

*На правах рукописи*

КОРОЛЬКОВА

Анна Игоревна

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОГРАММ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ  
РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ У ПАЦИЕНТОК ПОЗДНЕГО  
РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА НА ОСНОВАНИИ ОЦЕНКИ  
МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА И ПРЕИМПЛАНТАЦИОННОГО  
ГЕНЕТИЧЕСКОГО СКРИНИНГА ЭМБРИОНОВ

14.01.01 – Акушерство и гинекология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2019

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук

Мишиева Нона Годовна

доктор биологических наук,  
профессор РАН

Трофимов Дмитрий Юрьевич

Официальные оппоненты:

Калугина Алла Станиславовна – доктор медицинских наук, профессор ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России, кафедра акушерства, гинекологии и неонатологии.

Серебренникова Клара Георгиевна – доктор медицинских наук, профессор, научный руководитель по акушерству и гинекологии ФГБУЗ «Центральная клиническая больница РАН».

Ведущая организация: ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России.

Защита диссертации состоится «28» января 2020 г. в 13:00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.125.01 на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» по адресу: 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д.4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации <https://science.ncagp.ru/upfiles/pdf/Korolkova%20A.I.%20dissert.pdf>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 201\_\_ г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор медицинских наук, профессор

Калинина Елена Анатольевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Реализация репродуктивной функции у пациенток позднего репродуктивного возраста - один из наиболее сложных и нерешенных вопросов в области репродуктивных технологий. В последние годы доля пациенток позднего репродуктивного возраста имеет тенденцию к увеличению в связи с отложенным деторождением, учитывая инверсию социального положения женщин в 21 веке. Однако реализация репродуктивной функции с возрастом имеет ряд сложностей. Частота наступления беременности в программах ЭКО у пациенток 35-39 лет по разным данным составляет 25-30%, прогрессивно снижаясь к 40 и более годам до 5% [В. Meczekalski, 2016; N. Gleicher, 2016; D. Seifer, 2015]. Среди причин низких показателей частоты наступления беременности в данной когорте пациенток выделяют: снижение овариального резерва у женщин старше 35 лет, увеличение скорости атрезии фолликулов после 40 лет вдвое, отягощенный гинекологический анамнез [В. Meczekalski, 2016; Н.Г. Мишиева, 2008]. Однако одной из основных причин снижения эффективности программ ВРТ в данной группе пациенток является высокая частота анеуплоидий эмбрионов [К. Lukaszuk, 2016; Р. Brezina, 2016; Е. Fragouli, 2015]. Существующие методы селекции эмбрионов основаны на детальной морфологической, а также генетической оценке эмбрионов при помощи преимплантационного генетического скрининга (ПГС, или преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии (ПГТ-А)-синонимичный термин, введенный в 2017г). Однако, даже при переносе эуплоидной бластоцисты, эффективность программ ВРТ, по разным данным, составляет около 50% на цикл переноса размороженных эмбрионов [F. Fiorentino, 2014; Е. Fragouli, 2017]. Соответственно, необходимы дополнительные методы идентификации эмбрионов с высоким имплантационным потенциалом. В этой связи большое значение в последние годы придается митохондриальному потенциалу гамет и эмбрионов.

Митохондрии участвуют в регуляции многих важных процессов, таких как апоптоз, синтез аминокислот, гомеостаз кальция и генерация энергии в виде АТФ путем процесса окислительного фосфорилирования. Митохондриальная ДНК (мтДНК) играет прямую роль в клеточном метаболизме. Ранние эмбрионы человека характеризуются отсутствием репликации мтДНК. Их энергетический потенциал определяется исключительно функциональной компетентностью митохондрий ооцитов. Возобновление транскрипции мтДНК у эмбриона человека начинается одновременно с активацией собственного генома, что соответствует 72 часам после оплодотворения. Полноценная репликация мтДНК начинается в период преимплантационного развития на стадии бластоцисты, когда эмбрионы требуют адекватных уровней энергии для успешного деления. Существующие данные свидетельствуют о том, что правильная функция митохондрий ооцитов имеет определяющее значение на ранних этапах эмбриогенеза [E. Fragouli, 2015, 2017; M. Ogino, 2016].

Таким образом, нарушение процессов накопления энергии в клетке, вследствие дезорганизации работы митохондрий, может быть одним из возможных патогенетических механизмов сниженного потенциала развития эмбрионов. Изучение копийности мтДНК в кумулюсных клетках (КК) и клетках трофэктодермы (ТЭ) позволит оценить качество ооцитов и эмбрионов, и оптимизировать исходы программ ВРТ в различных группах пациентов, в том числе в группе пациенток позднего репродуктивного возраста.

#### Степень разработанности темы исследования

С возрастом снижается качество и количество ооцитов, увеличивается доля анеуплоидных эмбрионов, в связи с чем выдвигается большое количество теорий о возрастных изменениях митохондриального биогенеза [B. Meczekalski, 2016; Н.Г. Мишиева, 2008]. Кроме того, даже перенос эуплоидной бластоцисты в полость матки не гарантирует наступление беременности, предполагается, что причиной сниженного имплантационного потенциала бластоцист также является дезорганизация работы митохондрий и мтДНК [E. Fragouli, 2015, 2017; M. Ogino, 2016]. Однако в мировой литературе нет однозначных данных о связи

уровней мтДНК в клетках кумулюса и трофэктодермы с возрастным изменением качества, количества ооцитов, преимплантационным развитием эмбрионов.

В связи с вышеизложенным, целью исследования является повышение эффективности лечения бесплодия у пациенток позднего репродуктивного возраста в программах вспомогательных репродуктивных технологий путем переноса эуплоидных эмбрионов с учетом митохондриального потенциала.

#### Задачи исследования:

1. Изучить клинико-лабораторные и эмбриологические факторы эффективности программ ВРТ у пациенток позднего репродуктивного возраста.
2. Оценить связь копийности митохондриальной ДНК (мтДНК) в кумулюсных клетках у пациенток, вошедших в исследование, с возрастом и овариальным резервом, качеством полученных ооцитов, морфологической оценкой и плоидностью эмбрионов.
3. Выявить связь уровня мтДНК в трофэктодерме эмбрионов с возрастом, овариальным резервом пациенток, а также исследовать копийность мтДНК в трофэктодерме в зависимости от плоидности и качества эмбрионов у пациенток позднего репродуктивного возраста.
4. Изучить выявленные корреляционные связи (из задач № 2 и № 3) для определения порогового возраста изменения митохондриального биогенеза.
5. Провести анализ эффективности программ ВРТ у пациенток позднего репродуктивного возраста при переносе эуплоидных эмбрионов с нормальным митохондриальным потенциалом.
6. На основании полученных данных разработать алгоритм ведения пациенток позднего репродуктивного возраста в программах ВРТ с ПГС методом сравнительной геномной гибридизации и применением оценки митохондриального потенциала эмбрионов.

#### Научная новизна

В настоящей работе представлены клинико-анамнестические и лабораторные данные пациенток позднего репродуктивного возраста, при

исследовании которых были определены факторы риска неудач программ вспомогательных репродуктивных технологий данной когорты пациенток. На основании результатов преимплантационного генетического тестирования эмбрионов, был определен пороговый возраст пациенток, при превышении которого значительно снижалась доля эуплоидных эмбрионов и, соответственно, частота наступления беременности и живорождения. Также, изучен митохондриальный потенциал ооцитов и эмбрионов путем определения уровня мтДНК в кумулюсных клетках и клетках трофэктодермы. В ходе исследования были получены новые данные, свидетельствующие о связи копийности мтДНК в клетках кумулюса и трофэктодермы бластоцист с возрастом и овариальным резервом пациенток, а также уровня мтДНК в трофэктодерме с плоидностью и имплантационным потенциалом эмбрионов.

Полученные результаты позволили определить эффективность использования полногеномного генетического скрининга методом сравнительной геномной гибридизации на микрочипах в сочетании с определением уровня мтДНК в клетках трофэктодермы для повышения частоты наступления беременности в программах ВРТ у женщин позднего репродуктивного возраста.

#### Практическая значимость

На основании полученных данных выявлены факторы риска снижения эффективности программ ЭКО с преимплантационным генетическим тестированием на анеуплоидии, а также разработан и внедрен в клиническую практику алгоритм ведения пациенток позднего репродуктивного возраста в программах ВРТ на основании переноса эуплоидных эмбрионов в зависимости от уровня мтДНК в трофэктодерме бластоцист для повышения эффективности лечения бесплодия в данной когорте пациенток (Рисунок 5).

#### Методология и методы исследования

Проведено ретроспективное и проспективное обследование супружеских пар в программах ВРТ с ПГС и определением уровня мтДНК в кумулюсных клетках и клетках трофэктодермы. Пациенты были обследованы в соответствии

с приказом Минздрава России №107н от 30.08.2012 г. ПГС проводили методом микроматричной CGH (aCGH) на 5-е сутки культивирования эмбрионов. Относительная количественная оценка копийности мтДНК в клетках кумулюса и трофэктодерме бластоцист проводилась с использованием полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

#### Положения, выносимые на защиту

1. Среди когорты пациенток старше 35 лет, возраст 39 лет является пороговым, выше которого происходит значимое снижение эффективности программ ЭКО, в том числе с проведением преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии, что выражается в увеличении доли анеуплоидных эмбрионов в 2,3 раза, снижении частоты наступления беременности в 3,3 раза, и частоты живорождения в 4,8 раза по сравнению с пациентками до 39 лет.
2. Снижение копийности мтДНК в кумулюсных клетках ассоциировано с пороговым возрастом старше 39 лет и уровнем АМГ менее 1 нг/мл, что свидетельствует о снижении овариального резерва. Низкая копийность мтДНК и митохондриальный потенциал кумулюсных клеток не является определяющим фактором в развитии анеуплоидий.
3. Определение копийности мтДНК в трофэктодерме бластоцисты в совокупности с проведением преимплантационного генетического тестирования на анеуплоидии, является надежным методом селекции эмбрионов с высоким имплантационным потенциалом, позволяющим увеличить эффективность лечения бесплодия в программах ЭКО. Пороговое значение копийности мтДНК в ТЭ, превышение которого, позволяет прогнозировать неудачу имплантации является 0,004 о.е. Пациентки старше 39 лет имели в 4,1 раза большее число эуплоидных бластоцист с надпороговым уровнем мтДНК в трофэктодерме, т.е. эмбрионов с низким имплантационным потенциалом, по сравнению с пациентками в возрасте до 39 лет.

#### Личный вклад автора

Автор непосредственно участвовала в выборе темы диссертационной работы, поиске и мониторинге данных литературы по теме диссертации,

определении целей и задач исследования, разработке индивидуальной анкеты для сбора анамнеза и добровольного информированного согласия на проведение исследования, изучении анамнеза, результатов клинко-лабораторного обследования пациенток. Автор лично принимала участие в ведении пациенток, включенных в исследование, на всех этапах программ ЭКО с ПГТ-А и программ переноса размороженных эмбрионов. Автор лично участвовал в сборе материала, получении, анализе и интерпретации экспериментальных данных, их обобщении и статистической обработке, также автор осуществляла подготовку публикаций по выполненной работе.

#### Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.01.01 – акушерство и гинекология. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 4 и 5 паспорта акушерства и гинекологии.

#### Степень достоверности полученных результатов

Достоверность результатов исследования подтверждается репрезентативной выборкой (161 пациентка позднего репродуктивного возраста), использованием современных методов исследования, которые соответствуют поставленной цели и задачам. Выводы и практические рекомендации закономерно вытекают из результатов исследования и подтверждают положения, выносимые на защиту. Подготовка, статистический анализ и интерпретация полученных результатов проведены с использованием современных методов обработки информации и статистического анализа.

#### Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены и используются в практической работе 1-го гинекологического отделения ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России.

По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, из которых 4 входят в перечень рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК.



### Апробация работы

Работа обсуждена на межклинической конференции сотрудников 1 гинекологического отделения (20.06.2019г.) и заседании апробационной комиссии ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России (02.09.2019г., протокол № 9).

### Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены в практическую работу 1-го гинекологического отделения и лаборатории молекулярно-генетических методов ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России.

По теме диссертации опубликовано 8 научных трудов, из которых 4 статьи – в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК.

### Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 114 страницах, состоит из введения, 5 глав, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений, списка литературы и приложения. Работа содержит 11 рисунков, 29 таблиц. Список литературы включает 92 работы, в том числе 17 отечественных и 75 работ зарубежных авторов.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материал и методы исследования

В исследование была включена 161 пациентка, обратившаяся для лечения бесплодия в программе ЭКО/ИКСИ с ПГТ-А, в период с ноября 2016 по март 2018. Все пациентки, включенные в исследование, были предварительно обследованы в соответствии с приказом Минздрава России №107н.

На первом этапе исследования были изучены клинико-лабораторные и эмбриологические данные 161 пациентки позднего репродуктивного возраста. На основании результатов ПГТ-А, сравнив доли полученных в ходе исследования эуплоидных и анеуплоидных эмбрионов и, проведя ROC-анализ, был определен пороговый возраст, при превышении которого увеличивалась доля анеуплоидных эмбрионов. В связи с чем все пациентки были разделены на

2 группы в зависимости от найденного порогового возраста: группа А- пациентки в возрасте <39 лет; группа Б- пациентки в возрасте ≥39 лет.

На следующем этапе настоящего исследования было отобрано 67 пациенток позднего репродуктивного возраста, для исследования уровня мтДНК в кумулюсных клетках (n=454). На третьем этапе работы исследовался уровень мтДНК в трофэктодерме 473 бластоцист в когортах изучаемых групп (324 эмбриона пациенток в возрасте <39 лет-группа А; 149 эмбрионов пациенток в возрасте ≥39 лет- группа Б).

Всем пациенткам стимуляцию функции яичников проводили в стандартных протоколах с антагонистами ГнРГ. В качестве триггера использовались либо человеческий хорионический гонадотропин (ЧХГ) в дозе 10000 МЕ, либо агонист ГнРГ (аГнРГ) в дозе 0,2 мг. Трансвагинальная пункция яичников производилась в асептических условиях под УЗ-контролем, в условиях кратковременной внутривенной анестезией в малой операционной 1 гинекологического отделения.

После определения общего числа ооцит-кумулюсных комплексов, кумулюсные клетки (КК) отделялись при помощи тонких игл, помещались в пробирку типа эппендорф и замораживались при -80°C для последующего анализа копийности мтДНК. Все ооциты оплодотворялись посредством ИКСИ для исключения контаминации биоптатов генетическим материалом сперматозоидов, остающихся на zona pellucida при оплодотворении путем инсеминации спермы. Морфологическую оценку эмбрионов осуществляли согласно принятым критериям (классификация D.K. Gardner, 1999). Биопсия трофэктодермы эмбрионов осуществлялась на 5-6-й сутки развития. ПГТ-А проводилось методом сравнительной геномной гибридизации на чипе (aCGH), согласно инструкции. Полученные ампликоны разводились в соотношении 1:50 и передавались для измерения копийности мтДНК в трофэктодерме.

Относительная количественная оценка копийности мтДНК в КК и ТЭ бластоцист проводилась с использованием полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). В реакции использованы специально

разработанные олигонуклеотиды и TaqMan-пробы для амплификации и количественного определения специфических фрагментов мтДНК (ген МТ-ND2, ген МТ-ND4). Нормировка осуществлялась на геномную ДНК (ген LTC4S). Пороговые значения мтДНК устанавливались с использованием ROC-анализа при сравнении образцов трофэктодермы имплантировавшихся и неимплантировавшихся эмбрионов. Всем пациенткам осуществлялся перенос 1 размороженного зуплоидного эмбриона. Ведение посттрансферного периода и диагностику беременности проводили по стандартизированной методике.

Исследование было одобрено комиссией по этике биомедицинских исследований Центра.

Статистическая обработка данных выполнена с помощью электронных таблиц «Microsoft Excel» и программы «IBM SPSS Statistics 22.0» (США). Статистически значимыми считали отличия при  $p \leq 0,05$ .

#### Результаты собственных исследований и их обсуждение

При анализе клинико-anamнестических и эмбриологических исходов всех пациенток, включенных в исследование, было выявлено, что средний возраст составил  $37,9 \pm 2,8$  лет, средний уровень АМГ  $2,0 \pm 0,5$  нг/мл, среднее количество зрелых ооцитов составило  $6,9 \pm 1,8$ , число бластоцист хорошего/отличного качества  $3,0 \pm 0,8$ .

По результатам преимплантационного генетического тестирования эмбрионов на анеуплоидии в когорте пациенток позднего репродуктивного возраста из 473 эмбрионов, 252 бластоцисты были диагностированы как зуплоидные, 221- как анеуплоидные.

Проведя сравнение доли полученных в ходе исследования зуплоидных и анеуплоидных эмбрионов, был определён пороговый возраст, при превышении которого увеличивалась доля анеуплоидных эмбрионов в 2,3 раза (ОШ 2,3 (95%ДИ: 1,57, 3,48),  $p < 0,001$ ). Площадь под ROC кривой составила 0,675, с чувствительностью 61,2% и специфичностью 77,0%.

Таким образом, было принято решение о делении пациенток позднего репродуктивного возраста на 2 группы: группа А- пациентки в возрасте  $< 39$

лет; группа Б- пациентки в возрасте  $\geq 39$  лет. Средний возраст пациенток группы А составил  $36,6 \pm 1,5$  лет, группы Б -  $40,8 \pm 1,4$ . При анализе клинико-анамнестических данных и менструальной функции нами не было выявлено статистически значимых различий между исследуемыми группами женщин. Анализ данных исходного гормонального профиля, а также показателей овариального резерва, выявил, что у пациенток группы  $\geq 39$  лет, уровень АМГ был статистически ниже по сравнению с группой пациенток  $< 39$  лет,  $0,9 \pm 0,3$  и  $2,4 \pm 0,6$ , соответственно ( $p=0,02$ ). Также отмечалась тенденция к более высокому уровню базального ФСГ в группе  $\geq 39$  лет ( $12,5 \pm 2,0$ ) по сравнению с группой  $< 39$  лет ( $7,3 \pm 2,4$ ),  $p=0,02$ . При анализе данных лечебного цикла не выявлено значимых различий в назначении человеческого менопаузального и рекомбинантных гонадотропинов. Средняя суммарная доза гонадотропинов была выше во группе  $\geq 39$  лет, чем в группе  $< 39$  лет,  $2601 \pm 370,6$ МЕ и  $1620,3 \pm 262,1$ МЕ, соответственно, ( $p=0,03$ ). Результаты сравнительного анализа оо- и эмбриогенеза между группами представлены в таблице 1.

Таблица 1- Особенности оогенеза и эмбриогенеза исследуемых групп

Параметры	Группа А (n=93)	Группа Б (n=68)	<i>p</i>
Общее количество ооцитов *	$9,7 \pm 2,2$	$4,7 \pm 1,2$	<b>0,04</b>
Среднее число ооцитов МП *	$9,0 \pm 2,0$	$3,9 \pm 1,1$	<b>0,02</b>
Среднее число нормально оплодотворившихся ооцитов (2PN)*	$8,1 \pm 1,9$	$3,3 \pm 1,0$	<b>0,02</b>
Частота оплодотворения (%)**	78,4%	72,6%	0,328
Морфологическая оценка эмбрионов на 3-и сутки (баллы) *	$2,7 \pm 0,3$	$2,2 \pm 0,7$	0,512
Среднее число бластоцист *	$5,3 \pm 1,1$	$2,1 \pm 0,6$	<b>0,012</b>
Среднее число бластоцист отличного/хорошего качества, пригодных для биопсии*	$4,2 \pm 0,9$	$1,5 \pm 0,6$	<b>0,01</b>
Среднее число эуплоидных эмбрионов*	$3,1 \pm 0,8$	$0,7 \pm 0,3$	<b>0,005</b>

\* Среднее  $\pm$  стандартное отклонение на 1 пациентку, t-тест

\*\* Данные представлены как %,  $\chi^2$ -тест

Представленные результаты позволяют сделать вывод о том, что возраст 39 лет является пороговым, выше которого происходит значимое снижение полученных ооцитов, а также количества, морфологического качества и плоидности бластоцист. Для изучения генеза возрастного влияния на качество и количество ооцитов, а также эмбрионов, нами было проведено исследование копийности мтДНК в кумулюсных клетках и клетках трофэктодермы пациенток позднего репродуктивного возраста

С целью изучения копийности мтДНК в кумулюсных клетках было отобрано 454 ооцит-кумулюсных комплекса, полученных у 67 пациенток позднего репродуктивного возраста (средний возраст  $37,8 \pm 2,1$  лет). Общая характеристика пациенток представлена в таблице 2.

Таблица 2 - Общая характеристика пациенток (n = 67)

Возраст (лет)	37,8±2,1
Индекс массы тела, кг/м <sup>2</sup>	22,3±1,5
Базальный уровень ФСГ, мЕд/мл	6,5±3,0
Базальный уровень ЛГ, мЕд/мл	4,7±3,0
Базальный уровень Е2, пмоль/л	116,4±135
АМГ, нг/мл	2,66±1,09
Средняя суммарная доза гонадотропинов, МЕ	2778,5±835,3
Продолжительность лечения (дней)	10±1,8

Среднее ±стандартное отклонение

По результатам исследования была выявлена отрицательная корреляция между средним уровнем мтДНК в КК и возрастом пациенток ( $r = - 0,542$ ,  $p = 0,008$ ) (Рисунок 1). Соответственно, по мере увеличения возраста отмечалось снижение копийности мтДНК в КК. В когортах исследуемых групп: средний уровень мтДНК в КК пациенток <39 лет (n=34) составил  $340 \pm 38$ , средний уровень мтДНК в КК пациенток  $\geq 39$  лет (n=33) составил  $251 \pm 23$ , разница между группами была статистически значима ( $p=0,04$ ).

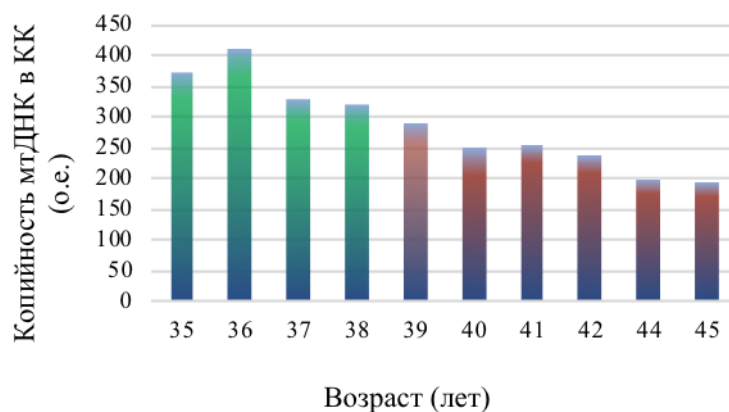


Рисунок 1. Корреляция уровня мтДНК в КК с возрастом пациенток.

Кроме того, относительные показатели копийности мтДНК в КК коррелировали с уровнем АМГ в сыворотке крови ( $r = 0,639$ ,  $p = 0,003$ ). В группе пациенток с АМГ более 1 нг/мл ( $3,2 \pm 1,1$  нг/мл) копийность мтДНК в КК была статистически значимо выше, чем в группе с АМГ менее 1 нг/мл ( $0,7 \pm 0,3$  нг/мл), 369(203;696) и 210(98;597), соответственно ( $p=0,001$ ).

Учитывая полученные результаты исследования уровня мтДНК в КК, можно предположить, что низкая копийность мтДНК, вероятно, отражает возрастное снижение как количества, так и качества ооцитов. Что согласуется с данными ряда зарубежных авторов [Boucret L., 2015; May-Panloup P., 2016]. В нашем исследовании, также, как и в исследованиях Taugourdeau A. et al. (2018), Boucret L. et al. (2015), Desquirit-Dumas V. et al. (2017), не было выявлено статистически значимой связи копийности мтДНК в КК с морфологическим качеством бластоцист и плоидностью полученных эмбрионов. Отсутствие данных корреляций может объясняться тем, что в ооцитах имеется достаточное количество митохондрий и мтДНК, обеспечивающее необходимый уровень энергии для последующего развития эмбрионов до стадии бластоцисты, не зависимо от морфологического качества. Также сниженная копийность мтДНК и митохондриальный потенциал ооцитов/кумулюсных клеток не всегда является определяющим в развитии анеуплоидии.

Важно отметить, что была выявлена тенденция к снижению копийности мтДНК в КК в группе неимплантировавшихся эмбрионов по сравнению с группой имплантировавшихся,  $299 \pm 32$  и  $390 \pm 40$ , соответственно ( $p = 0,08$ ).

Согласно данным А. Taugourdeau et al. (2018), копияность мтДНК в КК в группе имплантировавшихся эмбрионов значительно выше, чем в группе неимплантировавшихся ( $p < 10^{-4}$ ), таким образом, авторы сделали вывод, что количество мтДНК в КК может являться определяющим фактором успешного развития и имплантации эмбрионов. Возможно, отсутствие сильной корреляции между уровнем мтДНК в КК и имплантационным потенциалом эуплоидных бластоцист в нашем исследовании связано с меньшим числом перенесенных эмбрионов ( $n=51$ ), по сравнению с А. Taugourdeau et al. ( $n=84$ ).

На следующем этапе исследования изучалась копияность мтДНК в трофэктодерме 473 бластоцист 161 пациентки позднего репродуктивного возраста. Как сообщалось ранее, все пациентки были разделены 2 группы на основании проведенного сравнения доли всех полученных в ходе исследования эуплоидных ( $n=252$ ) и анеуплоидных ( $n=221$ ) эмбрионов. В когортах исследуемых групп: группа А (<39 лет)- из 324 эмбрионов, 194 (59,8%) эуплоидные бластоцисты, 130 - анеуплоидные (40,2%); в группе Б ( $\geq 39$  лет) - из 149 эмбрионов, 58 (39%) были эуплоидными и 91(61%)- анеуплоидными. Таким образом, в группе А число эуплоидных бластоцист в 2,3 раза выше, чем в группе Б (ОШ 2,3 (95%ДИ: 1,57; 3,48),  $p < 0,001$ ).

Далее, по результатам исследования была выявлена положительная корреляционная связь относительного уровня мтДНК в трофэктодерме эмбрионов с возрастом пациенток ( $r=0,483$ ,  $p=0,003$ ). Таким образом, закономерно, что в когортах исследуемых групп отмечалось статистически значимая разница в копияности мтДНК в ТЭ: в группе А уровень мтДНК в ТЭ был ниже, чем в группе Б, 0,003 (0,000495; 0,01) и 0,004 (0,001; 0,02), соответственно ( $p=0,03$ ) (Рисунок 2).

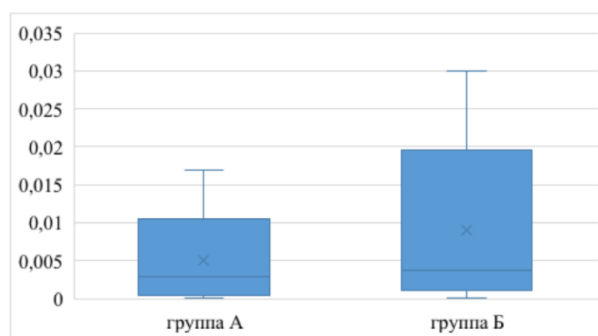


Рисунок 2. График, отражающий зависимость среднего уровня мтДНК в трофэктодерме (о.е.) от возраста (лет) исследуемых группах пациенток. Линия в середине «ящика» - медиана (50-й процентиль), границы «ящика» - первый и третий квартили (25-й и 75-й процентиля). Концы «усов» соответствуют минимальному и максимальному значениям,  $p=0,03$  (тест Манна-Уитни).

Наши данные расходятся с результатами Santos M. et al. (2017), которые не выявили статистически значимой связи между копийностью мтДНК и возрастом пациенток, но сами авторы отмечают отсутствие охвата широких возрастных диапазонов ( $38,8 \pm 3,2$ ). Однако результаты настоящего исследования согласуются с гипотезой, выдвинутой коллективами авторов Fragouli E. et al. (2015, 2017) и Ravichandran K. et al., (2017), о компенсаторном увеличении уровня мтДНК в связи с наличием возрастного накопления мутаций в митохондриальном геноме ооцитов и впоследствии эмбрионов.

Кроме того, была выявлена статистически значимая отрицательная связь копийности мтДНК с уровнем АМГ ( $r=-0,567$ ,  $p=0,006$ ) (Рисунок 3). Иными словами, у пациенток со сниженным овариальным резервом уровень мтДНК в ТЭ повышен.

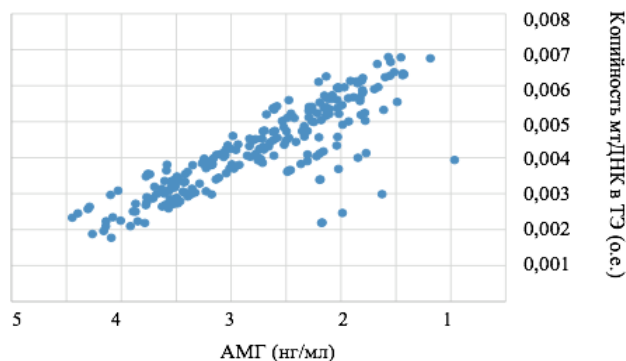


Рисунок 3. Корреляция копийности мтДНК в ТЭ (о.е.) и уровня АМГ крови (нг/мл).

Оценив уровни мтДНК в трофэктодерме бластоцист методом ПЦР в режиме реального времени было выявлено, что среди всех анеуплоидных



эмбрионов (n=221) уровень мтДНК был статистически выше –  $0,00459 \pm 0,0005$ , чем в трофэктодерме эуплоидных бластоцист (n=252) –  $0,00246 \pm 0,0003$  (p=0,003).

Средняя копияность мтДНК в ТЭ эуплоидных эмбрионов (n=194) группы <39 лет составила 0,00259 (0,00012), в то время как уровень мтДНК в ТЭ эуплоидных эмбрионов (n=58) группы ≥39 лет - 0,00308 (0,00018), что является статистически значимой разницей (p=0,02). Среди анеуплоидных эмбрионов (n=91) группы ≥39 лет наблюдалась тенденция к более высоким показателям копияности мтДНК в ТЭ по сравнению с генетически аномальными эмбрионами (n=130) группы <39 лет, 0,00397(0,00078) и 0,00608 (0,0008), соответственно (p=0,06) (Рисунок 4).

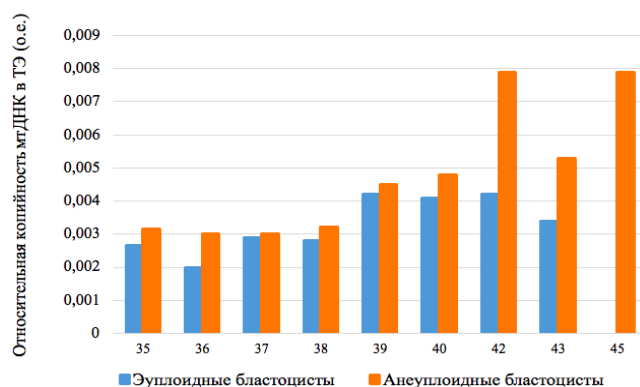


Рисунок 4. Копийность мтДНК (о.е.) в зависимости от возраста (лет) пациенток и пloidности эмбрионов.

При оценке исходов программ ВРТ с ПГТ-А было выявлено, что из 186 принесённых в полость матки эуплоидных бластоцист, 99 привели к беременности (99/186), частота наступления клинической беременности составила 53,2%. Доля прерванных беременностей до 12 недель гестации -12 (12,1%). На момент исследования 81 (43,5%) беременность закончилась родами. Было зафиксировано 6 (3,2%) биохимических беременностей. При применении ROC анализа было установлено пороговое значение уровня мтДНК, составившее 0,004о.е., превышение которого предвещало неудачу имплантации с чувствительностью 80,5% и специфичностью 100%, площадь под ROC-кривой составила 0,857, что говорит о высокой прогностической силе.

Из 186 перенесенных эмбрионов у 123 бластоцист уровень мтДНК был ниже выявленного порогового значения, таким образом, частота имплантации для эуплоидных эмбрионов с подпороговым уровнем мтДНК составила 80,5% (99/123) (95% ДИ: 0,710-0,97). В то время как, не зарегистрировано ни одного случая успешной имплантации эуплоидной бластоцисты с уровнями мтДНК выше установленного порогового значения ( $\chi^2$  с поправкой Йейтса = 105,2,  $p < 0,001$ ) (Таблица 3).

Таблица 3 - Количество эуплоидных бластоцист с нормальным и повышенным уровнем мтДНК в ТЭ

Клинический исход после переноса 1 размороженного эмбриона	Количество перенесенных эуплоидных бластоцист (n=186)	Количество эуплоидных бластоцист с подпороговым уровнем мтДНК (n=123)	Количество эуплоидных бластоцист с надпороговым уровнем мтДНК (n=63)
Беременность	99 (53,2%)	99(79,8%)	0 (0%)
Нет беременности	87 (46,8%)	24(19,5%)	63 (100%)

Далее было изучено распределение исходов программ ВРТ по группам (Таблица 4)

Таблица 4 - Исходы программ ЭКО с ПГТ-А у пациенток исследуемых групп

Показатель	Группа А (n=93)	Группа Б (n=68)	ОШ (95% ДИ)	$p, \chi^2$
Количество перенесенные эуплоидных эмбрионов в полость матки	144	42	-	0,783
Частота наступления беременности на перенос эмбрионов, абс.(%)	86 (59,7%)	13 (31%)	3,3(1,58;6,89)	<b>0,002</b>
Частота наступления клинической беременности, абс.(%)	81 (56,25%)	12 (28,6%)	3,21(1,52;6,78)	<b>0,002</b>
Частота прерывания беременности до 12 недель гестации, абс(%)	10 (12,3%)	2 (16,7%)	1,4(0,27;7,44)	0,677
Частота биохимических беременностей, абс.(%)	5 (5,8%)	1 (7,7%)	0,39(0,04;3,49)	0,792
Частота прогрессирующих беременностей, абс.(%)	43 (29,86%)	8(19,0%)	1,8(0,77;4,22)	0,167
Частота живорождения, абс.(%)	28 (19,4%)	2 (4,7%)	4,8(1,10;12,1)	<b>0,02</b>

При этом с учетом копияности мтДНК в ТЭ были получены следующие результаты: в группе А (<39) частота имплантации эуплоидных бластоцист с подпороговыми значениями мтДНК в ТЭ составила 81,1%, то есть из 106

бластоцист с подпороговыми уровнями- 86 привели к беременности. В группе Б ( $\geq 39$  лет) - частота имплантации эуплоидных бластоцист с подпороговыми значениями мтДНК в ТЭ составила 76,4%, 17 бластоцист имели нормальным (подпороговый) уровень мтДНК в ТЭ и 13 из них привели к беременности. Не наблюдалось статистически значимых различий между группами в числе эуплоидных эмбрионов с нормальным митохондриальным потенциалом ( $p=0,653$ ). Однако было выявлено увеличение доли эуплоидных эмбрионов с патологическими надпороговыми уровнями мтДНК, из которых ни один не привел к беременности, у пациенток старше 39 лет в 4,1 раза, по сравнению с пациентками до 39 лет ОШ 4,1 (95%ДИ: 1,99; 8,41),  $p<0,001$ . То есть из 42 принесённых эуплоидных эмбрионов группы  $\geq 39$  лет - 59,5% (25) бластоцист имели патологические надпороговые уровни мтДНК. В то время как в группе пациенток  $<39$  лет, из 144 перенесенных эуплоидных эмбрионов -доля бластоцист с надпороговыми значениями составила лишь 26,3% (38).

Для определения порогового возраста изменения митохондриального биогенеза было проведено сравнение доли всех полученных эуплоидных эмбрионов, а не только описанных выше (перенесенных в полость матки бластоцист), с подпороговыми и надпороговыми значениями мтДНК в трофэктодерме. При этом, пороговым возрастом оказался возраст 39 лет. Площадь под ROC кривой составила 0,659, с чувствительностью 53,4% и специфичностью 89,4%. ОШ наличия эмбрионов с надпороговыми значениями мтДНК в трофэктодерме составило 4,9 (95%ДИ: 2,03;8,59),  $p<0,001$ .

Таким образом, полученные результаты не противоречат данным многих зарубежных исследований [E.Fragouli, 2015, 2017; D.Wells, 2017; K. Ravichandran, 2017], которые также показали связь между сниженной копийностью мтДНК в ТЭ и эуплоидией, а также повышенным потенциалом к имплантации. Кроме того, представленные данные согласуются с гипотезой «тихого эмбриона», предложенная Leese (2002), которая предполагает, что жизнеспособный эмбрион имеет относительно низкий или «тихий метаболизм», в то время как эмбрионы, находящиеся под влиянием стресса, и со сниженным

потенциалом развития, как правило, метаболически более активны. Таким образом, определение копийности мтДНК в трофэктодерме бластоцист, в совокупности с проведением преимплантационного генетического тестирования эмбрионов, является надежным методом селекции эмбрионов с высоким имплантационным потенциалом, который позволяет увеличить эффективность лечения бесплодия в программах ЭКО.

## ВЫВОДЫ

1. Возраст 39 лет является пороговым, при превышении которого происходит значимое снижение числа полученных ооцитов, количества и качества бластоцист, а также происходит снижение доли эуплоидных эмбрионов. Это объясняет низкую эффективность программ ЭКО у данной категории пациенток. Так, в групп А(<39 лет) и Б( $\geq 39$  лет) число полученных ооцитов ( $9,7 \pm 2,2$  против  $4,7 \pm 1,2$ ,  $p=0,04$ ), число зрелых ооцитов ( $9,0 \pm 2,0$  против  $3,9 \pm 1,1$ ,  $p=0,02$ ), нормально оплодотворившихся ооцитов ( $8,1 \pm 1,9$  против  $3,3 \pm 1,0$ ,  $p=0,02$ ), а также общее количество бластоцист ( $5,3 \pm 1,1$  против  $2,1 \pm 0,6$ ,  $p=0,012$ ), бластоцист отличного/хорошего качества, пригодных для биопсии трофэктодермы с целью проведения ПГТ-А ( $4,2 \pm 0,9$  против  $1,5 \pm 0,6$ ,  $p=0,01$ ) было статистически выше у пациенток моложе 39 лет. Кроме того, число эуплоидных эмбрионов 5-6 суток развития превалировало в когорте пациенток до 39 лет в 2,3 раза (ОШ 2,3 (95%ДИ: 1,57;3,48,  $p<0,001$ ). Таким образом, частота наступления беременности статистически выше в группе пациенток <39 лет, чем в группе  $\geq 39$  лет (ОШ 3,3; 95%ДИ 1,58;6,89;  $p=0,002$ ). Частота клинической беременности также была статистически значимо выше в группе А, по сравнению с группой Б, 81 (56,25%) и 12 (28,6%), соответственно (ОШ 3,21(95% Д: 1,52;6,78,  $p= 0,02$ ). Частота живорождения была статистически значимо выше в группе А- 28 (19,4%), по сравнению с группой Б- 2 (4,7%) (ОШ 4,8 (95% ДИ: 1,10;12,1,  $p=0,02$ )).

2. По результатам исследования уровня мтДНК в клетках кумулюса, была выявлена отрицательная корреляция с возрастом пациенток ( $r = - 0,542$ ,  $p = 0,008$ ). То есть с увеличением женского возраста, копийность мтДНК в КК

снижется. Относительные показатели копийности мтДНК в КК положительно коррелировали с уровнем АМГ в сыворотке крови ( $r = 0,639$ ,  $p = 0,003$ ). Таким образом, снижение копийности мтДНК в кумулюсных клетках ассоциировано с пороговым возрастом старше 39 лет и уровнем АМГ менее 1 нг/мл, что свидетельствует о снижении овариального резерва. Не было выявлено статистически значимой связи копийности мтДНК в КК с морфологическим качеством бластоцист и их плоидностью, следовательно, митохондриальный потенциал ооцитов/кумулюсных клеток не является определяющим в развитии анеуплоидии.

3. Копийности мтДНК в ТЭ положительно коррелирует с возрастом пациенток ( $r=0,483$ ,  $p=0,003$ ). В группе пациенток <39 лет уровень мтДНК был ниже, чем в группе  $\geq 39$  лет,  $0,003$  ( $0,000495$ ;  $0,01$ ) и  $0,004$  ( $0,001$ ;  $0,02$ ), соответственно ( $p=0,03$ ). Также была выявлена статистически значимая отрицательная связь копийности мтДНК в ТЭ с уровнем АМГ ( $r=-0,567$ ,  $p=0,006$ ). Более того, эуплоидные эмбрионы имели статистически значимо низкую копийность мтДНК в ТЭ, по сравнению с анеуплоидными ( $0,00246 \pm 0,003$  и  $0,00459 \pm 0,0005$ , соответственно,  $p=0,003$ ). Причем уровень мтДНК в ТЭ изменяется с возрастом как в трофэктодерме эуплоидных, так и анеуплоидных эмбрионов: копийность мтДНК в ТЭ эуплоидных эмбрионов ( $n=194$ ) группы А составила  $0,00259 \pm 0,00012$ , эуплоидных эмбрионов ( $n=58$ ) группы Б-  $0,00308 \pm 0,00018$ , ( $p=0,02$ ). Среди анеуплоидных эмбрионов ( $n=91$ ) группы Б наблюдалась тенденция к более высоким показателям копийности мтДНК в ТЭ по сравнению с анеуплоидными бластоцистами ( $n=130$ ) группы А,  $0,00397 \pm 0,00078$  и  $0,00608 \pm 0,0008$ , соответственно ( $p=0,06$ ).

4. Пороговым возрастом изменения митохондриального биогенеза является 39 лет. Так, при достижении этого возраста доля генетически нормальных бластоцист с надпороговыми значениями мтДНК в ТЭ в 4,9 раз выше по сравнению с более молодой когортой пациенток (ОШ 4,9 (95%ДИ: 2,03; 8,59,  $p < 0,001$ )). Площадь под ROC кривой составила 0,659, с чувствительностью 53,4% и специфичностью 89,4%.

5. Определение копийности мтДНК в трофэктодерме бластоцист в совокупности с проведением преимплантационного генетического тестирования эмбрионов является надежным методом селекции эмбрионов с высоким имплантационным потенциалом, который позволит увеличить эффективность лечения бесплодия в программах ЭКО. Так, изучив уровень мтДНК в ТЭ имплантировавшихся и неимплантировавшихся эмбрионов, был определён пороговый уровень мтДНК, составивший 0,004о.е., превышение которого предвещало неудачу имплантации с чувствительностью 80,5% и специфичностью 100%, площадь под ROC-кривой составила 0,857, что говорит о высокой прогностической силе. Из 186 перенесенных эмбрионов у 123 бластоцист уровень мтДНК был ниже выявленного порогового значения, таким образом, частота имплантации для эуплоидных эмбрионов с подпороговым уровнем мтДНК составила 80,5% (99/123) (95% ДИ: 0,710-0,97). В то время как, не зарегистрировано ни одного случая успешной имплантации эуплоидной бластоцисты с уровнями мтДНК выше установленного порогового значения ( $\chi^2$  с поправкой Йейтса = 105,2,  $p < 0,001$ ). В когортах исследуемых групп было выявлено увеличение доли эуплоидных эмбрионов с патологическими надпороговыми уровнями мтДНК, из которых ни один не привел к беременности, у пациенток старше 39 лет в 4,1 раза, по сравнению с пациентками до 39 лет. То есть из 42 принесённых эуплоидных эмбрионов группы старше 39 лет - 59,5% (25) бластоцист имели патологические надпороговые уровни мтДНК. В то время как в группе пациенток младше 39 лет, из 144 перенесенных эуплоидных эмбрионов -доля бластоцист с надпороговыми значениями составила лишь 26,3% (38). Что согласуется с ранее полученными результатами о связи копийности мтДНК в ТЭ с пороговым возрастом, а также исходами программ ВРТ.

#### ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Пациенткам позднего репродуктивного возраста показано проведение преимплантационного генетического скрининга эмбрионов на анеуплоидии, в

связи с высокими показателями анеуплоидных бластоцист в данной группе женщин.

2. С целью улучшения эффективности программ ЭКО с ПГТ-А, при наличии нескольких эуплоидных эмбрионов, пациенткам позднего репродуктивного возраста рекомендовано определение копийности мтДНК в трофэктодерме бластоцист, с целью селекции эмбрионов с высоким имплантационным потенциалом. Для переноса рекомендованы эмбрионы, копийность мтДНК которых, не превышает пороговый уровень, составляющий 0,004о.е.

3. Перенос эуплоидных бластоцист с подпороговыми значениями мтДНК позволяет увеличить частоту наступления беременности и снизить риск ранних репродуктивных потерь, что позволяет увеличить эффективность программы ЭКО.

#### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1) Современные методы селекции эмбрионов при проведении программ вспомогательных репродуктивных технологий / **А.И. Королькова**, Н.Г. Мишиева, О.В. Бурменская, А.Н. Екимов, А.Н. Абубакиров, Х.А. Богатырева // **Акушерство и гинекология**. – 2018. -№ 2. -С. 13-18.

2) Антимюллеров гормон как показатель фертильности женщин позднего репродуктивного возраста / **А.А. Королькова**, Н.Г. Мишиева, Б.А. А.Н. Абубакиров, Ю.С.Павлова, Т.Б.Имиева // **Проблемы репродукции**. – 2018. - 24(2). – С. 23-27.

3) Повышение эффективности программ ЭКО на основании определения копийности митохондриальной ДНК в трофэктодерме эмбрионов / **А.И.Королькова**, Н.Г. Мишиева, Б.А. Мартазанова, О.В. Бурменская, А.Н. Екимов, Д.Ю. Трофимов, М.А. Веюкова, А.О. Кириллова, А.Н. Абубакиров // **Акушерство и гинекология**. – 2019.- № 3. – С. 98-104.

4) Значимость копийности мтДНК в клетках кумулюса пациенток позднего репродуктивного возраста / **А.И. Королькова**, Н.Г. Мишиева, Б.А.

Мартазанова, О.В. Бурменская, М.А. Веюкова, А.Н. Екимов, Д.Ю. Трофимов, А.Н. Абубакиров // **Акушерство и гинекология**. – 2019. - №10. - С. 78-83.

5) Clinical Significance of the mitochondrial DNA copy number in cumulus cells at advanced reproductive age patients / **A. Korolkova**, M.Veyukova, A. Kirillova, V. Lapina, N.Mishieva, A.Abubakirov, M. Vysokikh, P.Vishnyakova // **Материалы 34th Annual Meeting of ESHRE, Barcelona, Spain, from 1 to 4 July 2018.**

6) Determination of mitochondrial DNA levels in human blastocysts as a predictor for embryonic implantation potential / **A. Korolkova**, N. Mishieva, B. Martazanova, M. Veyukova, A. Kirillova, A.Abubakirov // **Материалы 35th Annual Meeting of ESHRE, Vienna, Austria, from 23 to 26 June 2019.**

7) The mitochondrial DNA quantification in cumulus cells and implantation potential of embryos / **A. Korolkova**, N. Mishieva, B. Martazanova, Y.Kiseleva, E. Kovalskaya, O. Burmenskaya, A. Abubakirov // **Материалы ASRM 2019 – American Society for Reproductive Medicine Annual Meeting – Philadelphia**

8) Клиническая значимость оценки копийности митохондриальной ДНК в клетках кумулюса в программах ВРТ/ **А.И. Королькова**, П.А. Вишнякова, С.В. Пятаева, Ю.А. Суханова, М.А. Володина, М.В. Марей, М.А. Веюкова, Н.Г. Мишиева, А.Н. Абубакиров, М.Ю. Высоких, Г.Т. Сухих // **XII Международный конгресс по репродуктивной медицине. Москва, 16-19 января 2018.**





Рисунок 5 - Алгоритм проведения программы ЭКО у женщин позднего репродуктивного возраста

ДЛЯ ЗАМЕТОК

ДЛЯ ЗАМЕТОК

ДЛЯ ЗАМЕТОК