

©Коллектив авторов

ПРОФИЛИРОВАНИЕ МЕТАБОЛИТОВ В ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ ПЯТИДНЕВНЫХ ЭМБРИОНОВ ЧЕЛОВЕКА

*И.М. Зорина¹, Ч.М. Эльдаров¹, С.А. Ярыгина¹, Н.П. Макарова¹, Д.Ю. Трофимов¹,
В.Ю. Смольникова¹, Е.А. Калинина¹, М.Ю. Бобров^{1,2*}*

¹Национальный исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии
имени академика В.И. Кулакова, Москва

²Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова,
Москва; эл. почта: mbobr@mail.ru

Целью исследования являлось определение изменения профилей метаболитов в эмбриональных питательных средах (ЭПС) для оценки качества и имплантационного потенциала культивируемых эмбрионов человека. ЭПС (163 шт.) были собраны на 5-й день до переноса или криоконсервации эмбрионов. Часть эмбрионов вошла в программу предимплантационного генетического скрининга с целью обнаружения анеуплоидных кариотипов. Образцы были разделены на группы согласно морфологической классификации эмбрионов (по Гарднеру) в соответствии с данными генетического анализа и информации об имплантации после переноса. ЭПС экстрагировали метанолом, осадок отделяли центрифугированием и продукцию метаболитов отдельных эмбрионов детектировали с использованием ВЭЖХ-МС в режиме положительных ионов. После обнаружения пиков и выравнивания хроматограмм данные обрабатывали при помощи анализа главных компонент (РСА). Профилирование метаболитов в ЭПС выявило существенные различия между морфологическими классами эмбрионов. Внутригрупповые сравнения не обнаружили достоверных отличий между представителями одного класса. Генетический скрининг эмбрионов выявил 33 анеуплоидных кариотипа. Было показано, что число хромосом не влияет на профиль метаболитов по сравнению с нормальной группой эмбрионов того же класса. В ЭПС имплантировавшихся и неимплантировавшихся эмбрионов были выявлены специфические молекулярные сигнатуры, позволяющие дифференцировать эмбрионы с разным исходом имплантации. Предполагается, что профилирование метаболитов в ЭПС с помощью ВЭЖХ-МС может способствовать более точному отбору для переноса одного эмбриона с целью снижения риска нежелательных последствий многоплодной беременности.

Ключевые слова: метаболомика, метаболомное профилирование, масс-спектрометрия, эмбрионы человека, имплантация

DOI: 10.18097/PBMC20176305385

ВВЕДЕНИЕ

Количество детей, рождённых с помощью вспомогательных репродуктивных технологий, увеличивается по всему миру. Однако, приблизительно 70-80% эмбрионов, получаемых *in vitro*, не имплантируются, что приводит к достаточно низкому уровню эффективности (порядка 66%) возникновения беременности в циклах ЭКО [1]. Одним из способов повышения эффективности является одновременный перенос нескольких эмбрионов, однако такой подход часто приводит к возникновению нежелательной множественной беременности и развитию сопутствующих ей осложнений [2]. В настоящее время, в основе разрабатываемых методов повышения эффективности имплантации лежит всесторонняя оценка качества получаемых эмбрионов. Наиболее широко используемым методом является отбор по морфологическим критериям. Анализ морфологии эмбриона – это самый простой способ оценки его развития и прогнозирования жизнеспособности, но большинство исследований показывают, что качественный морфологический фенотип эмбрионов является недостаточным параметром для прогнозирования успешной имплантации [3].

Кроме того, значительная доля анеуплоидных эмбрионов способна формировать морфологически нормальный фенотип, однако генетические аномалии впоследствии могут препятствовать имплантации и физиологическому развитию [4]. В этой связи для оценки качества эмбрионов и их кариотипа используются методы предимплантационного генетического скрининга. Однако данный подход является инвазивным, и остается пока малодоступным в связи с его высокой стоимостью.

Ограничения, связанные с морфологической и генетической классификацией, стимулировали исследования по поиску вспомогательных подходов для неинвазивной биохимической оценки жизнеспособности и качества эмбрионов. Эти подходы включают измерения глюкозы, лактата, пирувата, аминокислот и белков в составе эмбриональной питательной среды (ЭПС). [5-7]. В последнее время применение ряда методов спектроскопии (Рамановская спектроскопия, ЯМР-спектроскопия, ИК-спектроскопия) было использовано для изучения эмбрионального метаболома [8-10]. Состояние метаболома отражает динамические изменения жизнедеятельности клеток, связанные с экспрессией определённых наборов генов, и кодируемых ими белков, и является характеристикой их молекулярного

* - адресат для переписки

фенотипа. Таким образом, профилирование метаболитов в ЭПС может служить информативным подходом для изучения функциональных особенностей развития эмбрионов и выполнения ими генетических программ.

Одним из эффективных методов профилирования и идентификации метаболитов является метод хроматографического разделения аналитов с последующей масс-спектрометрической детекцией (ВЭЖХ-МС). Данный подход широко используется в современной метаболомике, однако на сегодняшний день опубликовано скромное количество данных по анализу метаболитов в ЭПС с применением ВЭЖХ-МС. В данном исследовании при помощи ВЭЖХ-МС нами был проведён анализ отличий профилей метаболитов питательных сред эмбрионов разных морфологических групп, включающих эмбрионы с нормальным и анэуплоидным кариотипом, а также эмбрионов с различными исходами после переноса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Целью исследования являлось определение изменения профилей метаболитов в эмбриональных питательных средах (ЭПС) для оценки качества и имплантационного потенциала культивируемых эмбрионов человека.

В ходе одномоментного исследования в параллельных группах были получены образцы сред культивирования эмбрионов различного морфологического качества от 21 пациентки в возрасте до 45 лет, проходящих программу ЭКО (ИКСИ) с использованием препаратов гонадотропинов с проведением предимплантационного генетического скрининга (ПГС) методом сравнительной геномной гибридизации [11]. От всех пациенток получено информированное согласие на проведение исследования. ЭПС (163 шт.) были собраны на 5-й день, до переноса или криоконсервации эмбрионов. Часть эмбрионов вошла в программу предимплантационного генетического скрининга с целью обнаружения анэуплоидных кариотипов. Культивирование эмбрионов производилось в индивидуальных каплях ЭПС (CSC Irvine, "Irvine Scientific", США) одинакового объёма (30 мкл). На 5-е сутки культивирования производилась морфологическая оценка полученных эмбрионов и биопсия трофобластической оболочки для проведения ПГС, после чего эмбрионы были криоконсервированы. Образцы отработанных ЭПС были отобраны в равных объёмах для исследуемых групп, промаркированы и заморожены (-80°C).

Перед проведением ВЭЖХ-МС проводили экстракцию метаболитов добавлением трёх объёмов метанола к одному объёму инкубационной среды. После перемешивания, преципитат осаждали центрифугированием при 14000 g, надосадок использовали для анализа.

Для ВЭЖХ-МС анализа в хроматографические флаконы со стеклянными вставками отбирали 20 мкл экстракта каждого образца, разделение проб проводили на колонке Zorbax SB C18 – 5 мкм, длина 15 см, внутренний диаметр 0,5 мм ("Agilent",

США) при помощи хроматографической системы Ultimate 3000 Nano LC System ("Thermo Scientific", США). Элюирование компонентов образцов проводили в градиенте подвижной фазы "В" (водный раствор 80% ацетонитрила и 0,1% муравьиной кислоты; объём/объём) 5-35% в течение 20 мин при скорости потока 20 мкл/мин. Для промывки и уравнивания колонки довели концентрацию раствора "В" до 99% в течение 5 мин, затем промывали 5 мин (99% раствора В) и 5 мин подвижной фазой "А" (водный раствор 0,1% муравьиной кислоты). Общее время хроматографии одного образца составило 35 мин. Детекция метаболитов проводилась на гибридном масс-спектрометре Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ ("Thermo Fisher Scientific", США) в трёх измерениях на один образец. Масс-спектры получали при разрешении 60000 в диапазоне 100-1500 m/z , в режиме положительно заряженных ионов.

Детекция пиков, удаление шумовых сигналов, обработка и анализ данных проводились программным пакетом Progenesis QI 2.0 ("Waters", США). Обработка и выравнивание масс-спектров были выполнены с параметрами: тип прибора – масс-спектрометр высокого разрешения; минимальная абсолютная интенсивность пика – 600 ед.; минимальная ширина пика – 0,02 мин. В качестве характеристических сигнатур были отобраны однозарядные ионы, достоверно отличающиеся между группами минимум в 2 раза. Достоверность проверялась с помощью теста ANOVA статистическим модулем, входящим в программный пакет, с порогом достоверности $p < 0,05$. Для выбранных сигнатур было проведено сравнительное исследование различных групп эмбриональных сред методом анализа главных компонент (PCA), а также попарные сравнения групп при помощи критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферрони для множественного сравнения. Критерием достоверности также являлось значение $p < 0,05$ с учётом поправки.

РЕЗУЛЬТАТЫ

По данным морфологического исследования эмбрионы были разделены на группы на основании классификации Гарднера [12]. Как указано в таблице, эмбрионы были распределены на четыре класса в соответствии с морфологической группой после 5-го дня культивирования. В данной классификации цифры указывают степень зрелости бластоцисты (1-6 по возрастанию, первая буква характеризует внутриклеточную массу, вторая трофобластический слой (А, В, С по убыванию)). ПГС проводили у ряда эмбрионов из 1-го и 2-го класса, которые чаще всего используются для последующего переноса. Из 35 эмбрионов, относящихся к 1-му классу, 12 имели анэуплоидный кариотип. Во втором классе присутствовало 43 эмбриона, у 21 из которых наблюдались хромосомные аномалии. Из 33 выявленных анэуплоидных кариотипов (моносомии, трисомии и их комбинации) изменения числа хромосом в одной паре наблюдалось у двадцати,

в двух парах у восьми, в трёх и более парах у пяти эмбрионов. Всего для исследования было отобрано 163 образца, из которых 20 и 55 относились к 3-му и 4-му классам, соответственно, а также 10 образцов сред культивирования, которые инкубировались 5 дней в отсутствии эмбрионов.

С использованием ВЭЖХ-МС были получены наборы данных хроматографического разделения и детекции молекулярных ионов исследуемых образцов. После детекции хроматографических пиков и удаления шумовых сигналов с учётом применённых параметров было обнаружено 129 ионов в диапазоне m/z от 100 до 600. С помощью программного алгоритма было выявлено 105 однозарядных ионов и 24 иона с количеством зарядов более двух. Для метаболомного профилирования был отобран массив однозарядных ионов, из которых для сравнительного анализа использовали 51 ион с кратностью изменения интенсивности сигнала не менее двух.

Для уменьшения размерности многокомпонентных наборов данных и для визуализации кластеризации групп образцов по профилям метаболитов был применён анализ главных компонент (РСА), где матрица данных сводится к серии главных компонент, представляющих линейную комбинацию исходных площадей под пиками в координатах Rt - m/z , где Rt – время удерживания аналита, m/z – соотношение его массы к заряду. Проведённый РСА-анализ выявил отличия в профилях метаболитов ЭПС исследуемых классов. Отличия наблюдались у всех классов по сравнению с контрольной группой (ЭПС без эмбрионов), кроме 4-го класса, где развитие эмбрионов затормозилось на ранних этапах дробления. На рисунке 1 приведены характерные диаграммы межгруппового сравнения. Также проводилось внутригрупповое сравнение эмбрионов одного класса, имеющих отличия в морфологических параметрах. На рисунке 2а показано внутригрупповое сравнение эмбрионов 1-го класса, в состав которого вошли эмбрионы морфологических групп 6АА, 4АА, 4АВ, 3АА. Внутригрупповое сравнение в 1-м и 2-м (данные не приведены) классах не выявило достоверных отличий. Полученные данные свидетельствуют о том, что для каждого морфологического класса характерны специфические профили метаболитов, обусловленные, по-видимому, особенностями метаболизма, соответствующими уровню развития эмбриона.

Среди исследованных в работе эмбрионов методом ПГС было выявлено 33 анеуплоидных кариотипа в первом и втором морфологических классах. Сравнительный анализ ЭПС эмбрионов с нормальным и аномальным количеством хромосом не выявил значимых отличий в исследуемых группах 1-го и 2-го класса (рис. 2б,в). Данное обстоятельство свидетельствует о том, что обнаруженные анеуплоидии не оказывают существенного влияния на метаболическую активность зародышей, что может объяснять развитие анеуплоидными эмбрионами нормального морфологического фенотипа.

Оценка зависимости имплантационного потенциала перенесенных эмбрионов от состава ЭПС проводилась на образцах от 25 эмбрионов, использованных для переноса. Об удачной имплантации эмбриона судили по повышению уровня хореотропного гормона и данным ультразвукового исследования. Количество переносов с удачным и неудачным исходом распределилось приблизительно одинаково: 12 положительных и 13 отрицательных. Обработка данных позволила обнаружить достоверные отличия между группами с различными исходами после переноса, что свидетельствует о важной роли изменений метаболизма эмбрионов на стадии культивирования для последующей имплантации (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

На сегодняшний день, в основе стратегии преодоления низкого уровня успешных попыток имплантации эмбриона лежат методики избыточного получения ооцитов и переноса нескольких эмбрионов. Однако данный подход имеет серьёзные недостатки, связанные с развитием нежелательных многоплодных беременностей, повышением риска материнской и детской заболеваемости и смертности, а также с увеличением расходов на здравоохранение [2].

В основе попыток применения метаболомных подходов к отбору эмбрионов лежат ранние работы, в которых авторы использовали различные типы спектроскопии для анализа ЭПС [8-10]. Первые работы по анализу эмбриональных сред проводились с использованием ближней ИК-спектроскопии, по данным которой авторы могли сравнивать спектры поглощения образцов и соотносить их с жизнеспособностью и имплантационным

Таблица. Распределение эмбрионов на классы по морфологическим критериям

| Классы эмбрионов | 1-й | 2-й | 3-й | 4-й |
|------------------|--------------------------|------------------------------|----------|---------|
| Морфология | 6АА, 4АА, 3АА | 6ВВ, 4ВА, 4ВВ, 3АВ, 3ВА, 3ВВ | 3ВС, 3СС | атрезия |
| Кариотип N | 23 | 22 | н/о | н/о |
| Кариотип А | 12 | 21 | н/о | н/о |
| Всего | 35 | 43 | 20 | 55 |
| Контроль | Среды без эмбрионов - 10 | | | |

Примечание. Кариотип N и А - нормальный и анеуплоидный кариотип, соответственно. Контроль - среды инкубированные без эмбрионов 5 дней.

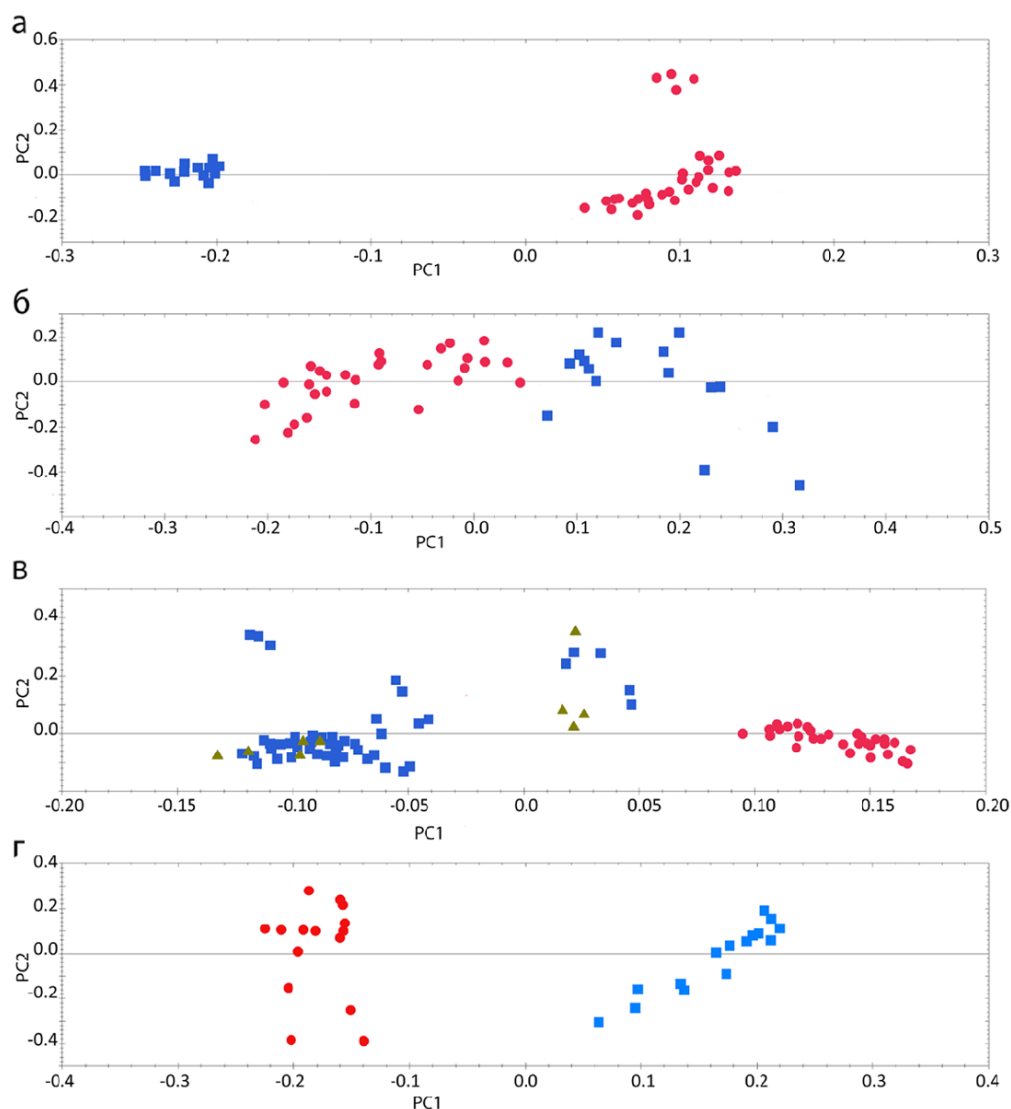


Рисунок 1. Межгрупповое сравнение профилей метаболитов ЭПС эмбрионов разных морфологических классов (РСА-анализ). а - для 1 (●) и 2 (■) класса эмбрионов; б - для 1 (●) и 3 (■) класса; в - 1 (●) и 4 (■) класса, а также контрольных сред без эмбрионов (▲); г - для 2 (●) и 3 (■) класса.

потенциалом. В одной из основополагающих работ с применением данного подхода авторы провели ретроспективное исследование на 400 образцах ЭПС, полученных от эмбрионов 2-3-х суток жизни после переноса [13]. Авторы предложили индекс жизнеспособности эмбрионов, по которому можно прогнозировать их способность к имплантации и развитию беременности. Также было отмечено, что показатели жизнеспособности эмбриона не коррелируют с его морфологическим классом, поскольку эмбрионы одного класса демонстрировали отличающиеся метаболические профили. Эта работа вызвала значительный интерес, однако, последующие рандомизированные исследования, в которых сравнивали рождаемость в группах, где отбор эмбрионов проводился только по морфологии и в комбинации с ИК-спектроскопией, не подтвердили эффективности комбинированного подхода [14]. По мнению ряда авторов, это связано с техническими особенностями имеющегося оборудования,

низкими значениями соотношения сигнал-шум, что не позволяет идентифицировать тонкие различия в составе ЭПС [15]. Кроме этого, недостатком данного метода является невозможность провести идентификацию и измерить концентрацию отдельных метаболитов.

В этой связи использование масс-спектрометрии (МС) может быть перспективным, так как позволяет с высокой специфичностью и чувствительностью идентифицировать и давать количественную оценку метаболитам в широком диапазоне молекулярных масс. Тем не менее, имеется незначительное количество исследований с использованием данного метода. В одной из первых работ МС применяли для оценки метаболомных профилей инкубационных сред трёхдневных эмбрионов. Исследования проводили без хроматографического разделения в режиме отрицательных ионов. Авторам удалось выявить характерные отличия в профилях метаболитов для предикции имплантационного потенциала [16].

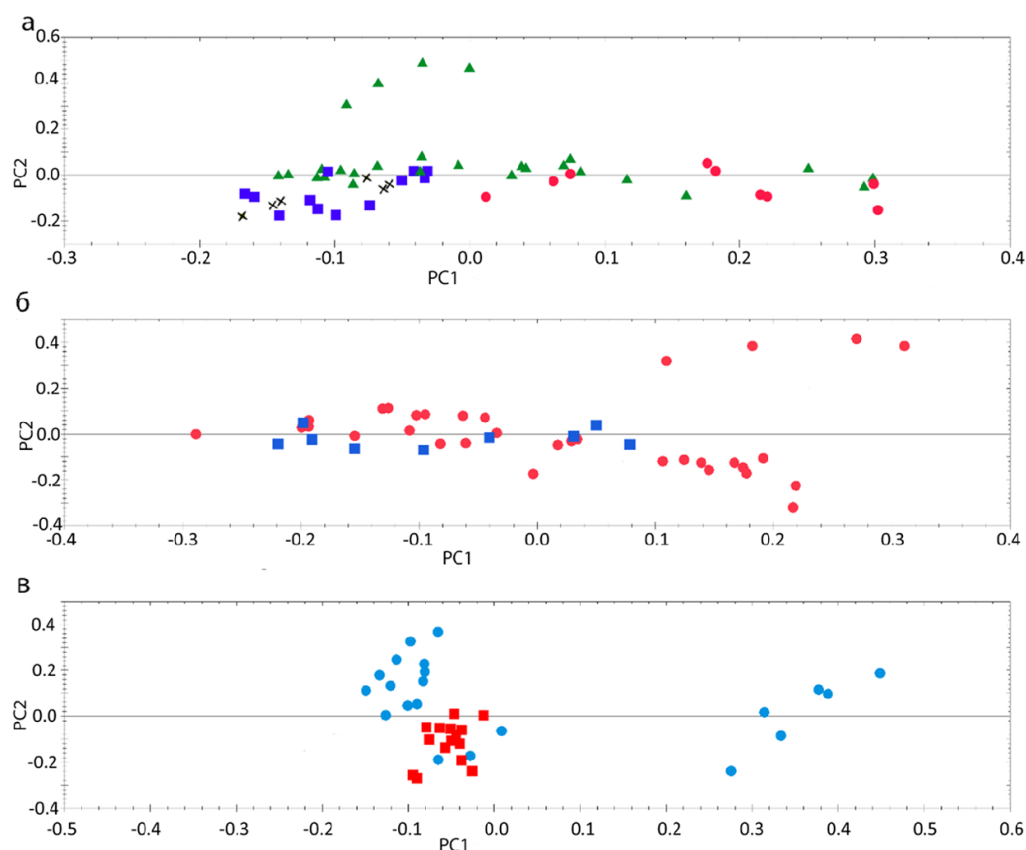


Рисунок 2. а - Внутригрупповое сравнение в первом морфологическом классе эмбрионов: 6АА (●), 4АА (■), 4АВ (×), 3АА (▲). Сравнение ЭПС эуплоидных (●) и анеуплоидных (■) эмбрионов 1-го (б) и 2-го (в) классов.

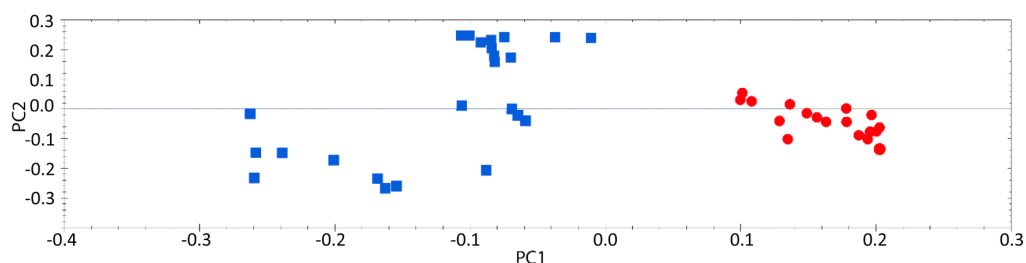


Рисунок 3. Оценка имплантационного потенциала по профилям метаболитов в ЭПС у эмбрионов с успешной имплантацией (●) и с отрицательным исходом (■).

Необходимо отметить, что для понимания особенностей метаболизма эмбрионов человека, для оптимизации условий культивирования и более точного прогноза важное значение имеет оценка содержания отдельных метаболитов. Эту проблему можно эффективно решать с применением хроматографического разделения перед МС детекцией. В недавней работе был проведён ВЭЖХ-МС анализ свободных жирных кислот в инкубационных средах эмбрионов пятого дня культивирования, разделённых по уровню развития на две группы с использованием морфологических критериев. Авторы показали достоверное снижение содержания докозагексаеновой кислоты в средах эмбрионов с лучшими морфологическими характеристиками. Сходная тенденция отмечалась и для ряда других эссенциальных жирных кислот [17].

Ещё одно интересное исследование с использованием ВЭЖХ-МС было проведено с целью идентификации различий в ЭПС трёхдневных эмбрионов, анеуплоидных по 21 паре хромосом и имеющих нормальный кариотип. Было выявлено несколько метаболитов, позволяющих дифференцировать эмбрионы с анеуплоидиями по 21 хромосоме. По мнению авторов, данный подход может в перспективе служить альтернативным методом оценки кариотипа эмбрионов [18].

В проведённом нами исследовании были использованы ЭПС эмбрионов пятого дня культивирования. На данном сроке наблюдается формирование бластоцисты, что позволяет давать более детальную морфологическую характеристику эмбрионов по сравнению с третьим днем развития. Эмбрионы были разделены на 4 класса, в каждый

из которых входили наборы с отличающимися морфологическими параметрами (таблица), что позволило провести межгрупповой (рис. 1а-г) и внутригрупповой (рис. 2а) сравнительный анализ. При профилировании метаболитов по данным РСА анализа были установлены различия между всеми исследуемыми морфологическими классами. Наблюдаемые различия могут быть связаны как с количеством и соотношением клеток, так и их специфической метаболической активностью, характерной для определенного уровня развития.

При сравнении групп анеуплоидных эмбрионов с нормальными эмбрионами того же класса достоверных отличий установлено не было, однако наблюдалась тенденция к разделению групп в соответствии с характеристиками кариотипа (рис. 2б,в). Можно предположить, что на данной стадии развития выявленные анеуплоидии либо не вносят существенного вклада в метаболическую активность эмбрионов, либо происходит адаптация к генетическим перестройкам, приводящая к сглаживанию общей картины состава метаболитов. Кроме этого, в нашем исследовании все ЭПС анеуплоидных эмбрионов были объединены в одну группу, что могло также препятствовать выявлению отличий. В перспективе разделение анеуплоидных эмбрионов на группы по отдельным аномалиям может выявить характерные сигнатуры, специфичные для определенной геномной мутации.

Нами также было продемонстрировано, что применение ВЭЖХ-МС для анализа ЭПС пятидневных эмбрионов может быть использовано для оценки их имплантационного потенциала (рис. 3). Данные результаты были получены на небольшом количестве образцов, и поэтому для более достоверной верификации данного метода оценки требуются дополнительные исследования на большей выборке. Необходимо также отметить, что не все удачные имплантации реализуются в полноценную беременность и оканчиваются родоразрешением. Это может быть связано как с нефизиологической локализацией имплантировавшегося эмбриона, так и с влиянием материнского фактора на развитие плаценты и вынашивание плода. Поэтому, кроме увеличения выборки необходимо длительное наблюдение и детальный анализ исходов беременностей после переноса эмбрионов. Ещё одним ограничением метода, в частности для точной идентификации метаболитов, определяющих наблюдаемые отличия, может быть малый объём исследуемого образца. Используемое в работе оборудование позволило выявить отличия в исследуемых группах, однако для определения конкретных метаболитов, особенно с невысокой интенсивностью сигнала путём фрагментации характеристических ионов, количества анализируемого материала может быть не достаточно. Для решения данной проблемы на основании полученных нами данных об отсутствии внутригрупповых отличий в профилях метаболитов можно предложить объединение и концентрирование образцов одного морфологического класса.

Продолжение исследований в данном направлении с использованием ВЭЖХ-МС на большем количестве образцов и идентификацией метаболитов, вносящих вклад в наблюдаемые отличия, может дать ценную информацию для понимания молекулярного портрета эмбрионов на разных стадиях развития и имеет перспективы внедрения в клиническую практику для эффективного отбора одного эмбриона с высоким имплантационным потенциалом.

ВЫВОДЫ

Профилирование метаболитов в ЭПС с помощью ВЭЖХ-МС может способствовать более точному отбору для переноса одного эмбриона с целью снижения риска нежелательных последствий многоплодной беременности.

БЛАГОДАРНОСТИ

Масс-спектрометрические данные были получены в ФБГНУ “Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича”, на оборудовании ЦКП “Протеом человека”, поддержанного Минобрнауки России, в рамках выполнения соглашения №14.621.21.0017 (уникальный идентификатор работ RFMEFI62117X0017).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Patrizio P., Sakkas D.* (2009) *Fertil. Steril.*, **91**, 1061-1066.
2. *Setti P.E., Bullett C.* (2011) *Ann. N.-Y. Acad. Sci.*, **1221**, 75-79.
3. *Wang Q., Sun Q.Y.* (2007) *Reprod. Fertil. Dev.*, **19**, 1-12.
4. *Alfarawati S., Fragouli E., Colls P., Stevens J., Gutierrez-Mateo C., Schoolcraft W.B., Katz-Jaffe M.G., Wells D.* (2011) *Fertil. Steril.*, **95**, 520-524.
5. *Gardner D.K., Lane M., Stevens J., Schoolcraft W.B.* (2001) *Fertil. Steril.*, **76**, 1175-1180.
6. *Houghton F.D., Hawkhead J.A., Humpherson P.G., Hogg J.E., Balen A.H., Rutherford A.J., Leese H.J.* (2002) *Hum. Reprod.*, **17**, 999-1005.
7. *Dominguez F., Gadea B., Esteban F.J., Horcujadas J.A., Pellicer A., Simon C.* (2008) *Hum. Reprod.*, **23**, 1993-2000.
8. *Ahlstrom A., Wikland M., Rogberg L., Barnett J.S., Tucker M., Hardarson T.* (2011) *Reproductive BioMedicine Online*, **22**, 477-484.
9. *Huang Z., Sun Y., Wang J., Du S., Li Y., Lin J., Feng S., Lei J., Lin H., Chen R., Zeng H.* (2013) *J. Biomed. Opt.*, **18**(12) 127003. DOI: 10.1117/1.JBO.18.12.127003
10. *Wallace M., Cottell E., Cullinane J., McAuliffe F.M., Wingfield M., Brennan L.* (2014) *Syst. Biol. Reprod. Med.*, **60**(1), 58-63.
11. *Сорвачева М.В., Екимов А.Н., Веюкова М.А., Екимова Е.В., Мишинева Н.Г., Аксененко А.А., Абубакиров А.Н., Трофимов Д.Ю., Барков И.Ю., Левков Л.А., Сухих Г.Т.* (2013) *Акушерство и гинекология*, №5, 107-109.
12. *Gardner D.K., Schoolcraft W.B., Jansen R., Mortimer D.* (1999) in: *In vitro culture of human blastocysts, Toward Reproductive Certainty: Fertility and Genetics Beyond*, UK Parthenon Publishing London, pp 378-388.

13. Seli E., Vergouw C.G., Morita H., Botros L., Roos P., Lambalk C.B., Yamashita N., Kato O., Sakkas D. (2010) *Fertil. Steril.*, **94**, 535-542.
14. Hardarson T., Ahlström A., Rogberg L., Botros L., Hillensjö T., Westlander G., Sakkas D., Wikland M. (2012) *Hum. Reprod.*, **27**(1), 89-96.
15. Vergouw C.G., Heymans M.W., Hardarson T., Sfountouris I.A., Economou K.A., Ahlström A., Rogberg L., Lainas T.G., Sakkas D., Kieslinger D.C., Kosteljik E.H., Hompes P.G., Schats R., Lambalk C.B. (2014) *Hum. Reprod.*, **29**(3), 455-461.
16. Cortezzi S.S., Cabral E.C., Trevisan M.G., Ferreira C.R., Setti A.S., Braga D.P., Figueira C., Iaconelli A., Eberlin M.N., Borges E. (2013) *Jr. Reproduction*, **145**(5), 453-462.
17. Yagi A., Miyana S., Shrestha R., Takeda S., Kobayashi S., Chiba H., Kamiya H., Hui S.P. (2016) *Clin. Chim. Acta.*, **456**, 100-106.
18. Sanchez-Ribas I., Riqueros M., Vime P., Puchades-Carrasco L., Jonsson T., Pineda-Lucena A., Ballesteros A., Dominguez F., Simon C. (2012) *Fertil. Steril.*, **98**(5), 1157-1164.

Поступила: 31. 08. 2017.
Принята к печати: 19. 09. 2017.

METABOLOMIC PROFILING IN CULTURE MEDIA OF DAY-5 HUMAN EMBRYOS

*I.M. Zorina¹, C.M. Eldarov¹, S.A. Yarigina¹, N.P. Makarova¹, D.Yu. Trofimov¹,
V.Yu. Smolnikova¹, E.A. Kalinina¹, M.Yu. Bobrov^{1,2}*

¹Kulakov Scientific Center of Obstetrics, Gyneacology and Perinatology,
Moscow, Russia; e-mail: mbobr@mail.ru

²Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia

The aim of this study was to determine the changes of metabolomic profiles in embryonic culture media (ECM) for the evaluation of quality and implantation potential of human embryos. ECM (n=163) were collected on day 5 before transfer or cryopreservation. Some embryos were used in preimplantation genetic screening for detection of aneuploidy karyotypes. Samples were subdivided into groups according to embryo morphological classification (by Gardner), genetic analysis and implantation data. ECM were extracted with methanol, precipitates were separated by centrifugation and metabolite production of individual embryo was analysed by LC-MS (the positive ion mode). After peak detection and retention time alignment, data were analysed using the PCA algorithm. MS fingerprinting analysis of embryo culture medium showed significant differences between morphologically divided groups. Intragroup comparisons did not reveal differences between subclasses. Genetic screening of embryos revealed 33 aneuploid karyotypes. It was shown that chromosome number did not affect the metabolite profiles comparing with the normal group. The culture media of embryos that were positive or negative for successful implantation showed specific signatures that allowed to distinguish embryos with different outcomes. The characterization of ECMs by LC-MS may facilitate more accurate selection of the best embryo for the implantation, improving single-embryo transfer and thus eliminating the risk and undesirable effects of multiple pregnancies.

Key words: metabolomics, metabolomics profiling, mass-spectrometry, human embryo, implantation