

Свободная ДНК в фолликулярной жидкости у женщин с различными показателями овариальной функции

Андреева Е.А.¹, Хонина Н.А.^{1,2}, Демченко Е.Н.¹, Гаврилова Е.Д.¹,
Пасман Н.М.², Козлов В.А.¹, Черных Е.Р.¹

¹ Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии (НИИФКИ)
Россия, 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет (НГУ)
Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2

РЕЗЮМЕ

Целью работы явились исследование свободной ДНК (свДНК) в фолликулярной жидкости (ФЖ) женщин, проходящих лечение по программе экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), и анализ взаимосвязи уровня свДНК с различными клиническими параметрами, а также показателями овариального резерва, фолликуло- и оогенеза.

Материалы и методы. В исследование были отобраны 53 женщины, у 49 из которых ооциты получали при стимуляции овуляции гонадотропинами, у 4 – в естественном цикле. Концентрация свободной ДНК оценивалась флуориметрическим методом с использованием прибора QuantiFluor™ Handheld Fluorometers (BioSilica, Россия).

Результаты. Образцы ФЖ содержали детектируемые концентрации свДНК, уровень которой у женщин со стимулированной овуляцией был значимо выше, чем у женщин в естественном цикле. Различий в содержании свДНК у женщин с бесплодием и доноров ооцитов не отмечалось. В то же время у женщин с более длительным периодом бесплодия (>5 лет) концентрация свДНК была выше, чем в оппозитной группе. Женщины с повышенным уровнем антимюллерового гормона, характеризовались более высоким содержанием свДНК, при этом между уровнем антимюллерового гормона и концентрацией свДНК выявлялась умеренная, но достоверная корреляционная зависимость. Наиболее высокое содержание свДНК выявлялось также в группе женщин с более высоким количеством овуляторных фолликулов. В то же время концентрация свДНК не коррелировала с количеством ооцитов.

Заключение. Уровень свДНК в ФЖ женщин может рассматриваться как дополнительный критерий эффективности ответа яичников на стимуляцию овуляции.

Ключевые слова: свободная ДНК, фолликулярная жидкость, экстракорпоральное оплодотворение, овариальный резерв, бесплодие.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Соответствие принципам этики. Все участницы исследования подписывали информированное согласие. Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИФКИ.

Для цитирования: Андреева Е.А., Хонина Н.А., Демченко Е.Н., Гаврилова Е.Д., Пасман Н.М., Козлов В.А., Черных Е.Р. Свободная ДНК в фолликулярной жидкости у женщин с различными показателями овариальной функции. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019; 18 (2): 16–23. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-16-23>.

УДК 618.11-008.6:612.621:577.218

<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-16-23>

Cell-free DNA in follicular fluid of women with different parameters of ovarian function

Andreeva E.A.¹, Khonina N.A.^{1,2}, Demchenko E.N.¹, Gavrilova E.D.¹,
Pasman N.M.², Kozlov V.A.¹, Chernykh E.R.¹

¹ Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology (RIFCI)
14, Yadrintsevskaya Str., Novosibirsk, 630099, Russian Federation

² Novosibirsk National Research State University (NSU)
2, Pirovog Str., Novosibirsk, 630090, Russian Federation

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate cell-free DNA (cfDNA) in the follicular fluid (FF) of women undergoing IVF treatment and to analyze the relationship between cfDNA levels and the parameters of folliculogenesis and oogenesis as well as the quality of embryos.

Materials and methods. The study included 53 women aged 20 to 45 years. In 49 patients, oocytes were obtained by stimulating ovulation with gonadotropins, and 4 patients underwent natural cycle IVF without hormonal stimulation. Measurement of cfDNA was carried out by fluorimetry using QuantiFluor™ Handheld Fluorometers (BioSilica, Russian Federation).

Results. The FF of women with ovulation stimulation revealed a higher level of cfDNA as opposed to FF of women in the natural cycle. There were no differences in the cfDNA levels in women with infertility and oocyte donors. Women with infertility lasting for more than 5 years had a higher level of cfDNA. Women with the elevated anti-Müllerian hormone (AMH) levels were characterized by the high FF cfDNA concentration and a large number of follicles. Likewise, correlation analysis showed that FF cfDNA was significantly and positively correlated with the AMH level. The obtained data revealed the participation of cfDNA in different stages of oogenesis.

Conclusions. The level of FF cfDNA in women may serve as an additional biomarker of the effectiveness of ovulation induction.

Key words: cell free DNA, follicular fluid, IVF, ovarian reserve, infertility.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Source of financing. The authors state that there is no funding for the study.

Conformity with the principles of ethics. All women who were included in the study signed an informed consent. The study was approved by the local ethics committee RIFCI.

For citation: Andreeva E.A., Khonina N.A., Demchenko E.N., Gavrilova E.D., Pasman N.M., Kozlov V.A., Chernykh E.R. Cell-free dna in follicular fluid of women with different parameters of ovarian function. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019; 18 (2): 16–23. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2019-2-16-23>.

ВВЕДЕНИЕ

Среди различных биомаркеров патологических процессов свободная внеклеточная ДНК (свДНК) в последнее время привлекает большое внимание [1]. Несвязанная с клетками ДНК является в различных биологических жидкостях организма [2–4], ее концентрация возрастает при

целом ряде заболеваний (онкологические, ауто-иммунные, посттравматический синдром) [5–9], включая акушерско-гинекологическую патологию [10], что обуславливает интерес к исследованию диагностической и прогностической значимости свДНК [11–14].

Наличие свДНК в фолликулярной жидкости (ФЖ) связано с апоптозом и некрозом клеток,

окужающих растущий ооцит по мере интенсивного роста фолликула [15]. В этом аспекте концентрация свДНК в ФЖ может являться дополнительным показателем влияния стимуляции гонадотропинами на процесс фолликулогенеза и оогенеза. Оценка овариального резерва женщины является обязательным условием для подбора оптимального протокола стимуляции овуляции в программе вспомогательных репродуктивных технологий. Для этого перед вступлением в программу экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) у женщины определяют уровень антимюллерового гормона (АМГ) и число антральных фолликулов (АФ) [16–18]. Однако определение этих показателей не во всех случаях позволяет правильно подобрать оптимальную дозу гонадотропинов для стимуляции овуляции, что чревато развитием опасного синдрома гиперстимуляции яичников. Поэтому уровень свДНК в ФЖ может представлять интерес в качестве дополнительного маркера эффективности ответа яичников на стимуляцию. Еще одним важным параметром, определяющим успешное развитие эмбриона и наступления беременности, является качество ооцитов, во многом определяющее исходы ЭКО. Однако значение свДНК как показателя овариального резерва и биомаркера эффективности стимуляции овуляции остается недостаточно исследованным. Таким образом, целью работы явились оценка уровня свДНК в образцах ФЖ жен-

щин, находящихся в программе ЭКО, и анализ взаимосвязи свДНК с клиническими параметрами и показателями овариальной функции, фолликуло- и оогенеза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 53 женщины, из них 49 проводили стимуляцию овуляции гонадотропинами, четырем пациенткам процедуру ЭКО осуществляли в естественном цикле. Отдельную группу составили 5 фертильных женщин – доноры ооцитов, у которых для стимуляции овуляции также использовали гонадотропины. Забор материала осуществляли на базе ООО «Клиника профессора Пасман» (г. Новосибирск), последующая обработка ФЖ и исследование содержания свДНК в ФЖ проводили в лаборатории НИИФКИ (г. Новосибирск). Возраст женщин с бесплодием варьировал от 20 до 45 лет (медиана 33,2), из них женщины раннего репродуктивного возраста (<35 лет) составили 56,6%, позднего (≥35 лет) – 43,4%; длительность бесплодия – от 1 года до 18 лет (медиана 7,1). Первичное бесплодие было диагностировано у 52% женщин, вторичное – у 48 (таблица). Причиной бесплодия в 13% случаев был мужской фактор, в 87% случаев – женское бесплодие. Причиной женского бесплодия в 45% случаев являлся трубно-перитонеальный фактор, 5% – эндокринный фактор, 50% – сочетанное бесплодие.

Таблица
Table

Свободная ДНК в фолликулярной жидкости у женщин с различными клиническими параметрами, нг/мл Cell free DNA in the follicular fluid in women with different clinical parameters, ng/ml				
Параметр Parameter	Кол-во, % Number, %	$Me (LQ-UQ)$	$Min-Max$	p_u p_u
Бесплодие: Infertility:				
– мужское (a) – male (a)	13	40,9 (29,3–45,2)	20,9–47,6	–
– женское (b) – female (b)	87	39,2 (31,1–52,2)	19,8–65,9	$p_{ab} = 0,6$
Трубно-перитонеальный фактор (c) Tubal and peritoneal factor (c)	45	39,7 (31,6–50,7)	19,9–65,9	$p_{ac} = 0,6$
Эндокринный фактор (d) Endocrine factor (d)	5	35,5 (31,1–40,0)	31,0–40,2	$p_{ad} = 0,8$
Сочетанное бесплодие (e) Concomitant infertility (e)	50	36,7 (26,9–53,1)	19,8–60,9	$p_{ac} = 0,8$
Бесплодие: Infertility:				0,95
– первичное (a) – primary (a)	52	40,0 (19,8–60,9)	29,3–52,2	–
– вторичное (b) – secondary (b)	48	41,1 (19,9–65,9)	33,8–50,9	–

Окончание табл.
End of table

Параметр Parameter	Кол-во, % Number, %	$Me (LQ-UQ)$	$Min-Max$	p_u p_u
Женщины с бесплодием ($n = 44$) Women with infertility ($n = 44$)	90	40,3 (30,7 ± 50,8)	19,8–65,9	0,44
Доноры ооцитов ($n = 5$) Oocyte donors ($n = 5$)	10	43,8 (33,9–53,6)	32,8–57,9	–

* p – достоверность различий по U -критерию Манна – Уитни.* p – statistical significance of the differences using Mann – Whitney test.

Гормональный статус определяли на 2–3-й день менструального цикла у каждой пациентки. Средний уровень фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), лютеинизирующего гормона и простагландина Е2 в указанные сроки составлял, соответственно, $8,4 \pm 4,7$ МЕ/л; $6,2 \pm 5,6$ МЕ/л и $178 \pm 175,2$ пмоль/л. Процедура ЭКО (инсеминация *in vitro*) была проведена у 47% женщин, интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида (IntraCytoplasmic Sperm Injection, ICSI, ИКСИ) – у 53%. Выбор протокола стимуляции опирался на анамнез и овариальный резерв женщины: 44 из них стимулировали по протоколу антагонистов (короткий протокол), 5 женщин – по протоколу агонистов ГнРг (длинный протокол). Стимуляция яичников проводилась препаратами рекомбинантного или менопаузального ФСГ. Ответ яичников на стимуляцию контролировали путем ультразвуковой оценки роста фолликулов и эндометрия.

Третью группу составили 4 женщины в естественном цикле без введения препаратов ФСГ. Стимуляция овуляции у всех пациенток индуцировалась инъекцией 250 мкг человеческого хорионического гонадотропина, когда один доминирующий фолликул (естественный цикл) или три и более фолликула (стимулированный цикл) достигали диаметра 18 мм при ультразвуковом исследовании. Через 36 ч с момента введения триггера овуляции проводили извлечение ооцитов с помощью трансвагинальной ультразвуковой аспирации. В этот момент осуществлялся сбор образцов ФЖ из доминантных фолликулов. В случае видимой контаминации образцов ФЖ кровью исследование не проводили. Образцы ФЖ центрифугировали при 2 000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость собирали, замораживали и хранили при температуре -80°C . Концентрацию ДНК оценивали флуориметрическим методом с использованием прибора QuantiFluor™ Handheld Fluorometers и коммерческих наборов Blood DNA Isolation Kit фирмы BioSilica Ltd. (г. Новосибирск) в соответствии с инструкциями производителя.

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ Statistica 6.0 для Windows. Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали критерий Манна – Уитни (U) для непарных выборок. Корреляционный анализ проводили методом ранговой корреляции Спирмана (r). Данные представлены в виде медианы, интерквартильного диапазона $Me (LQ-UQ)$, минимальных и максимальных значений $Min-Max$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведенные исследования выявили наличие в ФЖ женщин со стимуляцией овуляции наличие свДНК, уровень которой варьировал в пределах 19,8–65,9 нг/мл (медиана Me 40,3 нг/мл). Характерно, что образцы ФЖ, полученные в естественном цикле (без введения гонадотропинов), содержали достоверно меньшие концентрации свДНК, чем ФЖ женщин со стимулированной овуляцией (26,8 vs 40,3 нг/мл; $p_u = 0,03$) (рис. 1, а). То есть стимуляция овуляции ассоциировалась с более высоким содержанием в ФЖ свДНК, чем овуляция в естественном цикле. При этом в циклах стимулированной овуляции женщины с бесплодием не отличались по уровню свДНК от женщин-доноров ооцитов (40,3 vs 43,8 нг/мл; $p_u = 0,44$), на основании чего эти группы были объединены при последующем анализе.

Учитывая исходную клиническую гетерогенность исследуемой группы, первоначально было проанализировано, влияют ли такие факторы, как возраст, длительность бесплодия, а также форма и причина бесплодия на уровень свДНК. Анализ образцов ФЖ женщин раннего (<35 лет) и позднего (≥ 35 лет) репродуктивного возраста не выявил достоверных различий в уровне свДНК (рис. 1, б). В то же время умеренно выраженные, но статистически достоверные различия в концентрации свДНК были выявлены в группах с различной продолжительностью бесплодия. Так, в ФЖ женщин с бесплодием более 5 лет уровень свДНК был выше, чем в группе с длительностью

бесплодия ≤ 5 лет (36,6 vs 40,9 нг/мл; $p_u = 0,03$) (рис. 1, с). Уровень свДНК в группах женщин с первичным и вторичным бесплодием (40,0 vs 41,1 нг/мл), мужским и женским факторами бесплодия (40,9 vs 39,2 нг/мл), а также с различными факторами женского бесплодия (трубно-перитонеальным, эндокринным, сочетанным) значимо не различались (см. таблицу). Учитывая отсутствие сопряженности свДНК с большинством клинических параметров, изучение взаимосвязи между количеством свДНК и параметрами, характеризующими фолликуло- и оогенез, проводилось в общей группе пациенток.

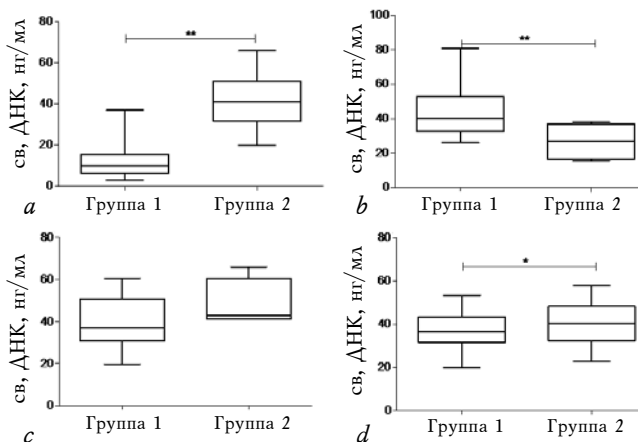


Рис. 1. Уровень свДНК в фолликулярной жидкости у бесплодных женщин с различными клиническими параметрами: а – в стимулированном (группа 1) и естественном (группа 2) циклах; б – в возрастных группах <35 лет (группа 1) и ≥35 лет (группа 2); в – в группах с продолжительностью бесплодия ≤5 лет (группа 1) и >5 лет (группа 2). Здесь и в рис. 2: данные представлены в виде медианы, интерквартильного диапазона (LQ–UQ), Min–Max. * $p_u < 0,05$; ** $p_u < 0,01$ (критерий Манна – Уитни)

Fig. 1. The level of cfDNA in follicular fluid in women with different clinical parameters: а – in stimulated (group 1) and natural (group 2) cycles; б – in the age groups <35 years (group 1) and ≥35 years (group 2); в – in groups with duration of infertility ≤5 years (group 1) and >5 years (group 2). Here and in Fig. 2: data are presented as a median (Me), interquartile range (LQ–UQ), Min–Max. * $p_u < 0,05$; ** $p_u < 0,01$ (Mann – Whitney test)

Одним из важных параметров при определении тактики ЭКО и подборе протокола стимуляции является овариальный резерв женщин, который включает оценку базального уровня АМГ и числа АФ. Поэтому на первом этапе исследовали взаимосвязь между данными показателями и содержанием свДНК в ФЖ. В зависимости от ко-

личества АФ, способных отвечать на стимуляцию суперовуляции, женщин разделили на три группы: АФ <5 (группа 1); АФ 5–14 (группа 2); и АФ >14 (группа 3). Уровень свДНК в группе 3 был в 1,3 раза выше, чем в группе 1 (47,8 vs 37,8; $p_u = 0,04$) (см. рис. 2, а). Тем не менее достоверной корреляционной связи между указанными параметрами не выявили ($r = 0,22$; $p = 0,1$).

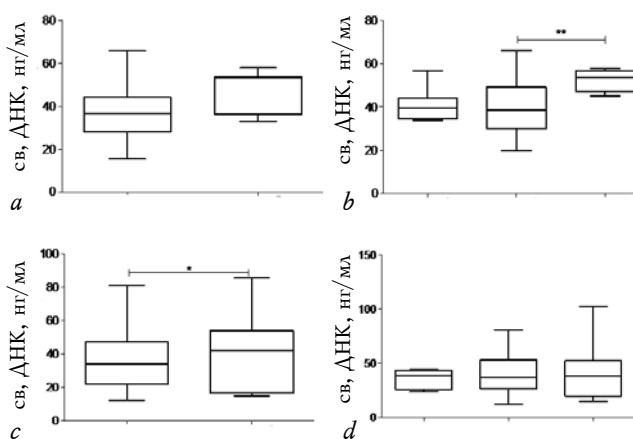


Рис. 2. Уровень свДНК в фолликулярной жидкости у бесплодных женщин в стимулированных циклах овуляции в зависимости от показателей овариального резерва, количества фолликулов и ооцитов: а – АФ <5 (группа 1), АФ 5–14 (группа 2) и АФ >14 (группа 3); б – уровень АМГ <1,0 нг/мл (группа 1), 1,0–6,0 нг/мл (группа 2), >6,0 нг/мл (группа 3); в – количество овуляторных фолликулов <12 (группа 1), ≥12 (группа 2); д – количество ооцитов <4 (группа 1), 4–8 (группа 2), >8 (группа 3)

Fig. 2. The level of cfDNA in the follicular fluid in women in stimulated ovulation cycles, depending on the parameters of the ovarian reserve and the number of follicles and oocytes. The data are presented on the content of cfDNA: а – AF <5 (group 1), AF 5–14 (group 2) and AF >14 (group 3); б – level of AMH <1.0 ng/ml (group 1), 1.0–6.0 ng/ml (group 2), >6.0 ng/ml (group 3); в – number of ovulatory follicles <12 (group 1), ≥12 (group 2); д – number of oocytes <4 (group 1), 4–8 (group 2), >8 (group 3).

В зависимости от уровня АМГ все женщины также были разделены на три группы: с низким (<1,0 нг/мл; группа 1), средним (1,0–6,0 нг/мл; группа 2) и высоким (>6,0 нг/мл; группа 3) уровнем гормона. Содержание свДНК в ФЖ у женщин группы 3 было достоверно выше, чем у женщин группы 2 (53,7 vs 38,5; $p_u = 0,01$) и в виде выраженного тренда превышало аналогичный показатель в группе 1 (53,7 vs 41,0; $p_u = 0,059$) (рис. 2, б). При этом между уровнем АМГ и концентрацией свДНК отмечалась умеренная прямая корреляционная взаимосвязь ($r = 0,31$; $p = 0,03$).

Важно отметить, что ответ яичников на стимуляцию существенно различался, что проявлялось вариациями в количестве овуляторных фолликулов и полученных ооцитов. Оценка содержания свДНК с учетом данных параметров показала, что концентрация свДНК в образцах ФЖ женщин с высоким количеством овуляторных фолликулов (≥ 12) составляла 44,2 (40,0–53,6) нг/мл и была достоверно выше, чем у женщин с меньшим (< 12) количеством фолликулов 36,6 (29,8–47,5) нг/мл; $p_u = 0,04$ (см. рис. 2, с). Однако значимой корреляционной связи между указанными параметрами не выявили ($r = 0,25$; $p = 0,1$). Для анализа взаимосвязи свДНК с количеством ооцитов, получаемых при трансвагинальной пункции яичников, женщин разделили на три группы – с низким (< 4 ; группа 1), средним (4–8; группа 2) и высоким (> 8 ; группа 3) содержанием ооцитов. Уровень свДНК в ФЖ женщин в сформированных группах значимо не различался (см. рис. 2, d).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании продемонстрировано, что содержание свДНК в ФЖ женщин со стимулированной овуляцией значимо выше, чем в естественных циклах. Полученные результаты согласуются с данными других авторов, которые выявили наличие свДНК в ФЖ женщин со стимулированной овуляцией [14, 19–21] и показали прямую взаимосвязь между концентрацией свДНК и дозой гонадотропина [14]. Данные о наличии свДНК в ФЖ женщин в естественных циклах ранее в литературе не освещались и, учитывая иммуномодулирующие свойства ДНК [5], могут послужить основой для исследования новых аспектов иммунно-эндокринных взаимодействий в регуляции фолликулогенеза и созревания ооцитов.

Анализ влияния различных клинических параметров на уровень свДНК в ФЖ (возраст, первичное или вторичное бесплодие, причина бесплодия) показал, что указанные факторы не влияли на содержание свДНК. В то же время большая длительность бесплодия ассоциировалась с более высоким уровнем свДНК, что может быть обусловлено усилением апоптотических процессов на фоне длительно протекающих воспалительных процессов и гормональных дисфункций [22, 23].

Одной из важнейших задач при подборе протокола стимуляции яичников у женщин, находящихся в программе ЭКО, является оценка овариального резерва. Выбор оптимального про-

токола позволяет получить оптимальное число фолликулов и, соответственно, достаточное число ооцитов и эмбрионов, чтобы отобрать для переноса эмбрионы высокого качества. У пациенток с нарушениями овариального резерва подобная задача становится фактически неразрешимой. Полученные нами данные показали сопряженность свДНК с уровнем сывороточного АМГ и количеством АФ, которые, по данным литературы, характеризуют овариальный резерв [16, 18]. В частности, у женщин с повышенным уровнем АМГ (> 6 нг/мл) регистрировалась наиболее высокая концентрация свДНК, при этом между указанными параметрами обнаруживалась прямая корреляционная взаимосвязь. Это, по-видимому, связано со способностью АМГ (в высоких концентрациях) вызывать в клетках гранулозы оксидативный стресс и индукцию Fas/FasL-опосредованного апоптоза, что сопровождается высвобождением свДНК [15].

Высокий уровень АМГ наиболее часто выявляется при большом количестве АФ у женщин с синдромом поликистозных яичников (СПКЯ) и мультифолликулярными яичниками. Так, S. Traver и соавт. выявили повышенный уровень свДНК в группе женщин с СПКЯ [14]. В настоящем исследовании продемонстрировано, что наличие большого числа АФ (> 14) у женщин с мультифолликулярными яичниками также ассоциируется с высокой концентрацией свДНК. Интересно отметить, что S. Traver и соавт. в своих исследованиях выявили повышенный уровень свДНК (в виде тренда) не только в группе с СПКЯ, но и у женщин со сниженным овариальным резервом.

Одним из новых фактов, полученных в нашем исследовании, стали данные о сопряженности высоких концентраций свДНК с большим количеством овуляторных фолликулов. Это, по-видимому, объясняется тем, что созревание большого количества фолликулов при стимуляции гонадотропинами сопровождается выраженными процессами апоптоза клеток гранулезы [24].

По данным литературы, крупные фолликулы с ооцитами высокого качества содержат меньше свДНК, чем мелкие фолликулы с незрелыми ооцитами [21]. В наших исследованиях мы не выявили различий в концентрации свДНК в зависимости от количества ооцитов. Возможно, это связано с тем, что для исследований отбирали образцы ФЖ только из крупных фолликулов. Таким образом, уровень свДНК в ФЖ может служить дополнительным биомаркером эффективности ответа яичников на стимуляцию гонадотропинами.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Козлов В.А. Свободная внеклеточная ДНК в норме и при патологии. *Медицинская иммунология*. 2013; 15 (5): 399–412. [Kozlov V.A. Free extracellular DNA in normal state and under pathological conditions. *Medical Immunology*. 2013; 15 (5): 399–412 (in Russ.)].
2. Boissière A., Gala A., Ferrières-Hoa A., Mullet T., Baillet S., Petiton A., Torre A., Hamamah S. Cell-free and intracellular nucleic acids: new non-invasive biomarkers to explore male infertility. *Basic Clin. Androl.* 2017; 27: 7. DOI: 10.1186/s12610-017-0052-0.
3. Li H.-G., Huang S.-Y., Zhou H., Liao A.-H., Xiong C.-L. Quick recovery and characterization of cell-free DNA in seminal plasma of normozoospermia and azoospermia: implications for non-invasive genetic utilities. *Asian J. Androl.* 2009; 11 (6): 703–709. DOI: 10.1038/aja.2009.65.
4. Tzimagiorgis G., Michailidou E.Z., Kritis A., Markopoulos A.K., Koudou S. Recovering circulating extracellular or cell-free RNA from bodily fluids. *Cancer Epidemiol.* 2011; 35 (6): 580–589. DOI: 10.1016/j.canep.2011.02.016.
5. Fűri I., Kalmár A., Wichmann B., Spisák S., Schöller A., Barták B., Tulassay Z., Molnár B. Cell free DNA of tumor origin induces a ‘metastatic’ expression profile in HT-29 cancer cell line. *PLoS One*. 2015; 10 (7). DOI: 10.1371/journal.pone.0131699.
6. Lam N.Y., Rainer T.H., Chan L.Y., Joynt G.M., Lo Y.M. Time course or early and late changes in plasma DNA in trauma patients. *Clin. Chem.* 2003; 49 (8): 1286–1291.
7. Ralla B., Stephan C., Meller S., Dietrich D., Kristiansen G., Jung K. Nucleic acid-based biomarkers in body fluids of patients with urologic malignancies. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2014; 51 (4): 200–231. DOI: 10.3109/10408363.2014.914888.
8. Thierry A.R., El Messaoudi S., Gahan P.B., Anker P., Stroun M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev.* 2016; 35 (3): 347–376. DOI: 10.1007/s10555-016-9629-x.
9. Wang W., Kong P., Ma G., Li L., Zhu J., Xia T., Xie H., Zhou W., Wang S. Characterization of the release and biological significance of cell-free DNA from breast cancer cell lines. *Oncotarget*. 2017; 8 (26): 43180–43191. DOI: 10.18632/oncotarget.17858.
10. Traver S., Assou S., Scalici E., Haouzi D., Al-Edani T., Belloc S., Hamamah S. Cell-free nucleic acids as non-invasive biomarkers of gynecological cancers, ovarian, endometrial and obstetric disorders and fetal aneuploidy. *Hum. Reprod. Update*. 2014; 20 (6): 905–923. DOI: 10.1093/humupd/dmu031.
11. Assou S., Ant-Ahmed O., El Messaoudi S., Thierry A.R., Hamamah S. Non-invasive pre-implantation genetic diagnosis of X-linked disorders. *Med. Hypotheses*. 2014; 83 (4): 506–508. DOI: 10.1016/j.mehy.2014.08.019.
12. Kevin P. Daly Circulating donor-derived cell-free DNA: a true biomarker for cardiac allograft rejection? *Ann. Transl. Med.* 2015; 3 (4): 47. DOI: 10.3978/j.issn.2305-5839.2015.01.35.
13. Quezada M.S., Francisco C., Dumitrascu-Biris D., Nicolaides K.H., Poon L.C. Fetal fraction of cell-free DNA in maternal plasma in the prediction of spontaneous preterm delivery. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* 2015; 45 (1): 101–105. DOI: 10.1002/uog.14666.
14. Traver S., Scalici E., Mullet T., Molinari N., Vincens C., Anahory T., Hamamah S. Cell-free DNA in human follicular microenvironment: new prognostic biomarker to predict *in vitro* fertilization outcomes. *PLoS One*. 2015; 10 (8): e0136172. DOI: 10.1371/journal.pone.0136172.
15. Guan Y., Zhang W., Wang X., Cai P., Jia Q., Zhao W. Cell-free DNA induced apoptosis of granulosa cells by oxidative stress. *Clin. Chim. Acta*. 2017; 473: 213–217. DOI: 10.1016/j.cca.2016.11.023.
16. Broer S.L., Dylleman M., Opmeer B.C., Fauser B.C., Mol B.W., Broekmans F.J. AMH and AFC as predictors of excessive response in controlled ovarian hyperstimulation: a meta-analysis. *Hum. Reprod. Update*. 2011; 17 (1): 46–54. DOI: 10.1093/humupd/dmq034.
17. Tal R., Tal O., Seifer B.J., Seifer D.B. Antimüllerian hormone as predictor of implantation and clinical pregnancy after assisted conception: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2015; 103 (1): 119–130. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2014.09.041.
18. Iwase A., Nakamura T., Osuka S., Takikawa S., Goto M., Kikkawa F. Anti-Müllerian hormone as a marker of ovarian reserve: What have we learned, and what should we know? *Reprod. Med. Biol.* 2015; 15 (3): 127–136. DOI: 10.1007/s12522-015-0227-3.
19. Al-Saleh I., El-Doush I., Arif J., Coskun S., Jaroudi K., Al-Shahrani A., El-Din Mohamed G. Levels of DNA adducts in the blood and follicular fluid of women undergoing *in vitro* fertilization treatment and its correlation with the pregnancy outcome. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2010; 84 (1): 23–28. DOI: 10.1007/s00128-009-9889-z.
20. Dimopoulou M., Anifandis G., Messini C.I., Dafopoulos K., Kouris S., Sotiriou S., Satra M., Vamvakopoulos N., Messinis I.E. Follicular fluid oocyte/cumulus-free DNA concentrations as a potential biomolecular marker of embryo quality and IVF outcome. *BioMed Research International*. 2014; 2014: 289306. DOI: 10.1155/2014/289306.
21. Scalici E., Traver S., Molinari N., Mullet T., Monforte M., Vintejoux E., Hamamah S. Cell-free DNA in human follicular fluid as a biomarker of embryo quality. *Hum. Reprod.* 2014; 29 (12): 2661–2669. DOI: 10.1093/humrep/deu238.
22. Czamanski-Cohen J., Sarid O., Cwikel J., Levitas E., Lunenfeld E., Douvdevani A., Har-Vardi I. Decrease in cell free DNA levels following participation in stress reduction techniques among women undergoing infertility treatment. *Arch. Womens Ment. Health*. 2014; 17 (3): 251–253. DOI: 10.1007/s00737-013-0407-2.

23. Lynch C.D., Sundaram R., Maisog J.M., Sweeney A.M., Buck Louis G.M. Preconception stress increases the risk of infertility: results from a couple-based prospective cohort study—the LIFE study. *Hum. Reprod.* 2014; 29 (5): 1067–1075. DOI: 10.1093/humrep/deu032 PMID: 24664130.
24. Liu S., Feng H.L., Marchesi D., Chen Z.J., Hershlag A. Dose-dependent effects of gonadotropin on oocyte developmental competence and apoptosis. *Reprod. Fertil. Dev.* 2011; 23 (8): 990–996. DOI: 10.1071/RD11079 PMID: 22127004.

Вклад авторов

Андреева Е.А. – отбор пациентов, сбор образцов ФЖ, пробоподготовка для оценки свДНК, анализ клинических данных, подготовка текста статьи. Демченко Е.Н., Гаврилова Е.Д. – пробоподготовка и анализ свДНК в образцах ФЖ. Хонина Н.А. – анализ и интерпретация данных, подготовка текста статьи. Пасман Н.М. – подготовка текста статьи. Козлов В.А., Черных Е.Р. – окончательное утверждение для публикации рукописи.

Authors contribution

Andreeva E.A. – selection of the patients, collection of the FF samples, preparation of the samples for evaluating cfDNA, analysis of the clinical data, drafting of the manuscript. Demchenko E.N., Gavrilova E.D. – preparation of the samples and analysis of cfDNA in the FF samples. Khonina N.A. – analysis and interpretation of the data, drafting of the manuscript. Pasman N.M. – drafting of the manuscript. Kozlov V.A., Chernykh E.R. – final approval of the manuscript for publication.

Сведения об авторах

Андреева Евгения Александровна, аспирант, НИИФКИ, г. Новосибирск.

Хонина Наталья Алексеевна, д-р мед. наук, вед. науч. сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии, НИИФКИ; профессор, медицинский факультет, НИГУ, г. Новосибирск.

Демченко Елена Николаевна, канд. хим. наук, науч. сотрудник, лаборатория экспериментальной иммунотерапии, НИИФКИ, г. Новосибирск.

Гаврилова Елена Давидовна, канд. биол. наук, ст. науч. сотрудник, лаборатория экспериментальной иммунотерапии, НИИФКИ, г. Новосибирск.

Пасман Наталья Михайловна, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой акушерства и гинекологии, НИГУ, г. Новосибирск.

Козлов Владимир Александрович, д-р мед. наук, профессор, академик РАН, науч. руководитель НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0002-1756-1782.

Черных Елена Рэмовна, д-р мед. наук, профессор, член-корреспондент РАН, зав. лабораторией клеточной иммунотерапии, НИИФКИ, г. Новосибирск. ORCID iD 0000-0003-2346-6279.

(✉) Андреева Евгения Александровна, e-mail: evga_91@mail.ru.

Authors information

Andreeva Evgeniya A., PhD-student, Laboratory of Cellular Immunotherapy, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation.

Khonina Natalia A., DM, Leading Researcher, Laboratory of Cellular Immunotherapy, RIFCI; Medical Department, NSU, Novosibirsk, Russian Federation.

Demchenko Elena N., PhD, Researcher, Laboratory of Experimental Immunotherapy, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation.

Gavrilova Elena D., PhD, Researcher, Laboratory of Experimental Immunotherapy, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation.

Pasman Natalia M., DM, Head of Obstetrics and Gynecology Division, Medical Department, NSU, Novosibirsk, Russian Federation.

Kozlov Vladimir A., DM, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Scientific Supervisor of RIFCI, Head of the Laboratory of Clinical Immunopathology, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0002-1756-1782.

Chernykh Elena R., DM, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Laboratory of Cellular Immunotherapy, RIFCI, Novosibirsk, Russian Federation. ORCID iD 0000-0003-2346-6279.

(✉) Andreeva Evgeniya A., e-mail: evga_91@mail.ru.

Поступила в редакцию 06.07.2018
Подписана в печать 14.12.2018

Received 06.07.2018
Accepted 14.12.2018