

Опыт использования time-lapse – микроскопии в программах ЭКО и ИКСИ

Н. В. Сараева, н.с., соискатель кафедры акушерства и гинекологии ИПО¹, ассистент кафедры репродуктивной медицины, клинической эмбриологии и генетики¹, врач – акушер-гинеколог (репродуктолог)², зав. отделением ЭКО²

Н. В. Спиридонова, д.м.н., проф., зав. кафедрой акушерства и гинекологии ИПО¹

М. Т. Тугушев, к.м.н., зав. кафедрой репродуктивной медицины, клинической эмбриологии и генетики¹, гл. врач²

О. В. Шурьгина, д.м.н., проф., проф. кафедры гистологии и эмбриологии¹, доцент кафедры репродуктивной медицины, клинической эмбриологии и генетики¹

А. И. Синицына, н.с., ассистент кафедры репродуктивной медицины, клинической эмбриологии и генетики¹, врач – акушер-гинеколог²

¹ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Самара

²ЗАО «Медицинская компания ИДК», г. Самара

Experience of using time-lapse microscopy in IVF and ICSI programs

N. V. Saraeva, N. V. Spiridonova, M. T. Tugushev, O. V. Shurygina, A. I. Sinitsyna

Samara State Medical University, IDK Medical Co. Samara, Russia

Резюме

Для повышения вероятности наступления беременности в программах вспомогательных репродуктивных технологий первостепенное значение имеет возможность выбора эмбриона с наивысшим потенциалом имплантации. Один из инструментов выбора качественного эмбриона на перенос – использование time-lapse – микроскопии (TLM). Целью работы было оценить преимущества использования TLM при переносе одного эмбриона на 5-е сутки культивирования в программах ЭКО и ИКСИ. У 282 пациенток выбор и перенос эмбриона проведены с использованием системы TLM (группа исследования); у 461 пациентки – с использованием традиционного культивирования (группа контроля). Проведена оценка качества переносимых эмбрионов, частоты наступления клинической беременности и частоты родов. Группы не различались по соотношению циклов ЭКО и ИКСИ, среднему возрасту, фактору бесплодия. Доля эмбрионов отличного качества на перенос составила 77,0% в основной группе и 65,1 – в группе контроля ($p = 0,001$). В подгруппе с получением восьми и менее ооцитов отмечена тенденция к получению эмбрионов более высокого качества в основной группе ($p = 0,052$). В подгруппе девяти и более ооцитов распределение перенесенных эмбрионов по качеству не различалось между изучаемыми группами. Частота наступления клинической беременности составила 60,2% в основной группе и 52,9% – в контрольной ($p = 0,057$). Доля родов составила 45,0% в основной группе и 39,9% – в группе контроля ($p > 0,050$).

Ключевые слова: вспомогательные репродуктивные технологии, перенос одного эмбриона, перенос бластоцисты, time-lapse – микроскопия.

Summary

In order to increase the pregnancy rate in the assisted reproductive technology, the selection of one embryo with the highest implantation potential it is very important. Time-lapse microscopy (TLM) is a tool for selecting quality embryos for transfer. This study aimed to assess the benefits of single-embryo transfer of autologous oocytes performed on day 5 of embryo incubation in a TLM-equipped system in IVF and ICSI programs. Single-embryo transfer following incubation in a TLM-equipped incubator was performed in 282 patients, who formed the main group; the control group consisted of 461 patients undergoing single-embryo transfer following a traditional culture and embryo selection procedure. We assessed the quality of transferred embryos, the rates of clinical pregnancy and delivery. The groups did not differ in the ratio of IVF and ICSI cycles, average age, and infertility factor. The proportion of excellent quality embryos for transfer was 77.0% in the main group and 65.1% in the control group ($p = 0.001$). In the subgroup with receiving eight and less oocytes we noted the tendency of receiving more quality embryos in the main group ($p = 0.052$). In the subgroup of nine and more oocytes the quality of the transferred embryos did not differ between two groups. The clinical pregnancy rate was 60.2% in the main group and 52.9% in the control group ($p = 0.057$). The delivery rate was 45.0% in the main group and 39.9% in the control group ($p > 0.050$).

Key words: assisted reproductive technology, single-embryo transfer, time-lapse microscopy.

Введение

Для повышения вероятности наступления беременности в программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) первостепенное значение имеет возможность выбора эмбриона с наивысшим потенциалом имплантации. Благодаря этому можно сократить время до достижения беременности и повысить кумулятивный показатель наступления беременности в расчет на один цикл стимуляции [7].

С момента возникновения технологии экстракорпорального оплодотворения (ЭКО) морфологическая

оценка эмбрионов человека была основным методом, используемым для оценки развития и выбора эмбрионов при переносе. Использование морфологических классификаций на практике оказалось более трудным, чем ожидалось, из-за высокодинамичного характера развития эмбриона. Другими словами, эмбрион, оцененный в 8 часов утра на 2-е сутки развития, может выглядеть совсем по-другому через несколько часов. Следовательно, чрезвычайно сложно интерпретировать данные по морфологии без включе-

ния времени в качестве связанной переменной. Удаление эмбриона из инкубатора для оценки может дать информацию только о сиюминутном его состоянии.

С внедрением в лабораторию ЭКО time-lapse – технологии, или TLM (электронной микроскопии с временным интервалом), – современного метода выбора эмбриона для переноса, наступила новая эра эмбриологии. Благодаря этой методике на сегодняшний день возможна континуум-оценка морфологии эмбрионов, то есть

с фиксацией изображения каждые несколько минут [3]. Авторы текущих ретроспективных и проспективных исследований подчеркивают и преимущество этой технологии с многообещающими результатами [2, 10], и отсутствие различий по сравнению с морфологической оценкой качества эмбрионов [9, 4].

Цель исследования: оценить преимущества использования time-lapse – микроскопии при переносе одного эмбриона в программах ЭКО и ИКСИ.

Материалы и методы

В исследование были включены 743 женщины с бесплодием, которым проведен перенос одного эмбриона в программах ЭКО и ИКСИ на базе ЗАО «Медицинская компания ИДК» (г. Самара) в 2013–2015 годах.

Произведен статистический анализ 743 клинических и эмбриологических протоколов пациенток с помощью статистического пакета SPSS 21 (лицензия № 20130626–3; IBM, США) и Microsoft Excel (Microsoft, США).

Критерии включения в исследование: программы ЭКО и ИКСИ; циклы с использованием собственных ооцитов; перенос одного эмбриона на 5-е сутки культивирования; толщина эндометрия 8 мм и более на день переноса эмбриона.

Критерии исключения: циклы с использованием донорских ооцитов; циклы с переносом размороженного эмбриона; перенос эмбрионов на 3-и сутки культивирования; перенос двух эмбрионов; толщина эндометрия менее 8 мм на день переноса эмбриона.

В группу исследования вошли 282 пациентки с переносом одного эмбриона с использованием TLM. Группу контроля составили 461 пациентка с переносом одного эмбриона с использованием метода традиционного культивирования и выбора эмбриона для переноса.

Эмбриологический этап программы в группе исследования проводили с использованием видеосистемы наблюдения за развитием эмбрионов Primovision (Vitrolife, Швеция). В обеих группах для оценки качества эмбрионов использовали буквенно-цифровую систему, разработанную Gardner и Schoolcraft в 1999 году [6].

Дополнительно в группе исследования выбор эмбрионов на перенос проводили на основании их соответствия ключевым морфодинамическим параметрам системы. В качестве ключевых событий деления оценивали параметры: время первого дробления; интервал времени между первым и вторым дроблением; время второго дробления; время третьего дробления; время формирования бластоцисты. Если все параметры соответствовали референсным значениям, то такой эмбрион выбирали для переноса (референс-положительный эмбрион; 140 пациенток). В том случае, если один или несколько параметров деления не соответствовало референсному значению, выбор эмбриона на перенос осуществляли дополнительно на основании стандартной морфологической оценки (референс-отрицательный эмбрион; 142 пациентки).

В обеих группах культивирование проводили с использованием универсальной среды Continuous Single Culture (Irvine Scientific, США). Оценку качества эмбрионов на 5-е сутки культивирования проводили через 116–118 часов после оплодотворения.

Изучаемые параметры: возраст, тип бесплодия, фактор бесплодия, продолжительность бесплодия, качество эмбрионов на перенос, частота клинической беременности, частота родов.

Результаты

Количество пациенток в программах ЭКО и ИКСИ статистически не отличалось между двумя группами. Доля программы ЭКО составила 46,5% в основной группе и 50,3% –

в контрольной, доля программы ИКСИ – 53,6 и 49,7% соответственно ($p > 0,05$).

Средний возраст женщин в основной группе и в группе контроля составил $31,70 \pm 0,24$ и $31,82 \pm 0,20$ года соответственно ($p > 0,05$). В обеих группах минимальный возраст пациенток был 22 года, максимальный – 44 года.

Поскольку возраст женщины является одним из ключевых факторов, влияющих на результат программы ЭКО и ИКСИ, проведено распределение женщин по четырем возрастным группам. В обеих группах большинство женщин находилось в возрасте до 35 лет: 73,8 – в основной группе и 70,9 – в группе контроля ($p > 0,05$). В этой возрастной группе женщин в программах ЭКО и ИКСИ, по статистике, стабильно высокий процент беременности и родов при низком риске хромосомных аберраций у плода.

Так как настоящее исследование включало только группу женщин с переносом одного эмбриона, то доля пациенток позднего репродуктивного возраста была ниже, чем в целом в программах ВРТ в ЗАО «МК ИДК» (включая циклы с переносом двух эмбрионов) и по данным литературы [1]. Количественные характеристики возрастных групп представлены в табл. 1.

Первичное бесплодие было у 48,9% женщин в основной группе и у 46,6% в группе контроля, вторичное бесплодие – у 51,1 и 53,4% женщин соответственно ($p > 0,05$).

Средняя продолжительность бесплодия составила $4,78 \pm 0,19$ года в основной группе и $5,43 \pm 0,17$ – в группе контроля ($p = 0,025$).

Средняя величина порядкового номера настоящей программы составила $1,44 \pm 0,05$ в основной группе и $1,47 \pm 0,04$ – в группе контроля ($p > 0,05$). Согласно утвержденной в ЗАО «МК ИДК» внутренней инструкции порядковый номер программы ЭКО и ИКСИ является одним из критериев выбора количества переносимых эмбрионов. При первой или второй программе ЭКО и ИКСИ и наличии на перенос эмбриона отличного качества пациентке предлагается перенос одного эмбриона.

Мы не получили статистически значимых отличий по факторам бесплодия между двумя группами отдельно в программе ЭКО и в программе

Таблица 1
Характеристика групп по возрасту

		Основная группа		Контрольная группа		p
		Абс. число	Процент	Абс. число	Процент	
Возраст	До 35 лет	208	73,8	327	70,9	0,684
	35–37 лет	52	18,4	86	18,7	
	38–40 лет	17	6,0	38	8,2	
	41 год и старше	5	1,8	10	2,2	

ИКСИ. В программе ЭКО наиболее частой причиной бесплодия в основной и контрольной группах был трубный фактор (55,7 и 55,4% соответственно). В программе ИКСИ, закономерно, на первом месте был мужской фактор бесплодия: 58,1% в основной группе и 50,0% в группе контроля ($p > 0,05$).

Количество полученных ооцитов на пункцию фолликулов в основной группе было $10,40 \pm 0,25$, в группе контроля – $8,39 \pm 0,23$, количество зигот – $7,06 \pm 0,20$ и $5,62 \pm 0,16$ соответственно ($p < 0,05$). В основной группе количество полученных эмбрионов статистически отличалось от контрольной группы: $7,01 \pm 0,20$ и $5,59 \pm 0,16$ соответственно ($p < 0,05$).

Известно, что качество переносимых эмбрионов существенно влияет на вероятность наступления беременности в программах ВРТ. Так, при переносе эмбрионов отличного или хорошего качества показатель частоты наступления клинической беременности значительно выше, чем при переносе эмбрионов удовлетворительного качества [6, 9].

В основной группе получена меньшая доля эмбрионов неудовлетворительного ($p = 0,046$), удовлетворительного ($p = 0,016$) и отличного качества ($p = 0,001$). Доля эмбрионов хорошего качества не отличалась между двумя группами. Таким образом, в основной группе качество эмбрионов на перенос было достоверно выше по сравнению с группой контроля.

В обеих группах в большинстве случаев перенесены эмбрионы хорошего и отличного качества: 95,1% в основной группе и 87,4% – в группе контроля. Это неудивительно, так как основным критерием для переноса одного эмбриона является наличие на перенос эмбрионов отличного или хорошего качества. В табл. 2 представлено качество перенесенных эмбрионов в обеих группах.

Поскольку количество полученных ооцитов у пациентки влияет на возможность получения эмбрионов отличного и хорошего качества, проведена оценка связи между количеством полученных ооцитов на пункцию и качеством переносимых эмбрионов [5].

В обеих группах было выделено две подгруппы пациенток – подгруппа с получением восьми и менее ооци-

Таблица 2
Распределение перенесенных эмбрионов по качеству

		Основная группа		Контрольная группа		p
		Абс. число	Процент	Абс. число	Процент	
Качество эмбрионов на перенос	Неудовлетворительное	2	0,7	15	3,3	0,046
	Удовлетворительное	12	4,3	43	9,3	0,016
	Хорошее	51	18,1	103	22,3	0,196
	Отличное	217	77,0	300	65,1	0,001

Таблица 3
Распределение перенесенных эмбрионов по качеству в подгруппе с получением восьми и менее ооцитов

		Основная группа		Контрольная группа		p
		Абс. число	Процент	Абс. число	Процент	
Качество эмбрионов на перенос	Неудовлетворительное	2	1,85	12	4,56	0,052
	Удовлетворительное	5	4,63	33	12,55	
	Хорошее	27	25,00	67	25,48	
	Отличное	74	68,52	151	57,41	

Таблица 4
Распределение перенесенных эмбрионов по качеству подгруппе с получением девяти и более ооцитов

		Основная группа		Контрольная группа		p
		Абс. число	Процент	Абс. число	Процент	
Качество эмбрионов на перенос	Неудовлетворительное			3	1,52	0,210
	Удовлетворительное	7	4,02	10	5,05	
	Хорошее	24	13,79	36	18,18	
	Отличное	143	82,18	149	75,25	

тов на пункцию, и подгруппа с получением девяти и более ооцитов. В основной группе количество пациенток с получением восьми и менее ооцитов было 108 (38,3%), в группе контроля – 236 (57,1%); в подгруппе с получением девяти и более ооцитов – 174 (61,7%) и 198 (43%) пациенток соответственно ($p < 0,001$).

В подгруппе восьми и менее ооцитов наблюдалась явная тенденция к получению эмбрионов более высокого качества в основной группе, хотя различия были статистически незначимыми (табл. 3).

В подгруппе девяти и более ооцитов распределение перенесенных эмбрионов по качеству не различалось между двумя изучаемыми группами (табл. 4).

Поскольку главным исходом переноса эмбриона являются роды, проведен анализ всех исходов переноса эмбриона: отсутствие беременности, потеря беременности на разных сроках и роды (табл. 5).

Частота клинической беременности была выше при использовании ТЛМ и составила 60,2% по сравнению с группой контроля (52,9%), хотя разница была статистически незначимой ($p = 0,057$). Доля родов составила 45,0% в основной группе и 39,9%

в группе контроля ($p > 0,05$); доля ранней потери беременности – 14,5 и 12,15% соответственно ($p > 0,05$).

Мы не получили статистически значимых различий в группе исследования между подгруппой пациенток с положительным референсным значением перенесенных эмбрионов и подгруппой с отрицательным референсным значением в частоте клинической беременности (65,3 и 56,2% соответственно) и родов (48,4 и 41,0% соответственно).

Обсуждение результатов

Строго контролируемые и стабильные условия инкубации важны для культивирования эмбрионов, поскольку колебания температуры и pH могут ухудшать их развитие и качество. Технология использования ТЛМ позволяет минимизировать контакт эмбриона с внешней средой, что может быть одним из факторов, обуславливающих его более высокий имплантационный потенциал. Непрерывный мониторинг с короткими промежутками времени дает больше информации о кинетике и морфологии эмбриона по сравнению со стандартной оценкой [3].

В нашем исследовании в группе ТЛМ была больше доля пациенток с пе-

Таблица 5
Исходы переноса эмбрионов у пациенток основной группы и группы контроля

		Основная группа		Контрольная группа		χ^2	P
		Абс. число	Процент	Абс. число	Процент		
Беременность	Нет	112	39,72	217	47,07	3,8	0,057
	Да	170	60,28	244	52,93		
Исходы	Нет беременности	112	39,72	217	47,07	5,5	0,220
	Ранние потери	41	14,54	56	12,15		
	Поздние потери	2	0,71	4	0,87		
	Преждевременные роды	1	0,35	5	1,08		
	Срочные роды	126	44,68	179	38,83		
Роды	Нет	155	54,96	277	60,09	1,8	0,100
	Да	127	45,04	184	39,91		

переносом эмбрионов отличного качества, что совпадает с данными ряда авторов [8, 10]. Поскольку в нашей работе пациентки по клиническим характеристикам (возрасту, факторам бесплодия, продолжительности бесплодия) не различались между двумя группами, можно предположить, что различие в доле эмбрионов отличного качества связано с отсутствием влияния в группе TLM факторов внешней среды (температуры, света, изменения pH). На наш взгляд, заслуживает внимания и тот факт, что в подгруппе с получением восьми и менее ооцитов (прогностически менее благоприятной в отношении шанса на беременность) мы получили преимущество в группе TLM по качеству эмбрионов на перенос ($p = 0,052$), в то время как подгруппе пациенток с хорошим овариальным резервом преимуществ использования TLM не было.

Отсутствие различий между подгруппой пациенток с положительным референсным значением перенесенных эмбрионов и подгруппой пациенток с отрицательным референсным значением в частоте беременности и родов может быть связано с небольшим количеством морфодинамических параметров, используемых для оценки в указанный интервал времени (2013–2015 годы). В текущих публикациях обсуждается оценка от 10 до 12 морфодинамических параметров деления эмбрионов, что позволяет показать преимущества культивирования в инкубаторах с TLM [7, 3].

По результатам недавнего обзора Cochrane (2995 супружеских пар), отсутствуют убедительные доказательства преимущества TLM по сравне-

нию с традиционным культивированием – отсутствие достоверных различий в частоте случаев наступления клинической беременности (ОШ = 0,95; 95% ДИ: 0,78–1,16) и частоте родов (ОШ = 1,12; 95% ДИ: 0,92–1,36) [4].

В другом исследовании, напротив, показано преимущество использования TLM по сравнению со стандартной инкубацией и оценкой качества эмбрионов [10]. В этом исследовании сообщается о высокой частоте наступления клинической беременности (51,0 против 39,9%; ОШ = 1,54; 95% ДИ: 1,21–1,97), более низкой частоте ранней потери беременности (15,3 против 21,3%; ОШ 0,66; 95% ДИ: 0,47–0,94) и высокой частоте случаев живорождения (44,2 против 31,3%; ОШ = 1,67; 95% ДИ: 1,13–2,46).

В обеих группах нашего исследования получена высокая частота наступления клинической беременности (60,2% в группе исследования и 52,9% – в контрольной) и родов (45,0% и 39,9% соответственно), что может свидетельствовать об отсутствии негативного влияния на культуру эмбрионов использования TLM.

Несмотря на отсутствие в настоящее время убедительных доказательств клинической пользы TLM, разумно предположить, что, по сравнению со статическими наблюдениями, непрерывный мониторинг эмбрионов в стабильных условиях культивирования даст больше информации о развитии эмбрионов, что может улучшить их идентификацию. Для получения весомых доказательств благоприятного эффекта TLM необходимы хорошо организованные рандомизированные контролируемые

исследования, сообщающие о живорождениях и перинатальных исходах. Сейчас сложно предсказать будущие достижения TLM, но нет сомнений, что эта технология будет и дальше использоваться. Поэтому ее освоение на практике становится обязательным для эмбриологов и лабораторий ЭКО [3].

Выводы

В проведенном исследовании не выявлено достоверных различий в частоте наступления клинической беременности, частоте достижения родов и частоте случаев ранней потери беременности между группой TLM и группой традиционного культивирования эмбрионов.

При использовании TLM качество эмбрионов на перенос было достоверно выше по сравнению с группой контроля. При использовании TLM была выше доля эмбрионов отличного качества в подгруппе с получением восьми и менее ооцитов.

Список литературы

1. Российская ассоциация репродукции человека. Регистр ВРТ. Отчет за 2017 год [электронный ресурс]. – URL: http://rahr.ru/d_registr_otchet/RegistrART2017.pdf.
2. Adamson GD, Abusief ME, Palao LM, Gvakharia M. Improved implantation rates of day 3 embryo transfers with the use of an automated time-lapse – enabled test to aid in embryo selection. *Fertil Steril*. 2015; 105: 369-75.
3. Apter S, Ebner T, Freour T, Guns Y, Kovacic B, Le Clef N, et al. Good practice recommendations for the use of time-lapse technology. *Human Reproduction Open*, Volume 2020, Issue 2, 2020, hoaa008. <https://doi.org/10.1093/hropen/hoaa008>.
4. Armstrong S, Bhide P, Jordan V, Pacey A, Marjoribanks J, Farquhar C. Time-lapse systems for embryo incubation and assessment in assisted reproduction. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2019, May 29; 5: CD011320. DOI: 10.1002/14651858.CD011320.pub4.
5. Drakopoulos P, Blockeel C, Stoop D, Camus M, Vos M, Toumaye H, Polyzos N. Conventional Ovarian Stimulation and Single Embryo Transfer for IVF/ICSI. How Many Oocytes Do We Need to Maximize Cumulative Live Birth Rates After Utilization of All Fresh and Frozen Embryos? *Hum Reprod*. 2016 Feb; 31 (2): 370-6.
6. Gardner DK, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 1999 Jun; 11 (3): 307-11.
7. Gardner DK, Meseguer M, Rubio C, Treff NR. Diagnosis of human preimplantation embryo viability. *Hum Reprod Update*. 2015; 21: 727-47.
8. Goodman LR, Goldberg J, Falcone T, Austin C, Desai N. Does the addition of time-lapse morphokinetics in the selection of embryos for transfer improve pregnancy rates? A randomized controlled trial. *Fertil Steril*. 2016; 105 (2): 275-85.
9. Minasi MG, Colasante A, Riccio T, Ruberti A, Casciani V, Scarselli F, et al. Correlation between aneuploidy, standard morphology evaluation and morphokinetic development in 1730 biopsied blastocysts: a consecutive case series study. *Hum Reprod*. 2016; 31 (10): 2245-54.
10. Pribenszky C, Nilselid AM, Montag M. Time-lapse culture with morphokinetic embryo selection improves pregnancy and live birth chances and reduces early pregnancy loss: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online*. 2017 Nov; 35 (5): 511-520.

Для цитирования: Сараева Н.В., Спиридонова Н.В., Тугушев М.Т., Шурыгина О.В., Синицына А.И. Опыт использования time-lapse – микроскопии в программах ЭКО и ИКСИ. *Медицинский алфавит*. 2020 (16): 47–50. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-16-47-50>.

For citation: Saraeva N.V., Spiridonova N.V., Tugushev M.T., Shurygina O.V., Sinitynina A.I. Experience of using time-lapse microscopy in the IVF and ICSI programs. *Medical alphabet*. 2020 (16): 47–50. <https://doi.org/10.33667/2078-5631-2020-16-47-50>.

