DOI: 10.31550/1727-2378-2025-24-5-7-11

BY-NC-SA

Time-lapse микроскопия в доимплантационной оценке эмбрионов человека

Т.С. Архипова[1, 2], Ю.А. Татищева[3], А.С. Калугина[3, 4], Д.А. Геркулов[3], Н.А. Сломинская[3], Н.А. Кузьминых[3], О.С. Прядкина[3], А.Ф. Сайфитдинова[1, 2, 5] ✉

[1] ФГБУН «Институт цитологии» РАН; Россия, г. Санкт-Петербург

[2] АО «Международный центр репродуктивной медицины»; Россия, г. Санкт-Петербург

[3] ООО «Скайферт»; Россия, г. Санкт-Петербург

[4] ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России; Россия, г. Санкт-Петербург

[5] ФГБОУ ВО «Российский государственный педагогический университет имени А.И. Герцена»; Россия, г. Санкт-Петербург

РЕЗЮМЕ

Цель. Прогнозирование выбора эуплоидных эмбрионов на основании морфокинетической оценки (KIDScore) развития доимплантационных эмбрионов с применением time-lapse инкубатора.
Дизайн. Ретроспективное исследование.
Материалы и методы. Исследованы 543 эмбриона человека, оплодотворенные *in vitro* и культивированные до пятого дня развития в time-lapse инкубаторе с использованием KIDScore. Преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидию (ПГТ-А) проводилось методом Next Generation Sequencing.
Результаты. Обнаружено, что среди эмбрионов из ооцитов женщин в возрасте до 36 лет включительно преобладают эуплоидные. У женщин 37 лет и старше количество анеуплоидных эмбрионов превышает количество эуплоидных. Установлены границы возраста для женщин (24–36 лет), когда может быть обоснованно применение оценки KIDScore для выбора эуплоидных эмбрионов.
Заключение. Time-lapse микроскопия не дает возможность определить мейотические ошибки в результате неправильного расхождения хромосом, что зависит от возраста матери и приводит к повышению числа анеуплоидий. Для эмбрионов из ооцитов женщин 24–36 лет с увеличением оценки KIDScore увеличивается и шанс выбора эуплоидного эмбриона с наиболее высоким потенциалом для развития. Для эмбрионов из ооцитов женщин 37 лет и старше культивирование в time-lapse инкубаторе с оценкой по шкале KIDScore только с последующим проведением ПГТ-А позволит повысить вероятность выбора наиболее жизнеспособного эмбриона.
Ключевые слова: вспомогательные репродуктивные технологии, экстракорпоральное оплодотворение, морфокинетика, преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидии, старший репродуктивный возраст.

Для цитирования: Архипова Т.С., Татищева Ю.А., Калугина А.С., Геркулов Д.А., Сломинская Н.А., Кузьминых Н.А., Прядкина О.С., Сайфитдинова А.Ф. Time-lapse микроскопия в доимплантационной оценке эмбрионов человека. Доктор.Ру. 2025;24(5):7–11. DOI: 10.31550/1727-2378-2025-24-5-7-11

Time-lapse Microscopy in Preimplant Assessment of Human Embryos

T.S. Arkhipova[1, 2], Yu.A. Tatishcheva[3], A.S. Kalugina[3], D.A. Gerkulov[3], N.A. Slominskaya[3], N.A. Kuzminykh[3], O.S. Pryadkina[3], A.F. Saifitdinova[1, 2, 5] ✉

[1] Institute of Cytology; Saint Petersburg, Russian Federation

[2] International Center for Reproductive Medicine; Saint Petersburg, Russian Federation

[3] Skyfert Clinic; Saint Petersburg, Russian Federation

[4] Pavlov First Saint Petersburg State Medical University; Saint Petersburg, Russian Federation

[5] Herzen University; Saint Petersburg, Russian Federation

ABSTRACT

Aim. Predicting the selection of euploid embryos based on morphokinetic assessment (KIDScore) of the development of preimplantation embryos using a time-lapse incubator.
Design. A retrospective study.
Materials and methods. 543 human embryos fertilized *in vitro* and cultured up to the fifth day of development in a time-lapse incubator using KIDScore were studied. Preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A) was performed using the Next Generation Sequencing method.
Results. It was found that euploid embryos predominate among the embryos from the oocytes of women under the age of 36 years inclusive. In women 37 years of age and older, the number of aneuploid embryos exceeds the number of euploid ones. Age limits have been established for women (24–36 years old), when it may be reasonable to use the KIDScore assessment to select euploid embryos.
Conclusion. Time-lapse microscopy does not provide an opportunity to identify methodological errors as a result of incorrect chromosome separation, which depends on the age of the mother and leads to an increase in the number of aneuploidies. For embryos from oocytes

✉ Сайфитдинова Алсу Фаритовна / Saifitdinova, A.F. — E-mail: saifitdinova@mail.ru

of women aged 24–36 years, with an increase in the KIDScore score, the chance of choosing a euploid embryo with the highest potential for development also increases. For embryos from oocytes of women 37 years of age and older, culturing in a time-lapse incubator with a KID Score only followed by PGT-A will increase the likelihood of choosing the most viable embryo.
Keywords: assisted reproductive technologies, *in vitro* fertilization, morphokinetics, preimplantation genetic testing for aneuploidy, older reproductive age.

For citation: Arkhipova T.S., Tatishcheva Yu.A., Kalugina A.S., Gerkulov D.A., Slominskaya N.A., Kuzminykh N.A., Pryadkina O.S., Saifitdinova A.F. Time-lapse microscopy in preimplant assessment of human embryos. Doctor.Ru. 2025;24(5):7–11. (in Russian). DOI: 10.31550/1727-2378-2024-23-5-7-11

ВВЕДЕНИЕ

Морфологическая оценка является базовым критерием характеристики эмбрионов в циклах экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), существующие данные подтверждают корреляцию морфологии эмбриона, эуплоидии и потенциала к имплантации [1, 2]. Общепринята классификация эмбрионов по Гарднеру, численно выражающая степень развития эмбриона и буквенно — состояние внутриклеточной массы и трофэктодермы [3].

Однако такая традиционная оценка имеет ограничения. Для уменьшения негативного воздействия окружающей среды при извлечении чашки с эмбрионами из инкубатора процесс оценки сильно ограничен во времени. Кроме того, существуют стандартные временны́е интервалы от момента инсеминации (16–18 часов, 72 часа и 120 часов), через которые проводится оценка развития эмбрионов. При этом важно учитывать, что процесс развития эмбриона носит динамический характер, и то, что происходит между точками контроля, остается вне поля зрения эмбриолога, а значит, не учитывается при оценке.

Постоянное совершенствование вспомогательных репродуктивных технологий способствует внедрению новых методов оценки качества доимплантационных эмбрионов человека, решающих проблему отсутствия информации о состоянии эмбриона между классическими проверками. Так, в ежедневную практику клинической эмбриологии значительный вклад вносят современные системы покадровой визуализации с применением компьютерного анализа — time-lapse инкубаторы. Подобные специализированные инкубаторы имеют встроенную камеру, позволяющую создавать серию макрофотографий эмбрионов с определенным настраиваемым интервалом времени. Компьютерный анализ осуществляется с помощью программ, созданных нейросетью специально для работы с time-lapse инкубаторами, на основании паттернов развития десятков тысяч эмбрионов с известным исходом цикла ЭКО после имплантации, позволяющих аннотировать все культивируемые эмбрионы[1].

Все это дает огромные преимущества по сравнению со стандартной оценкой: поддержание необходимых условий без изъятия эмбриона из оптимальной среды на протяжении всего времени культивирования; непрерывный мониторинг развития, позволяющий регистрировать не только все стадии развития и их время, но и особенности развития между определенными стадиями, например обратное дробление, многоядерность, вакуолизацию, синхронность деления. Таким образом, происходит переход от морфологической оценки к морфокинетической, когда вместе с морфологией учитываются скорость достижения эмбрионом каждого этапа доимплантационного развития и длительность нахождения на этом этапе.

Наиболее точно морфокинетические параметры описывает Алисон Кэмпбел в Атласе эмбриологии: «Морфокинетические переменные… обычно исчисляются в часах и определяются как время с момента инсеминации (t0) до исчезновения пронуклеусов (time to pronuclear fading, tPNf); образования двух (t2), трех (t3), четырех (t4), пяти клеток (t5) и т. д.; морулы (tM); начала бластуляции (tSB) и формирования полной бластоцисты (tB)» [2].

В то же время основным методом определения качества эмбриона остается преимплантационное генетическое тестирование на анеуплоидию (ПГТ-А), позволяющее снизить риски рождения детей с хромосомной патологией, так как морфологическая оценка не может быть использована для определения плоидности. Целью такого исследования является выявление численных хромосомных аномалий, а следовательно, предотвращение переноса анеуплоидного эмбриона и рождения ребенка с патологией [4].

Несмотря на то что ПГТ-А увеличивает шансы на наступление беременности и ее вынашивание, существует сложность проведения данного исследования, связанная с необходимостью инвазивного вмешательства — биопсии трофэктодермы. Для сокращения внешнего вмешательства и рисков повреждения эмбриона нужно определить возможность прогнозирования потенциала эмбриона к имплантации и вероятность отсутствия в нем хромосомных патологий на основании морфокинетических параметров.

Цель исследования: прогнозирование выбора эуплоидных эмбрионов на основании морфокинетической оценки (KIDScore) развития доимплантационных эмбрионов с применением time-lapse инкубатора.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения исследования использованы данные, полученные в течение 2021–2023 гг. в клинике репродукции «Скайферт» города Санкт-Петербурга после культивирования в time-lapse инкубаторе и ПГТ-А методом Next Generation Sequencing (NGS, секвенирование нового поколения) на платформе ReproSeq (Thermo Fisher Scientific). Выполнялись 100 000 прочтений на образец, что обеспечивало разрешающую способность метода менее 5 Мб. Для анализа полученных данных использовалась компьютерная система Ion Reporter. Для компьютерного анализа морфокинетических параметров эмбрионов применяли программное обеспечение EmbryoViewer (Vitrolife, Дания) и программный инструмент поддержки принятия решений KIDScore D3 (Vitrolife, Дания).

Из исследования исключали эмбрионов из замороженных ооцитов и эмбрионов, культивированных до шестого дня, так как система заведомо занижает оценку данных эмбрионов. Для снижения риска искажения интерпретации полученных результатов принято решение уменьшить количество переменных, в исследование вошли только эмбрионы из нативных ооцитов, культивированные до 5-го дня. Можно также найти опубликованные данные о более низкой

[1] *Программное обеспечение EmbryoViewer. Руководство пользователя (VitroLife.com). URL: https://clck.ru/35y8XY (дата обращения — 15.05.2025); приложение KIDScore D5 (Vitrolife.com). URL: https://clck.ru/35y8Za (дата обращения — 15.05.2025).*

эффективности циклов лечения бесплодия с использованием замороженных ооцитов, чем свежих [5, 6].

В испытания вошли 543 эмбриона, оплодотворенные *in vitro* и культивированные до 5-го дня в одношаговой среде (GLT, Vitrolife) при пониженном содержании кислорода (5%). Оплодотворение проводились путем ЭКО и интрацитоплазматической инъекции сперматозоида через 40 часов после введения триггера овуляции. Для выявления распределения количества эуплоидных и анеуплоидных эмбрионов все эмбрионы были разделены на небольшие группы в зависимости от возраста генетических матерей.

В дополнение для определения соотношения эуплоидных и анеуплоидных эмбрионов после культивирования в time-lapse инкубаторе все данные распределены на подгруппы в соответствии с оценкой KIDScore для поиска взаимосвязи между морфокинетической оценкой и результатом ПГТ-А. В подгруппу № 1 входили все эмбрионы, получившие оценку до 3,99 включительно; в подгруппу № 2 — 4–5,99; № 3 — 6–7,99; № 4 — 8–10.

Статистический анализ проводился с помощью пакета StatPlus и программы для работы с электронными таблицами Microsoft Excel. Для статистического исследования выбран непараметрический метод, U-критерий Манна — Уитни ввиду ненормальности распределения данных. Уровень значимости (p-value) принят равным 0,05. Различия между анализируемыми группами считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У женщин в возрасте до 36 лет включительно было 188 эуплоидных эмбрионов и 88 анеуплоидных, у женщин 37 лет и старше — 83 эуплоидных эмбриона и 184 анеуплоидных.

В ходе исследования воздействия возраста генетической матери на результат ПГТ-А, по данным, полученным после преимплантационного генетического тестирования методом NGS, установлено влияние возраста на соотношение эуплоидных и анеуплоидных эмбрионов (*рис. 1*).

У женщин до 36 лет включительно количество эуплоидных эмбрионов всегда превышало количество анеуплоидных ($p = 0,0014$). Доля анеуплоидных эмбрионов в этой группе составила 31,88%. У женщин 37 лет и старше всегда преобладали анеуплоидные эмбрионы или эуплоидные отсутствовали вовсе ($p = 0,00005$). Доля анеуплоидных эмбрионов в этой группе — 68,91%.

По данным, полученным в результате культивирования эмбрионов в time-lapse инкубаторе с выставлением оценок KIDScore и с последующим проведением ПГТ-А методом NGS, выявлена связь численного нарушения хромосомного набора и оценки KIDScore (*рис. 2*).

Многочисленные исследования показывают зависимость наличия анеуплоидий от возраста генетической матери, причем их количество существенно возрастает с увеличением возраста [7, 8]. Традиционно возрастом критичного повышения числа анеуплоидий считали 35 лет [9]. Полученные

Рис. 1. Распределение количества эуплоидных и анеуплоидных эмбрионов в зависимости от возраста пациенток
Fig. 1. Distribution of the number of euploid and aneuploid embryos depending on patients' age

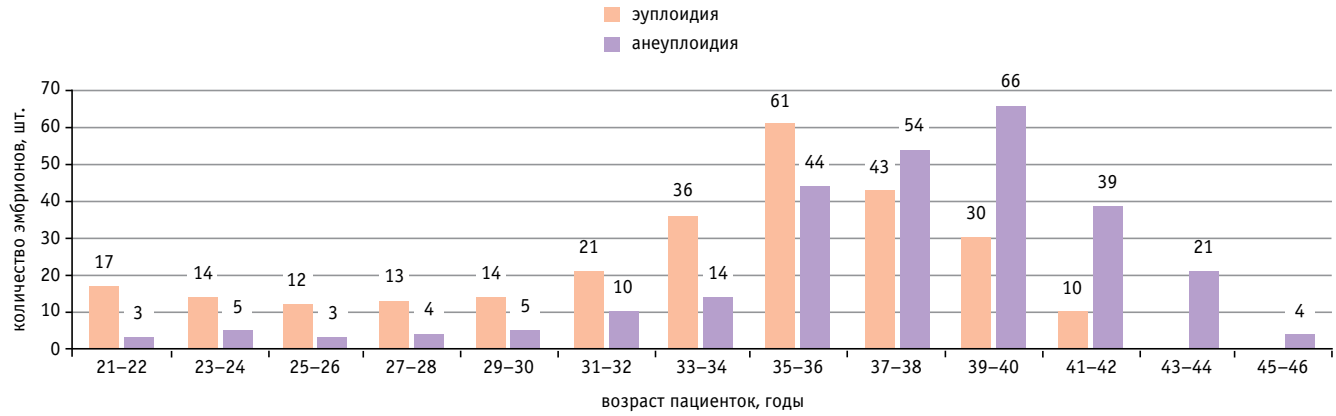
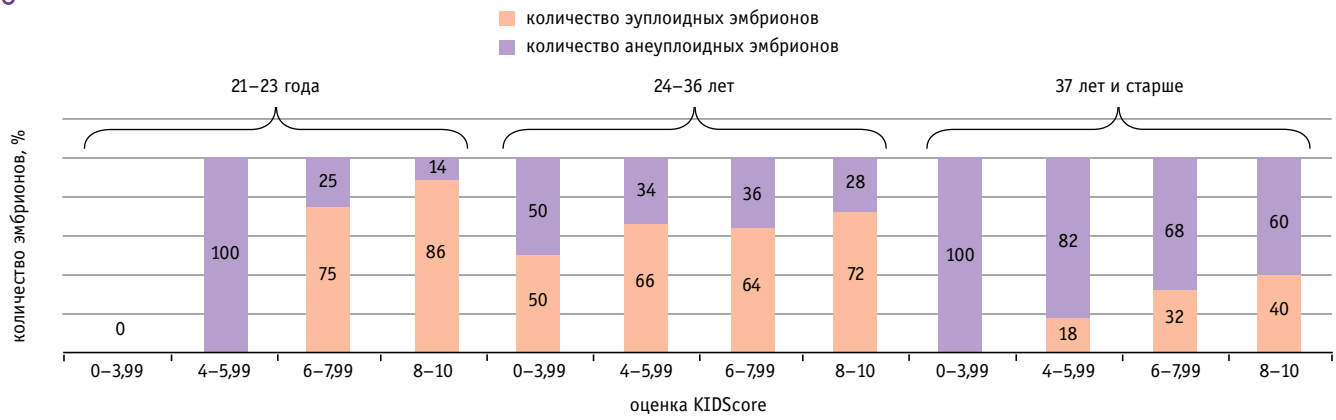


Рис. 2. Соотношение эуплоидных и анеуплоидных эмбрионов в зависимости от оценки KIDScore
Fig. 2. Ratio of euploid and aneuploid embryos depending on KIDScore value



в данном исследовании результаты не исключают заметного увеличения количества анеуплоидий с 35 лет, но показывают, что в данном возрасте количество эуплоидных эмбрионов все еще больше, и позволяют сдвинуть эту границу до 36 лет включительно.

Исследования наших коллег в области ПГТ показали корреляцию между повышенным количеством анеуплоидий и младшим репродуктивным возрастом, в особенности повышенный риск возникновения синдрома Патау (трисомии по 13 хромосоме) у пациенток до 20 лет и общее повышенное количество анеуплоидий (> 40%) у пациенток в возрасте до 23 лет. При этом наименьший уровень анеуплоидий в исследовании наблюдался в возрасте 26–37 лет (от 2 до 6%) [10–12].

Нами была предпринята попытка найти возрастную группу, в которой будет статистически значимо применение морфокинетических параметров с оценкой KIDScore с целью выбора лучшего эмбриона. При анализе полученных данных установлен возраст женщин, в котором обоснованно применение шкалы оценки эмбрионов KIDScore при культивировании в time-lapse инкубаторе, — от 24 до 36 лет (256 эмбрионов; p = 0,026 для сравнения четырех групп эмбрионов в зависимости от их оценки). Для женщин 37 лет и старше только морфокинетических параметроов для выбора эмбриона недостаточно, и необходимо проведение ПГТ (p = 0,007 для сравнения четырех групп эмбрионов в зависимости от их оценки).

Таким образом, верхней границей возраста пациенток, которым может быть рекомендован метод выбора эмбриона на перенос по результатам оценки KIDScore без проведения ПГТ-А с высокой вероятностью получения эуплоидного эмбриона, можно считать 36 лет. Однако в обеих группах по оценке KIDScore можно сделать предположение о возможном результате ПГТ. У женщин 21–23 лет не найдена связь между оценкой KIDScore и патологией развития эмбриона.

Данные литературы позволяют объяснить распределение эмбрионов в разных возрастных подгруппах, представленное на *рисунке 2*, наличием мейотических ошибок, например из-за нарушений во время сегрегации хромосом, обусловленных качеством ооцитов и возрастом матери, и митотических ошибок, вызванных нарушениями первых дроблений зиготы. Согласно параметрам работы, программа KIDScore ставит эмбрионам соответствующую оценку в результате наличия или отсутствия видимых нарушений первых дроблений и последующих нарушений в течение всего времени культивирования [2, 3, 13].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Time-lapse микроскопия не дает возможность определять мейотические ошибки в результате неправильного расхождения хромосом, что зависит от возраста матери и приводит к повышению числа анеуплоидий. Для эмбрионов из ооцитов женщин 24–36 лет с увеличением оценки KIDScore увеличивается и шанс выбора эуплоидного эмбриона с наиболее высоким потенциалом для развития. В остальных группах применение time-lapse микроскопии не может существенно снизить риск выбора анеуплоидного эмбриона на основе только морфокинетического анализа. Для эмбрионов из ооцитов женщин 37 лет и старше культивирование в time-lapse инкубаторе с оценкой по шкале KIDScore только с последующим проведением ПГТ-А позволит повысить вероятность выбора наиболее жизнеспособного эмбриона.

Вклад авторов / Contributions

Все авторы внесли существенный вклад в подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией. Вклад каждого из авторов: Архипова Т.С. — сбор и обработка материала, статистическая обработка данных, написание текста; Татищева Ю.А., Сломинская Н.А., Кузьминых Н.А., Прядкина О.С. — сбор и обработка материала, редактирование текста; Калугина А.С., Геркулов Д.А. — редактирование текста; Сайфитдинова А.Ф. — разработка концепции и дизайна исследования, редактирование текста, утверждение рукописи для публикации.

All authors made a significant contribution to the preparation of the article, read and approved the final version before publication. Special contribution: Arkhipova, T.S. — collection and processing of material, statistical data processing, writing text; Tatishcheva, Yu.A., Slominskaya, N.A., Kuzminykh, N.A., Pryadkina, O.S. — collection and processing of material, text editing; Kalugina, A.S., Gerkulov, D.A. — text editing; Saifitdinova, A.F. — development concepts and design of research, text editing, manuscript approval.

Конфликт интересов / Disclosure

Авторы заявляют об отсутствии возможных конфликтов интересов.

The authors declare no conflict of interest.

Об авторах / About the authors

Архипова Татьяна Сергеевна / Arkhipova, T.S. — аспирант ФГБУН «Институт цитологии» РАН; эмбриолог АО «МЦРМ». eLIBRARY.RU SPIN: 2724-6121. https://orcid.org/0009-0004-1368-3127. E-mail: archipova_tanya@mail.ru

Татищева Юлия Александровна / Tatishcheva, Yu.A. — к. б. н., эмбриолог, заведующая эмбриологической лабораторией ООО «Скайферт». E-mail: yuliya.tatischeva@skyfert.clinic

Калугина Алла Станиславовна / Kalugina, A.S. — профессор кафедры акушерства, гинекологии и неонатологии ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России; генеральный директор ООО «Скайферт», д. м. н., профессор. https://orcid.org/0000-0002-4796-7812. E-mail: alla19021962@gmail.com

Геркулов Дмитрий Андреевич / Gerkulov, D.A. — к. м. н., акушер-гинеколог-репродуктолог, заведующий отделением вспомогательных репродуктивных технологий ООО «Скайферт». E-mail: gerkulov@gmail.com

Сломинская Наталия Александровна / Slominskaya, N.A. — к. б. н., эмбриолог лаборатории ООО «Скайферт». E-mail: slominska@mail.ru

Кузьминых Наталья Александровна / Kuzminykh, N.A. — врач клинической лабораторной диагностики, эмбриолог лаборатории ООО «Скайферт». E-mail: natakuzminykh@gmail.com

Прядкина Оксана Сергеевна / Pryadkina, O.S. — к. б. н., эмбриолог ООО «Скайферт». E-mail: Pryadkina.oksana@icloud.com

Сайфитдинова Алсу Фаритовна / Saifitdinova, A.F. — д. б. н., старший научный сотрудник ФГБУН «Институт цитологии» РАН; профессор кафедры анатомии и физиологии человека и животных факультета биологии ФГБОУ ВО РГПУ им. А.И. Герцена; заместитель заведующего лабораторией вспомогательных репродуктивных технологий АО «МЦРМ». eLIBRARY.RU SPIN: 5114-4844. https://orcid.org/0000-0002-1221-479X. E-mail: saifitdinova@mail.ru

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. *Nazem T.G., Sekhon L., Lee J.A., Overbey J. et al. The correlation between morphology and implantation of euploid human blastocysts. Reprod. Biomed. Online. 2019;38(2):169–76. DOI: 10.1016/j.rbmo.2018.10.007*
2. *Кэмпбел А., Фишел С., ред. Атлас эмбриологии. Последовательные покадровые изображения (timelaps-технология). М.: МЕДпресс-информ; 2018. 120 с. Campbell A., Fishel S., eds. Atlas of time-lapse embryology. M.: MEDpress-inofrm; 2018. 120 p. (in Russian)*
3. *Корсак В.С., ред. Руководство по клинической эмбриологии. 3-е изд. М.: Медиа Сфера; 2022. 250 с. Korsak V.S., ed. Guide to clinical embryology. 3rd ed. M.: Media Sphera; 2022. 250 p. (in Russian)*
4. *Коган И.Ю., ред. Экстракорпоральное оплодотворение: практическое руководство для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2021. 368 с. Kogan I.Yu., ed. In vitro fertilization: a practical guide for doctors. M.: GEOTAR-Media; 2021. 368 p. (in Russian)*
5. *Braun C.B., DeSantis C.E., Lee J.C., Kissin D.M. et al. Trends and outcomes of fresh and frozen donor oocyte cycles in the United States. Fertil. Steril. 2024;122(5):844–55. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2024.07.004*
6. *Setti A.S., Braga D.P.A.F., Iaconelli A., Borges E. Fresh oocyte cycles yield improved embryo quality compared with frozen oocyte cycles in an egg-sharing donation programme. Zygote. 2021;29(3):234–38. DOI: 10.1017/S0967199420000842*
7. *La Marca A., Capuzzo M., Imbrogno M.G., Donno V. et al. The complex relationship between female age and embryo euploidy. Minerva Obstet. Gynecol. 2021;73(1):103–10. DOI: 10.23736/S2724-606X.20.04740-1*
8. *La Marca A., Capuzzo M., Longo M., Imbrogno M.G. et al. The number and rate of euploid blastocysts in women undergoing IVF/ICSI cycles are strongly dependent on ovarian reserve and female age. Hum. Reprod. 2022;37(10):2392–401. DOI: 10.1093/humrep/deac191*
9. *Баранов В.С., Кузнецова Т.В., Кащеева Т.К., Иващенко Т.Э. Пренатальная диагностика наследственных болезней: состояние и перспективы. СПб.: Эко-Вектор; 2020. 503 с. Baranov V.S., Kuznetsova T.V., Kascheeva T.K., Ivaschenko T.E. Prenatal diagnostics of genetic diseases: state and outlook. SPb.: Eco-Vector; 2020. 503 p. (in Russian)*
10. *Franasiak J.M., Forman E.J., Hong K.H., Werner M.D. et al. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophectoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. Fertil. Steril. 2014;101(3):656–63.e1. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.11.004*
11. *Wei L., Zhang J., Shi N., Luo C. et al. Association of maternal risk factors with fetal aneuploidy and the accuracy of prenatal aneuploidy screening: a correlation analysis based on 12,186 karyotype reports. BMC Pregnancy Childbirth. 2023;23(1):136. DOI: 10.1186/s12884-023-05461-4*
12. *Makinson C. The health consequences of teenage fertility. Fam. Plann. Perspect. 1985;17(3):132–9.*
13. *McCoy R.C., Summers M.C., McCollin A., Ottolini C.S. et al. Meiotic and mitotic aneuploidies drive arrest of in vitro fertilized human preimplantation embryos. Genome Med. 2023;15(1):77. DOI: 10.1186/s13073-023-01231-1*

Поступила / Received: 26.01.2024
Принята к публикации / Accepted: 26.01.2024