Үр шилжүүлэн суулгах эмчилгээнд соронзон идэвхит эс ялгах технологи ашигласан үр дүн

Э.Одхүү[1,2], Ч.Оргилболд[1], Г.Ариунаа[1], Х.Дөлгөөн[1], Т.Тэлмэн[1], Н.Баасандамба[1], О.Зэсэмдорж[1,2], Э.Будзаяа[1], Л.Үнэнцацрал[1], Г.Батбаатар[2], М.Мөнхзол[2]
[1] "RMC" Үр шилжүүлэн суулгах үндэсний төв
[2] АШУҮИС, Био-Анагаахын сургууль
odkhuu@mnums.edu.mn

Түлхүүр үг
астенотератозоосперми, ДНХ фрагментаци, эрэгтэй үргүйдэл

Товч утга
Өндгөн эсийн цитоплазмд сперматазоидыг тарих арга нь эрэгтэй шалтгаант үргүйдлийн эмчилгээний алтан стандарт хэмээн тооцогддог. Үрийн шингэнээс соронзон идэвхит эс ялгах технологи ашиглан, эр бэлгийн эс ялгаж, үр шилжүүлэн суулгах эмчилгээнд ашиглан, үр дүнг харьцуулан судлах зорилгоор энэхүү судалгааг хийлээ. "RMC" Үр шилжүүлэн суулгах төвд 2018-2020 онд үр шилжүүлэн суулгах эмчилгээнд хамрагдсан 106 үйлчлүүлэгчийг хамруулаа. Судалгаанд ороцогдыг хяналтын, эрэгтэй шалтгаант үргүйдэлтэй (олигоастенотератозоосперми OATS), эрэгтэй шалтгаант үргүйдэлтэй+MACS хийсэн (OATS+MACS) хэмээн 3 бүлэгт хувааж, үр дүнг тооцлоо. Өндгөвчийг "Зөөлөн сэдээх аргачлал"-аар сэдээж, 22G (Kitazato, Japan) зүү ашиглан, өндгөн эсийг соруулсан. Хяналтын болон OATS бүлгийн үрийн шингэнийг угааж цэвэрлэн үр тогтоолт хийсэн бол OAST+ACS бүлэгт үрийн шингэнээс соронзон идэвхит эс ялгах (Annexin V kit, Miltenyi Biotech, Germany) аргаар, ДНХ фрагментаци үүсээгүй эр бэлгийн эсийг ялгасан. Микроскопийн хяналтанд (Nikon Eclipse Ts2) өндгөн эсэд ICSI-Injection (TPC, Australia) ашиглан, эр бэлгийн эс тарьж үр тогтоон, үр хөврөлийн хөгжлийг үнэлж, үр дүнг харьцуулан судалсан. Судалгаанд хамрагдагсдыг 3 бүлэгт хувааж (OATS n=39, OATS_MASC n=29, хяналт n=38), нийт 404 өндгөн эсэд тарих аргаар үр тогтоолт хийж, үр дүнг харьцуулан тооцов. Үр тогтолтыг тооцоход OAST бүлэгт 72.3%, бластоцист үүсэлт 48.9% байсан. Харин OATS+MACS бүлэгт үр тогтолт 77.9%, бластоцист үүсэлт 58.5% байгаа нь MACS аргаар эс ялган, үр тогтоох нь үр дүнг 9.64%-иар нэмэгдүүлж, хяналтын бүлэгтэй (үр тогтолт 82.9%, бластоцист үүсэлт 64.7%) ойролцоо байна. Үрийн шингэн дэх эр бэлгийн эсийн ДНХ фрагментацийг MACS аргаар ялгаж, үр шилжүүлэн суулгах эмчилгээнд ашиглах нь эмчилгээний үр дүнг (9.64%, $p<0.01$) нэмэгдүүлж байна.

Үндэслэл
Эрэгтэй шалтгаант үргүйдлийн эмчилгээний Алтан стандарт нь өндгөн эсийн цитоплазмд сперматазоидыг тарих арга хэмээн тооцогддог ажээ. Уг эмчилгээний үед нягтын зөрүү бүхий уусмал ашиглан (Density Gradient Centrifugation – DGC арга), үрийн шингэнээс хөдөлгөөнтэй, бүтцийн хувьд эрүүл эр бэлгийн эсийг ялган авч, үр тогтооход ашигладаг. Үрийн шингэн дэх эр бэлгийн эсийн хөдөлгөөн, морфологи бүтэц хэвийн хэдий ч, ДНХ фрагментаци олонтаа тохиолддог болохыг судлаачид тэмдэглэжээ. ДНХ фрагментаци бүхий, апоптоз эхэлсэн эр бэлгийн эсээр үр тогтоох нь үр шилжүүлэн суулгах эмчилгээ үр дүнгүй болох нэг шалтгаан хэмээн үздэг. Орчин цагт соронзон идэвхит эс ялгах (Magnetic activated cell sorting-MACS) технологи ашиглан, үрийн шингэнээс эр бэлгийн гэмтэлгүй эсийг сонгох боломжтой болжээ. Судлаач Ziarati, N. (2018), Zhang, H. (2018) нар соронзон идэвхит эс ялгах технологи ашиглан, эр бэлгийн эсийг ялгаж үр тогтоох нь эмчилгээний үр дүнд сайн нөлөөтэй хэмээн дүгнэжээ.

Зорилго, зорилт

Үрийн шингэнээс ДНХ фрагментаци бүхий эр бэлгийн эсийг Соронзон идэвхит эс ялгах технологи ашиглан ялгаж, үр шилжүүлэн суулгах эмчилгээний үр дүнг харьцуулан судлах зорилго тавин энэхүү судалгааг хийлээ.

Арга аргачлал

"RMC" Үр шилжүүлэн суулгах төвд 2018-2020 онд үргүйдлийн онош батлагдан үр шилжүүлэн суулгах эмчилгээнд хамрагдсан 106 үйлчлүүлэгчийг хамруулаа. Судалгаанд оролцогчдыг хяналт (үрийн шингэний үзүүлэлт хэвийн), эрэгтэй шалтгаант үргүйдэлтэй (олигоастенотератозоосперми OATS), эрэгтэй шалтгаант үргүйдэлтэй ба MACS хийсэн (OATS+MACS) хэмээн 3 бүлэгт хуваан, үр дүнг тооцлоо. Өндгөвчийг "Зөөлөн сэдээх аргачлал"-аар сэдээж өндгөн эсийг хөгжүүлэн, боловсруулж, хэт авиан хяналтанд 22G (Kitazato, Japan) зүү ашиглан, хатгаж фолликулын шингэнийн соруулсан. Уг шингэнээс нийт 404 өндгөн эсийг микроскопийн хяналтанд ялган авч, үр тогтоолтонд ашиглав. Судалгаанд хамрагдагсдын үрийн шингэнийг DGC арга ашиглан, угааж цэвэрлэн, эр бэлгийн эсийг ялган авсан. Харин OAST+ACS бүлэгт нэмэлтээр соронзон идэвхит эс ялгах технологи ашиглан (Annexin V kit, Miltenyi Biotech, Germany), ДНХ фрагментаци үүсээгүй эр бэлгийн эсийг ялган, үр тогтоолт хийв. Өндгөн эсийн цитоплазмд эр бэлгийн эсийг тарихдаа ICSI-Injection зүү (TPC, Australia) ашиглан, микроскопийн хяналтанд (Nikon Eclipse Ts2, x400) хийж, үр тогтоосон. Цаашид үр хөврөлийг 37C^0 дулаантай, 5% CO_2, 5% O_2, 90 N_2 бүхий in vitro орчинд 5-7 хоног өсгөвөрлөн, бластоцист үүсгэж, эхийн умайд хэт авиан хяналттайгаар шилжүүлэн суулгасан. Судалгааны бүлэг тус бүрт In vitro орчин дахь хөврөлийн хөгжлийн үзүүлэлт, суулгалт хийсний дараах эмнэлзүйн үр дүнг харьцуулан судлав.

Үр дүн

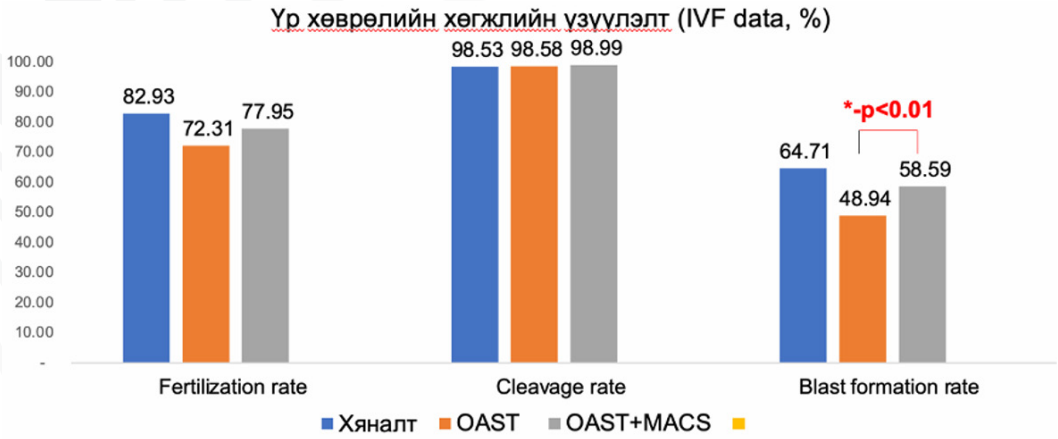
Судалгаанд хамрагдагсдыг 3 бүлэгт хувааж, бүлэг тус бүрийн ерөнхий үзүүлэлтийг хүснэгт 1-т харуулав.

Хүснэгт 1. Ерөнхий үзүүлэлт

	Хяналт n=38	OATS n= 39	OATS + MACS n=29
Дундаж нас (жил)	33.88±3.85	33.4±3.99	34.03±4.24
Өндгөн эсийн тоо	82	195	127
Үрийн шингэний үзүүлэлт			
• Хэмжээ (ml)	3.51±1.44	3.42±1.7	3.03±1.44*
• Нягтаршил (10^6)	82.49±3.64	21.90±2.18**	31.80±3.46**
• Хөдөлгөөн (%)	63.62±7.99	33.65±1.25**	46.01±1.27**
• Давшилтат хөдөлгөөн (%)	44.39±8.22	19.84±0.88**	26.00±0.78*
• Хэвийн бүтэц (%)	5.4±1.94	1.99±0.94**	2.00±0.75**

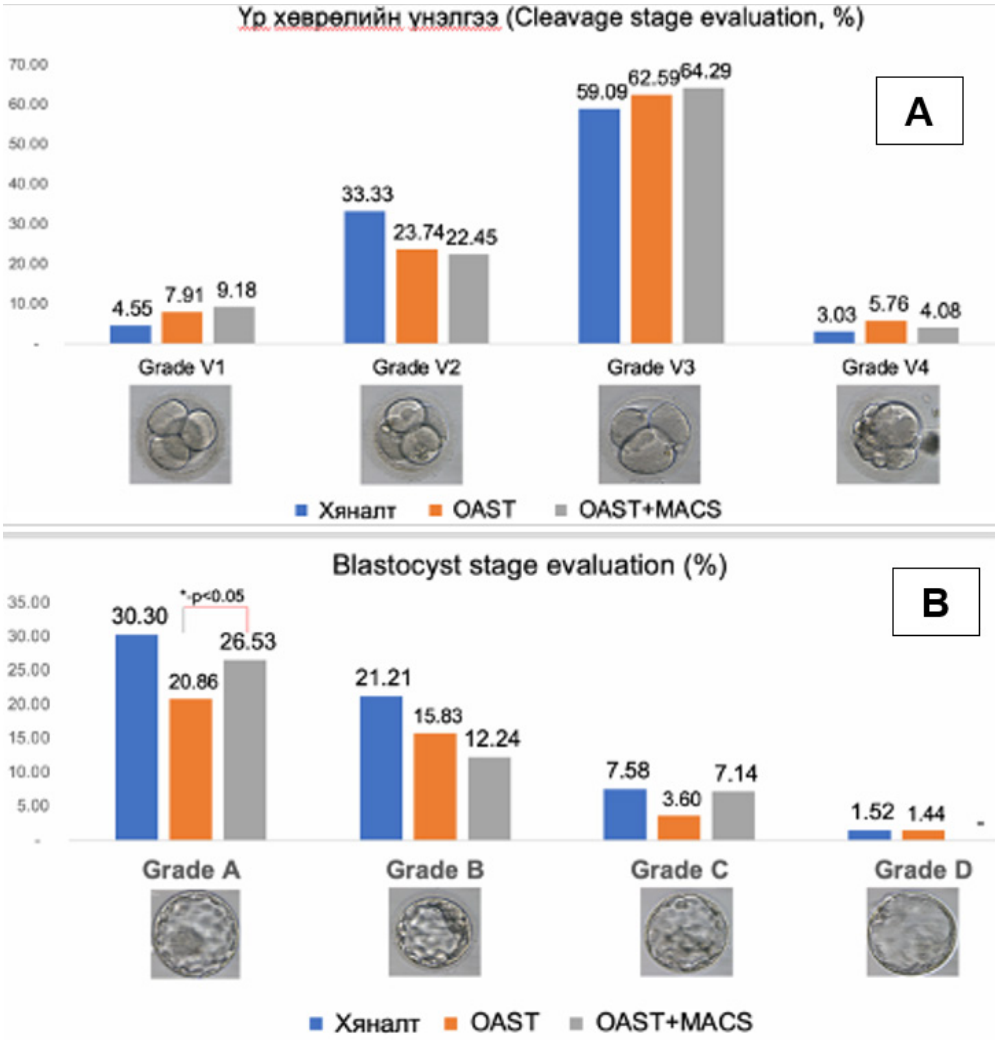
*-p<0.05, **-p<0.01

Дээрх хүснэгтээс харахад үрийн шингэний үзүүлэлт нь OATS болон OATS+MACS бүлэгт хяналтын бүлгээс статистик ач холбогдол бүхий бага тодорхойлогдсон. Олон улсад in vitro орчин дахь үр хөврөлийн хөгжлийг үр тогтолтын (fertilization rate), хөврөл хуваагдлын (cleavage rate), болон бластоцист хөгжлийн (blast formation rate) хувь зэрэг үзүүлэлтээр үнэлж, тооцдог. Тиймээс бид эдгээр үзүүлэлтийг бүлэг тус бүрт тооцон, Зураг 1-т харуулав.



Зураг 1. Үр хөврөлийн хөгжлийн үзүүлэлт (%)

Дээрх зургаас харахад судалгааны 3 бүлэгт үр тогтолтын ба хөврөл хуваагдлын хувь нь бодит ялгаагүй, харин соронзон идэвхит эс ялгах технологи ашигласан бүлэгт бластоцист хөгжлийн хувь нь (58.59%) эрэгтэй шалтгаант үргүйдэлтэй бүлгийнхээс (48.94%) статистик ач холбогдол бүхий илүү байсан. Үр хөврөлийн чанарын үзүүлэлтийг өсгөвөрийн 2 дахь өдөр "Veeck", 5 дахь өдөр "Kato" ангилал ашиглан үнэлж, бүлэг хоорондын ялгаатай байдлыг тодорхойлон, дараах зурагт харуулав.



Зураг 2. Үр хөврөлийн чанарын үзүүлэлт (А-өсгөвөрийн 2 дахь өдөр, В- өсгөвөрийн 5 дахь өдөр)

Дээрх зургаас харахад үр хөврөл хуваагдлын шат буюу өсгөвөрийн 2 дахь өдөр сайн чанарын үр хөврөл (Grade 1 болон Grade 2) үүсэж хөгжих хувь бүлэг хооронд ялгаагүй байв. Харин сайн чанарын бластоцист үүсэх нь соронзон идэвхит эс ялгах технологи ашигласан бүлэгт эрэгтэй үргүйдэлтэй бүлгээс статистик ач холбогдол бүхий илүү байгаа нь тогтоогдлоо.

Нийт 76 эмэгтэйд үр хөврөл шилжүүлэн суулгасан ба суулгалтын дараах үр дүнг хүснэгт 2-т харуулав.

Хүснэгт 2. Үр шилжүүлэн суулгасан эмчилгээний үр дүн

	Хяналт n=26	OAST n=31	OAST+MACS n=19
Имплантацийн хувь (Implantation rate-%)	73.08 (n=19)	67.74(n=21)	63.16 (n=12)
Жирэмслэлтийн хувь (Clinical pregnancy rate-%)	68.42 (n=13)	52.38 (n=11)	50.00 (n=6)
Амьд төрөлтийн хувь (Live birth rate-%)	23.08 (n=6)	16.13 (n=5)	21.05 (n=4)*

*-p<0.05

Дээрх хүснэгтээс харвал имплантаци ба жирэмслэлтийн хувь бүлэг бүрт статистик ач холбогдол бүхий ялгаагүй ч амьд төрөлтийн хувь нь соронзон идэвхит эс ялгах технологи ашигласан бүлэгт эрэгтэй үргүйдэлтэй бүлгээс статистик ач холбогдол бүхий илүү байна.

Хэлцэмж

Бидний судалгааны үр дүнгээс харвал соронзон идэвхит технологи ашиглан, үрийн шингэнээс эр бэлгийн эсийг ялган үр тогтоох нь бластоцист үүсэлтийг 9.64%, амьд төрөлтийг 4.92% тус тус нэмэгдүүлсэн. Судлаачид, фосфотидилсерин (phosphatidylserine PS) нь эсийн митохондрийн мембран ба ДНХ гэмтлийг үнэлэх нэг үзүүлэлт хэмээн дүгнэсэн байдаг. Судлаач Vendrell нар (2013) үрийн шингэний үзүүлэлт хэвийн эрэгтэйчүүдэд эр бэлгийн эсийн ДНХ фрагментаци ба апоптозыг үнэлэн судалжээ. Уг судалгаагаар апоптозын маркер болох PS-тэй соронзон идэвхит анексин V холбох замаар (MACS арга) үрийн шингэнээс гэмтэлгүй эр бэлгийн эсийг ялгаж болохыг тогтоосон байна. Судлаач Lee нар (2010), Khalid (2011) болон Zahedi нар өндгөн эсийн цитоплазмд эр бэлгийн эс тарихдаа MACS арга ашиглах нь хөврөлийн хөгжилд илүү эерэг нөлөөтэйг баталжээ. Судлаач Sбnchez-Martнn, P. нар (2017) соронзон идэвхит аргаар эр бэлгийн эсийг ялгаж, үр шилжүүлэн суулгахад зулбах эрсдэл буурдаг төдийгүй, амьд төрөлтийн хувь ч нэмэгддэг болохыг тогтоосон. Дээрх судлаачид соронзон идэвхит технологиор анексин V ашиглан, ДНХ фрагментацигүй, апоптоз эрт үе эхлээгүй, хэвийн бүтэцтэй, хөдөлгөөний идэвх сайтай эр бэлгийн эс ялгах боломжтой ба энэ нь эмчилгээний цаашдын дүн, тавиланг сайжруулдаг хэмээн дүгнэжээ. Gil нар (2013) MACS технологи ашигласан 499 судалгаанд мета-анализ хийж, энэхүү аргыг үр шилжүүлэн суулгах эмчилгээний стандарт болгохыг санал болгожээ.

Дүгнэлт

Үрийн шингэн дэх эр бэлгийн эсийн ДНХ фрагментацийг MACS аргаар ялгаж, үр тогтоох нь in vitro орчинд сайн чанарын бластоцит хөгжихөд эерэг нөлөөтэй байна (9.64%, x^2-1.87 p<0.05). Эрэгтэй шалтгаант үргүйдлийн үед ДНХ фрагментацийг ялгаж, үр шилжүүлэн суулгах эмчилгээнд ашиглах нь имплантаци ба жирэмслэлтийн явцад төдийлөн нөлөөлөхгүй ч амьд төрөлтийн хувийг нэмэгдүүлж байна (4.92%, p<0.05).

Талархал

Энэхүү судалгааг хийх боломж бүрдүүлсэн "RMC" үр шилжүүлэн суулгах үндэсний төвийн эмч, сувилагч, эмбриологич, нийт ажилчдад гүн талархал илэрхийлье.

Ном зүй

1. *Chi, HJ. et al. (2016) Efficient isolation of sperm with high DNA integrity and stable chromatin packaging by a combination of density-gradient centrifugation and magnetic-activated cell sorting. Clin Exp Reprod Med. 43(4): 199–206.*
2. *Degheidy, T. et al. (2015) Magnetic activated cell sorting: an effective method for reduction of sperm DNA fragmentation in varicocele men prior to assisted reproductive techniques. Andrologia 47(8): 892–6.*

3. *Troya, J. et al. (2015) Annexin V-MACS in infertile couples as method for separation of sperm without DNA fragmentation. JBRA Assisted Reproduction 19(2): 66–69.*
4. *Vendrell, X. et al. (2014) Correlation between aneuploidy, apoptotic markers and DNA fragmentation in spermatozoa from normozoospermic patients. Reprod Biomed Online 28(4): 492–502.*
5. *Sheikhi, A. et al. (2013) Elimination of apoptotic spermatozoa by magnetic-activated cell sorting improves the fertilization rate of couples treated with ICSI procedure. Andrology 1(6): 845–9.*
6. *Zahedi, A. et al. (2013) Zeta potential vs apoptotic marker: which is more suitable for ICSI sperm selection? J Assist Reprod Genet. 30(9): 1181–6.*
7. *Gil, M. et al. (2013) Sperm selection using magnetic activated cell sorting (MACS) in assisted reproduction: a systematic review and meta-analysis. J Assist Reprod Genet. 30(4): 479–85.*
8. *Herrero, MB. et al. (2012) Differential enrichment of sperm with no DNA strand breaks using magnetic activated cell sorting (MACS) in men with various categories of semen parameters. Human reproduction 27 (suppl. 2): ii121–ii150.*
9. *San Celestino, M. et al. (2011) Improved pregnancy rate after sperm magnetic separation technique in egg donation cycles using frozen sperm samples. Human Reproduction 26 (suppl. 1): i123–i148.*
10. *Khalid, S. N. et al. (2011) Pregnancy rate improves in couples with unexplained infertility following intrauterine insemination (IUI) with magnetically selected non-apoptotic sperms. Fertility and Sterility 96(3); S25.*
11. *Lee, T. H. et al. (2010) Magnetic-activated cell sorting for sperm preparation reduces spermatozoa with apoptotic markers and improves the acrosome reaction in couples with unexplained infertility. Hum Reprod. 25(4): 839–46.*
12. *Zhang, H. et al. (2018) Selection of viable human spermatozoa with low levels of DNA fragmentation from an immotile population using density gradient centrifugation and magnetic-activated cell sorting. Andrologia 50(1).*
13. *Ziarati, N. et al (2018) Clinical outcomes of magnetic activated sperm sorting in infertile men candidate for ICSI. Hum. Fertil. 24: 1–8.*
14. *Esbert, A. et al. (2017) Spermatozoa with numerical chromosomal abnormalities are more prone to be retained by Annexin V-MACS columns. Andrology 5(4): 807–813.*
15. *Berteli, T.S. et al. (2017) Magnetic-activated cell sorting before density gradient centrifugation improves recovery of high-quality spermatozoa. Andrology 5(4): 776–782.*
16. *Sбnchez-Martнn, P. et al. (2017) Magnetic cell sorting of semen containing spermatozoa with high DNA fragmentation in ICSI cycles decreases miscarriage rate. Reprod Biomed Online 34(5): 506–512.*
17. *Romany, L. et al. (2017) Obstetric and perinatal outcome of babies born from sperm selected by MACS from a randomized controlled trial. J Assist Reprod Genet. 34(2): 201–207.*

Clinical outcome of magnetic activated cell sorting technology in assisted reproductive treatment

[1,2]Odkhuu.E, [1]Orgilbold.Ch, [1]Ariunaa.G, [1]Dulguun.Kh, [1]Telmen.T, [1]Baasandamba.N, [1,2]Zesemdorj.O, [1]Budzaya.E, [1]Unentsatsral.L, [2]Batbaatar.G, [2]Munkhzol.M
[1]"RMC" National IVF center,
[2] Mongolian National University of Medical Sciences
odkhuu@mnums.edu.mn

ABSTRACT

Intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI) is a specialized form of in vitro fertilization (IVF) and is used as a gold standard technique for the treatment of severe male factor infertility. To determine whether the use of Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) as a sperm selection technique improves ART success rates in couples undergoing assisted reproduction treatment. In this study, we included total of 106 infertile couples, between 2018 and 2020 at RMC IVF center. All semen samples allocated into 3 group (control, oligoastenoteratozoospermia and oligoastenoteratozoospermia with MACS). We use mild stimulation for ovarian induction, 22G (Kitazato, Japan) needle used for oocyte pick up under the control ultrasound. Density gradient centrifugation was performed in all semen for sperm isolation. MACS was performed isolated sperm incubated with AV-conjugated microbeads. The ICSI procedure was performed according to standard protocols under the control inverted microscope (Nikon Eclipse Ts2). We did 404 ICSI procedure divided into 3 group (Control n=38, OATS n=39, OATS+MASC n=29). Fertilization rate was 72.3% vs 77.9% and blast formation rate was 48.9% vs 58.5% in OATS vs OATS+MACS group. We concluded that to separate DNA fragmentation sperm by MACS procedure could be positive effect embryo development.