

Embrüoselektiooni uued võimalused – embrüodiagnostika

Andres Salumets^{1,2}, Peeter Karits¹, Tarmo Tiido¹ ja Ivo Saarma¹ – ¹Nõmme Erahaiгла, AS Ferthal; ²The Family Federation of Finland, Infertility Clinic, Helsinki

kehaväline viljastamine, embrüoselektioon, embrüodiagnostika

Viljatuse kõige tõhusamaks ravimeetodiks on kehaväline viljastamine, mida Eestis on rakendatud alates 90. aastate algusest. Kehavälise viljastamise õnnestumiseks on oluline embrüote selektioon, et siirata kõige arenemisvõimelisem ja kromosomaalselt normaalne embrüo. Selektiooni tulemuslikkuse parandamise uueks võimaluseks on embrüodiagnostika.

Viljatus on üldlevinud meditsiiniline probleem, millega puutub kokku 10–15% paaridest. Kuigi viljatuse ravis kasutatakse väga mitmesuguseid ravimeetodeid, on kõige efektiivsem kehaväline viljastamine (*in vitro fertilisation*, IVF). IVF-protseduure tehakse maailmas üha rohkem: Euroopas teostati 1999. aastal keskmiselt 943 IVF-protseduuri ühe miljoni inimese kohta ning sündis 17 887 last (1,6% kõigist vastündinutest) (1). Eestis on IVF viljatuse ravis kasutusel olnud 90ndate algusest ning IVF-protseduuride arv on aasta-aastalt kasvanud. Eesti meditsiinilise sünniregistri andmetel sündis 2001. aastal IVF abil ligikaudu 100 last, s.o ~0,8% kõigist vastündinutest (2). IVF tulemuslikkust mõjutavad väga mitmed tegurid, seetõttu on küllaltki raske võrrelda erinevate kliinikute tulemusi. Üle-euroopalise statistika põhjal võib väita, et 1999. aastal raseetus 27,7% kõigist IVF-protseduuri läbinud naistest (1). Keskmine tulemuslikkus on küllaltki väike ning ebaõnnestumiste kartuses siiratakse emakasse tavaliselt rohkem kui üks embrüo. Ainult ligikaudu 12%-l juhtudest siirati IVF-protseduuridel emakasse üks embrüo, 39% IVF-protseduuridest lõppes kahe embrüo siirdamisega ning 49% protseduuridel siirati vähemalt kolm embrüot. Selline praktika viib mitmikraseduste suure (26%) osakaaluni viljatuse ravis (1). Mitmikraseduste suur sagedus on aga peamine tegur, mis põhjustab IVF-lasteta antenataalseid ja neonataalseid probleeme ning

suurendab meditsiinilisi kulutusi 5,4 korda võrreldes teiste vastündinutega (3, 4). Nõmme erahaiгла siiratakse maksimaalselt kaks embrüot ning üksikute juhtudel oleme meditsiinilistel näidustustel siiranud ainult ühe embrüo. Ühe embrüo siirdamine IVF-protseduuril (*single embryo transfer*, SET) aitaks täielikult kõrvaldada mitmikraseduste probleemi. SET on populaarsust võitnud ennekõike Põhja-maadetes (Soomes ja Rootsis) ning Belgias (5). Soome viljatuskliinikute 2000. aasta andmete põhjal siirati üks embrüo 24% IVF-protseduuridest (6). SETi kasutamine eeldab, et siirdamiseks valitakse välja kõige arenemisvõimelisem embrüo.

Embrüoselektioon IVF-protseduuril

Tavapäraselt toimub embrüote selektioon ning siirdamine 2. või 3. päeval pärast munarakkude viljastamist. Embrüote mikroskoopiline uurimine on kõige lihtsam, ohutum ning odavam võimalus embrüote arenemisvõime hindamisel. Peamised kriteeriumid, mille alusel toimub embrüote selektioon, on embrüo rakkude ehk blastomeeride jagunemise kiirus ning embrüo morfoloogia (7). Tsütoplasmaatiliste fragmentide, eri suurusega ning mitme tuumaga blastomeeride esinemine vähendab oluliselt embrüote implanteerimisvõimet. Samuti on IVF-protseduuri tulemuslikkus väiksem, kui emakasse siiratakse aeglasema blastomeeride jagunemisega embrüoid. Kasutades munarakudoonorlust, mille korral ühe naise (doonori) munarakud jaotatakse

kahe retsiipiendi vahel, oleme uurinud gameetide osatähtsust embrüo arengus (8). On selgunud, et embrüo morfoloogilised iseärasused sõltuvad ennekõike munarakkude kvaliteedist, kuid blastomeeride jagunemise kiirust mõjutavad nii muna- kui ka seemnerakkude omadused.

Viimastel aastatel on intensiivselt otsitud uusi võimalusi embrüote selektsiooni parandamiseks. Scott ja Smith väitsid 1998. aastal, et embrüote implanteerimisvõimet saab hinnata sügootstaadiumis (esimene päev pärast munarakkude viljastamist) (9). Tavapäraselt siiratakse emakasse vähemalt kaks embrüot. Seetõttu on raskendatud embrüo kvaliteedi ning implanteerumise vahelise seose uurimine, kuna ei ole teada, kumb embrüo implanteerus. SET-protseduur võimaldab täpselt tuvastada embrüo kvaliteedi ning tema arengupotentsiaali vahelise seose. Uurides 200 SET-protseduuri, tulime järeldusele, et sügooti morfoloogia abil ei ole võimalik tuvastada kõrgema arengupotentsiaaliga embrüoid (10). Tähelepanu on juhitud ka sügootide esimese jagunemise tähtsusele IVF-protseduuris. Sügootidel, mis lõpetavad esimese mitootilise jagunemise 25–27 tundi pärast viljastamist, on oluliselt suurem arengupotentsiaal kui aeglasemalt arenevatel sügootidel (11, 12). SET-protseduuride tulemuslikkust uurides oleme leidnud sellele kinnitust (13). Kiiremini arenevad embrüod olid oluliselt parema arengupotentsiaaliga (50% embrüotest implanteerus) kui aeglasemini arenevad embrüod (26,4% embrüotest implanteerus). Seega on embrüote varajane jagunemine osutunud küllaltki heaks lisakriteeriumiks, mida on võimalik kasutada IVF-protseduuril.

Alternatiivseks võimaluseks embrüote selektsioonis on nende kasvatamine blastotsüsti staadiumini. Embrüod arenevad blastotsüsti staadiumini viie päevaga. Kahjuks peatub selle aja jooksul ~50% embrüote areng (14). Ennekõike võib peatuda kromosomaalselt defektsete embrüote areng. Samuti on areng takistatud morfoloogiliselt defektsetel embrüotel (15). Gardner jt (1998) on näidanud, et ligikaudu iga teine emakasse siiratud

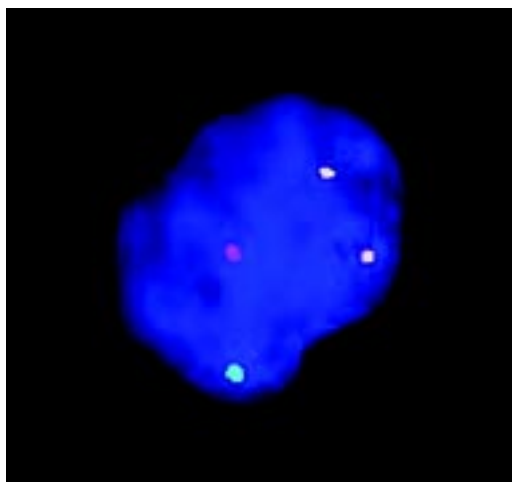
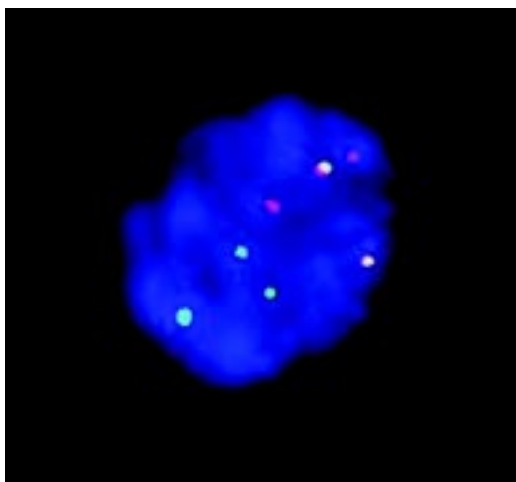
blastotsüst implanteerub (14). Blastotsüstide kasvatamise peamiseks probleemiks on aga see, et ~10% patsientidel ei arene embrüod blastotsüsti staadiumini ning seetõttu embrüote siirdamist ei toimu (14). Samuti takistab blastotsüstide kasvatamise laiemat levikut blastotsüstide külmutamise tehnoloogia puudulikkus, mis ei võimalda IVF-protseduuril üle jäävaid blastotsüste säilitada.

Embrüoselektsiooni uued võimalused – embrüodiagnostika

Põhjused, miks ainult 10–15% emakasse siiratud embrüotest implanteerub, on arste ning teadlasi köitnud juba pikka aega. Üheks peamiseks põhjuseks näib olevat kromosomaalsete defektide suur esinemissagedus preimplantatiivsetes embrüotes. Uurides embrüoid viie erineva kromosoomi suhtes (13., 18., 21., X ja Y), selgus, et ainult 42% kõigist embrüotest olid kromosomaalselt normaalsed (16). Suurem osa embrüotest olid aga kromosomaalselt defektsete: 24% aneuploidsed (trisoomsed või monosoomsed) ning 34% mosaiiksed. Sama seisukohta kinnitab ka meie kogemus: uurisime embrüoid kuue erineva kromosoomi suhtes (13., 16., 18., 21., X ja Y) ning leidsime, et ainult iga kolmas embrüo on kromosomaalselt normaalne. Juhul kui emakasse siiratakse kromosomaalselt defektne embrüo, ebaõnnestub IVF-protseduur. IVF-protseduuri



Joonis 1. Embrüodiagnostika. Embrüo rakkude eemaldamine geneetiliseks analüüsiks.



Joonis 2. Embrüo rakke uuriti FISHi meetodil 6 erineva kromosoomi (13., 16., 18., 21., X ja Y) suhtes. Embrüo osutus kromosomaalselt defektseks (13. kromosoomi trisoomia ehk 47,XY,+13). A. FISH 13. (roheline), 16. (kollane) ning 21. (punane) kromosoomi suhtes. B. FISH 18. (kollane), X (roheline) ning Y (punane) kromosoomi suhtes.

tulemuslikkust oleks võimalik parandada, siirates emakasse kromosomaalselt normaalseid embrüoid.

Embrüodiagnostika (*preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening*, PGD-AS) kasutamise korral eraldatakse kolme päeva vanusest (8rakulised) embrüost kaks rakku (vt jn 1), mida uuritakse FISH (*fluorescence in situ hybridisation*) meetodi abil.

Emakasse siiratakse ainult kromosomaalselt normaalseid (46,XX või 46,XY) embrüoid. Embrüo rakkude eemaldamine ei kahjusta arenevat embrüot ega loodet. Embrüodiagnostika kasutamine on oluliselt parandanud IVF tulemuslikkust: ennekõike on vähenenud varajaste abortide esinemissagedus. Samuti välistab PGD-AS kasutamine kromosoomihaigusega (Downi sündroom) lapse sünni (17). Embrüodiagnostika abil on võimalik parandada IVF-protseduuri tulemuslikkust 1) vanematel, üle 35aastastel patsientidel; 2) patsientidel, kelle eelnevad IVF-protseduurid (≥ 3) on ebaõnnestunud; ja 3) patsientidel, kellel on esinenud (≥ 2) spontaanseid aborte (17).

Aastatel 1999–2001 tehti Euroopas ligikaudu 800 PGD-AS protseduuri (17). Eestis tehti esimene PGD-AS protseduur Nõmme Erahai glas 2002. aastal. PGD-AS teostati 40aastasele

patsiendile, kelle viljatuse on tingitud munajuhade sulgusest, kroonilisest salpingo-ooforiidist ning väikese vaagna liitelistest muutustest. Patsient oli eelnevalt läbinud 5 ebaõnnestunud IVF-protseduuri. PGD-AS käigus uuriti 6 embrüot kuue erineva kromosoomi suhtes (13, 16, 18, 21, X ja Y) (vt jn 2).

Ainult üks embrüo osutus kromosomaalselt normaalseks (46, XY) ning siirati blastotsüsti staadiumis. Kahjuks rasestumist ei toimunud, kuid ettevalmistusel on järgmine embrüodiagnostika protseduur.

Kokkuvõte

Viljatuse ravi tulemuslikkus on viimase kahekümne aasta jooksul oluliselt paranenud, kuid kahjuks õnnestub IVF-protseduur siiski ainult ~30%-l patsientidest. Ebaõnnestumised võivad olla tingitud embrüoselektiooni puudulikkusest. Traditsiooniliselt on embrüote selektioon põhinenud mikroskoopilisel hindamisel, kuid tulevikus on kindlasti suurema tähtsusega embrüodiagnostika. Embrüodiagnostika kasutamisel siiratakse emakasse kromosomaalselt normaalseid embrüoid, mis parandab oluliselt viljatuse ravi kvaliteeti.

Kirjandus

1. Nygren KG, Andersen AN. Assisted reproductive technology in Europe, 1999. Results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2002;17:3260-74.
2. Tellmann A, Karro H, Serkina V. Eesti Meditsiiniline Sünniregister 1992-2001. Eesti Abordiregister 1996-2001. Tallinn: Eksperimentaalse ja Kliinilise Meditsiini Instituut; 2002.
3. Bergh T, Ericson A, Hillensjö T, Nygren KG, Wennerholm UB. Deliveries and children born after in-vitro fertilisation in Sweden 1982-95: a retrospective cohort study. *Lancet* 1999;354:1579-85.
4. Gissler M, Malin Silverio M, Hemminki E. In-vitro fertilization pregnancies and perinatal health in Finland 1991-1993. *Hum Reprod* 1995;10:1856-61.
5. Vilska S, Tiitinen A, Hyden-Granskog C, Hovatta O. Elective transfer of one embryo results in an acceptable pregnancy rate and eliminates the risk of multiple birth. *Hum Reprod* 1999;14:2392-5.
6. STAKES. IVF-tilastot 2000. <http://www.stakes.fi/stakestieto/pdf/2002/Tp8.pdf> 2002.
7. Steer CV, Mills CL, Tan SL, Campbell S, Edwards RG. The cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an in-vitro fertilization and embryo transfer programme. *Hum Reprod* 1992;7:117-9.
8. Salumets A, Suikkari AM, Mols T, Soderstrom-Anttila V, Tuuri T. Influence of oocytes and spermatozoa on early embryonic development. *Fertil Steril* 2002;78:1082-7.
9. Scott LA, Smith S. The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Hum Reprod* 1998;13:1003-13.
10. Salumets A, Hyden-Granskog C, Suikkari AM, Tiitinen A, Tuuri T. The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality. *Hum Reprod* 2001;16:2177-81.
11. Sakkas D, Shoukir Y, Chardonnens D, Bianchi PG, Campana A. Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability. *Hum Reprod* 1998;13:182-7.
12. Shoukir Y, Campana A, Farley T, Sakkas D. Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Hum Reprod* 1997;12:1531-6.
13. Salumets A, Hyden-Granskog C, Mäkinen S, Suikkari AM, Tiitinen A, Tuuri T. Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures. *Hum Reprod* 2003; in press.
14. Gardner DK, Schoolcraft WB, Wagley L, Schlenker T, Stevens J, Hesel J. A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1998;13:3434-40.
15. Alikani M, Calderon G, Tomkin G, Garrisi J, Kokot M, Cohen J. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro. *Hum Reprod* 2000;15:2634-43.
16. Munne S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J. Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril* 1995;64:382-91.
17. ESHRE. ESHRE Preimplantation Genetic Diagnosis Consortium: data collection III (May 2001). *Hum Reprod* 2002;17:233-46.

Summary

New possibilities of embryo selection – preimplantation genetic analysis

Infertility is defined as the inability of a couple to get offspring after one year of intercourse without using any type of contraception. According to different estimates, 10-15% of couples are coping with involuntary childlessness. The birth of the first IVF (*in vitro* fertilisation) baby opened up a completely new frontier in medical treatment of infertility. Pregnancy rates have constantly improved during the last ten years and nowadays the success rates of around 25-30% are routinely reported by majority of IVF programmes. Unfortunately, the need to increase pregnancy rate has led to transfer of multiple embryos resulting in

unacceptably high (~30%) multiple pregnancy rate. In order to achieve total elimination of multiple pregnancies only a single embryo should be transferred. Transferring one embryo requires extremely careful evaluation of embryo quality. Traditionally, embryos are selected for transfer two days after insemination considering simultaneously their morphological appearance and growth rate. More promising future strategies for embryo selection can, however, be based on preimplantation genetic diagnosis.

asalumets@ferthal.ee