенеза и раннего эмбриогенеза.

Дополнительно все бластоцисты были стратифицированы на группы по наличию анеуплоидии (n=195): группа 1.1. — зуплоидные бластоцисты (n=98), группа 2.1. — анеуплоидные бластоцисты (n=97).

Для всех 195 полученных бластоцист была выполнена оценка уровня копийности мтДНК в клетках ТФЭ и уровня копийности гДНК и мтДНК в ОКС.

Оценка уровня копийности мтДНК в трофэктодерме

Определение уровня копийности мтДНК в клетках ТФЭ осуществлялось путем нормировки на аутосомы согласно программному обеспечению SeqVario. Долю мтДНК в ТФЭ исчисляли в относительных единицах (о.е.). Расчет значения определяли путем отношения ридов, выровненных на митохондрию, к количеству всех ридов, выровненных на геном (все хромосомы и митохондрии).

Оценка уровня копийности мтДНК и гДНК в отработанной культуральной среде

Определение уровня копийности гДНК и мтДНК в ОКС осуществляли с помощью метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). Реакцию проводили одновременно с двумя наборами праймеров на всем объеме (25 мкл) полученной культуральной среды. Подсчет копий мтДНК проводили по ранее описанной методике [4].

Оценка уровня гДНК проводилась в геномных единицах. Стандарты были приготовлены из лейкоцитов человека. Концентрация ДНК стандарта была установлена на флуориметре qubit 3.0. Для проведения ПЦР использовали амплификатор CFX96 («Bio Rad», USA). Температурный профиль реакции: 95 °С 5 мин; 40 циклов: 95 °С 10 с., 60 °С 30 с. Используемые праймеры представлены в табл. 1. Праймеры были подобраны с помощью программного обеспечения Lasergene-Software (DNASTAR, Madison, Wisconsin, USA) выбор происходил исходя из максимальной эффективности ПЦР, праймеры были проверены на отсутствие альтернативных продуктов при помощи веб-сервера BiSearch [6]. Полученные данные флуоресценции были пересчитаны в абсолютное количество копий с помощью программного обеспечения амплификатора CFX96 BioRad.

Таблица 1 / Table 1

Последовательности праймеров и зондов / Sequences of primers and probes

Ген / Gene	Последовательность / Sequence	Праймер / Зонд / Primer / Probe
CHR1	CACAGACTGCCTGGAATC	Праймер прямой / Forward primer
	TCCATCTGTCTGTGAAGTGA	Праймер обратный / Reverse primer
	(ROX)ATCTCTAGAAAACCTCTAGAAGAGCTTCA(BHQ2)	Зонд / Probe
MITN	CCACATCTACCATCACCTC	Праймер прямой / Forward primer
	TAGAATAAATAGGAGGCTAGGTT	Праймер обратный / Reverse primer
	(R6G)ATCACCGCCCCGACCTTAGCTCTCA(BHQ2)	Зонд / Probe

Статистическая обработка данных

Статистический анализ проводился в программе Jamovi. Для описания категориальных бинарных данных использовали абсолютные значения и процентные доли от общего числа в группе. Анализ качественных признаков проводили с помощью χ^2 Пирсона. Для сравнения бинарных данных мерой сравнения явилось ОШ с 95 % доверительным интервалом (95 % ДИ). Метод логистической регрессии использовался при расчете ОШ_{кор} для контроля конфаундеров. Непрерывные переменные были представлены в виде медианы и межквартильных значений (Me(Q1-Q3)). С целью определения статистической значимости различий непараметрических данных был выбран критерий Манна – Уитни. При проведении ROC-анализа рассчитывали порог отсечки, площадь под ROC-кривой (AUC), рассчитывали чувствительность (Se) и специфичность (Sp) модели. Величину порогового уровня значимости p принимал и равной 0,05.

Результаты и обсуждение

В исследование включено 211 образцов культуральной среды: 195 образцов, содержащих эмбрион, от 93 супружеских пар, и 16 образцов — в качестве контроля.

Клиническая характеристика пациенток, которым был выполнен перенос размороженного эмбриона

После ПРЭ беременность наступила у 22 пациенток, но у 4 из них произошел самопроизвольный выкидыш до 12 недель беременности, поэтому основную группу 1 составили 18 пациенток с продолжающейся >12 недель беременностью, группу сравнения 2–25 пациенток с не наступившей или прервавшейся беременностью. Характеристики групп пациенток представлены в табл. 2. Пациентки группы 1 отличались от пациенток группы 2 тем, что у них было меньше абортос и более длительный период бесплодия в анамнезе, а также в 3 раза чаще выявлялась миома матки. Также в группе 1 в 2,8 раз чаще производился перенос эмбриона отличного качества.

Таблица 2 / Table 2

Характеристики пациенток, которым был выполнен ПРЭ, в зависимости от наступления и пролонгирования беременности после ВРТ (n=43) / Characteristics of patients who underwent FET depending on the onset and prolongation of pregnancy after ART (n=43)

Параметр / Parameter	Группа 1 (беременность+) n=18 / Group 1 (pregnancy+) n=18	Группа 2 (беременность-) n=25 / Group 2 (pregnancy-) n=25	p
Возраст, антропометрические данные, вредные привычки / Age, anthropometric data, bad habits			
Возраст** / Age**	35 (31–37)	36 (34–41)	0,14
ИМТ** / BMI**	22 (20,3–23)	21 (20–24)	0,38
Менструальный цикл и репродуктивная функция / Menstrual cycle and reproductive function			
Число беременностей*** / Number of pregnancies***	0 (0–4)	0 (0–6)	0,12
Число родов*** / Number of births***	0 (0–2)	0 (0–3)	0,28
Число абортов*** / Number of abortions***	0 (0–0)	0 (0–3)	0,03
Анамнез гинекологических заболеваний / History of gynecologic diseases			
Заболевания шейки матки* / Cervical diseases*	4 (22,2 %)	9 (36 %)	0,33
Аденомиоз и/или НГЭ* / Adenomyosis and/or EGE*	6 (33,3 %)	8 (32 %)	0,93
Миома матки* / Uterine myoma*	7 (38,9 %)	3 (12 %)	0,04
Полип эндометрия* / Endometrial polyp*	6 (33,3 %)	10 (40 %)	0,65
СПКЯ* / PCOS*	1 (5,6 %)	0	0,23

Параметр / Parameter	Группа 1 (беременность+) n=18 / Group 1 (pregnancy+) n=18	Группа 2 (беременность-) n=25 / Group 2 (pregnancy-) n=25	p
Анамнез гинекологических оперативных вмешательств / History of gynecologic surgical procedures			
Тубэктомия* / Tubectomy*	2 (11,1 %)	4 (16 %)	0,65
Гистероскопия* / Hysteroscopy*	12 (66,7 %)	11 (44 %)	0,14
Оперативные вмешательства на яичниках* / Ovarian surgery*	5 (27,8 %)	2 (8 %)	0,08
Анамнез заболевания на момент цикла овариальной стимуляции / Medical history at the time of the ovarian stimulation cycle			
Первичное бесплодие* / Primary infertility*	10 (55,6 %)	10 (40 %)	0,31
Длительность бесплодия, лет** / Duration of infertility, years**	5 (3,5–8,7)	2 (1–5)	0,04
Уровень АМГ, нг/мл** / AMH level, ng/mL**	1,4 (0,8–3,2)	2,1 (1,5–3,6)	0,47
Характеристики протокола овариальной стимуляции / Characteristics of the ovarian stimulation protocol			
Номер попытки ЭКО** / IVF number**	3 (1–5)	2 (1–4)	0,36
Длительность стимуляции, дней** / Duration of ovarian stimulation, days**	10 (9–11)	10 (9–11)	0,90
Суммарная доза гонадотропинов, МЕ** / Total dose of gonadotropins, IU**	1800 (1500–2156)	1650 (1500–2400)	0,88
Характеристики эмбриологического этапа цикла овариальной стимуляции / Characteristics of the embryologic stage of the ovarian stimulation cycle			
Число зрелых ооцитов** / Number of mature oocytes**	6 (3–12)	6 (5–11)	0,71
Число зигот** / Number of zygotes**	5 (3–10)	6 (4–11)	0,48
Характеристики эмбрионов / Characteristics of embryos			
Экспансия бластоцисты на 5-е сутки* / Blastocyst expansion on the 5th day*	13 (72,2 %)	15 (60 %)	0,41
Перенос бластоцисты отличного качества* / Transfer of excellent quality blastocyst *	8 (44,4 %)	4 (16 %)	0,04

Примечание: abs (%), χ^2 -тест, ** Me (Q25-Q75), *** Me (min-max), тест Манна – Уитни, статистически значимые отличия группы 1 от группы 2 ($p \leq 0,05$); ИМТ – индекс массы тела, НГЭ – наружный генитальный эндометриоз, СПКЯ – синдром поликистозных яичников, АМГ – антимюллеров гормон.

Note: *abs (%), χ^2 test, ** Me (Q25-Q75), *** Me (min-max), Mann – Whitney test, significant differences between group 1 and group 2 ($p \leq 0,05$); BMI – body mass index, EGE – external genital endometriosis, PCOS – polycystic ovary syndrome, AMH – anti-müllerian hormone.

Сравнение клинических исходов, уровня копийности мтДНК в клетках трофэктодермы, гДНК и мтДНК в отработанной культуральной среде эмбрионов после переноса размороженного эмбриона.

На первом этапе выполнили анализ уровня ДНК в ОКС в сравнении с контрольными каплями (которые находились в тех же условиях культивирования, но не содержали эмбрион) (табл. 3).

Таблица 3 / Table 3

**Уровень копийности гДНК и мтДНК в ОКС в каплях, содержащих эмбрион, и контрольных каплях /
Copy number levels of gDNA and mtDNA in SCM in embryo-containing droplets and control droplets**

Параметр / Parameter	Эмбрионы n=195 / Embryos n=195	Контрольные капли n=16 / Control drops n=16	p
мтДНК в ОКС / mtDNA in SCM	134 (50,0–256)	32,2 (10,6–63,9)	<0,001
мтДНК/гДНК / mtDNA/gDNA	11,4 (6,47–26,1)	2,52 (1,36–7,92)	<0,001

Примечание: Me(Q25-Q75), тест Манна – Уитни, статистически значимые отличия между группами ($p \leq 0,05$); ОКС – отработанная культуральная среда, мтДНК – митохондриальная ДНК, гДНК – геномная ДНК

Note: Me(Q25-Q75), Mann – Whitney test, significant differences between groups ($p \leq 0.05$); SCM – spent culture medium, mtDNA – mitochondrial DNA, gDNA – genomic DNA

Уровень копийности мтДНК и мтДНК/гДНК в ОКС был статистически значимо выше, чем в контрольных каплях. Учитывая, что мтДНК и гДНК в ОКС была также детектирована в контрольных каплях, следует предположить возможность некоторой контаминации на эмбриологическом или лабораторном этапах. Возможные причины кон-

таминации и методы ее профилактики обсуждены в предыдущих исследованиях [4].

Далее уровень копийности мтДНК в клетках ТФЭ, гДНК и мтДНК в ОКС эмбрионов был проанализирован в зависимости от факта продолжающейся клинической беременности >12 недель — в группах 1 и 2 (табл. 4).

Таблица 4 / Table 4

**Уровень копийности гДНК, мтДНК, мтДНК/гДНК в ОКС, мтДНК в ТФЭ
в зависимости от продолжающейся >12 недель беременности после ПРЭ /
Copy number levels of gDNA, mtDNA, mtDNA/gDNA in SCM, and mtDNA in TE as a function of continued >12 weeks gestation after FET**

Параметр / Parameter	Группа 1 n=18 / Group 1 n=18	Группа 2 n=25 / Group 2 n=25	p
мтДНК в ТФЭ (о. е.) / mtDNA in TE (relative units)	0,002 (0,002–0,003)	0,002 (0,001–0,003)	0,43
гДНК в ОКС (число копий) / gDNA in SCM (copy number)	4,1 (3,5–6,6)	9,0 (6,3–17,8)	0,01
мтДНК в ОКС (число копий) / mtDNA in SCM (copy number)	49,3 (20,7–126)	264 (154–382)	0,007
мтДНК/гДНК в ОКС / mtDNA/gDNA in SCM	8,6 (5,4–27,5)	17,2 (9,9–55,4)	0,09

Примечание: Me(Q25-Q75), тест Манна – Уитни, статистически значимые отличия между группами ($p \leq 0,05$); ТФЭ – трофэктодерма, ОКС – отработанная культуральная среда, мтДНК – митохондриальная ДНК, гДНК – геномная ДНК

Note: Me(Q25-Q75), Mann – Whitney test, significant differences between groups ($p \leq 0.05$); TE – trophectoderm, SCM – spent culture medium, mtDNA – mitochondrial DNA, gDNA – genomic DNA

Уровень копийности мтДНК и гДНК в ОКС был статистически значимо ниже в группе 1 (продолжающаяся беременность >12 недель) по сравнению с группой 2. Отличий в уровне копийности мтДНК в ТФЭ выявлено не было.

Был проведен многофакторный анализ для оценки ОШ_{кор} продолжающейся беременности > 12 недель после переноса зуплоидного

эмбриона с учетом выявленных конфаундеров: число аборт в анамнезе, длительность бесплодия и частота миомы матки, качество переносимого эмбриона. Были созданы модели прогноза продолжающейся беременности, в которой статистической значимостью обладали следующие факторы: мтДНК и гДНК в ОКС и качество переносимого эмбриона.

Для каждой количественной величины (мтДНК в ОКС, гДНК в ОКС) был найден порог отсечки: для мтДНК в ОКС он составил 95 копий ($Se=66,7\%$, $Sp=80\%$, $AUC=73\%$, $p=0,008$), для гДНК в ОКС — 5 копий ($Se=58\%$, $Sp=85\%$, $AUC=71\%$, $p=0,01$). ОШ_{кор} наступления и пролонгирования беременности при уровне мтДНК в ОКС <95 копий с учетом указанных конфаундеров составил 3,2 (95 % ДИ=1,1–31,6).

Была получена следующая формула прогноза вероятности продолжающейся беременности после ПРЭ с включением количественных показателей (Se модели составила 67,0 %, Sp — 91 %, площадь под кривой (AUC) — 90,0 %) (формула (1), рис. 1).

$$P(\text{ПБ}) = \left(\frac{\text{Exp}[0,52-0,002* \text{mtDNA} -0,16* \text{gDNA} +2,0* \text{Кач}]}{1+ \text{Exp}[0,52-0,002* \text{mtDNA} -0,16* \text{gDNA} +2,0* \text{Кач}]} \right) * 100 \% \quad (1)$$

где $P(\text{ПБ})$ — вероятность продолжающейся беременности после ПРЭ; Exp — экспонента; mtDNA — копийность мтДНК в ОКС; gDNA — копийность гДНК в ОКС; Кач — перенос бластоцисты отличного качества

$$P(\text{ПБ}) = \left(\frac{\text{Exp}[0,52-0,002* \text{mtDNA} -0,16* \text{gDNA} +2,0* \text{quality}]}{1+ \text{Exp}[0,52-0,002* \text{mtDNA} -0,16* \text{gDNA} +2,0* \text{quality}]} \right) * 100 \% \quad (1)$$

where $P(\text{ПБ})$ is the probability of continued pregnancy after FET; Exp — exponent; mtDNA — mtDNA copy number in SCM; gDNA — gDNA copy number in SCM; quality — transfer of excellent quality blastocyst

Кроме того, была получена следующая формула прогноза вероятности продолжающейся беременности после ПРЭ с включением бинарных показателей (Se модели составила 75,0 %, Sp — 70 %, площадь под кривой (AUC) — 83,8 %) (формула (2)).

$$P(\text{ПБ}) = \left(\frac{\text{Exp}[-1,14+1,5* \text{mtDNA} < 95 + 2,4* \text{gDNA} < 5 + 1,2* \text{Кач}]}{1+ \text{Exp}[-1,14+1,5* \text{mtDNA} < 95 + 2,4* \text{gDNA} < 5 + 1,2* \text{Кач}]} \right) * 100 \% \quad (2)$$

где $P(\text{ПБ})$ — вероятность продолжающейся беременности после ПРЭ; Exp — экспонента; mtDNA — копийность мтДНК в ОКС; gDNA — копийность гДНК в ОКС; Кач — перенос бластоцисты отличного качества

$$P(\text{ПБ}) = \left(\frac{\text{Exp}[-1,14+1,5* \text{mtDNA} < 95 + 2,4* \text{gDNA} < 5 + 1,2* \text{quality}]}{1+ \text{Exp}[-1,14+1,5* \text{mtDNA} < 95 + 2,4* \text{gDNA} < 5 + 1,2* \text{quality}]} \right) * 100 \% \quad (2)$$

where $P(\text{ПБ})$ is the probability of continued pregnancy after FET; Exp — exponent; mtDNA — mtDNA copy number in SCM; gDNA — gDNA copy number in SCM; quality — transfer of excellent quality blastocyst

ROC кривая / ROC curve

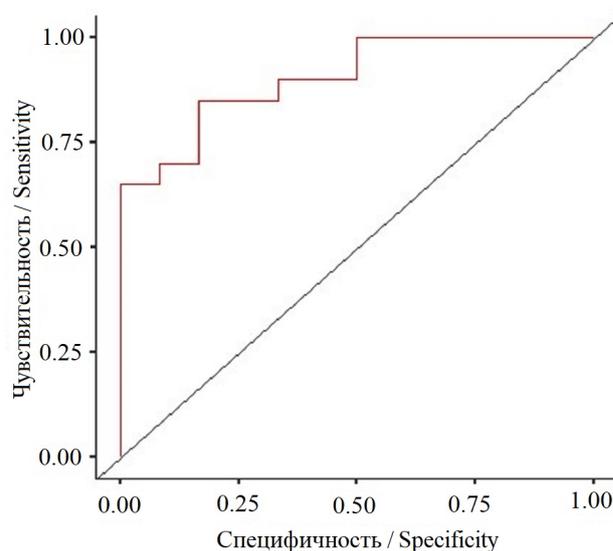


Рис. 1. ROC-кривая для модели оценки вероятности продолжающейся беременности (>12 недель) после переноса эуплоидного эмбриона в зависимости от уровня копийности мтДНК и гДНК в ОКС

Fig. 1. ROC curve for a model to estimate the probability of ongoing pregnancy (>12 weeks) after euploid embryo transfer as a function of mtDNA and gDNA copy number levels in SCM

Дополнительно был проанализирован уровень копийности мтДНК в клетках ТФЭ, гДНК и мтДНК в ОКС эмбрионов в зависимости от пloidности бластоцист — в группах 1.1. и 2.1. (табл. 5). Не было выявлено каких-либо отличий в сравниваемых группах.

В представленной работе изучалась зависимость между характеристиками пациенток, хромосомным статусом эмбрионов и уровнем гДНК и мтДНК в ОКС, а также уровнем мтДНК в ТФЭ. В качестве контроля использовался уровень мтДНК в образцах культуральной среды, не содержащей эмбрионы и находившейся в тех же условиях.

Таблица 5 / Table 5

Уровень копийности гДНК и мтДНК в ОКС, мтДНК в ТФЭ в зависимости от плоидности бластоцист по результатам ПГТ-А /
Copy number levels of gDNA and mtDNA in SCM, mtDNA in TE depending on the ploidy of blastocysts according to PGT-A results

Параметр / Parameter	Группа 1.1. (эуплоидные эмбрионы) n=98 / Group 1.1 (euploid embryos) n=98	Группа 1.2 (анеуплоидные эмбрионы) n=97 / Group 1.2 (aneuploid embryos) n=97	p
мтДНК в ТФЭ (о.е.) / mtDNA in TE (relative units)	0,002 (0,002–0,003)	0,002 (0,001–0,003)	0,87
гДНК в ОКС (число копий) / gDNA in SCM (copy number)	8,3 (5,2–16,6)	10,0 (4,8–18,4)	0,99
мтДНК в ОКС (число копий) / mtDNA in SCM (copy number)	148 (53,5–259)	113 (42,0–253)	0,62
мтДНК/гДНК в ОКС / mtDNA/gDNA in SCM	11,6 (6,6–28,3)	11,3 (6,0–21,3)	0,59

Примечание: Me(Q25-Q75), тест Манна – Уитни, статистически значимые отличия между группами ($p \leq 0,05$); ТФЭ – трофэктодерма, ОКС – отработанная культуральная среда, мтДНК – митохондриальная ДНК, гДНК – геномная ДНК

Note: Me(Q25-Q75), Mann – Whitney test, significant differences between groups ($p \leq 0.05$); TE – trophectoderm, SCM – spent culture medium, mtDNA – mitochondrial DNA, gDNA – genomic DNA

В представленной работе изучалась зависимость между характеристиками пациенток, хромосомным статусом эмбрионов и уровнем гДНК и мтДНК в ОКС, а также уровнем мтДНК в ТФЭ. В качестве контроля использовался уровень мтДНК в образцах культуральной среды, не содержащей эмбрионы и находившейся в тех же условиях.

Согласно полученным результатам уровень копийности мтДНК и гДНК в ОКС был статистически значимо ниже в группе с продолжающейся беременностью > 12 недель по сравнению с группой без наступления беременности или ее прерыванием в первом триместре. При уровне мтДНК в ОКС < 95 копий шансы наступления и сохранения беременности повышались в 3,2 раза.

Некоторые исследователи также изучали вопрос возможной предикции исхода переноса эмбриона в зависимости от уровня мтДНК в ОКС и/или уровня мтДНК в ТФЭ. По одним данным, повышенный уровень мтДНК в ОКС эмбрионов ассоциирован с успешным исходом переноса и наступившей беременностью [7, 8]. По другим данным, связь между уровнем мтДНК в ОКС и частотой клинической беременности не была найдена [4, 9].

Кроме того, согласно результатам работы, отличий в уровне копийности мтДНК в ТФЭ выявлено не было. Полученные нами данные согласуются с рядом научных работ, представивших аналогич-

ные выводы [5, 10–12]. Однако, согласно данным литературы, другие ученые показали повышенный потенциал к имплантации и успешной беременности для эмбрионов со сниженным уровнем мтДНК в клетках ТФЭ [3, 13–16].

В приведенной работе дополнительно изучалась зависимость между уровнем мтДНК и гДНК в ОКС, а также мтДНК в ТФЭ с учетом наличия анеуплоидий у эмбрионов. Значимых отличий нами не обнаружено, что согласуется с результатами других исследователей, получивших аналогичные данные [9, 11, 17]. В литературе также обсуждается взаимосвязь между уровнем мтДНК в ТФЭ и хромосомным статусом эмбрионов. Так, одни авторы показали повышение уровня мтДНК в ТФЭ анеуплоидных эмбрионов, в сравнении с эуплоидными [18]. В то же время, другие ученые статистически значимой разницы не обнаружили [11].

Массив работ, представленных к настоящему времени в мировой литературе, представляет разношерстные, часто противоположные данные о зависимости уровня гДНК и мтДНК в ОКС и качестве эмбрионов. Большинство работ включают небольшие выборки пациентов и не оценивают их репродуктивные исходы.

Кроме того, подобная широкая вариабельность результатов может быть связана с особенностями работы митохондрий в разные фазы деления эмбрионов. Так, с самого начала развития эмбриона функция

указанных органелл зависит именно от митохондрий, привнесенных ооцитом [3, 19–21]. Далее, следует отметить, что согласно теории «горлышка от бутылки» («mtDNA bottleneck theory»), в первые дни развития эмбриона общее количество митохондрий зиготы разделяется между клетками эмбриона при делении, а собственная репликация митохондриальной ДНК активируется к 3 суткам развития и значительно усиливается к 5 суткам [8, 19–21].

Теория «тихого эмбриона» представляет меньшее количество мтДНК в клетках ТФЭ бластоцист различного и хорошего качества, находящихся в оптимальных условиях, не требующих повышения интенсивности энергетического метаболизма для борьбы со «стрессом» [3, 5, 19]. Однако каким именно образом происходит распределение мтДНК в клетках эмбриона (для внутренней клеточной массы и ТФЭ) и выделение внеклеточной ДНК в ОКС, остается неизвестным. Исследований, одновременно оценивающих соотношение уровня гДНК и мтДНК в клетках эмбриона и ОКС в зависимости от его качества или потенциала к имплантации, в настоящее время в литературе не представлено. В то же время, согласно полученным в настоящей работе результатам, повышенный уровень мтДНК в клетках ТФЭ и сниженный уровень мтДНК в ОКС отмечался у эмбрионов с более высоким потенциалом к имплантации и продолжающейся беременности. Представленные данные не противоречат описанным выше теориям и согласуются с представлениями о том, что сбалансированное достаточное функционирование митохондрий в клетках эмбриона сопряжено с повышенным содержанием мтДНК в ТФЭ и, соответственно, со сниженным количеством мтДНК в ОКС. И, наоборот, для эмбрионов со сниженным потенциалом к продолжающейся беременности, нарушенная функция митохондрий в клетках и «энергетический стресс» приводят к снижению мтДНК в ТФЭ и, возможно, повреждению клеток и выходу мтДНК в ОКС, повышая ее концентрацию.

Выводы

Несмотря на то, что ВРТ интенсивно развиваются и появляются новые эмбриологические методики с целью повышения эффективности лечения беспло-

дия, не менее половины циклов ЭКО заканчиваются неудачным исходом. В ходе настоящей работы было показано, что уровень копийности гДНК и мтДНК в ОКС является значимым прогностическим фактором наступления и пролонгирования беременности. Так, более низкие показатели уровня мтДНК в ОКС связаны с повышением вероятности наступления и пролонгирования беременности > 12 недель. По результатам проведенного исследования предложена формула расчета вероятности успешного исхода переноса эмбриона по уровню внеклеточной ДНК в ОКС, позволяющая производить отбор лучших эмбрионов для переноса в полость матки для увеличения эффективности лечения бесплодия методами ВРТ и снижения репродуктивных потерь.

References/Библиографический список

1. Kravtsova EI, Kolesnikova NV, Lukoshkina IN, Uryupina KV, Avakimyan VA. Immunological and immunohistochemical features of endometrial implantation factor in healthy patients of late reproductive age. RUDN Journal of Medicine. 2023;27(1):46–56. (In Russian). [Кравцова Е.И., Колесникова Н.В., Лукошкина И.Н., Урюпина К.В., Авакимян В.А. Иммунологические и иммуногистохимические особенности имплантационного фактора эндометрия у здоровых пациенток позднего репродуктивного возраста // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2023. Т. 27. № 1. С. 46–56.] doi: 10.22363/2313-0245-2023-27-1-46-56
2. Semyatov SM, Leffad LM. Prediction of infertility in patients with uterine leiomyoma. RUDN Journal of Medicine. 2022;26(4):396–403. doi: 10.22363/2313-0245-2022-26-4-396-403
3. Lledo B, Ortiz JA, Morales R, García-Hernández E, Ten J, Bernabeu A, Llácer J, Bernabeu R. Comprehensive mitochondrial DNA analysis and IVF outcome. Hum Reprod Open. 2018;4: hoy023. doi:10.1093/hropen/hoy023
4. Makarova NP, Lisitsyna OI, Nepsha OS, Krasnyi AM, Sadekova AA, Nezlina AL, Dolgushina NV, Zingerenko BV, Kalinina EA. Mitochondrial DNA expression profile in embryo culture medium in assisted reproductive technology. Obstetrics and Gynecology. 2022;3:89–96. (In Russian). [Макарова Н.П., Лисицына О.И., Непша О.С., Красный А.М., Садекова А.А., Незлина А.Л., и др. Особенности профиля экспрессии митохондриальной ДНК в среде культивирования эмбрионов в программах вспомогательных репродуктивных технологий // Акушерство и гинекология. 2022. № 3. С. 89–96.] doi:10.18565/aig.2022.3.89-96
5. Nepsha OS, Kulakova EV, Ekimov AN, Drapkina YuS, Makarova NP, Kraevaya EE, Kalinina EA. Value of embryonic mitochondrial DNA in predicting the effectiveness of assisted reproductive technologies. Obstetrics and Gynecology. 2021;11:125–

134. (In Russian). [Непша О.С., Кулакова Е.В., Екимов А.Н., Дранкина Ю.С., Макарова Н.П., Краевая Е.Е., и др. Использование митохондриальной ДНК эмбрионов в качестве предиктора эффективности программ вспомогательных репродуктивных технологий // Акушерство и гинекология. 2021. № 11. С. 125–34]. doi:10.18565/aig.2021.11.125-134
6. Arányi T, Váradi A, Simon I, Tusnády GE. The BiSearch web server. *BMC Bioinformatics*. 2006;7:431. doi: 10.1186/1471-2105-7-431
7. 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. doi:10.1093/MOLEHR/GAU086
8. Sayed GA, Al-Sawaf HA, Al-Sawaf AH, Saeid M, Maged A, Ibrahim IH. Mitochondrial DNA in Fresh versus Frozen Embryo Culture Media of Polycystic Ovarian Syndrome Patients Undergoing In Vitro Fertilization: A Possible Predictive Marker of a Successful Pregnancy. *Pharmgenomics Pers Med*. 2021;14:27–38. doi:10.2147/PGPM.S284064
9. Zhang X, Sun Y, Dong X, Zhou J, Sun F, Han T. Mitochondrial DNA and genomic DNA ratio in embryo culture medium is not a reliable predictor for in vitro fertilization outcome. *Sci Rep*. 2019;9:5378. doi:10.1038/S41598-019-41801-1
10. Treff NR, Zhan Y, Tao X, Olcha M, Han M, Rajchel J, Morrison L, Morin SJ, Scott RT Jr. Levels of trophectoderm mitochondrial DNA do not predict the reproductive potential of sibling embryos. *Hum Reprod*. 2017;32(4):954–62. doi:10.1093/humrep/dex034
11. Victor AR, Brake AJ, Tyndall JC, Griffin DK, Zouves CG, Barnes FL, Viotti M. Accurate quantitation of mitochondrial DNA reveals uniform levels in human blastocysts irrespective of ploidy, age, or implantation potential. *Fertil Steril*. 2017;107(1):34–42.e3. doi:10.1016/j.fertnstert.2016.09.028
12. Klimczak AM, Pacheco LE, Lewis KE, Massahi N, Richards JP, Kearns WG, Saad AF, Crochet JR. Embryonal mitochondrial DNA: relationship to embryo quality and transfer outcomes. *J. Assist. Reprod. Genet*. 2018;35(5):871–7. doi:10.1007/s10815-018-1147-z
13. Fragouli E, Spath K, Alfarawati S, Kaper F, Craig A, Michel CE, Kokocinski F, Cohen J, Munne S, Wells D. Altered levels of mitochondrial DNA are associated with female age, aneuploidy, and provide an independent measure of embryonic implantation potential. *PLoS Genet*. 2015;11(6): e1005241. doi:10.1371/journal.pgen.1005241
14. Fragouli E, McCaffrey C, Ravichandran K, Spath K, Grifo JA, Munné S, Wells D. Clinical implications of mitochondrial DNA quantification on pregnancy outcomes: a blinded prospective non-selection study. *Hum Reprod*. 2017;32(11):2340–7. doi:10.1093/humrep/dez014
15. Diez-Juan A, Rubio C, Marin C, Martinez S, Al-Asmar N, Riboldi M, Díaz-Gimeno P, Valbuena D, Simón C. Mitochondrial DNA content as a viability score in human euploid embryos: less is better. *Fertil. Steril*. 2015;104(3):534–41.e1. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.05.022
16. Korolkova AI, Mishieva NG, Martazanova BA, Bourmenskaya OV, Ekimov AN, Trofimov Dyu, 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). [Королькова А.И., Мишиева Н.Г., Мартазанова Б.А., Бурменская О.В., Екимов А.Н., Трофимов Д.Ю., и др. Повышение эффективности программ ЭКО на основании определения копийности митохондриальной ДНК в трофэктодерме эмбрионов // Акушерство и гинекология. 2019. № 3. С. 98–104.]. doi:10.18565/aig.2019.3.98-104
17. 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. doi:10.1007/S10815-019-01603-W
18. Lee YX, Chen CH, Lin SY, Lin YH, Tzeng CR. Adjusted mitochondrial DNA quantification in human embryos may not be applicable as a biomarker of implantation potential. *J Assist Reprod Genet*. 2019;36(9):1855–65. doi:10.1007/s10815-019-01542-6
19. Lisitsyna OI, Dolgushina NV, Makarova NP, Burmenskaya OV. Mitochondrial DNA as a quality marker of gametes and embryos in assisted reproductive technologies programs. *Obstetrics and Gynecology*. 2023;(7):20–26. (In Russian). [Лисицына О.И., Долгушина Н.В., Макарова Н.П., Бурменская О.В. Митохондриальная ДНК как маркер качества гамет и эмбрионов в программах вспомогательных репродуктивных технологий // Акушерство и гинекология. 2023. № 7. С. 20–6.]. doi:10.18565/aig.2023.94
20. Durairajanayagam D, Singh D, Agarwal A, Henkel R. Causes and consequences of sperm mitochondrial dysfunction. *Andrologia*. 2021;53(1): e13666. doi:10.1111/and.13666
21. Desquiret-Dumas V, Clément A, Seegers V, Boucret L, Ferré L'Hotellier V, Bouet PE, Descamps P, Procaccio V, Reynier P, May-Panloup P. The mitochondrial DNA content of cumulus granulosa cells is linked to embryo quality. *Hum Reprod*. 2017;32(3):607–14. doi:10.1093/humrep/dew341.

Ответственный за переписку: Лисицына Ольга Игоревна — аспирант, Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Российская Федерация, 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4. E-mail: o_yazykova@inbox.ru
Лисицына О.И. SPIN 5211-4258; ORCID: 0000-0002-7775-3508
Макарова Н.П. SPIN 8498-4890; ORCID: 0000-0003-1396-7272

Красный А.М. SPIN 3949-3450; ORCID: 0000-0001-7883-2702

Екимов А.Н. SPIN 7491-7303; ORCID: 0000-0001-5029-0462

Романов А.Ю. SPIN 6068-4561; ORCID: 0000-0003-1821-8684

Долгушина Н.В. SPIN 1725-9876; ORCID: 0000-0003-1116-138X

Corresponding author: Lisitsyna Olga Igorevna — postgraduate student, Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology Ministry of Healthcare of Russian Federation, 117997, Oparina St., 4, Moscow, Russian Federation. E-mail: o_yazykova@inbox.ru.

Lisitsyna O.I. ORCID: 0000-0002-7775-3508

Makarova N.P. ORCID: 0000-0003-1396-7272

Krasnyi A.M. ORCID: 0000-0001-7883-2702

Ekimov A.N. ORCID: 0000-0001-5029-0462

Romanov A. Yu. ORCID: 0000-0003-1821-8684

Dolgushina N.V. ORCID: 0000-0003-1116-138X