

Morfokinētiskās un morfoloģiskās embriju atlasēšanas metodes ietekme uz agrīnu grūtniecības izjukšanu

Anna Miskova¹, Diāna Andžāne², Violeta Fodina³

¹ Rīgas Stradiņa universitāte, Dzemdniecības un ginekoloģijas katedra, Latvija
dr.anna.miskova@gmail.com

² Rīgas Stradiņa universitāte, Medicīnas fakultāte, Latvija

³ Klīnika "iVF Rīga", Latvija

Kopsavilkums

Ievads. Agrīna grūtniecības izjukšana (AGI) ir visbiežākā komplikācija agrīnā grūtniecības periodā. Aptuveni 80% spontāno abortu notiek līdz grūtniecības 12. nedēļai, visbiežāk – augļa hromosomālo anomāliju dēļ. Mūsdienīgu asistēto reproduktīvo tehnoloģiju lietošana, piemēram, morfokinētiskā embriju atlase, varētu samazināt AGI risku.

Darba mērķis. Izpētīt atšķirības agrīnas grūtniecības izjukšanas biežumā, atlasot embrijus ar morfoloģisko un laiksprīžu uzraudzības (*time-lapse monitoring*) morfokinētisko metodi.

Materiāls un metodes. Pētījums tika veikts klīnikā "iVF Rīga". Pētījuma grupā bija iekļautas 118 pacientes, kuru embriji tika atlasīti, izmantojot laiksprīžu uzraudzības morfokinētisko metodi. Kopā šīm pacientēm 146 embriotransfēru (ET) laikā tika pārnesti 243 embriji. Kontroles grupā tika iekļautas 249 pacientes, kuru embriji tika kultivēti standarta inkubatorā un atlasīti embriotransfēriem, izmantojot morfoloģisko metodi. Šajā grupā tika veikti 386 ET ar 638 embrijiem.

Rezultāti. Klīniskā grūtniecība vienādi bieži iestājās gan kontroles grupā (41,1%), gan pētījuma grupā (36,6%) (izredžu attiecības (OR) – 1,21; 95% ticamības intervāls (TI) – 0,82–1,79; $p = 0,332$). AGI, rēķināta uz grūtniecību skaitu, statistiski ticami retāk bija pētījuma grupā (28,4% vs. 41,8%; OR – 0,55; TI – 0,31–0,99; $p = 0,044$). Rēķinot uz pārnesto embriju skaitu, AGI statistiski ticami retāk arī bija pētījuma grupā (9,1% vs. 19,1%; OR – 0,41; TI – 0,17–0,97; $p = 0,043$).

Embriju implantācija pētījuma grupā notika 31,7% gadījumu, bet kontroles grupā – tikai 28,1%, taču šis rezultāts nav statistiski ticams. Pētījuma grupā sievietēm vecumā līdz 35 gadiem un autologām olšūnām visi implantētie embriji veiksmīgi sasniedza 12. grūtniecības nedēļu, bet kontroles grupā 25% implantētu embriju gāja bojā (OR – 0,48; TI – 0,38–0,61; $p < 0,001$).

Secinājumi. Embriju atlase ar laiksprīžu uzraudzības morfokinētisko metodi samazina agrīnas grūtniecības izjukšanas biežumu pacientēm, kurām lietota mākslīgā apaugļošana.

Atslēgvārdi: agrīna grūtniecības izjukšana, embriju atlase, laiksprīžu uzraudzība, morfokinētiskā embriju atlasēšanas metode.

Ievads

Agrīna grūtniecības izjukšana (AGI) ir grūtniecības spontāna pārtraukšanās pirms pilnām 12 grūtniecības nedēļām (Farquharson et al., 2005; Matule u. c., 2013). AGI sievietēm agrīnā grūtniecības periodā ir visbiežākā komplikācija (Stalder, 2012; Poorolajal et al., 2014), kas pārim sagādā ļoti

smagu psiholoģisku pārdzīvojumu. Tās izplatība klīnisko grūtniecību (ultrasonogrāfiski (US) diagnosticēto) vidū ir 15–20% (Farquharson *et al.*, 2005; Stalder, 2012; Poorolajal *et al.*, 2014; Puscheck, 2014; Vaiman, 2015). Pēdējo gadu desmitu laikā ir identificēti ļoti daudzi riska faktori, kas var izraisīt AGI, tomēr līdz pat 50% spontāno abortu cēloņi nav zināmi (Quenby, 2012; Poorolajal *et al.*, 2014). Biežākais zināmais AGI cēlonis ir embrija aneiploīdija, kā sastopamība pieaug līdz ar vecumu (Atik *et al.*, 2011). Zināmi arī citi cēloņi, piemēram, endokrinopātija, trombofilija, neadekvāta mātes imūnā atbilde, vecums, ķermeņa svara novirzes, dzemdes dobuma patoloģija.

Viens no veiksmīgas grūtniecības norises priekšnoteikumiem ir veselīgs un dzīvotspējīgs embrijs. Attīstoties asistētām reproduktīvajām tehnoloģijām (ART), paveras plašas šāda embrija identificēšanas iespējas, tāpēc mazinās arī AGI risks. Par spīti mākslīgās apaugļošanas efektivitātes uzlabošanas centieniem, Eiropā tikai 33% embriotransfēru (ET) rezultātā iestājas klīniskā grūtniecība un 25% – dzīva bērna piedzimšana (Kupka *et al.*, 2014).

Lai uzlabotu procedūras efektivitāti, bieži vien uz dzemdes dobumu vienlaikus tiek pārnesti vairāki embriji, kas palielina daudzaugļu grūtniecības risku un ar to saistīto komplikāciju biežumu (Herrero *et al.*, 2013). Arvien biežāk klīniskajā praksē izvēlas viena embrija pārnesi. Tāpēc izšķirīga loma ir embrija izvēlei – ar visaugstāko attīstības potenciālu (Kirkegaard, Agerholm *et al.*, 2012).

Embrija aneiploīdijas precīzai diagnostikai tiek ieteikts preimplantācijas ģenētiskais skrīnings vai diagnostika (PGS / PGD), taču šī ir invazīva metode. Pastāv divas citas metodes, kas ir neinvazīvas, – morfoloģiskā un nesen atklātā morfokinētiskā embriju atlasē metode. Tās abas vērstas uz tādu embriju identificēšanu, kuriem ir vislielākais implantācijas un attīstības potenciāls (Kirkegaard, Agerholm *et al.*, 2012; Herrero *et al.*, 2013). Morfoloģiskā metode vēl nesen bija embriju izvēles pamatā, kad tos izraudzījās pāršanai uz dzemdes dobumu. Metodes būtība ir šāda: notiek embriju kultivācija standarta inkubatorā (SI) un to morfoloģijas izvērtēšana noteiktos laika momentos, izņemot embrijus ārā no SI. Taču šī metode ir subjektīva (Herrero *et al.*, 2013; Rubio *et al.*, 2014).

Līdz ar jaunāko tehnoloģiju laiksprīžu (*time-lapse*) embriju uzraudzīšanas sistēmu (*time-lapse monitoring* – TLM) ieviešanu, radās iespēja vērot embriju attīstību dinamikā 24 stundas diennaktī un novērtēt to morfokinētiku, neizjaucot embrijiem labvēlīgos vides apstākļus (Polanski *et al.*, 2014). Pētījumi rāda, ka šī jaunā metode par 16,7% uzlabo klīniskās grūtniecības iestāšanos (Rubio *et al.*, 2014), pamatojot rezultātus ar atziņu, ka eiploīdi un aneiploīdi embriji, kam ir līdzīga morfoloģija, dalās ar dažādu ātrumu (Meseguer *et al.*, 2011; Rubio *et al.*, 2014).

Iespējams, ka TLM morfokinētiskās metodes parametri precīzāk norāda uz eiploīdiem embrijiem, šādā veidā samazinot AGI sastopamību, taču nav pārliecinošu pierādījumu, ka šī metode varētu ietekmēt grūtniecības izjukšanas biežumu (Polanski *et al.*, 2014). Tādēļ šā darba mērķis ir izpētīt atšķirības agrīnas grūtniecības izjukšanas biežumā, atlasot embrijus ar morfoloģisko un laiksprīžu (*time-lapse*) morfokinētisko metodi.

Darba mērķis

Izpētīt atšķirības agrīnas grūtniecības izjukšanas biežumā, atlasot embrijus ar morfoloģisko un laiksprīžu (*time-lapse*) morfokinētisko metodi.

Materiāls un metodes

Pētījuma dizains un populācija

Analītisks, retrospektīvi prospektīvs pētījums tika veikts klīnikā SIA “iVF Rīga”. Pētījumā tika iekļautas pacientes, kuru embriji 2013. un 2014. gadā tika kultivēti standarta inkubatorā vai izmantojot TLM sistēmu, bet pētījumā neiekļāva ārstēšanas mēģinājumus, kuru laikā nenotika ET. Daļai sieviešu, iekļaujot pētījumā, jau bija zināms ET un grūtniecības iznākums, bet daļai sieviešu bija jāsapaida pilna 12. grūtniecības nedēļa.

Pirms uzsākt neauglības ārstēšanu visas pacientes tika izmeklētas, un visi patoloģiskie faktori, kas varētu sekmēt AGI (trombofilija, endokrinopātija, infekciju slimības u. c.), tika koriģēti. Tāpēc šīs sievietes tika ietvertas pētījumā.

Pētījuma grupā (TLM grupa) tika iekļautas 118 pacientes, kuru embriji tika kultivēti TLM sistēmā un atlasīti, izmantojot morfokinētisko metodi. Kopā morfokinētiskā metode tika lietota 706 embrijiem, no kuriem 243 atlasīti un pārnesti pacientēm 146 ET laikā. Kontroles grupā (SI grupa) tika iekļautas 249 pacientes, kuru embriji tika kultivēti SI un atlasīti embriotransfēriem, izmantojot morfoloģisko metodi. Ar šo metodi novērtēja 1607 embrijus, no kuriem atlasīja 638 un pārnesa 386 ET laikā.

Iznākumu interpretācija

Samazinātas olnīcu rezerves tika definētas kā folikulus stimulējošā hormona (FSH) līmenis asins serumā 2.-5. cikla dienā virs 12 mIU/ml (*Huang et al.*, 2015). Spermatozoīdu koncentrāciju spermā novērtēja pēc Krugera kritērijiem: normāla koncentrācija ir vismaz 18 miljoni spermatozoīdu vienā mililitrā spermas (*Grow et al.*, 1994).

Bioķīmiska grūtniecība tika definēta, kā β -hCG līmenis pacientes asins serumā virs 5 IU/ml ne agrāk kā 12. dienā pēc ET. Klīniskā grūtniecība tika noteikta, ja US konstatēja augļa olu ar sirds-darbību. Agrīna grūtniecības izjukšana tika diagnosticēta, ja grūtniecība pārtraucās pirms 12. grūtniecības nedēļas, bet, ja tā turpinājās, grūtniecība tika saukta par progresējošu. Implantācija tika rēķināta kā US konstatēto augļa olu ar sirds-darbību skaits uz visiem dzemdes dobumā pārnestiem embrijiem. Implantēta embrija neiznēsāšana – bojā gājušo embriju skaits, rēķināts uz visiem implantētajiem embrijiem.

Statistiskās analīzes metodes

Iegūtie dati tika apstrādāti *MS Excel 2010* un *IBM SPSS Statistics 22* datorprogrammā. Kvantitatīvo datu (vecums, embriotransfēra diena) sadalījuma novērtēšanai tika izmantots Kolmogorova-Smirnova tests; ja tie neatbilda normālam sadalījumam, tad tālākai analīzei izmantoja Manna-Vitnija testu. Statistiski izvērtējot kvalitatīvus datus (klīniskā grūtniecība, bioķīmiska grūtniecība, AGI, endometrioze u. c.) izmantojām χ^2 testu vai Fišera testu. Samērošanu veicām, izmantojot loģiskās regresijas analīzi.

Rezultāts par statistiski ticamu tika uzskatīts, ja būtiskuma līmenis bija $p < 0,05$.

Rezultāti

TLM grupā pacienšu vidējais vecums bija $35,9 \pm 6,5$ gadi, bet SI grupā – $39,2 \pm 6,2$ gadi. Tā kā abu grupu pacienšu vecuma sadalījums neatbilda normālajam sadalījumam, grupas tika salīdzinātas, izmantojot Manna-Vitnija testu, kur $p < 0,001$.

Grupu sievietes tika salīdzinātas arī pēc šādiem rādītājiem: endometrioze, policistisku olnīcu sindroms (PCOS), samazināta olnīcu rezerve, iepriekšējās grūtniecības, dzemdības, neauglības ārstēšana ar ART palīdzību, AGI biežums (sk. 1. tab.). Nevienā no šiem kritērijiem nebija statistiski ticamu atšķirību starp grupām. Ne visām sievietēm pirms ārstēšanas tika dokumentēts FSH līmenis. TLM grupā FSH noteica 88 pacientēm, no kurām deviņām (10,2%) tas bija paaugstināts. SI grupā FSH bija paaugstināts 25 (16,1%) sievietēm no 155, kurām to noteica.

Grupu embriotransfēri ir salīdzināti 2. tabulā pēc šādiem parametriem: autologo vai donora olšūnu izmantošana, pārnesto embriju skaits viena ET laikā, ET diena pēc kārtas kopš veikta intracitoplazmatiska spermatozoīda injekcija (ICSI). Visu olšūnu apaugļošanai izmantoja ICSI metodi. Tika atklāta statistiski ticama atšķirība autologo vai donoru olšūnu izmantošanas biežumā – TLM grupā par 27% biežāk izmantoja autologas olšūnas nekā SI grupā ($p < 0,001$). Viena ET laikā pārnesa vienu vai divus embrijus. Vidējais pārnesto embriju skaits abās grupās bija $1,7 \pm 0,5$ embriji. Vidēji embriju pārnesānu TLM grupā veica $4,7 \pm 0,7$ dienā pēc ICSI un $4,4 \pm 0,9$ dienā SI grupā.

1. tabula. Pacienšu pazīmju salīdzinājums

Patient characteristics

Pazīme	TLM grupa (n = 118)		SI grupa (n = 249)		p vērtība*
	%	n	%	n	
Vecums, gadi ± SD	35,9 ± 6,5		39,2 ± 6,2		< 0,001**
Endometrioze	12,7	15	7,6	19	0,117
PCOS	8,5	10	4,4	11	0,118
FSH > 12 mIU/ml	10,2	9	16,1	25	0,171
Grūtniecības	48,3	57	47,8	119	0,927
Dzemdības	22	26	26,1	65	0,399
Ārstēšana ar ART	59,3	70	53,8	134	0,321
Iepriekš bijusi AGI	25,4	30	27,7	69	0,645

* χ^2 tests.

** Manna-Vitnija tests.

AGI - agrīna grūtniecības izjukšana, ART - asistētās reproduktīvās tehnoloģijas, FSH - folikulus stimulējošais hormons, PCOS - policistisku olnīcu sindroms, SD - standartdeviācija, SI - standarta inkubators, TLM - laiksprīžu uzraudzības sistēma.

Tika ņemta vērā izmantotās spermās kvalitāte (sk. 2. tab.). Normāla spermatozoīdu koncentrācija abās grupās bija statistiski ticami vienādi bieži sastopama. Spermatozoīdu DNS fragmentācijas tests TLM grupā tika veikts tikai 33 partneriem, no kuriem 16 (48,5%) gadījumos rādītāji bija normas robežās, bet SI grupā testu veica 13 partneriem un septiņiem (53,8%) no tiem testa rezultāts bija normāls. Saskaņā ar Fišera testu starp šiem lielumiem nav ticamas atšķirības, $p = 0,744$.

2. tabula. Embriotransfēru pazīmju salīdzinājums

Sperm, oocyte and embryo characteristics per ET

Pazīme		TLM grupa		SI grupa		p vērtība*
		%	n	%	n	
Pārnesto embriju skaits	Viens	33,6	49	34,7	134	0,803
	Divi	66,4	97	65,3	252	
ET diena pēc ICSI	3. diena	13	19	22,3	86	0,054
	5. diena	81,5	119	71,5	276	
	4. vai 6. diena	5,5	8	6,2	24	
Apaugļošanā izmantotās olšūnas	Autologas	71,2	104	44,3	170	< 0,001
	Donora	28,8	39	55,7	216	
Apaugļošanā izmantotā sperma	Spermatozoīdu koncentrācija > 18 milj./ml	84,9	124	86	332	0,751
	DNS fragmentācija	48,5	16 (no 33)	53,8	7 (no 13)	0,744**

* χ^2 tests.

** Fišera tests.

DNS- dezoksiribonukleīnskābe, ET - embriotransfērs, ICSI - intracitoplazmatiska spermatozoīda injekcija, SI - standarta inkubators, TLM - laiksprīžu uzraudzības sistēma.

Kopējie embriotransfēru un grūtniecību iznākumi ir apkopoti 3. tabulā. Rēķinot dažādu grūtniecību iestāšanās biežumus uz embriotransfēru skaitu, netika atklāta statistiski ticama atšķirība starp TLM un SI grupu. Tomēr iezīmējās tendence, ka gan bioķīmiska, gan klīniska, gan progresējoša grūtniecība biežāk attīstījās TLM grupā nekā SI grupā. Rēķinot uz grūtniecību skaitu, izrādījās, ka AGI retāk bija TLM grupā (28,4%), bet SI grupā – 41,8% (OR – 0,55; 95% TI – 0,31–0,99; $p = 0,044$). Rēķinot uz pārnesto embriju skaitu, implantācija bija lielāka TLM grupā, tomēr atšķirība nav statistiski ticama. Implantēta embrija neiznēsāšana TLM grupā bija 9,1%, bet SI grupā par 10% vairāk gadījumu, kas ir statistiski ticama atšķirība (OR – 0,41; 95% TI – 0,17–0,97; $p = 0,043$).

Salīdzinot pacientu un ET parametrus, atklājās statistiski ticamas nevienlīdzības starp grupām, tāpēc grupu samērošanai jeb standartizācijai pēc vecuma un olšūnu izcelsmes tika izmantota loģiskās regresijas analīze. Papildus grupu nevienlīdzības novēršanai statistiskā analīze tika veikta atsevišķi pacientu embriotransfēriem ar autologām olšūnām vecuma grupās līdz 35 gadu vecumam un pēc 35 gadu vecuma. Pēc grupu standartizācijas (pēc vecuma un olšūnu izcelsmes) embriotransfēru un grūtniecību iznākumu tendences saglabājās (sk. 4. tab.). Tomēr p vērtība un izredžu attiecība AGI biežumam norāda, ka atšķirība vairs nav statistiski ticama ($p = 0,068$), bet implantēta embrija neiznēsāšanas rādītājam p vērtība un izredžu attiecība (OR) joprojām rāda, ka TLM grupā AGI ir statistiski ticami retāk (pirms samērošanas $p = 0,043$; OR – 0,41 un pēc samērošanas $p = 0,044$; OR – 0,41).

Embriotransfēru un grūtniecību iznākumi pacientēm līdz 35 gadu vecumam ar autologām olšūnām ir apkopoti 5. tabulā. TLM grupā bija iekļauti 68 ET, kas tika veikti ar 110 embrijiem 55 pacientēm, bet SI grupā – 92 ET, kuru laikā uz dzemdes dobumu pārnesa 161 embriju 73 sievietēm. TLM grupā implantējās 39 embriji un visi veiksmīgi sasniedza 12. grūtniecības nedēļu. SI grupā no 48 implantētiem embrijiem 12 gāja bojā līdz 12. grūtniecības nedēļai. Rezultātā TLM grupā klīniskās grūtniecības izjukšana un implantēta embrija neiznēsāšana bija statistiski ticami uz pusi retāk (OR – 0,53; $p = 0,033$ un OR – 0,48; $p < 0,001$).

Pacientēm pēc 35 gadu vecuma ar autologām olšūnām: TLM grupā 32 sievietēm veica 36 ET, kuru laikā uz dzemdes dobumu pārnesa 63 embrijus, bet SI grupā 52 pacientēm veica 78 ET ar 121 embriju. Salīdzinot šīs grupas (sk. 6. tab.), neviena statistiski ticama atšķirība netika konstatēta.

3. tabula. Embriotransfēru un grūtniecību iznākums

Outcome measures

Iznākums	TLM grupa		SI grupa		p vērtība*	Izredžu attiecība	95% ticamības intervāls
	%	n	%	n			
Embriotransfēri	n = 146		n = 386				
Bioķīmiska grūtniecība	50,7	74	50,3	194	0,930	1,02	0,70–1,49
Klīniska grūtniecība	41,1	60	36,6	141	0,332	1,21	0,82–1,79
Progresējoša grūtniecība	36,3	53	29,3	113	0,119	1,38	0,92–2,06
Grūtniecības							
Bioķīmiskas grūtniecības izjukšana	18,9	14	27,5	54	0,136	0,61	0,31–1,17
Klīniskas grūtniecības izjukšana	12,1	7	19,1	27	0,200	0,56	0,23–1,36
AGI kopā	28,4	21	41,8	81	0,044	0,55	0,31–0,99
Pārnestie embriji	n = 243		n = 638				
Implantācija	31,7	77	28,1	179	0,290	1,19	0,86–1,64
Agrīna implantēta embrija neiznēsāšana	9,1	7	19,1	35	0,043	0,41	0,17–0,97

* χ^2 tests.

AGI – agrīna grūtniecības izjukšana, SI – standarta inkubators, TLM – laiksprīžu uzraudzības sistēma.

4. tabula. Embriotransfēru un grūtniecību iznākumi, samērojot grupas pēc vecuma un olšūnu izcelsmes (TLM grupa vs SI grupa)

Logistic regression analysis adjusted by age and autologous oocyte TLM vs. Control

Iznākums	p vērtība*	Izredžu attiecība	95% ticamības intervāls
Embriotransfēri			
Bioķīmiska grūtniecība	0,600	1,12	0,74-1,68
Klīniska grūtniecība	0,184	1,33	0,88-2,01
Progresējoša grūtniecība	0,107	1,42	0,93-2,17
Grūtniecības			
Bioķīmiskas grūtniecības izjukšana	0,113	0,57	0,29-1,14
Klīniskas grūtniecības izjukšana	0,388	0,67	0,27-1,68
AGI kopā	0,068	0,57	0,31-1,04
Pārnēstie embriji			
Implantācija	0,308	1,19	0,85-1,66
Agrīna implantēta embrija neiznēsāšana	0,044	0,41	0,17-0,98

* Loģiskā regresija.

AGI - agrīna grūtniecības izjukšana, SI - standarta inkubators, TLM - laiksprīžu uzraudzības sistēma.

5. tabula. Embriotransfēru un grūtniecību iznākumi pacientēm līdz 35 gadu vecumam ar autoloģām olšūnām
Outcome measures for women younger than 35 years with autologous oocytes

Iznākums	TLM grupa		SI grupa		p vērtība*	Izredžu attiecība	95% ticamības intervāls
	%	n	%	n			
Embriotransfēri	n = 68		n = 92				
Bioķīmiska grūtniecība	54,4	37	47,8	44	0,411	1,30	0,69-2,44
Klīniska grūtniecība	39,7	27	38	35	0,831	1,07	0,56-2,04
Progresējoša grūtniecība	39,7	27	31,5	29	0,283	1,43	0,74-2,76
Grūtniecības							
Bioķīmiskas grūtniecības izjukšana	27	10	20,5	9	0,601**	1,44	0,51-4,04
Klīniskas grūtniecības izjukšana	0	0	17,1	6	0,033**	0,53	0,41-0,68
AGI kopā	27	10	34,1	15	0,630**	0,72	0,28-1,86
Pārnēstie embriji	n = 110		n = 161				
Implantācija	35,5	39	29,8	48	0,329	1,29	0,77-2,17
Agrīna implantēta embrija neiznēsāšana	0	0	25	12	< 0,001**	0,48	0,38-0,61

* χ^2 tests.

** Fišera tests

AGI - agrīna grūtniecības izjukšana, SI - standarta inkubators, TLM - laiksprīžu uzraudzības sistēma.

6. tabula. Embriotransfēru un grūtniecību iznākumi pacientēm pēc 35 gadu vecuma ar autologām olšūnām
Outcome measures for women older than 35 years with autologous oocytes

Iznākums	TLM grupa		SI grupa		p vērtība*	Izredžu attiecība	95% ticamības intervāls
	%	n	%	n			
Embriotransfēri	n = 36		n = 78				
Bioķīmiska grūtniecība	33,3	12	30,8	24	0,784	1,13	0,48–2,62
Klīniska grūtniecība	27,8	10	21,8	17	0,486	1,38	0,56–3,42
Progresējoša grūtniecība	25	9	15,4	12	0,222	1,83	0,69–4,85
Grūtniecības							
Bioķīmiskas grūtniecības izjukšana	16,7	2	29,2	7	0,685**	0,49	0,08–2,81
Klīniskas grūtniecības izjukšana	10	1	29,4	5	0,361**	0,27	0,03–2,70
AGI kopā	25	3	50	12	0,282**	0,33	0,07–1,54
Pārnestie embriji	n = 63		n = 121				
Implantācija	15,8	10	14	17	0,740	1,15	0,49–2,70
Agrīna implantēta embrija neiznēsāšana	10	1	29,4	5	0,361**	0,27	0,03–2,70

* χ^2 tests.

** Fišera tests.

AGI – agrīna grūtniecības izjukšana, SI – standarta inkubators, TLM – laiksprīžu uzraudzības sistēma.

Diskusija

Analizējot un salīdzinot iegūtos ET rezultātus, var secināt, ka TLM morfokinētiskā embriju atlasē metode neietekmē ne bioķīmiskās, ne klīniskās grūtniecības iestāšanās biežumu. Mūsu pētījumā konstatētais atbilst citu pētījumu secinājumiem, proti, bioķīmiskās grūtniecības biežums, izmantojot TLM, sasniedz 65,3%, izmantojot SI, – 61,1%, bet klīniskās grūtniecības biežums svārstās no 37% līdz 60%, izmantojot TLM, un 33–57%, kultivējot SI (*Kirkegaard, Hindkjaer et al.*, 2012; *Polanski et al.*, 2014; *Rubio et al.*, 2014).

Vienīgi *Meseguer et al.* pēc sava lielā pētījuma par septiņiem tūkstošiem ārstēšanas mēģinājumu konstatēja klīniskās grūtniecības absolūtā riska pieaugumu par 9%, izmantojot laiksprīža uzraudzības (*time-lapse monitoring*) sistēmu. Iegūtos rezultātus autors pamato ne tikai ar morfokinētiskās embriju atlasē metodes izmantošanu, bet arī ar stabiliem, optimāliem kultivēšanas apstākļiem un labu vides attīrīšanu jaunajā sistēmā (*Meseguer et al.*, 2012).

Progresējošas grūtniecības attīstība mūsu pētījumā nav atkarīga no embriju atlasē metodes. Šo secinājumu apstiprina arī *Polanski et al.* metaanalīzes rezultāti, kurus autori novērtē kā mērenu pierādījumu kvalitāti (*Polanski et al.*, 2014). Savukārt *Rubio et al.* atklāja, ka, izmantojot morfokinētisko embriju atlasē metodi, ir pusotras reizes lielākas iespējas sasniegt 12. grūtniecības nedēļu (*Rubio et al.*, 2014).

Mūsu pētījumā TLM grupā bija statistiski ticami mazāk AGI nekā SI grupā, kas pierāda izvirzīto hipotēzi, ka morfokinētiskās embriju atlasē metodes izmantošana spēj samazināt AGI risku. TLM grupā AGI risks bija uz pusi mazāks nekā SI grupā (OR – 0,55; p = 0,044). Arī vecuma grupā līdz 35 gadiem, izmantojot TLM morfokinētisko atlasē metodi, bija uz pusi mazāks AGI risks nekā lietojot morfoloģisko metodi. *Rubio et al.* arī pierāda šo hipotēzi (*Rubio et al.*, 2014), bet *Polanski et al.* noliedz, tomēr savu pierādījumu kvalitāti atzīst kā zemu apskatīto pētījumu neprecizitātes dēļ un iesaka veikt papildu pētījumus pierādījumu kvalitātes uzlabošanai (*Polanski et al.*, 2014).

Pēc ESHRE datiem Eiropā AGI pēc ET vidēji skar 13,3–16,7% klīnisku grūtniecību (*Kupka et al.*, 2014). Mūsu pētījumā TLM grupā iegūts labāks rezultāts (12,1%), bet SI grupā – sliktāks (19,1%). No šī var secināt, ka morfokinētiskā embriju atlasē metode var uzlabot AGI rādītāju arī Eiropas līmenī, jo arī Latvija iesniedz savus datus Eiropas statistikas veidošanai.

Visi pētījumi, izņemot *Rubio et al.*, pierāda, ka morfokinētiskā embriju atlases metode nespēj uzlabot embriju implantāciju, kuras līmenis līdzinās morfoloģiskās metodes efektivitātei (*Kirkegaard, Hindkjaer et al.*, 2012; *Polanski et al.*, 2014). Arī mūsu pētījumā jaunās metodes izmantošana neietekmēja implantāciju. Nevienā pētījumā netika noteikts implantēta embrija neiznēsāšanas risks. Mūsaprāt, šis rādītājs precīzāk atspoguļo metožu efektivitāti, jo rāda AGI risku katram embrijam atsevišķi, nevis grūtniecībai kopumā.

Ja, piemēram, daudzaugļu grūtniecībā viens no embrijiem iet bojā, grūtniecība tomēr turpinās un, nosakot kopējo AGI, implantēta embrija bojāeja netiek ņemta vērā. Savukārt, nosakot implantēta embrija neiznēsāšanu, ikkatra embrija bojāeja ietekmē rezultātu. Jaunā rādītāja priekšrocība – to neietekmē pārnesto embriju skaits viena ET laikā, bet trūkums – tas nav aktuāls pacientiem, jo neatspoguļo grūtniecības dažādu iznākumu iespējas, ja vienlaikus tiek pārnesti vairāki embriji. Implantēta embrija neiznēsāšana bija statistiski ticami zemāka TLM grupā gan bez ierobežojumiem pēc dalībnieču vecuma un olšūnu izcelsmes, gan pēc standartizācijas, gan sievietēm pirms 35 gadiem ar autologām olšūnām – tas vēlreiz apstiprina darbā izvirzīto hipotēzi.

Rēķinot visus rādītājus, ET pacientēm pēc 35 gadiem ar autologām olšūnām netika atrasta neviena statistiski ticama atšķirība. Tomēr TLM grupā iezīmējas labāku iznākumu tendences, kas liek domāt, ka salīdzināmo grupu lielums bija nepietiekams, lai pierādītu morfokinētiskās embriju atlases metodes efektivitāti šajā grupā. Šis pētījums ļauj izteikties tikai par vecuma grupu līdz 35 gadiem un kopējiem rezultātiem.

Novērotajiem labākiem rezultātiem TLM grupā var būt vairāki skaidrojumi, piemēram, šādi:

- 1) stingri kontrolēti un stabili inkubācijas apstākļi;
- 2) minimāla embriju cilāšana ārā no inkubatora un likšana atpakaļ tajā;
- 3) palielināts informācijas apjoms par embriju attīstību kvalitatīvai morfoloģiskai novērtēšanai;
- 4) kvantitatīvo morfokinētisko parametru izmantošana embriju atlasē (*Meseguer et al.*, 2012; *Rubio et al.*, 2014).

Nevar zināt, cik būtiski labos rezultātus ietekmēja uzlabotie kultivācijas apstākļi. Diemžēl pieejamās sistēmas neļauj atšķirt, kāds ir kultivācijas apstākļu un kāds morfokinētiskās atlases metodes ieguldījums TLM grupas rezultātos. Lai novērstu kultivācijas apstākļu ietekmi uz rezultātiem, būtu jāveic pētījums, kur visi embriji tiktu kultivēti TLM sistēmā, bet tie būtu atlasīti ar dažādām metodēm (morfoloģisko un morfokinētisko).

Randomizētā spāņu *Rubio et al.* pētījumā visi rādītāji ir par 10–15% labāki nekā mūsu pētījumā, kam cēlonis var būt stingrie iekļaušanas kritēriji par labu optimistiskākas prognozes pacientēm. Spāņu pētījumā iekļāva sievietes tikai līdz 38 gadiem, 69–81% sieviešu ART tehnoloģijas tika lietotas pirmo reizi, biežāk pārnesa divus embrijus vienlaikus (vidēji 1,9 embriji), neiekļāva pētījumā endometriozes un PCOS pacientes, kā arī sievietes ar iepriekš pārciestu AGI un nekvalitatīvas spermas izmantošanas gadījumus. Tomēr viņu pētījumā, līdzīgi mūsu darba TLM grupai, tikai 27% pacienšu izmantoja donora olšūnas. Turpretim tikai ceturtdaļā ET uz dzemdi pārnesa blastocistas (*Rubio et al.*, 2014), kas varēja negatīvi ietekmēt spāņu pētījuma rezultātus (*Centers for Disease Control and Prevention et al.*, 2014). *Polanski et al.* un *Kirkegaard et al.* pētījumos arī tika izmantoti stingri iekļaušanas kritēriji, kuri neparedzēja pētīt sievietes ar PCOS, endometriozī, iepriekš pārciestu AGI, zemām olnīcu rezervēm, nekvalitatīvas spermas izmantošanas gadījumus, kā arī ET, kur netika pārnestas blastocistas. Tie pētīja tikai sievietes līdz 35 gadiem (*Kirkegaard, Hindkjaer et al.*, 2012; *Polanski et al.*, 2014). Mūsu pētījuma sieviešu grupa līdz 35 gadu vecumam ir īpaši lietderīga salīdzināšanai ar šo autoru darbiem. Iekļaušanai mūsu pētījumā netika noraidītas sievietes ar PCOS, endometriozī, iepriekš pārciestu AGI, kā arī netika limitēts vecums.

Īpaša uzmanība jāpievērš pētījuma pacienšu populācijai. Pētījumā nebija iespējams randomizēt sievietes, tāpēc analizējam ārstēšanas rezultātus. Lielākajai pacienšu daļai bija neveiksmīga neauglības ārstēšanas pieredze un mazāk par pusi sieviešu ART tehnoloģijas izmantoja pirmo reizi, kas ir saistāms ar sliktākiem embriotransfēru un grūtniecību iznākumiem (*Centers for Disease Control and Prevention et al.*, 2014).

Citu autoru pētījumos tika noteikti stingri iekļaušanas kritēriji, kas neietvēra pacientes ar šādiem stāvokļiem (*Kirkegaard, Hindkjaer et al., 2012; Polanski et al., 2014; Rubio et al., 2014*). Vienā no šiem pētījumiem ir izteikta kritika pret šādu rūpīgu pacienšu atlasīšanu, jo šādā veidā labvēlīgais klīniskais rezultāts ir attiecināms tikai uz labas prognozes pacientēm un neatspoguļo patiesos radītājus populācijā (*Rubio et al., 2014*). Tas viss ļauj secināt, ka mūsu pētījums aptver neauglīgo populāciju *per se* – pacientes ar sliktāku ārstēšanas prognozi nekā citos pētījumos, kuros bija stingrāki iekļaušanas kritēriji.

Pētījumā tika atklāta statistiski ticama atšķirība starp grupām pacienšu vecumā un autologo olšūnu izmantošanas biežumā. Šie faktori var ietekmēt rezultātu ticamību, jo līdz ar vecumu samazinās grūtniecības iestāšanās iespējas (*Kupka et al., 2014*), bet donora olšūnu izmantošana ievērojami uzlabo grūtniecības varbūtību (*Centers for Disease Control and Prevention et al., 2014*). Neatbilstību dēļ bija nepieciešams izmantot standartizācijas metodes un grupu iedalīšanu sīkāk. No šīs rīcības varētu izvairīties, ja datu vākšanas laikā sekotu, lai rādītāji ir līdzīgi vai tiktu stingrāk noteikti iekļaušanas kritēriji.

Morfoloģiskās embriju atlasēšanas metodes izmantošanai nav nepieciešama pastāvīga embriju novērošana, tāpēc tos var kultivēt SI, taču šai metodei raksturīgs ir augstāks AGI risks. Savukārt morfokinētiskās metodes realizēšanai ir nepieciešama nepārtraukta embriju novērošana, tāpēc tā prasa inkubāciju TLM sistēmā. Moderno sistēmu izmantošanu attaisno zemāks AGI risks, bet embriju implantācijas, bioķīmiskas un klīniskas grūtniecības iestāšanās biežums līdzinās morfoloģiskās metodes lietošanas rezultātiem.

TLM sistēma un morfokinētiskā embriju atlasēšanas metode ir jaunums reprodūktīvajā medicīnā. Vairāku pētījumu autoriem nav vienprātības par morfokinētiskās embriju atlasēšanas metodes efektivitāti, tomēr nav šaubu par TLM sistēmas lietderīgumu. Šī metode nevar aizstāt PGD, taču var tikt izmantota kā alternatīva, ja PGD nav pieejama. Mūsu pētījums apliecina, ka TLM morfokinētiskās embriju atlasēšanas metodes izmantošana spēj uzlabot kvalitatīvu, potenciāli dzīvotspējīgāku embriju atpazīšanu un tā pārņemšanu uz dzemdes dobumu un rezultātā ļauj samazināt AGI risku.

Secinājumi

1. Embriju atlase ar TLM morfokinētisko metodi samazina agrīnas grūtniecības izjukšanas biežumu pacientēm, kurām lietota mākslīgā apaugļošana.
2. TLM sistēmas ieviešana klīniskajā praksē būtu lietderīga.
3. Morfokinētisko embriju atlasēšanas metodi var ieteikt pacientiem, kuriem nav indicēta preimplantācijas ģenētiskā diagnostika vai kuriem tā nav iespējama.



Embryo Selection Impact on Early Pregnancy Loss

Abstract

Early pregnancy loss (pregnancy loss before 12 weeks of gestation) is one of the most significant clinical problems in the field of reproductive medicine. Nearly 80% of pregnancies are lost during the first trimester of pregnancy mostly because of embryo chromosomal abnormalities. Increased probability of chromosomally normal embryo selection using time-lapse morphokinetics analysis could improve early pregnancy loss rate in patients undergoing infertility treatment.

The aim of the study was to compare early pregnancy loss rate between conservative embryo cultivation / selection and time-lapse system morphokinetics analysis groups.

The study was performed in infertility clinic iVF Riga, Latvia. Treatment outcomes were analysed retrospectively and prospectively. Study group included 243 embryos selected using time-lapse morphokinetics analysis for 146 embryo transfers. Control group included 638 embryos cultivated and selected conservatively before 386 embryo transfers.

For clinical pregnancy rate, differences were not statistically significant at 41.1% for the study group compared with 36.6% for the control group (odds ratio (OR) 1.21; 95% confidence interval (CI) 0.82–1.79; $p = 0.332$). Early pregnancy loss per pregnant cycle was statistically significantly decreased for the study

group with 28.4% versus 41.8% (OR 0.55; 95% CI 0.31–0.99; $p = 0.044$). Analysing per transferred embryo, the early pregnancy loss rate was statistically significantly decreased to 9.1% for the study group compared with 19.1% for the control group (OR 0.41; 95% CI 0.17–0.97; $p = 0.043$). In the study group of women younger than 35 years with autologous oocytes, none of the implanted embryos was lost, but in control group early pregnancy loss of all implanted embryos was 25% (OR 0.48; 95% CI 0.38–0.61; $p < 0.001$).

Embryo selection using time-lapse morphokinetic analysis could decrease early pregnancy loss rate and improve success of infertility treatment.

Keywords: early pregnancy loss, embryo selection, time-lapse monitoring, morphokinetic analysis.

Literatūra

1. Atik R. B., Hepworth-Jones B. E., Doyle P. *Risk factors for miscarriage. Early Pregnancy*. Ed. by Farquharson R. G., Stephenson M. D. Cambridge: Cambridge University Press, 2011, pp. 9–19.
2. *Centers for Disease Control and Prevention, American Society for Reproductive Medicine, Society for Assisted Reproductive Technology* (2012). Assisted Reproductive Technology National Summary Report. Atlanta (GA): US Dept of Health and Human Services, 2014, pp. 27–45.
3. Farquharson R. G., Jauniaux E., Exalto N. ESHRE Special Interest Group for Early Pregnancy (SIGEP). Updated and revised nomenclature for description of early pregnancy events. *Hum Reprod*, 2005; 20(11): 3008–3011.
4. Grow D. R., Oehninger S., Seltman H. J., et al. Sperm morphology as diagnosed by strict criteria: probing the impact of teratozoospermia on fertilization rate and pregnancy outcome in a large in vitro fertilization population. *Fertil Steril*, 1994; 62(3): 559–567.
5. Herrero J., Meseguer M. Selection of high potential embryos using time-lapse imaging: the era of morphokinetics. *Fertil Steril*, 2013; 99(4): 1030–1034.
6. Huang L. N., Jun S. H., Drubach N., Dahan M. H. Predictors of In Vitro Fertilization Outcomes in Women with Highest Follicle-Stimulating Hormone Levels ≥ 12 IU/L: A Prospective Cohort Study. *Plos One*, 2015; 10(4): e0124789.
7. Kirkegaard K., Agerholm I. E., Ingerslev H. J. Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment. *Hum Reprod*, 2012; 27(5): 1277–1285.
8. Kirkegaard K., Hindkjaer J. J., Grondahl M. L., et al. A randomized clinical trial comparing embryo culture in a conventional incubator with a time-lapse incubator. *J Assist Reprod Genet*, 2012; 29(6): 565–572.
9. Kupka M. S., Ferraretti A. P., de Mouzon J., et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2010: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod*, 2014; 29(10): 2099–2113.
10. Matule D., Vīberga I., Lazdāne G. Aborts. No: *Ginekoloģija*, Vīberga I. red. Rīga: Medicīnas apgāds, 2013, 423.–437. lpp.
11. Meseguer M., Herrero J., Tejera A., et al. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod*, 2011; 26(10): 2658–2671.
12. Meseguer M., Rubio I., Cruz M., et al. Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: a retrospective cohort study. *Fertil Steril*, 2012; 98(6): 1481–1489.
13. Polanski L. T., Coelho Neto M. A., Nastri P. A., et al. Time-lapse embryo imaging for improving reproductive outcomes: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2014; 44(4): 394–401.
14. Poorolajal J., Cheraghi P., Cheraghi Z., et al. Predictors of miscarriage: a matched case-control study. *Epidemiol Health*, 2014; 36: 2014031.
15. Puscheck E. E. Early Pregnancy Loss. Iegūts no: <http://reference.medscape.com/article/266317-overview> (sk. 29.09.2014.).
16. Quenby S. Recurrent miscarriage. *Dewhurst's Textbook of Obstetrics & Gynaecology*. Ed. by Edmonds K., 8th ed. Oxford, UK: Wiley-Blackwell Publishing, 2012, pp. 60–65.
17. Rubio I., Galan A., Larreategui Z., et al. Clinical validation of embryo culture and selection by morphokinetic analysis: a randomized, controlled trial of the EmbryoScope. *Fertil Steril*, 2014; 102(5): 1287–1294.
18. Stalder C. M. Spontaneous miscarriage. *Dewhurst's Textbook of Obstetrics & Gynaecology*. Ed. by Edmonds K., 8th ed. Oxford, UK: Wiley-Blackwell Publishing, 2012, pp. 53–59.
19. Vaiman D. Genetic regulation of recurrent spontaneous abortion in humans. *Biomed J*, 2015; 38(1): 11–24.