

Strokovni prispevek/Professional article

# REZULTATI *IN VITRO* ZORENJA MEJOTSKO NEZRELIH ČLOVEŠKIH JAJČNIH CELIC V ENOSTAVNEM GOJIŠČU

## RESULTS OF *IN VITRO* MATURATION OF MEIOTICALLY IMMATURE HUMAN OOCYTES IN A SIMPLE MEDIUM

Borut Kovačič, Veljko Vlajsavljević

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

Prispelo 2001-01-10, sprejeto 2001-04-26; ZDRAV VESTN 2002; 71: Supl. I: 13-7

**Ključne besede:** jajčna celica; redukcijska delitve; zorenje *in vitro*; oploditev; klinična uporaba

**Izvleček** – Izhodišča. V raziskavi ugotavljamo, kolikšen je med jajčnimi celicami, ki jih dobimo pri aspiraciji preovulatornih jajčnih foliklov v hormonsko spodbujanih ciklih, delež nezrelih jajčnih celic z jedrom v metafazi (M I oociti) ali celo profazi (GV oociti) prve redukcijske delitve in kakšna je sposobnost zorenja jajčnih celic *in vitro* v preprostem gojišču brez dodanih hormonov.

**Metode.** Pri 818 ženskah, spodbujanih z agonisti sproščevalcev gonadotropinov (GnRH $\alpha$ ) in gonadotropini, smo po aspiraciji preovulacijskih jajčnih foliklov dobili 4972 jajčnih celic. Le-tim smo odstranili celice kumulusa ooforusa in korone radiate in pod mikroskopom ocenili mejotsko zrelost. Celice v metafazi druge redukcijske delitve (M II oociti) in tiste, ki so dozorele po 5 urah, smo uporabili klinično v postopku intracitoplazmatskega injiciranja semenčice v jajčno celico (ICSI). Preostale nezrele celice smo pustili v enostavnem gojišču. Stanje njihove jedrne zrelosti smo ocenjevali po enem oziroma dveh dnevih zorenja. *In vitro* zorenje jajčnih celic smo klinično uporabili tudi v 14 ciklih z vsemi nezrelimi celicami.

**Rezultati.** Med 4731 jajčnimi celicami z odstranjeno korono in kumulusom je bilo 4199 (88,8%) zrelih M II oocitov, 295 (6,2%) nezrelih M I oocitov in 237 (5%) nezrelih GV oocitov. V pogojih *in vitro* je dozorelo 68,7% (90/131) GV oocitov. Med M I oociti je 63,6% (136/214) celic dozorelo že po 5 urah in 26,6% (57/214) do naslednjega dne. Pri vseh 14 ženskah s samo nezrelimi jajčnimi celicami na dan aspiracije smo po zorenju *in vitro* in ICSI postopku pridobili zarodke za prenos. Dosegli smo 4 nosečnosti in dve rojstvi.

**Zaključki.** Nezrele jajčne celice, ki jih dobimo v hormonsko spodbujanih ciklih, lahko postanejo klinično uporabne, če jih pustimo zoreti *in vitro* v enostavnem gojišču brez dodanih rastnih faktorjev in hormonov.

**Key words:** oocyte; meiosis; *in vitro* maturation; fertilization; clinical use

**Abstract** – Background. Among oocytes obtained during aspiration of preovulatory ovarian follicles in hormonally stimulated cycles, we ascertained the percentage of immature oocytes with the nucleus in the metaphase (M I oocytes) or even in the prophase (GV oocytes) of the first meiotic division and their capacity to mature *in vitro* in a simple medium without hormonal supplements.

**Methods.** In 818 women, stimulated by gonadotropin releasing hormone agonist (GnRH $\alpha$ ) and gonadotropins, aspiration of preovulatory size follicles yielded 4972 oocytes. From these we denuded cells of cumulus oophorus and corona, meiotic maturity was evaluated under a microscope. Cells in the metaphase of the second meiotic division (M II oocytes) and those maturing after 5 hours were used clinically in the intracytoplasmic sperm injection (ICSI) procedure. Immature cells were left in the simple medium. The degree of their nuclear maturity was evaluated after one and after two days of culture. *In vitro* maturation was clinically used also in 14 cycles with no mature oocytes.

**Results.** Among 4731 oocytes with denuded corona and cumulus, 4199 (88.8%) were mature M II oocytes, 295 (6.2%) immature M I oocytes and 237 (5%) immature GV oocytes. Under *in vitro* conditions, 68.7% (90/131) GV oocytes attained maturity. Among M I oocytes, 63.6% (136/214) cells matured already after 5 hours and 26.6% (57/214) until the next day. In all 14 women with only immature oocytes, the embryos for embryotransfer were obtained after *in vitro* maturation and ICSI procedure. The result was four pregnancies and two deliveries.

**Conclusions.** Immature oocytes, obtained in hormonally stimulated cycles, may become clinically applicable if left to mature *in vitro* in a simple medium without supplementation of growth factors and hormones.

## Uvod

Hormonsko spodbujanje ovulacije pri ženskah z agonisti sproščevalcev gonadotropinov (GnRHa) in folikle stimulirajočim hormonom (FSH) povzroči zorenje več kohort foliklov. V času hormonskega zdravljenja se stanje jedra jajčne celice ne spreminja. Jedro vsebuje pare homolognih kromosomov in ostaja v profazi prve redukcijske delitve, v kateri je od rojstva ženske. Pod mikroskopom ga opazimo kot germinalni vezikel (GV). Šele dajanje humanega horioničnega gonadotropina (hCG) v fazi preovulacijske velikosti foliklov, ki nadomesti biološki dvig koncentracije luteinizirajočega hormona (LH), spodbudi jedro jajčne celice posredno preko drugih mehanizmov k nadaljevanju redukcijske delitve (1). Iz mirujočega diktiotenskega stadija profaze (GV oocit) preide jedro v metafazo prve (M I oocit) in nato v metafazo druge redukcijske delitve (M II oocit), ko počaka na združitev s semenčico. Ta prehod se zgodi tik pred ovulacijo.

V postopku zunajtelesne oploditve (IVF) dobimo jajčne celice iz foliklov različne velikosti in zrelosti. Encimsko in mehansko odstranjevanje celic kumulusa ooforusa in korone radiate od jajčne celice nam omogoči ocenjevanje njene mejotske zrelosti. Pogosto lahko opazimo, da nekatere od jajčnih celic, dobljenih v hormonsko spodbujanih ciklih, kljub dajanju hCG ne uspejo jedro dozoreti in vivo. Zaradi neustreznega mejotskega razvoja oocitov takšne nezrele celice navadno ne uporabimo v klinične namene.

Mejotsko dozorevanje jajčne celice lahko poteka tudi in vitro. Prvo poročilo o zorenju človeških jajčnih celic in vitro sega v leto 1965 (2), vendar je bila prva nosečnost zabeležena šele 18 let kasneje (3), ko so nezrele celice iz hormonsko spodbujanih ciklov z FSH in hCG uporabili v postopku IVF. Zrelost jajčnih celic so ocenjevali po velikosti kumulusa ooforusa in po širini korone radiate, njihova jedrna zrelost pa je bila neznanca. Šele leta 1991 so dosegli nosečnost po pravem zorenju jajčnih celic in vitro, ki so jih dobili iz 2 do 5 mm velikih foliklov v naravnih ciklih po ovariektomiji (4).

Nosečnosti z uporabo hormonsko nespozbujanih jajčnih celic pri človeku, dozorelih in vitro, so redke (4–7). Še redkeje pa zasledimo nosečnosti iz jajčnih celic, ki so ostale nezrele kljub danemu hCG in so dozorele in vitro (8, 9).

V naši študiji poročamo o uspešnosti zorenja GV in M I oocitov iz hormonsko spodbujanih ciklov v preprostih pogojih in vitro in o prvih kliničnih nosečnostih, doseženih z uporabo jajčnih celic, dozorelih in vitro.

Raziskavo je odobrila Komisija za medicinsko etiko pri Ministrstvu za zdravstvo Republike Slovenije.

## Material in metode

### Hormonsko spodbujanje ovulacije

Pri 818 ženskah, vključenih v program spodbujanja ovulacije zaradi zdravljenja neplodnega para, smo z GnRHa povzročili desenzibilizacijo hipofize. Zdravilo smo dali med 18. in 20. dnevom menstruacijskega cikla. Po 14 do 21 dneh smo pričeli s spodbujanjem ovulacije s čistim FSH. Razvoj jajčnih foliklov smo sledili z ultrazvokom. Ko je predovulacijski folikel dosegel premer 18 mm, smo dali 10.000 IE hCG. Vsebinsko jajčnih foliklov smo aspirirali 36 ur po dajanju hCG.

### Zorenje jajčnih celic in vitro

V tekočini iz foliklov smo iskali jajčne celice. Najdene celice smo prenesli v gojišče s pufrom HEPES (Flushing medium, Medicult, Danska). Celice kumulusa ooforusa in korone radiate smo odstranili encimsko s 30-sekundnim izpostavljanjem jajčne celice hialuronidazi (80 mIE/ml; Medicult, Danska) in mehansko s pipetiranjem jajčne celice skozi zoženo kapilarno.

Očiščenim celicam smo ocenjevali jedrno zrelost oziroma fazo redukcijske delitve. Merilo za ocenjevanje je bila prisotnost prvega polarnega telesa oziroma germinalnega vezikla. Zrele M II oocite, ki so imeli izločeno prvo polarno telo (sl. 3), smo uporabili klinično v postopku ICSI. Nezrele M I oocite smo prepoznali po odsotnosti polarnega telesa v perivitelnem prostoru (sl. 2), GV oocite pa po prisotnosti germinalnega vezikla (sl. 1).



Sl. 1. Nezrela jajčna celica v profazi prve redukcijske delitve z jedrom v obliki germinalnega vezikla (GV).

Fig. 1. Immature oocyte in prophase of first meiotic division with nucleus in the form of germinal vesicle (GV).



Sl. 2. Nezrela jajčna celica v metafazi prve redukcijske delitve. Germinalni vezikel se je razgradil, v perivitelnem prostoru pa še ni izločenega prvega polarnega telesa.

Fig. 2. Immature oocyte in metaphase of first meiotic division. Germinal vesicle broke down but first polar body is not yet extruded.

Vsako nezrelo jajčno celico brez celic kumulusa ooforusa ali korone radiate smo prenesli v 15 µl kapljico enostavnega gojišča (IVF medium, Medicult, Danska) v petrijevki, prekrito s parafinskim oljem. Gojišču nismo dodali hormonov, rastnih faktorjev ali krvnega seruma. Celice smo gojili v inkubatorju pri 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> in 95% relativni vlažnosti.

Prvo ocenjevanje dozorelosti smo opravili že po 5 urah, pred koncem delavnika. Tiste nezrele celice, ki so v tem času dozorele, smo uporabili klinično za postopek ICSI. Stopnjo oplojenosti pri njih smo primerjali s kontrolno skupino, ki so jo pred-



Sl. 3. Zrela jajčna celica v metafazi druge redukcijske delitve. Ena garnitura homolognih kromosomov se je izločila s prvim polarnim telesom (PT).

Fig. 3. Mature oocyte in metaphase of second meiotic division. One set of homologous chromosomes was extruded with the first polar body (PT).

stavljali zreli M II oociti. Preostale jajčne celice smo pustili zoreti do naslednjega dne.

Po enem dnevu dozorele jajčne celice smo uporabili za postopek ICSI samo, če pri bolnici na dan aspiracije foliklov nismo našli nobene zrele celice. V tem primeru smo v jajčne celice vbrizgali semenčice iz svežega semenskega vzorca njihovih partnerjev.

### Izbira parov za ICSI

Indikacije za postopek ICSI so bile: a) nizka koncentracija semenčic v semenskem izlivu (< 500.000 gibljivih in morfološko normalnih semenčic, ocenjenih po strogih Tygerbergovih merilih); b) kombinacija prejšnje okvare, s katero od okvar pri ženski, ki povzroča neplodnost in c) neoplojenost vseh jajčnih celic v vsaj dveh predhodnih zaporednih IVF ciklih ne glede na koncentracijo semenčic v izlivu.

### Postopek ICSI

Za pripravo semena smo uporabili tehniko centrifugiranja semenskega izliva s 40% in 80% PureSperm (Nidacon, Švedska). Semenčice v usedlini smo ponovno centrifugirali v čistem gojišču in jih nato prenesli v kapljico polivinilpirolidona (PVP) (Medicult, Danska).

Mikrokirurški poseg na jajčni celici (ICSI) smo opravili na invertnem mikroskopu IMT-2 (Olympus), opremljenim z mikromanipulatorji (Narishige MO-188). Postopek je potekal v kapljicah gojišča pod parafinskim oljem. Jajčno celico smo pritrdili na oprijemalno pipeto (COOK, Avstralija) in jo namestili v središče vidnega polja, tako da je bilo polarno telo v položaju urinega kazalca na 6 ali 12. Z injekcijsko pipeto (COOK, Avstralija) smo se dotaknili repa gibljive semenčice, da se je prenehala gibati, in jo nato povlekli v pipeto za injiciranje. Z isto pipeto smo prodrli skozi zono pelucido in plazemsko membrano v citoplazmo jajčne celice. Preboj plazma membrane smo zaradi njene elastičnosti zagotovili z dodatnim poskanjem citoplazme v injekcijsko pipeto. Semenčico smo odložili v jajčno celico z minimalnim volumnom gojišča. Jajčne celice smo nato očistili v svežem gojišču in jih inkubirali pri 37 °C, 5-odstotnem CO<sub>2</sub> in 95-odstotni relativni vlažnosti.

Prisotnost pronukleusov in polarnih teles v jajčnih celicah smo opazovali po 18 urah pri 400-kratni povečavi.

## Rezultati

V 818 ciklih z enakim hormonskim spodbujanjem ovulacije smo po punkciji in aspiraciji foliklov dobili 4972 jajčnih celic. Med 4731 uspešno očiščenimi celicami brez kumulusa ooforusa in korone radiate smo našli 88,8% (4199/4731) zrelih M II oocitov, 6,2% (295/4731) nezrelih M I oocitov in 5% (237/4731) nezrelih GV oocitov.

Postopek zorenja in vitro smo začeli pri 131 GV oocitih in 214 M I oocitih (tab. 1). Mejotsko manj zreli GV oociti so v 19,8% (26/131) ostali v začetnem stadiju in redukcijske delitve niso nadaljevali. Med M I oociti je bilo samo 9,8% (21/214) takšnih, ki niso uspeli s prehodom v naslednjo fazo redukcijske delitve, kar je manj kot pri GV oocitih ( $p < 0,01$ ).

Tab. 1. Rezultati in vitro zorenja človeških jajčnih celic.

Tab. 1. Results of in vitro maturation of human oocytes.

Število GV jajčnih celic in vitro No. of GV oocytes in vitro	131
Dozorele do M II v 30 urah (%) / Matured to M II within 30 hrs (%)	79 (60,3)
Dozorele do M II po 30 urah (%) / Matured to M II after 30 hrs (%)	11 (8,4)
Skupaj dozorelih do M II (%) / Total matured to M II (%)	90 (68,7)
Zastoj v GV stadiju (%) / Arrest at GV stage (%)	26 (19,8)
Zastoj v M I stadiju (%) / Arrest at M I stage (%)	15 (11,5)
Število M I jajčnih celic in vitro No. of M I oocytes in vitro	214
Dozorele do M II v 5 urah (%) / Matured to M II within 5 hrs (%)	136 (63,6)
Dozorele do M II v 24 urah (%) / Matured to M II within 24 hrs (%)	57 (26,6)
Zastoj v M I stadiju (%) / Arrest at M I stage (%)	21 (9,8)

Zorenje in vitro je bilo uspešnejše pri M I oocitih v primerjavi z GV oociti, saj je do metafaze II dozorelo 90,2% (193/214) M I in 68,7% (90/131) GV oocitov ( $p < 0,0001$ ). Med GV oociti, ki so dozoreli, jih je kar 87,8% (79/90) doseglo metafazo II že v naslednjem dnevu (v 30 urah), preostalih 12,2% (11/90) pa 30 do 48 ur po aspiraciji. Kar 63,6% (136/214) M I oocitov je doseglo M II stadij že v 5 urah in smo jih lahko uporabili klinično v postopku ICSI, 26,6% (57/214) M I oocitov pa do naslednjega dne.

Rezultati postopka ICSI pri M I oocitih, ki so dozoreli v 5 urah, so prikazani v tab. 2. Delež normalno oplojenih celic, ki so dozorele in vitro, je bil statistično značilno nižji kot pri kontrolni skupini jajčnih celic, dozorelih in vivo (56,6% oz. 71,7%;  $p < 0,0005$ ). Nepravilna oploditev (eden ali več kot dva pronukleusa) je bila enako pogosta pri jajčnih celicah, dozorelih in vivo in in vitro.

Tab. 2. Rezultati ICSI pri jajčnih celicah, dozorelih in vivo oziroma in vitro iz M I stadija v 5 urah.

Tab. 2. Results of ICSI at oocytes matured in vivo and in vitro from M I stage within 5 hrs.

	In vitro	In vivo
Število injiciranih jajčnih celic Number of injected oocytes	136	5642
Normalna oploditev Normal fertilization	77 (56,6)*	4045 (71,7)
Izostanek oploditve Fertilization failure	44 (32,3)**	1144 (20,3)
Nepravilna oploditev Fertilization disorders	15 (11,1)	453 (8)

\*  $p < 0,0005$ ; \*\*  $p < 0,001$

V 1,7% (14/818) ciklov smo imeli za postopek ICSI na razpola go samo nezrele jajčne celice bodisi v metafazi I (31 celic) ali profazi I (15 celic). V teh primerih smo postopek zorenja in vitro tudi klinično uporabili.

Od 31 M I oocitov je do naslednjega dne dozorelo 87,1% (27/31) celic. Oplodilo se jih je 66,7% (18/27). Od 15 GV oocitov je do naslednjega dne dozorelo 93,3% (14/15) celic. Stadij zigote je doseglo 64,3% (9/14) celic. S postopkom ICSI smo pri vseh 14 ciklih dosegli oploditev in opravili prenos razvitih zarodkov v maternico. V maternico smo vnesli 15 zarodkov, razvitih in vitro iz M I oocitov, in 8 zarodkov, razvitih in vitro iz GV oocitov.

Dosegli smo 4 nosečnosti in dve rojstvi. Med 4 implantiranimi zarodki sta dva izhajala iz GV oocitov, en zarodek iz M I oocita, poreklo četrtega pa je bodisi iz GV bodisi iz M I oocita. Dve nosečnosti sta se končali s spontanim splavom.

Pri dveh ženskah se je nezrelost vseh celic ponovila v več hormonsko spodbujanih in tudi v naravnih ciklih. Pri vsaki smo in vitro zorenje in ICSI ponovili dvakrat. Kljub prenosu zarodkov v maternico pri nobeni od njih ni prišlo do zanositve.

## Razpravljanje

Klinična uporaba zorenja jajčnih celic in vitro pri človeku se je pokazala za upravičeno v naravnih ciklih (7), v naravnih ciklih pri ženskah, kjer grozi nevarnost hiperstimulacije zaradi polističnih jajčnikov (5), v hormonsko spodbujanih ciklih, vendar pred dajanjem hCG (10) in v IVF/ICSI ciklih, kjer dobimo nezrele celice kljub danemu hCG (8, 9). V naši raziskavi smo se osredotočili na slednje, saj delež nezrelih jajčnih celic, ki jih dobimo po aspiraciji foliklov v postopku izventelesne oploditve, ni zanemarljiv. Z analizo ugotavljamo, da je med dobljenimi jajčnimi celicami kar dobra desetina (11,2%) jedrno nezrelih celic in pogosto so za postopek izventelesne oploditve pri posameznih pacientkah na razpolago samo te. Pojavnost nezrelih GV oocitov oziroma M I oocitov se med različnimi študijami kljub istovrstni hormonski stimulaciji precej razlikuje: 4,4% GV oocitov (11), 7% GV in 4% M I (12), 11% GV in 4% M I (8, 13) in 21,7% GV oocitov (14).

Delež nezrelih jajčnih celic se precej spreminja tudi med posameznimi cikli. Ugotovili so, da se cikli z nekaj nezrelimi jajčnimi celicami razlikujejo od ciklov, kjer so zrele vse celice po višjem nivoju estradiola, večjem številu foliklov in dobljenih jajčnih celic (11). Pogosto se tudi zgodi, da kljub ustreznim sonografskim parametrom, ustrezajoči velikosti predovulacijskih foliklov ne uspemo zagotoviti zrelosti večine ali celo vseh jajčnih celic, kot se je to zgodilo v 1,7% ciklov pri nas. Pojav ni neznan, saj o njem poročajo tudi drugi avtorji (8, 15). Razlogi za nezrelost vseh jajčnih celic ob punkciji so lahko bodisi prezgodaj dan hCG, predvsem v primerih enega vodilnega in več manjših foliklov, bodisi prešibka bioaktivnost hCG. Ravno slednje bi lahko bilo razlog ponavljajočih se pojavov nezrelosti vseh celic tako v naravnih kot tudi v hormonsko spodbujanih ciklih, ki smo jih zabeležili pri dveh bolnicah v naši skupini. Kljub temu, kot dokazujemo v naši raziskavi, cikli z vsemi nezrelimi jajčnimi celicami ob punkciji niso klinično neuporabni. Nekateri med M I ali GV nezrelimi jajčnimi celicami imajo kljub temu dober razvojni potencial, saj lahko po mejotski dozorelosti z njimi dosežemo tudi nosečnosti.

Do danes še ni znano, kakšna so optimalna gojišča za zorenje jajčnih celic in tudi na trgu še ni komercialnega gojišča za te namene. V našem primeru smo uporabili enostavno gojišče (modificiran Earlov medij) brez hormonskih dodatkov. Jajčne celice smo gojili brez prisotnosti celic kumulusa ooforusa in korone radiate. Dokazujejo sicer, da dozori več celic, če zorijo skupaj s kumulusom (14) in če so gojišču dodani gonadotropini (16, 17) ali rastni faktorji, kot je na primer epidermalni rastni faktor (14). V raziskavi smo dosegli enako stopnjo mejotske zrelosti kot Nagy in sod. (8), ki poročajo, da v enostavnem mediju brez dodatkov spontano dozori 30–50% M I oocitov, in to v 1–5 urah, ter 50–70% GV oocitov po 30–32 urah.

Ugotovili smo, da se sposobnost dozorevanja in vitro razlikuje glede na stadij jajčne celice, pri katerem se zorenje začne, saj so GV oociti dozoreli redkeje (v 68,7%) kot M I oociti (v 90,2%). Odstranitev celic kumulusa in korone sicer omogoči jajčni celici nadaljevanje redukcijske delitve in prehod jedra iz GV oblike v metafazo I, vendar pa je z odstranitvijo teh celic prekinjena tudi oskrba citosola s tistimi elementi, ki jih jajčna celica ni sposobna sama sintetizirati (18). Celice v profazi izhajajo po navadi iz manjših foliklov, včasih celo iz druge kohorte, v primerih spontanega dviga LH pa iz že atrečnih foliklov. Zato je verjetno, da imajo te celice slabšo preskrbljenost citosola s potrebnimi koncentracijami substratov, encimov in citoplazmatskih faktorjev, kar je lahko razlog za slabšo sposobnost zorenja in vitro.

Med M I oociti v naši raziskavi prevladujejo takšni, ki so bili sposobni dozoreti v petih urah (63,6%) in so zato bili vedno uporabljivi tudi v kliničnem ICSI postopku. Do naslednjega dne je dozorelo še 26,6% M I oocitov. Stopnja normalne oplojenosti teh celic je bila nižja kot pri ostalih, zrelih oocitih (56,6% oz. 71,7%). Drugi avtorji poročajo, da je v petih urah dozorela samo četrtnina M I oocitov (13, 19). Tudi oni so pri njih opazili statistično značilno nižjo oploditveno sposobnost po ICSI postopku v primerjavi s skupino pravočasno dozorelih oocitov.

Nižja stopnja oplojenosti jajčnih celic, dozorelih in vitro, je verjetno posledica citoplazmatske nezrelosti kljub jedrni zrelosti. V pogojih in vivo preide jedro iz profaze I v metafazo I in nato v mejotsko zrelo metafazo II tik pred ovulacijo. To mejotsko zrelost jajčne celice zelo lahko ocenimo pod mikroskopom, ko v perivitelskem prostoru celice najdemo prisotno prvo polarno telo. Celice v metafazi II pa potrebujejo še nekaj časa, da so sposobne normalne oploditve (20). V tem času se izpopolnjuje še mehanizem za aktivacijo citoplazme, ki je nujna v procesu oploditve (21). Dokazano je, da je stopnja oploditve precej višja, če je bila osemenitev jajčnih celic, dozorelih in vitro, opravljena z osemurnim zamikom (22). Pri nas odstranimo kumulusa takoj po aspiraciji. Če so med celicami posamezne ženske tudi M I oociti, opravimo postopek ICSI šele čez 5 ur, sicer pa prej. Tako omogočimo kar 63,6% nezrelih M I celic, da mejotsko dozori. Verjetno pa je bil čas od dozorelosti do osemenitve kar za polovico jajčnih celic prekratek, saj je bilo med celicami, dozorelimi in vitro, statistično značilno manj normalno oplojenih celic. Kljub vprašljivi kakovosti jajčnih celic, dozorelih in vitro, smo nepravilnosti oploditve, kot so pojav enega ali več kot dveh pronukleusov, zasledili enako pogosto tudi pri jajčnih celicah, dozorelih in vivo.

## Zaključki

Dobra desetina jajčnih celic, ki jih dobimo pri aspiraciji hormonsko spodbujanih foliklov v postopku izventelesne oploditve, je mejotsko nezrelih. Le-te lahko dozori in vitro, če jih pustimo zoreti v enostavnem gojišču brez dodanih hormonov in brez celic kumulusa ooforusa ali korone radiate. Kljub njihovi slabši oploditveni sposobnosti v primerjavi s celicami, dozorelimi in vivo, so nezrele jajčne celice klinično uporabne, saj lahko tudi z njimi dosežemo nosečnost.

## Literatura

- Schultz R. Control mechanisms regulating meiotic maturation of mammalian oocytes. In: Wolf Don Ped. In vitro fertilization and embryo transfer. New York: Plenum Press, 1988: 349–58.
- Edwards RG. Maturation in vitro of human ovarian oocytes. *Lancet* 1965; 2: 926–6.
- Vecek LL, Wortham JE, Witmyer J, Sandow BA, Acosta AA, Garcia JE et al. Maturation and fertilization of morphologically immature human oocytes in a program of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1983; 39: 594–602.

4. Cha KY, Koo JJ, Ko JJ et al. Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program. *Fertil Steril* 1991; 55: 109-13.
5. 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.
6. Barnes FL, Crombie A, Gardner DK 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.
7. Russell JB, Knezevich BA, Fabian KF et al. Unstimulated immature oocyte retrieval: early versus midfollicular endometrial priming. *Fertil Steril* 1997; 67: 616-20.
8. Nagy ZP, Cecile J, Liu J, Loccufier A, Devroey P, Van Steirteghem A. Pregnancy and birth after intracytoplasmic sperm injection of in vitro matured germinal-vesicle stage oocytes: case report. *Fertil Steril* 1996; 65: 1047-50.
9. Edirisinghe WR, Junk SM, Matson PL, Yovich JL. Birth from cryopreserved embryos following in-vitro maturation of oocytes and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1997; 12: 1056-8.
10. Liu J, Katz E, Garcia JE et al. Successful in vitro maturation of human oocytes not exposed to human chorionic gonadotropin during ovulation induction, resulting in pregnancy. *Fertil Steril* 1997; 67: 566-8.
11. Avrech OM, Goldman GA, Rufas O, Stein A, Amit S, Yoles I, Pinkas H, Fisch B. Treatment variables in relation to oocyte maturation: lessons from clinical micromanipulation-assisted in vitro fertilization program. *J Assist Reprod Genet* 1997; 14: 337-42.
12. Greenblatt EM, Meriano JS, Casper R. Type of stimulation protocol affects oocyte maturity, fertilization rate, and cleavage rate after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1995; 64: 557-63.
13. De Vos A, Van de Velde H, Joris H, Van Sterteghem A. In-vitro matured metaphase-I oocytes have a lower fertilization rate but similar embryo quality as mature metaphase-II oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1999; 14: 1859-63.
14. Goud PT, Goud AP, Qian C, Laverge H, Van der Elst J, De Sutter P, Dhont M. In-vitro maturation of human germinal vesicle stage oocytes: role of cumulus cells and epidermal growth factor in the culture medium. *Hum Reprod* 1998; 13: 1638-44.
15. Hartshorne G, Montgomery S, Klentzeris L. A case of failed oocyte maturation in vivo and in vitro. *Fertil Steril* 1999; 71: 567-70.
16. Prins GS, Wagner C, Weidel L, Gianfortoni J, Marut EL, Scommegna A. Gonadotropins augment maturation and fertilization of human immature oocytes cultured in vitro. *Fertil Steril* 1987; 47: 1035-7.
17. 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.
18. Haghghat N, van Winkle LJ. Developmental change in follicular cell-enhanced amino acid uptake into mouse oocytes that depends on intact gap junctions and transport system Gly. *J Exp Zool* 1990; 253: 71-82.
19. Junca AM, Mandelbaum J, Belaisch-Allart J et al. Maturite et qualite ovocytaire: l'apport de l'ICSI. Fecondabilite des ovocytes microinjectes apres maturation in vitro. *Contracept Fertil Sex* 1995; 23: 463-5.
20. Lopata A, Leung PC. The fertilizability of human oocytes at different stages of meiotic maturation. *Ann NY Acad Sci* 1988; 541: 324-6.
21. Carroll J, Jones KT, Whittingham DG. Ca<sup>2+</sup> release and the development of Ca<sup>2+</sup> release mechanisms during oocyte maturation: a prelude to fertilization. *Reviews of Reproduction* 1996; 1: 137-43.
22. Dominko T, First NL. Timing of meiotic progression in bovine oocytes and its effect on early embryo development. *Mol Reprod Dev* 1997; 47: 456-67.