

Strokovni prispevek/Professional article

ZORENJE ČLOVEŠKIH JAJČNIH CELIC V POGOJIH IN VITRO

MATURATION OF HUMAN OOCYTES IN VITRO

Mojca Čížek-Sajko, Veljko Vlasisavljevič, Vilma Kovač

Oddelek za reproduktivno medicino in ginekološko endokrinologijo, Služba za ginekologijo in perinatologijo, Splošna bolnišnica Maribor, Ljubljanska 5, 2000 Maribor

Izvleček

- Izhodišča** *Pridobivanje nezrelih jajčnih celic in nato zorenje v pogojih in vitro je obetajoča metoda zdravljenja neplodnosti. Pri preiskovankah z morfološko normalnimi jajčniki in rednim menstruacijskim ciklusom ter pri preiskovankah s sindromom policističnih jajčnikov (PCOS) smo v postopkih zunajtelesne oploditve ugotavljali uspešnost zorenja jajčnih celic v pogojih in vitro.*
- Metode** *Pri 73 neplodnih parih smo retrospektivno analizirali 87 postopkov zunajtelesne oploditve z zorenjem jajčnih celic v pogojih in vitro. Primerjali smo uspešnost treh različnih protokolov hormonske priprave preiskovank: preiskovanke z normalnim menstruacijskim ciklusom in brez hormonskega spodbujanja (skupina A, n = 27); preiskovanke s PCOS in hormonsko pripravo s folitropinom (folikle spodbujajočim hormonom, FSH) (skupina B, n = 22); preiskovanke s PCOS in hormonsko pripravo s humanim horionskim gonadotropinom (hCG) (skupina C, n = 38). Uspešnost postopka smo ovrednotili s sposobnostjo jajčnih celic za zorenje, za oploditev in za razvoj v zarodke ter s kakovostjo zarodkov in njihovo sposobnostjo za ugnezditev v maternico.*
- Rezultati** *Pri preiskovankah z normalnim menstruacijskim ciklusom (n = 27) smo dobili bistveno manj nezrelih jajčnih celic ($3,2 \pm 2,5$) kot pri preiskovankah s PCOS in spodbujanih s FSH ($11,7 \pm 7,2$) oziroma preiskovankah s PCOS in spodbujanih s hCG ($10,4 \pm 7,2$). Stopnja dozorevanja jajčnih celic, stopnja oploditve in stopnja delitve zigot v zarodke je bila pri skupini A 57,7 %, 63,2 % in 91,7 %, pri skupini B 57,6 %, 66,2 % in 90,0 %, ter pri skupini C 58,0 %, 66,2 % in 91,0 % (razlike med skupinami so bile statistično neznačilne). Šest zanositev smo zabeležili le pri preiskovankah s PCOS. Delež zanositve na prenos zarodkov je bil 1/20 (5,0 %) pri preiskovankah, spodbujanih s FSH, in 5/33 (15,2 %) pri preiskovankah, spodbujanih s hCG.*
- Zaključki** *Zorenje jajčnih celic v pogojih in vitro je uspešno tako pri preiskovankah z morfološko normalnimi jajčniki in rednim menstruacijskim ciklusom kot pri preiskovankah s sindromom policističnih jajčnikov. Metoda zorenja jajčnih celic v pogojih in vitro v postopku zunajtelesne oploditve je klinično uporabna predvsem za preiskovanke s PCOS. Kot najuspešnejši protokol hormonske priprave preiskovank na punkcijo nezrelih foliklov se je izkazal protokol spodbujanja s hCG.*
- Ključne besede** *zorenje in vitro; FSH; hCG; normalni jajčniki; policistični jajčniki*

Avtor za dopisovanje / Corresponding author:

Mojca Čížek-Sajko, univ. dipl. biol., Oddelek za reproduktivno medicino in ginekološko endokrinologijo, Služba za ginekologijo in perinatologijo, Učna bolnišnica Maribor, Ljubljanska 5, SI-2000 Maribor, Slovenija, tel.: +386 2 321 100, faks: +386 2 3312 393, e-mail: mojca.cs@sb-mb.si

Abstract

- Background** *Immature oocyte retrieval followed by in vitro maturation is a promising infertility treatment option. In patients with morphologically normal ovaries and regular menstrual cycles and in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS) we attempted to assess the success of oocyte in vitro maturation in in vitro fertilization (IVF) procedures.*
- Methods** *Retrospectively we analyzed 87 IVF procedures with in vitro maturation of oocytes carried out in 73 infertile couples treated at the Maribor Teaching Hospital. We compared the success following three different hormone priming protocols: regular cycling patients with normal ovaries and without hormone priming (Group A, n = 27); patients with PCOS and hormone priming with follitropin (follicle stimulating hormone, FSH) (Group B, n = 22); patients with PCOS and hormone priming with human chorionic gonadotrophin (hCG) (Group C, n = 38). Success of the procedure was evaluated on the basis of the ability of oocytes to mature, fertilize and develop into embryos, and on the basis of the quality of embryos and their ability to implant in the uterus.*
- Results** *In regular cycling patients with normal ovaries (n = 27) we obtained a significantly lower number of immature oocytes (3.2 ± 2.5) compared with patients with PCOS and FSH priming (11.7 ± 7.2) or those with PCOS and hCG priming (10.4 ± 7.2). The oocyte maturation rate, the fertilization rate and the embryo cleavage rate were as follows: in Group A 57.7 %, 63.2 % and 91.7 %, in Group B 57.6 %, 66.2 % and 90.0 %, and in Group C 58.0 %, 66.2 % and 91.0 % (the differences between groups were not statistically significant). Six pregnancies were recorded only in patients with PCOS. The pregnancy rate per embryo transfer was 1/20 (5.0 %) in patients with FSH priming, and 5/33 (15.2 %) in patients with hCG priming.*
- Conclusions** *Oocyte in vitro maturation is successful in patients with normal ovaries and regular menstrual cycle as well as in those with polycystic ovary syndrome. Clinically the method of in vitro maturation of oocytes in IVF procedures is particularly justified in patients with PCOS. The hCG priming protocol proved the most successful hormone priming protocol for patients prior to puncture of immature follicles.*
- Key words** *in vitro maturation; FSH; hCG; normal ovaries; polycystic ovaries*

Uvod

Metoda zorenja jajčnih celic v pogojih *in vitro* (in vitro maturacija, IVM) se vse bolj uveljavlja kot ena od alternativ standardnih postopkov zdravljenja neplodnosti z oploditvijo z biomedicinsko pomočjo (OBMP) pri človeku. Največ koristi obeta predvsem ženskam s sindromom policističnih jajčnikov (PCOS), ki jih med zdravljenjem neplodnosti spodbujamo z gonadotropini. Zaradi hormonskega spodbujanja so bolnice izpostavljene povečanemu tveganju za razvoj sindroma ovarijske hiperstimulacije (OHSS). Pojavnost zmerne oblike OHSS je ocenjena na 6 % na cikel, pojavnost hude oblike pa se giblje od 0,5 do 5 % na cikel. Pojav težjih oblik OHSS je pri bolnicah s PCOS precej višji kot pri bolnicah z normalnimi jajčniki.¹ Zadovoljivi rezultati so bili doseženi tudi pri ženskah z morfološko normalnimi jajčniki in rednimi menstruacijskimi cikli² in pri preiskovankah, ki imajo slab odziv na spodbujanje ovulacije z eksogenimi gonadotropini.^{3,4} Metodo IVM lahko uporabimo tudi v naravnem ciklusu OBMP, kjer dobimo eno zrelo jajčno celico iz vodilnega folikla in nezrele jajčne celice iz manjših foliklov,⁵ s čimer lahko izboljšamo uspešnost zunajtelesne oploditve v naravnem ciklusu.

Za metodo IVM še vedno ni enotnega kliničnega in laboratorijskega protokola. Pri preiskovankah z normalnim menstruacijskim ciklusom naj bi hormonsko zdravljenje pred punkcijo ne imelo nobenega pomembnega učinka na izid postopka.⁶ Chian in sodelavci^{7,8} so poročali o večji uspešnosti metode pri hormonski pripravi preiskovank na punkcijo nezrelh foliklov s humanim horionskim gonadotropinom (hCG). Ugotovili so, da aplikacija hCG 36 ur pred punkcijo izboljša stopnjo jedrnega dozorevanja jajčnih celic. Poročajo o 40-odstotni stopnji zanositve, kar je bistveno več v primerjavi z drugimi protokoli (od 1–2 % do 29 %).^{6,9,10} Ista skupina raziskovalcev je tudi poročala, da je pri preiskovankah s PCOS možno doseči takšno stopnjo zanositve na cikel, ki je primerljiva z rezultati standardnih postopkov OBMP.¹¹ Drugi raziskovalci^{6,10,12,13} so preizkušali pripravo preiskovank na punkcijo nezrelh foliklov s follitropinom, vendar so si njihovi rezultati nasprotujoči. Wynn in njegovi sodelavci¹⁰ so v svoji raziskavi ugotovili, da priprava preiskovanke s FSH poveča število dozorevajočih foliklov in s tem število nezrelh jajčnih celic, ki jih dobimo pri punkciji. Nasprotno pa je Mikkelsen s sodelavci⁶ pokazala, da tridnevno zdravljenje preiskovank s FSH ne poveča števila dobljenih jajčnih ce-

lic na punkcijo, stopnje dozorevanja ali stopnje delitve zarodkov. Ista skupina raziskovalcev⁹ je kasneje ugotovila, da priprava s FSH pri preiskovankah s PCOS izboljša sposobnost jajčnih celic za zorenje in sposobnost zarodkov za ugnezditev.

V letu 2003 je bil naš center za IVF vključen v mednarodno raziskavo o uporabnosti metode IVM. Na Oddelku za reproduktivno medicino in ginekološko endokrinologijo Splošne bolnišnice Maribor smo izvedli raziskavo uspešnosti zorenja jajčnih celic v pogojih *in vitro*. Metoda je obetala koristi za specifično skupino preiskovank, zato smo jo kot cenejšo in enostavnejšo od standardnih postopkov OBMP ponudili neplodnim parom v Sloveniji.

Material in metode

Preiskovanci

V raziskavo smo vključili 73 neplodnih parov, pri katerih je bil v zdravljenju neplodnosti predviden postopek IVF in so se odločili izkoristiti ponujeno možnost sodelovanja v naši raziskavi. Opravili smo 87 postopkov zunajtelesne oploditve z zorenjem jajčnih celic v pogojih *in vitro*. Vključitvena merila za preiskovanke so bila: starost ≤ 39 let, sindrom policističnih jajčnikov ali pa morfološko normalni jajčniki in redni menstruacijski ciklusi s tubarnim vzrokom neplodnosti oziroma nepoznanim vzrokom neplodnosti. Vključili smo tudi neplodne pare z moško neplodnostjo, razen azoospermije. Iz raziskave pa smo izključili preiskovanke takrat, ko smo na 3. dan menstruacijskega ciklusa ugotovili: debelino endometrija > 5 mm ali koncentracijo E₂ $> 0,2$ nmol/L ali ovarijsko cisto premera > 20 mm, ali pa premer vodilnega folikla > 14 mm pri zadnji UZ preiskavi. Vsi neplodni pari, ki so bili vključeni v raziskavo, so bili o poteku raziskave obveščeni in so izrazili svojo privolitve s podpisom privolitvene izjave. Raziskavo je odobrila Komisija za medicinsko etiko pri Ministrstvu za zdravje Republike Slovenije.

Hormonska priprava preiskovank

Preiskovanke smo na punkcijo antralnih foliklov pripravili s hormonskim spodbujanjem po treh različnih protokolih: brez hormonskega spodbujanja pri preiskovankah z morfološko normalnimi jajčniki in rednimi menstruacijskimi ciklusi (skupina A, $n = 27$), hormonsko spodbujanje rasti foliklov s FSH pri preiskovankah s PCOS (skupina B, $n = 22$) ter hormonsko spodbujanje ovulacije s hCG pri preiskovankah s PCOS (skupina C, $n = 38$).

Pri preiskovankah s PCOS (skupina B in C) smo sprožili krvavitev z oralnim noretisteronom (Primolut Nor, Schering AG, Nemčija) v odmerku 10 mg dnevno osem do deset dni zapored. Preiskovanke iz skupine B smo hormonsko spodbujali z rekombinantnim folitropinom (Gonal-F, Serono, Švica) z dozo 150 IU/dan tri dni od 3. dneva menstruacijskega ciklusa. Aspiracijo foliklov smo izvedli po 2 dneh prekinitve hormonskega zdravljenja. Preiskovanke iz skupine C pa so bile spodbujane samo z 10.000 IU hCG (Profasi,

Serono) 36 ur pred aspiracijo foliklov, tj. med 10. in 14. dnevom ciklusa.

Endometriji preiskovanke smo hormonsko pripravili na ugnezditev zarodkov z estradiol valeratom 3×2 mg dnevno (Estrofem 2 mg, NovoNordisk, Danska) od dneva punkcije. Za lutealno podporo so preiskovanke prejele didrogesteron 3×10 mg dnevno (Dabroston 10 mg, Belupo, Hrvaška) od drugega dne po punkciji. Hormonsko zdravljenje je preiskovanka prejela do testa na nosečnost. V primeru pozitivnega testa je z zdravljenjem nadaljevala do 12. tedna nosečnosti.

Aspiracija foliklov in zorenje jajčnih celic

Pri vseh preiskovankah smo prvi ultrazvočni pregled z vaginalnim tipalom opravili 3. dan menstruacijskega ciklusa. Ocenili smo velikost jajčnikov in foliklov ter izmerili debelino endometrija, ki je morala biti < 5 mm. Naslednja ultrazvočna preiskava je bila 6. dan menstruacijskega ciklusa. Tretja ultrazvočna preiskava je bila 7. ali 8. dan menstruacijskega ciklusa. Pri preiskovankah skupine A je bila indikacija za aspiracijo foliklov premer vodilnega folikla 10–14 mm in debelina endometrija vsaj 5 mm. Pri preiskovankah skupine B smo aspiracijo foliklov izvedli po dveh dneh prekinitve spodbujanja s FSH. Pri preiskovankah skupine C pa je bil pogoj za dajanje hCG odsotnost vodilnega folikla in debelina endometrija vsaj 6 mm. Aspiracijo foliklov smo nato izvedli 36 ur po dajanju hCG.

Zbiranje nezrelih jajčnih celic je potekalo po protokolu, ki ga je opisala Mikkelsen s sodelavci:¹³ vsebino foliklov smo aspirirali transvaginalno s pomočjo ultrazvočno vodene punkcije. Igle za aspiracijo so debeline 17G (Tik, Kobarid, Slovenija). Aspirate foliklov smo zbirali v epruветah z ogretim gojiščem FM (MediCult) in pod lupo SMZ-U (Nikon, Japonska) poiskali nezrele jajčne celice. Jajčne celice smo prenesli v gojišče IVM LAG Medium (MediCult) za 2–3 ure. Zorenje jajčnih celic je potekalo v gojišču IVM Medium (MediCult), ki smo mu dodali 75 mIU/ml FSH + 75 mIU/ml luteotropina (luteinizirajočega hormona, LH) (Menogon, Ferring, Italija) in 10 % toplotno inaktiviranega homolognega seruma preiskovanke. Pri preiskovankah skupine A in B smo serum odvzeli na dan punkcije, pri preiskovankah skupine C pa na dan injekcije hCG pred aplikacijo. V tem primeru smo serum zamrznili na -20 °C do dneva punkcije.

Jajčne celice smo kultivirali ločeno v kapljicah gojišča, pokritih s parafinskim oljem (MediCult) pri 37 °C in atmosferi s 5-odstotnim CO₂. Štiriindvajset do 30 ur po punkciji smo jajčne celice očistili v hialuronidazi (80 IU/ml SynVitro Hyadase, MediCult) in ocenili njihovo jedrno zrelost.

Osemenitev, kultiviranje zarodkov in prenos zarodkov v maternico

Zrele jajčne celice smo osemenili s postopkom injiciranja semenčice v ooplazmo (postopek ICSI), ki smo ga že opisali¹⁴. Osemenjene jajčne celice smo kultivirali v gojišču BlastAssist Medium 1 (M1) (MediCult) do naslednjega dne, ko smo ocenili prisotnost pro-

nukleusov. Če so bile celice uspešno oplojene, smo jih kultivirali v istem gojišču še en dan (do 3. dneva po punkciji), ocenili morfološke značilnosti zarodkov in nato zarodke prenesli v maternico preiskovanke. V maternico smo prenesli največ tri zarodke.

Ocenjevanje kakovosti zarodkov

Na dan prenosa zarodkov smo ocenili kakovost zarodkov na podlagi treh meril: števila blastomer, stopnje fragmentiranosti blastomer (tj. kolikšen del zarodka izpolnjujejo brezjedrni citoplazmatski delci) in prisotnosti jeder v posameznih blastomerah. Glede na število blastomer in stopnjo fragmentacije smo opisali štiri skupine zarodkov z ocenami od GI do GIV: zarodki z ≥ 3 blastomerami in $\leq 20\%$ fragmentacijo (GI), zarodki z < 3 blastomerami in $\leq 20\%$ fragmentacijo (GII), zarodki z ≥ 3 blastomerami in $> 20\%$ fragmentacijo (GIII) in zarodki z < 3 blastomerami in $> 20\%$ fragmentacijo (GIV). Zarodke z oceno GI smo poimenovali optimalni zarodki, vse druge zarodke (ocenjene kot GII, GIII ali GIV) pa neoptimalni zarodki.

Glede na prisotnost jeder v posameznih blastomerah pa smo opisali tri skupine zarodkov (kot Moriwaki in sod.¹⁵): zarodki z enim jedrom v vsaki blastomeri (zarodki tipa a); zarodki z eno ali več blastomerami brez vidnega jedra (zarodki tipa b); in zarodki z eno ali več večjedrnimi blastomerami (zarodki tipa c). Zarodke tipa a in b smo ovrednotili kot¹ zarodke brez vidne večjedrnosti, zarodke tipa c pa kot² zarodke z večjedrnimi blastomerami.

Ugotavljanje zanositve

Zanositev smo ugotavljali z določanjem serumskega beta humanega horionskega gonadotropina (β -hCG) 16 dni po prenosu zarodkov in jo ultrazvočno potrdili 2 tedna po pozitivnem testu s prisotnostjo gestacijskega obročka z vidnimi srčnimi utripi.

Statistična analiza

Za testiranje enakosti median posameznih parametrov med tremi skupinami preiskovank smo uporabili neparametrična testa Kruskal-Wallisov test in Mann-Whitney *U*-test, za primerjavo frekvenc med skupinami preiskovank pa smo uporabili Pearsonov χ^2 test. Podatke smo obdelali s statističnim programom Statistica (StatSoft, ZDA). Vrednosti $P < 0,05$ so bile statistično značilne.

Rezultati

Povprečna starost preiskovank je bila $29,5 \pm 4,3$ (min. 20 – maks. 39) in se med posameznimi skupinami ni razlikovala ($P > 0,05$). Pri preiskovankah z morfološko normalnimi jajčniki in rednimi menstruacijskimi cikli (skupina A) je bil pri 4 preiskovankah vzrok neplodnosti nepojasnen, pri 5 preiskovankah tubarni dejavnik, moški dejavnik neplodnosti pa je bil prisoten pri 18 neplodnih parih. Pri preiskovankah s sindromom policističnih jajčnikov iz skupine B in skupine C je bil pri 1 oz. 7 preiskovankah vzrok neplodnosti poleg PCOS še tubarni dejavnik, moški vzrok neplodnosti pa je bil prisoten pri 9 oz. 21 neplodnih parih.

Rezultati postopkov IVM glede na protokol hormonskega spodbujanja so razvidni iz Razpr. 1. Pri vseh postopkih IVM smo jajčne celice osemenili z metodo ICSI ne glede na prisotnost moškega dejavnika neplodnosti. Primerjava med posameznimi skupinami je pokazala, da smo dobili pri punkciji nezrelih foliklov bistveno manj jajčnih celic pri preiskovankah z rednimi menstruacijskimi cikli kot pri preiskovankah s PCOS ($KW = 17,0$, $P < 0,0005$), kar je razumljivo, saj je že po definiciji število antralnih foliklov pri normalnih jajčnikih manjše kot pri policističnih. Stopnja oploditve in stopnja delitve zigot v zarodke pa se med skupinami ni razlikovala ($P > 0,05$). Bistveno manj prenosov

Razpr. 1. *Rezultati postopkov IVM pri preiskovankah brez hormonskega spodbujanja (Skupina A), pri preiskovankah s spodbujanjem s FSH (Skupina B) in pri preiskovankah s spodbujanjem s hCG (Skupina C).*

Table 1. *Results of IVM procedures in patients without hormone priming (Group A), in patients with FSH priming (Group B) and in patients with hCG priming (Group C).*

	Skupina A Group A	Skupina B Group B	Skupina C Group C
Število ciklusov / No. of cycles	27	22	38
Število ciklusov z jajčnimi celicami (%) / No. of positive OPU cycles (%)	23 (85,2)	22 (100,0)	38 (100,0)
Število jajčnih celic / No. of oocytes	73	257	397
Število jajčnih celic / ciklus, $X \pm SD$ (min-maks) / No. of oocytes / cycle, $X \pm SD$ (min-max)	$3,2 \pm 2,5^a$ (1-8)	$11,7 \pm 7,2$ (1-24)	$10,4 \pm 7,2$ (1-26)
Število osemenjenih jajčnih celic / No. of oocytes inseminated	38	136	219
Število pravilno oplojenih jajčnih celic (%) / No. of oocytes fertilized (%)	24 (63,2)	90 (66,2)	145 (66,2)
Število zarodkov (%) / No. of embryos (%)	22 (91,7)	81 (90,0)	132 (91,0)
Število prenosov zarodkov / No. of embryo transfers	12	20	33
Delež prenosov zarodkov na ciklus (%) / Portion of embryo transfers per cycle (%)	12/27 (44,4) ^b	20/22 (90,9)	33/38 (86,8)
Število prenesenih zarodkov / No. of embryos transferred	18	45	76
Število zarodkov / prenos zarodkov, $X \pm SD$ (min-maks) / No. of embryos / embryo transfer, $X \pm SD$ (min-max)	$1,5 \pm 0,7^c$ (1-3)	$2,3 \pm 0,8$ (1-3)	$2,3 \pm 0,8$ (1-3)
Stopnja zanositve na ciklus (%) / Pregnancy rate per cycle (%)	0	1/22 (4,5)	5/38 (13,2)
Stopnja zanositve na prenos zarodkov (%) / Pregnancy rate per embryo transfer (%)	0	1/20 (5,0)	5/33 (15,2)
Stopnja porodov na ciklus (%) / Delivery rate per cycle (%)	0	0/22 (0)	3/38 (7,9)
Stopnja porodov na prenos zarodkov (%) / Delivery rate per embryo transfer (%)	0	0/20 (0)	3/33 (9,1)

^a $P < 0,0005$ v primerjavi s skupino B in C / compared with groups B and C

^b $P < 0,0001$ v primerjavi s skupino B in C / compared with groups B and C

^c $P < 0,05$ v primerjavi s skupino B in C / compared with groups B and C

zarodkov v maternico smo lahko opravili pri preiskovankah z rednimi menstruacijskimi cikli (44,4 %) kot pri preiskovankah s PCOS (90,9 % oz. 86,8 %) ($\chi^2 = 19,1$, $P < 0,0001$). Pri preiskovankah skupine A smo v povprečju tudi prenesli manjše število zarodkov kot pri drugih dveh skupinah (KW = 6,2, $P < 0,05$). Nosečnosti smo zabeležili le pri preiskovankah s PCOS (skupina B in C), Stopnja zanositve je bila višja pri skupini C (13,2 %) kot pri skupini B (4,5 %). Preiskovanka iz skupine B, ki je zanosila, je splavila v 20. tednu nosečnosti zaradi popuščanja materničnega ustja. Pri preiskovankah skupine C smo zabeležili tri porode, od tega je ena preiskovanka rodila dvojčke. Dve nosečnosti pa sta se zaključili neuspešno: ena nosečnost je bila biokemična, druga pa se je končala s splavom v 20. tednu nosečnosti zaradi razpoka mehurja.

Delež nezrelih jajčnih celic, ki po 24–30 urah zorenja v pogojih *in vitro* niso nadaljevale mejotske delitve in so ostale na stopnji nezrele jajčne celice z zarodnim mešičkom (germinalno veziklo [GV]), ter delež jajčnih celic, ki so delno (metafaza I, MI) ali popolnoma dozorele (metafaza II, MII), prikazuje Razpr. 2. Jajčne celice, ki smo jih takoj po punkciji ovrednotili kot atre-

tične, nismo nadalje kultivirali v gojišču za zorenje. Osemenili smo samo jajčne celice, ki so dozorele do faze MII. Razpr. 2 prikazuje tudi sposobnost jajčnih celic za oploditev. Statistična analiza je pokazala, da se sposobnost nezrelih jajčnih celic za zorenje med skupinami ne razlikuje ($P > 0,05$).

Drugi dan kultivacije po osemenitvi smo ocenili kakovost zarodkov. V Razpr. 3 je prikazana kakovost zarodkov, ocenjena na osnovi števila blastomer, stopnje fragmentacije blastomer in števila jeder v posameznih blastomerah pri preiskovankah z vsemi tremi različnimi protokoli hormonskega spodbujanja. Pri preiskovankah skupine A manjkajo podatki o številu jeder v blastomerah pri 10 zarodkih, zato pri tej skupini tudi nismo računali deleža zarodkov z večjedrnimi blastomerami. S statistično analizo nismo mogli pokazati razlike v kakovosti zarodkov glede na število blastomer in stopnjo fragmentiranosti blastomer med posameznimi skupinami preiskovank ($P > 0,05$), ugotovili pa smo bistveno več zarodkov z večjedrnimi blastomerami pri preiskovankah, ki so bile spodbujane s FSH, v primerjavi s tistimi, ki so bile spodbujane s hCG ($\chi^2 = 12,1$, $P < 0,0005$).

Razpr. 2. *Sposobnost nezrelih jajčnih celic za zorenje in oploditev pri preiskovankah brez hormonskega spodbujanja (Skupina A), pri preiskovankah s spodbujanjem s FSH (Skupina B) in pri preiskovankah s spodbujanjem s hCG (Skupina C).*

Table 2. *Immature oocyte capacity for maturation and fertilization in patients without hormone priming (Group A), in patients with FSH priming (Group B) and in patients with hCG priming (Group C).*

	Skupina A Group A	Skupina B Group B	Skupina C Group C
Število jajčnih celic / No. of oocytes retrieved	73	257	397
Število atretičnih jajčnih celic ob punkciji (%) / No. of atretic oocytes at puncture (%)	2 (2,7)	19 (7,4)	18 (4,5)
Delež nezrelih jajčnih celic po 24–30 urah zorenja (%) / Portion of GV oocytes after 24–30 h. of maturation (%)	12/71 (16,9) ^a	45/238 (18,9)	64/379 (16,9)
Delež MI jajčnih celic po 24–30 urah zorenja (%) / Portion of MI oocytes after 24–30 h. of maturation (%)	12/71 (16,9) ^a	40/238 (16,8)	49/379 (12,9)
Delež MII jajčnih celic po 24–30 urah zorenja (%) / Portion of MII oocytes after 24–30 h. of maturation (%)	41/71 (57,7) ^a	137/238 (57,6)	220/379 (58,0)
Delež atretičnih jajčnih celic po zorenju (%) / Portion of atretic oocytes after maturation (%)	6/71 (8,5) ^a	16/238 (6,7)	46/379 (12,1)
Število osemenjenih jajčnih celic / No. of oocytes inseminated	38	136	219
Število pravilno oplojenih (2PN) jajčnih celic (%) / No. of oocytes fertilized (2PN) (%)	24 (63,2)	90 (66,2)	145 (66,2)
Število aktiviranih (1PN) jajčnih celic / No. of oocytes activated (1PN) (%)	0	10	6
Število nepravilno (> 2PN) oplojenih jajčnih celic / No. of abnormal fertilized (> 2PN) oocytes	1	4	6

^a Med skupinami ni statistično značilne razlike

^a There are no statistically significant differences between groups

Razpr. 3. *Kakovost zarodkov, ocenjena na osnovi treh meril, pri preiskovankah brez hormonskega spodbujanja (Skupina A), pri preiskovankah s spodbujanjem s FSH (Skupina B) in pri preiskovankah s spodbujanjem s hCG (Skupina C).*

Table 3. *Embryo quality, evaluated on the basis of three parameters in patients without hormone priming (Group A), in patients with FSH priming (Group B) and in patients with hCG priming (Group C).*

	Skupina A Group A	Skupina B Group B	Skupina C Group C
Število zarodkov / No. of embryos	22	81	132
Kakovost zarodkov glede na število blastomer in stopnjo fragmentiranosti blastomer, n (%) ^a / Embryo quality according to blastomere number and fragmentation rate, n (%) ^a			
Število (%) optimalnih zarodkov (GI) / No. (%) of optimal embryos (GI)	8 (36,4)	25 (30,9)	55 (41,7)
Število (%) neoptimalnih zarodkov (GII–GIV) / No. (%) of non-optimal embryos (GII–GIV)	14 (63,6)	56 (69,1)	77 (58,3)
Kakovost zarodkov glede na število jeder v blastomerah, n (%) ^b / Embryo quality according to number of nuclei in the blastomeres, n (%) ^b			
Število (%) zarodkov brez vidne večjedrnosti / No. (%) of embryos without visible multinucleation	NP	44 (54,3)	103 (78,0)
Število (%) zarodkov z večjedrnimi blastomerami / No. (%) of multinucleated embryos	NP	37 (45,7)	29 (22,0)

^a Med skupinami ni statistično značilne razlike / There are no statistically significant differences between groups

^b $P < 0,0005$ med skupinama B in C / $P < 0,0005$ between groups B and C

NP - ni podatka / MD - missing data

Razpravljanje in zaključki

Podatkov o uspešnosti metode *in vitro* zorenja jajčnih celic v postopkih zunajtelesne oploditve je v literaturi sorazmerno malo. Metoda je do nedavnega veljala le za eksperimentalno. Izvajali so jo le v nekaj centrih po svetu, predvsem v Skandinaviji. Poročila o prvih rojstvih otrok, spočetih iz nezrelih jajčnih celic po zorenju v pogojih *in vitro*, so objavili v 90. letih. Sprva so pridobili nezrele jajčne celice pri ooforektomiji¹⁶ ali pri carskem rezu.¹⁷ Kasneje se je metoda pridobivanja jajčnih celic izpopolnila z uvedbo transvaginalne aspiracije foliklov ob uporabi ultrazvočne sonde.¹⁸ Sledila so poročila o uspešni oploditvi jajčnih celic, dozorelih v pogojih *in vitro*, razvoju zarodkov in nosečnostih še iz drugih centrov po svetu.^{6, 12, 18-21} Računajo, da se je do sedaj rodilo okoli 300 otrok, spočetih z metodo IVM.²² Večina izkušenj z metodo zorenja v pogojih *in vitro* izhaja v glavnem od dveh skupin preiskovank. Prva skupina so ženske s PCO(S), ki so v postopkih zunajtelesne oploditve prekomerno občutljive na spodbujanje s FSH in imajo povečano verjetnost za razvoj sindroma ovarijske hiperstimulacije. Druga skupina pa so ženske z rednimi menstrualnimi cikli in morfološko normalnimi jajčniki, ki so vključene v postopke zunajtelesne oploditve. V našem centru smo se odločili vključiti v raziskavo obe skupini preiskovank, da bi lahko med njima primerjali uspešnost metode IVM in nato določili ciljno skupino preiskovank, ki bi imela od nove metode največ koristi.

Za preiskovanke s PCO(S) se po podatkih iz literature uporabljata dva različna protokola hormonske priprave na punkcijo nezrelih foliklov.^{8, 9} Poročila centrov govorijo o različni uspešnosti.^{8, 9, 11} Zato smo se odločili testirati uporabnost obeh protokolov: hormonsko spodbujanje rasti foliklov s FSH in spodbujanje jedrnega zorenja jajčnih celic s hCG. Pri preiskovankah z normalno delujočimi jajčniki (ovulacijski ciklusi) pa smo uporabili protokol brez hormonskega spodbujanja. Mikkelsen in njeni sodelavci⁶ so namreč ugotovili, da pri tej skupini preiskovank spodbujanje s FSH ne poveča števila aspiriranih nezrelih jajčnih celic in ne izboljša stopnje zorenja, stopnje oploditve, stopnje delitve v zarodek ali stopnje zanositve.

Naša raziskava je pokazala, da je bila metoda IVM uspešnejša pri preiskovankah s policističnimi jajčniki (skupina B in C) kot pri preiskovankah z normalnimi jajčniki (skupina A). Možna razlaga za slabšo uspešnost pri preiskovankah z normalnimi jajčniki je v manjšem številu nezrelih jajčnih celic, dobljenih pri punkciji. Zaradi manjšega števila jajčnih celic je bilo pri teh preiskovankah na voljo tudi manj zrelih jajčnih celic za osemenitev, manjša možnost selekcije zarodkov na osnovi morfoloških meril in manj zarodkov za prenos v maternico. O nizki stopnji uspešnosti postopkov IVM pri bolnicah z normalnimi jajčniki so poročali tudi drugi.²¹ Razliko v uspešnosti smo ugotovili tudi pri različnih protokolih spodbujanja bolnic s PCOS. Rezultati kažejo na to, da lahko po spodbujanju s hCG pričakujemo zarodke boljše kakovosti kot po spodbujanju s FSH. Predvidevamo lahko, da spodbujanje preiskovank s hCG zagotavlja ustrežnejšo ci-

toplazmatsko zorenje. Znano je namreč, da je kakovost jajčne celice odvisna predvsem od zrelosti njene citoplazme, ki jajčni celici omogoča normalno oploditev in razvoj v zarodek.²³ Možno je, da tridnevno spodbujanje rasti foliklov s FSH pri preiskovankah skupine B ni bistveno vplivalo na zrelost foliklov oz. na ustvarjanje primerne okolja za ustrezno jedrno in citoplazmatsko zorenje jajčne celice. Predvsem pa je vprašljiv učinek dvodnevne prekinitve spodbujanja s FSH, ki bi teoretično lahko bila razlog za začetek atrezije foliklov oziroma jajčnih celic. Nasprotno pa je spodbujanje preiskovank s hCG sprožilo zadnje faze jedrnega in citoplazmatskega zorenja jajčne celice, kar je sicer pri bolnicah s PCOS pogosto okrnjeno. Poročila različnih avtorjev o uspešnosti postopka se med seboj zelo razlikujejo. Uspešnost postopka IVM je namreč predvsem odvisna od pogojev, ki jih imajo jajčne celice za zorenje: gojišče za zorenje in čas zorenja.²⁴ O stopnji zanositve, ki je primerljiva z izidom pri spodbujenih ciklusih (> 30 %), poročajo le iz nekaterih centrov.^{8, 25} Nasprotno je Wynn in sod.¹⁰ dosegel stopnjo zanositve le 1–2 %. V naši raziskavi je bila stopnja zanositve na prenos zarodkov pri skupini preiskovank, spodbujanih s FSH, dokaj nizka – 5,0 %. Dosežena stopnja je bila nižja, kot so o njej poročali Mikkelsen in sod. – 29,0 %.⁹ Vendar pa je bilo tako v naši raziskavi kot v njihovi vključenih majhno število ciklusov (22 oziroma 24 ciklusov), zato so lahko vzrok za takšno razliko že individualne razlike med preiskovankami v obeh skupinah. Višjo stopnjo zanositve na prenos zarodkov (15,2 %) in stopnjo zanositve na punkcijo (13,2 %) pa smo dosegli pri preiskovankah, spodbujanih s hCG, kar je primerljivo našim rezultatom (12,0 %) iz nespozbujenih ciklusov s punkcijo preovulacijskega vodilnega folikla.²⁶

Nezrele jajčne celice so po 24–30 urah kultiviranja v pogojih *in vitro* pri preiskovankah vseh treh skupin dozorele v podobnem odstotku (pribl. 58,0 %). Naš odstotek uspešnosti zorenja je primerljiv tudi z uspešnostjo drugih raziskovalcev: 54–62 %.^{16, 27, 28} Nekateri so zoreli jajčne celice še en dan več, tj. 48 ur, zato so dosegli višjo končno stopnjo dozorevanja: 80–84 %.^{8, 16} Po naših lastnih izkušnjah imajo jajčne celice, ki dozoriijo šele po 48 urah, manjšo sposobnost oploditve, predvsem pa bistveno zmanjšano sposobnost za nadaljnji razvoj v zarodke. Zato smo se odločili osemeniti le tiste jajčne celice, ki so dozorele v prvem dnevu zorenja.

Za osemenitev jajčnih celic smo v vseh primerih uporabili postopek ICSI. Raziskave so namreč pokazale, da je pri jajčnih celicah, ki dozoriijo v pogojih *in vitro*, mogoče doseči bistveno večjo stopnjo oploditve s postopkom ICSI kot pa s klasično metodo IVF.^{19, 21} Poročajo o 45-odstotni stopnji oploditve pri osemenitvi s klasično metodo v primerjavi s stopnjo oploditve 70–75 % pri osemenitvi s postopkom ICSI.^{19, 20, 22} Prednost osemenitve s postopkom ICSI je tudi v tem, da lahko z odstranitvijo granuloznih celic določimo zrelost jajčne celice.

Sposobnost za oploditev se med tremi skupinami preiskovank ni razlikovala (63–66 %) in je primerljiva z našimi rezultati iz spodbujanih ICSI ciklusov (68–73 %)²⁹ oziroma je nekoliko nižja kot stopnja

oploditve, ki smo jo dosegli pri naravnih ICSI ciklusi (70–85 %).²⁶ Možna razlaga za to razliko je, da ima jajčna celica iz vodilnega folikla največjo sposobnost za normalno oploditev v primerjavi z jajčnimi celicami, ki jih dobimo iz drugih foliklov po hormonskem spodbujanju pri zorenju jajčnih celic *in vivo* ali *in vitro*.

Kakovost zarodkov glede na prisotnost večjedrnih blastomer je bila pri skupinah preiskovank s PCOS različna. Jajčne celice preiskovank, ki so imele hormonsko spodbudo s hCG, so se razvile v zarodke z bistveno manj večjedrnimi blastomerami. Večjedrnost je pogosto povezana tudi s povečano fragmentacijo blastomer in slabšim razvojem zarodkov ali z zastojem v razvoju.^{30–32} V naši raziskavi nismo našli razlike med skupinami preiskovank v številu optimalnih zarodkov glede na hitrost razvoja in stopnjo fragmentacije, čeprav smo v prejšnji raziskavi na manjšem številu preiskovank razliko lahko potrdili.³³ Mogoče bi opazili razliko v razvoju zarodkov tudi v pričujoči raziskavi, če bi sledili razvoju do stadija blastociste. Znano je, da je lahko večjedrnost povezana tudi s povečano stopnjo aneuploidij³⁴ in s slabšo sposobnostjo zarodkov za ugnezditev.³² Mi smo v skupini preiskovank z manj večjedrnimi zarodki zabeležili 5 zanositev na 38 opravljenih ciklusov (13,2 %), v skupini preiskovank z več večjedrnimi zarodki pa le 1 zanositev na 22 opravljenih ciklusov (4,5 %). Pri petih preiskovankah, ki so zanosile, je bilo število prenesenih zarodkov večje kot število ugnezdenih, le pri eni preiskovanki so se od treh prenesenih zarodkov vsi trije tudi ugnezdili. Zato ne moremo natančno vedeti, kakšna je bila kakovost zarodkov, ki so se ugnezdili. Vemo pa, da je od vseh 17 prenesenih zarodkov le eden imel ≥ 20 -odstotno stopnjo fragmentiranosti in eno od dveh blastomer večjedrno, ter da sta bila prenesena še dva zarodka z ≥ 20 -odstotno stopnjo fragmentiranosti, vendar brez vidne večjedrnosti. Vseh drugih 14 prenesenih zarodkov pa je bilo boljše kakovosti: imeli so ≤ 20 -odstotno stopnjo fragmentiranosti in blastomere brez vidne večjedrnosti.

Na osnovi ugotovitev naše raziskave lahko zaključimo, da lahko primerne pogoje za zorenje človeških jajčnih celic *in vitro* zagotovimo tudi v našem centru za IVF in tako ponudimo neplodnim parom dodatno metodo oploditve z biomedicinsko pomočjo tudi v Sloveniji. Uspešnost metode IVM pri preiskovankah s PCOS je trenutno primerljiva z uspešnostjo OBMP v naravnih IVF ciklikih pri ovulacijskih preiskovankah. Metoda je primerna predvsem za preiskovanke s sindromom policističnih jajčnikov, ki imajo povečano verjetnost za razvoj sindroma ovarijske hiperstimulacije. Pri preiskovankah s PCOS dobimo s punkcijo nezrelh foliklov bistveno več jajčnih celic kot pri preiskovankah z normalnimi jajčniki, kar poveča verjetnost za uspešen izid postopka OBMP. Primer na je tudi za preiskovanke, ki jih moramo med spodbujanjem ovulacije za OBMP izključiti iz nadaljnje obravnave že pred 10. dnevom spodbujanja zaradi velikega števila razvijajočih se foliklov. Kot najprimernejši protokol hormonske priprave preiskovank na punkcijo nezrelh foliklov pa se je pokazalo spodbujanje s hCG.

Zahvala

Za dragocene nasvete in izkazano podporo pri izvedbi raziskave in obdelavi podatkov se zahvaljujemo sodelavcem doc. dr. Borutu Kovačiču, univ. dipl. biol., doc. dr. Milanu Reljiču, dr. med., in asist. dr. Vidi Gavrić-Lovrec, dr. med. Sodelavki Nini Hojnik, univ. dipl. biol., se zahvaljujemo za pomoč pri delu v laboratoriju ter prevajalki ge. Marijani Gajšek-Marchetti z Znanstvenoraziskovalnega oddelka Splošne bolnišnice Maribor za njen prispevek pri pripravi članka.

Literatura

1. Delvigne A, Rozenberg S. Epidemiology and prevention of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS): a review. *Hum Reprod Update* 2002; 8: 559–77.
2. Mikkelsen AL, Smith S, Lindenberg S. Possible factors affecting the development of oocytes in in-vitro maturation. *Hum Reprod* 2000; 15: 11–7.
3. Requena A, Neuspiller F, Cobo AC, Aragones M, Remohi J, Simon C, Pellicer A. The potential use of maturation in vitro of human oocytes in low responder patients. *J Assist Reprod Genet* 2000; 17: 239–44.
4. Friden B, Hreinsson J, Hovatta O. Birth of a healthy infant after in vitro oocyte maturation and ICSI in a woman with diminished ovarian response: case report. *Hum Reprod* 2005; 20: 2556–8.
5. Chian RC, Buckett WM, Abdul-Jalil AK, Son WY, Sylvestre C, Rao D, Tan SL. Natural-cycle in vitro fertilization combined with in vitro maturation of immature oocytes is a potential approach in infertility treatment. *Fertil Steril* 2004; 82: 1675–8.
6. Mikkelsen AL, Smith SD, Lindenberg S. In-vitro maturation of human oocytes from regularly menstruating women may be successful without follicle stimulating hormone priming. *Hum Reprod* 1999; 14: 1847–51.
7. Chian RC, Gulekli B, Buckett WM, Tan SL. Priming with human chorionic gonadotrophin before retrieval of immature oocytes in women with infertility due to the polycystic ovary syndrome. *New Engl J Med* 1999; 341: 1624–6.
8. Chian RC, Buckett WM, Tulandi T, Tan SL. Prospective randomized study of human chorionic gonadotrophin priming before immature oocyte retrieval from unstimulated women with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* 2000; 15: 165–70.
9. Mikkelsen AL, Lindenberg S. Benefit of FSH priming of women with PCOS to the in vitro maturation procedure and the outcome: a randomized prospective study. *Reproduction* 2001; 122: 587–92.
10. Wynn P, Picton HM, Krapez JA, Rutherford AJ, Balen AH, Gosden RG. Pretreatment with follicle stimulating hormone promotes the numbers of human oocytes reaching metaphase II by in vitro maturation. *Hum Reprod* 1998; 13: 3132–8.
11. Child TJ, Phillips SJ, Abdul-Jalil AK, Gulekli B, Tan SL. A comparison of in vitro maturation and in vitro fertilization for women with polycystic ovaries. *Obstet Gynecol* 2002; 100: 665–70.
12. Suikkari AM, Tulppala M, Tuuri T, Hovatta O, Barnes F. Luteal phase start of low-dose FSH priming of follicles results in an efficient recovery, maturation and fertilization of immature human oocytes. *Hum Reprod* 2000; 15: 747–51.
13. Mikkelsen AL, Host E, Blaabjerg J, Lindenberg S. Maternal serum supplementation in culture medium benefits maturation of immature human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2001; 3: 112–6.
14. Vlaisavljević V, Kovačič B. Naše prve izkušnje s tehniko direktnega vnosa semenčice v citoplazmo jajčne celice (ICSI) pri zdravljenju moške neplodnosti. *Zdrav Vestn* 1995; 64: 677–9.
15. Moriwaki T, Sukanuma N, Hayakawa M, Hibi H, Katsumata Y, Oguci H, Furuhashi M. Embryo evaluation by analyzing blastomere nuclei. *Hum Reprod* 2004; 19: 152–6.
16. Cha KY, Koo JJ, Ko JJ, Choi DH, Han SY, Yoon TK. Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from non-stimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program. *Fertil Steril* 1991; 55: 109–13.

17. Hwang JL, Lin YH, Tsai YL. Pregnancy after immature oocyte donation and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1997; 68: 1139-40.
18. Trounson A, Wood C, Kausche A. In vitro maturation and the fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. *Fertil Steril* 1994; 62: 353-62.
19. Barnes FL, Crombie A, Gardner DK, Kausche A, Lacham-Kaplan O, Suikkari AM, et al. Blastocyst development and birth after in vitro maturation of human primary oocytes, intracytoplasmic sperm injection and assisted hatching. *Hum Reprod* 1995; 10: 3243-7.
20. Russell JB, Knezevich KM, Fabian KF, Dickson JA. Unstimulated immature oocyte retrieval: early versus midfollicular endometrial priming. *Fertil Steril* 1997; 67: 616-20.
21. Child TJ, Abdul-Jalil AK, Gulekli B, Tan SL. In vitro maturation and fertilization of oocytes from unstimulated normal ovaries, polycystic ovaries, and women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2001; 76: 936-42.
22. Mikkelsen AL. Strategies in human in-vitro maturation and their clinical outcome. *Reprod Biomed Online* 2005; 10: 593-9.
23. Cha KY, Chian RC. Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 103-20.
24. Trounson A, Anderiesz C, Jones G. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. *Reproduction* 2001; 121: 51-75.
25. Cha KY, Han SY, Chung HM, Choi DH, Lim JM, Lee WS, et al. Pregnancies and deliveries after in vitro maturation culture followed by in vitro fertilization and embryo transfer without stimulation in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2000; 73: 978-83.
26. Vlaisavljević V, Kovačić B, Reljić M, Gavrić-Lovrec V, Čížek-Sajko M. Results of intracytoplasmic sperm injection of single oocyte in 362 unstimulated cycles. *J Assist Reprod Genet* 2002; 19: 127-31.
27. Hreinsson J, Rosenlund B, Friden B, Levkov L, Ek I, Suikkari AM, et al. Recombinant LH equally effective as recombinant hCG in promoting oocyte maturation in a clinical in-vitro maturation programme: a randomized study. *Hum Reprod* 2003; 18: 2131-6.
28. Mikkelsen AL, Lindenberg S. Morphology of in-vitro matured oocytes: impact on fertility potential and embryo quality. *Hum Reprod* 2001; 16: 1714-8.
29. Vlaisavljević V, Kovačić B, Gavrić-Lovrec V, Reljić M. Simplification of the clinical phase of IVF and ICSI treatment in programmed cycles. *Int J Gynecol Obstet* 2000; 69: 135-42.
30. Van Royen E, Mangelschots K, Vercruyssen M, De Neubourg D, Valkenburg M, Ryckaert G, Gerris J. Multinucleation in cleavage stage embryos. *Hum Reprod* 2003; 18: 1062-9.
31. Balakier H, Cadesky K. The frequency and developmental capability of human embryos containing multinucleated blastomeres. *Hum Reprod* 1997; 12: 800-4.
32. Hardarson T, Hanson C, Sjogren A, Lundin K. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum Reprod* 2001; 16: 313-8.
33. Čížek-Sajko M, Kovač V, Vlaisavljević V. Multinucleation and cleavage of embryos derived from in vitro-matured oocytes. *Hum Reprod* 2005; 20 (Abstract book): 103 (P-277).
34. Staessen C, Van Steirteghem A. The genetic constitution of multinuclear blastomeres and their derivative daughter blastomeres. *Hum Reprod* 1998; 13: 1625-31.

Prispelo 2006-06-19, sprejeto 2006-11-12
