

Strokovni prispevek/Professional article

ZNAČILNOSTI RAZMNOŽEVANJA KUMULUSNIH CELIC DOMINANTNEGA FOLIKLA V *IN VITRO* POGOJIH

THE PROLIFERATION OF DOMINANT FOLLICLE CUMULUS CELLS IN *IN VITRO* CONDITIONS

Mojca Čížek-Sajko, Veljko Vlasisavljević

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

Prispelo 2001-01-10, sprejeto 2001-12-03; ZDRAV VESTN 2002; 71: Supl. I: 25-29

Ključne besede: *kultiviranje kumulusnih celic; morfologija kumulusnih celic; oploditev; kakovost zarodka*

Izvleček – Izhodišča. Proučevali smo sposobnost razmnoževanja kumulusnih celic dominantnega folikla v *in vitro* pogojih pri naravnih ciklih zunajtelesne oploditve. Zanimalo nas je, ali se obnašanje kumulusnih celic v kulturi odlikava tudi v oploditveni sposobnosti jajčne celice in v kakovosti zarodka.

Metode. Pri 69 preiskovankah smo v postopku zunajtelesne oploditve s punkcijo folikla dobili kompleks jajčna celica – kumulus. Dan po punkciji smo ocenili obliko kumulusnih celic in oploditev. Po treh dneh kultiviranja smo ocenili razmnoževanje kumulusnih celic in na dan prenosa zarodka, to je tretji dan po punkciji, ovrednotili tudi kakovost zarodka.

Rezultati. Spreminjanje oblike kumulusnih celic iz kroglaste v zvezdasto smo po enem dnevu kultiviranja opazili pri 87,0% vzorcev celic, pri 5,8% vzorcev so se celice pritrdele na podlago, vendar so ohranile kroglasto obliko, pri 7,2% vzorcev pa so kumulusne celice ostale v suspenziji. Po treh dneh kultiviranja so se kumulusne celice dobro razmnoževale pri 65,2% vzorcev, pri 34,8% vzorcev pa je bilo razmnoževanje le neznatno oziroma ga ni bilo. Primerjava spreminjanja oblike kumulusnih celic po enem dnevu kultiviranja in razmnoževanja, ocenjenega po treh dneh kultiviranja, je pokazala njuno medsebojno povezanost. Nismo našli povezanosti med sposobnostjo razmnoževanja kumulusnih celic in oploditveno sposobnostjo jajčne celice, lahko pa smo potrdili odvisnost med sposobnostjo razmnoževanja kumulusnih celic in morfologijo zarodka.

Zaključki. Kumulusne celice v *in vitro* pogojih izražajo različno sposobnost spreminjanja oblike in različno sposobnost razmnoževanja. Na podlagi vzorca razmnoževanja kumulusnih celic lahko sklepamo na kakovost zarodka, ne pa tudi na oploditveno sposobnost jajčne celice.

Key words: *cumulus cell culture; cumulus cell morphology; fertilization; embryo quality*

Abstract – Background. We studied the proliferative capacity of dominant follicle cumulus cells under *in vitro* conditions in natural *in vitro* fertilization (IVF) cycles. We attempted to determine whether the behavior of cumulus cells in culture medium is also reflected in the fertilization capacity of the oocyte and embryo quality.

Methods. In 69 patients undergoing IVF, the oocyte – cumulus complex was obtained by follicle puncture. On the day following puncture, cumulus cell morphology and fertilization were evaluated. After three days of culture, the proliferation of cumulus cells was evaluated and on the day of embryo transfer, i. e. on the third day after puncture, embryo quality also.

Results. After one day of culture, the transformation of cumulus cells from spherical to stellate form was noted in 87.0% cell samples, in 5.8% of samples the cells adhered to the bottom but retained their spherical form and in 7.2% of samples the cumulus cells remained in the suspension. After three days of culture, the cumulus cells exhibited good proliferation in 65.2% of samples, in 34.8% of samples proliferation was minimal or absent. The comparison of cumulus cell transformation after one day of culture and proliferation evaluated after three days of culture revealed their correlation. No relationship was found between the proliferative capacity of cumulus cells and fertilization, but we were able to confirm the relationship between the proliferative capacity of cumulus cells and embryo morphology.

Conclusions. Under *in vitro* conditions, cumulus cells express a different capacity of morphological transformation and proliferation. From the pattern of cumulus cell proliferation we can infer to the embryo quality but not to the fertilization capacity of the oocyte.

Uvod

Kumulusne celice (cumulus oophorus), ki v foliklu tesno obdajajo jajčno celico, se po ovulacijskem vrhu luteinizirajočega hormona (LH) oziroma po dajanju LH ali humanega horion-skega gonadotropina (hCG) morfološko in funkcionalno spremenijo (1, 2). Izločati začnejo velike količine hialuronana (HA), glikozaminoglikana z veliko molekularno težo. Nasprotno pa granulozne celice foliklove stene ne tvorijo s HA bogatega medceličnega matriksa in ob ovulaciji ostanejo v foliklu (3). Nekateri menijo, da razvoj granuloznih celic v granulozne celice foliklove stene in kumulusne celice parakrino nadzoruje jajčna celica z izločanjem določenih topnih dejavnikov (4) in da je od razdalje granuloznih celic od jajčne celice odvisno, kako se bodo granulozne celice morfološko in biokemično izrazile (5). Znano je, da je v naravnem ciklu ženske mejotška zrelost jajčne celice povezana s povečanjem stopnje razpršenosti kumulusne mase in s tvorbo viskoznega medceličnega matriksa (6). Matriks povečanega in razpršenega kompleksa kumulus – jajčna celica pospeši izluščanje le-tega iz folikla in skupaj s kumulusnimi celicami ustvarja primerno okolje za prodiranje semenčic do jajčne celice in za oploditev (7). Hialuronanska komponenta matriksa se namreč veže na proteinske receptorje PH-20 na površini semenčice in tako semenčici olajša akrosomsko reakcijo (8).

Sposobnost morfološkega spreminjanja in razmnoževanja izražajo kumulusne celice tudi v *in vitro* pogojih. Študije folikularnih celic pri spodbujenih postopkih zunajtelesne oploditve (IVF) so pokazale, da se obnašanje kumulusnih celic v kulturi zrcali v oploditveni sposobnosti jajčne celice (9), v kakovosti zarodka (9, 10) oziroma v sposobnosti zarodka, da se vgnezdi (11).

Znano je, da na razvoj folikla in zorenje jajčne celice v folikularni fazi menstrualnega cikla vpliva hormonsko mikrookolje. Gonadotropini, ki jih uporabljamo pri spodbujanju ovulacije med IVF postopkom, lahko vplivajo na normalno funkcijo kumulusnih celic. Geršak in Tomažević (12) sta proučevala celice granulozne iz foliklov naravnega ciklusa in ciklusa, spodbujenega z gonadotropini. Ugotovila sta, da se razlikujejo v morfometričnih lastnostih in v prisotnosti hCG na celicah ali znotraj njih. Poleg tega lahko v IVF postopku sledimo razvoju jajčne celice od oploditve do razvoja zarodka in njegove vgnezditve. Ta razvoj lahko primerjamo z morfološkimi in mitotskimi lastnostmi pripadajočega kumulusa samo pri zarodkih, nastalih iz foliklov nespojenega ciklusa, kjer s punkcijo folikla dobimo le eno jajčno celico.

Namen naše študije je bil proučiti sposobnost razmnoževanja kumulusnih celic *in vitro* pri naravnih ciklih IVF in ugotoviti, ali se obnašanje kumulusnih celic v kulturi odlikava tudi v oploditveni sposobnosti jajčne celice in v kvaliteti zarodka.

Material in metode

S prospektivno raziskavo smo analizirali kumulusne celice pri 69 naravnih ciklih IVF. V raziskavo smo vključili pare, ki so bili na seznamu za postopek spodbujenega cikla umetne oploditve in smo jim hkrati ponudili možnost sodelovanja pri naravnih ciklih IVF. Med temi smo izbrali le pare, pri katerih so preiskovanci ustrezali merilom za klasični postopek IVF, tj. da smo po osamitvi semenčic iz semenskih vzorcev s tehniko swim-up lahko pripravili semenske vzorce s koncentracijo gibljivih semenčic $5-10 \times 10^6/\text{ml}$. Razvoj folikla smo spremljali z ultrazvokom in določanjem ravni estradiola v serumu. Ovulacijo smo pri preiskovankah spodbudili s 5000 IE hCG, ko je premer folikla dosegel 16 mm in raven estradiola vsaj 0,49 nmol/L. Čez 36 ur smo s punkcijo dominantnega folikla dobili kompleks jajčna celica – kumulus (dan 0) in ga prenesli v 0,7 ml gojišča IVF (MediCult, Danska). Po 1- do 2-urni

inkubaciji v inkubatorju pri 37 °C in atmosferi s 5% CO₂ smo gojišču s kompleksom jajčna celica – kumulus dodali 30 µl pripadajočega semenskega vzorca s $5-10 \times 10^6/\text{ml}$ gibljivih semenčic, opranega v gojišču SPM (MediCult, Danska) in pripravljene s tehniko swim-up. Na dan 0 smo tudi ocenili zrelost kompleksa jajčna celica – kumulus. Glede na značilnosti kumulusnih celic, ki obdajajo jajčno celico (cumulus oophorus), in celic, ki so tesno povezane z ovojnico jajčne celice ali zono pellucido (krona, corona radiata), smo razlikovali med petimi tipi kompleksa jajčna celica – kumulus: (I.) nezrel: kumulusne celice v gostem matriksu, nerazpršene ali rahlo razpršene, krona kompaktna, temna; (II.) intermediarni: kumulus nerazpršen ali razpršen, krona rahlo razpršena; (III.) zrel: kumulusne celice močno razpršene, krona svetla in razpršena; (IV.) luteiniziran: kumulusne celice in celice krone temne in zbite v skupke ter (V.) degeneriran: kumulus in krona razpršena, zona pellucida počena, ooplazma degenerirana. Vsi ocenjeni kompleksi so bili zreli. Dan po punkciji smo jajčno celico mehansko ločili od kumulusnih celic, ocenili oploditev in jajčno celico predstavili v sveže gojišče. Na dan prenosa zarodka, to je tretji dan po punkciji, smo ovrednotili kakovost zarodka. Pri ocenjevanju smo upoštevali dve merili: (I.) morfologijo (fragmentiranost blastomer) in (II.) ustreznost dinamike delitve blastomer. Zarodke smo po teh merilih razdelili v dve skupini: skupina A – zarodki dobre kakovosti, tj. zarodki z nefragmentiranimi ali rahlo fragmentiranimi blastomerami (< 10%), pri katerih se je število blastomer z dneva 2 na dan 3 povečalo za vsaj 2 blastomeri; skupina B – zarodki slabe kakovosti, tj. zarodki z zmerno (10-50%) ali močno fragmentiranimi blastomerami (> 50%) ali z neustrezno hitrostjo delitve blastomer (število blastomer se je povečalo z dneva 2 na dan 3 za manj kot 2 blastomeri).

Ob ocenjevanju oploditve smo dan po punkciji z invertirnim mikroskopom IMT-2 (Olympus) ocenili tudi morfologijo kumulusnih celic. Razlikovali smo med dvema tipoma celic: kroglaste in zvezdaste. Vzorec kumulusnih celic smo ovrednotili kot celice s kroglasto obliko, če so vse celice v kulturi ostale kroglaste. Če pa je viden delež kumulusnih celic kazal zvezdasto obliko, smo tak vzorec ovrednotili kot celice z zvezdasto obliko. Zanimalo nas je, kako se kumulusne celice obnašajo v *in vitro* pogojih. Opazovali smo viskoznost kumulusne mase oziroma stopnjo razpršenosti. Glede na to smo razlikovali: (I.) viskozni medcelični matriks – celice v kulturi so v obliki kompaktnega skupka in (II.) razgrajeni medcelični matriks – kumulusna masa se razprši v manjše skupke in v posamezne celice. Ocenili smo sposobnost kumulusnih celic, da se pritrdijo na podlago, in sposobnost preoblikovanja iz kroglaste oblike v zvezdasto obliko s citoplazemskimi izrastki.

Kumulusne celice smo v istem gojišču kultivirali še dva dni, nato pa smo na dan 3 ponovno ocenili sposobnost kumulusnih celic za spreminjanje kroglaste oblike v zvezdasto, ovrednotili razpršenost celic kumulusne mase in njihovo razmnoževanje. Celice so se dobro razmnoževale, če jih je bila večina zvezdaste oblike in so se med seboj povezovale s citoplazemskimi izrastki. Sicer smo ovrednotili njihovo razmnoževanje kot slabo.

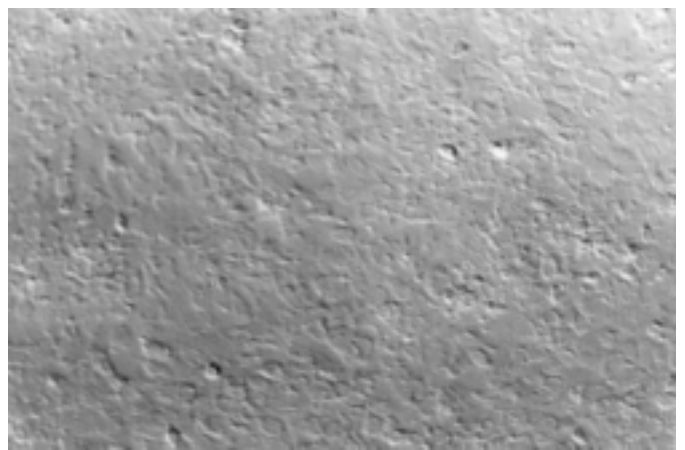
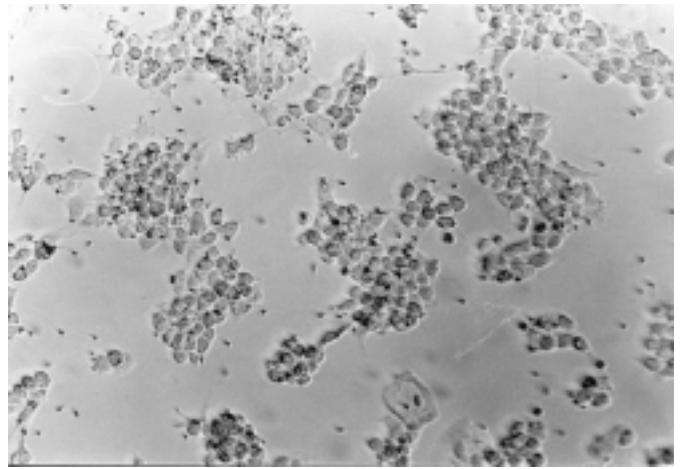
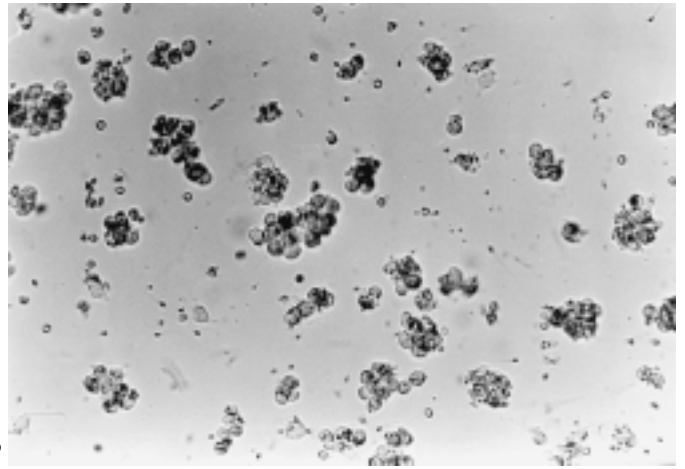
Kultiviranje smo pri delu vzorcev podaljšali na pet oziroma na sedem dni z menjavo gojišča vsak drugi dan.

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili računalniški program Statistika StatSoft. Povezavo med spreminjanjem oblike kumulusnih celic po enem dnevu kultiviranja in vzorcem razmnoževanja po treh dneh kultiviranja, odnos med razmnoževanjem kumulusnih celic in oploditvijo jajčne celice ter odnos med razmnoževanjem kumulusnih celic in kakovost zarodka in razmnoževanjem kumulusnih celic in zanositvijo smo ovrednotili z Yatesovo korekcijo testa hi-kvadrat.

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

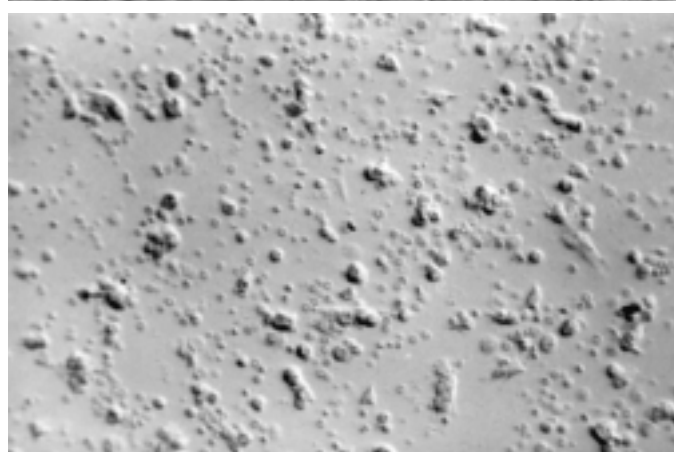
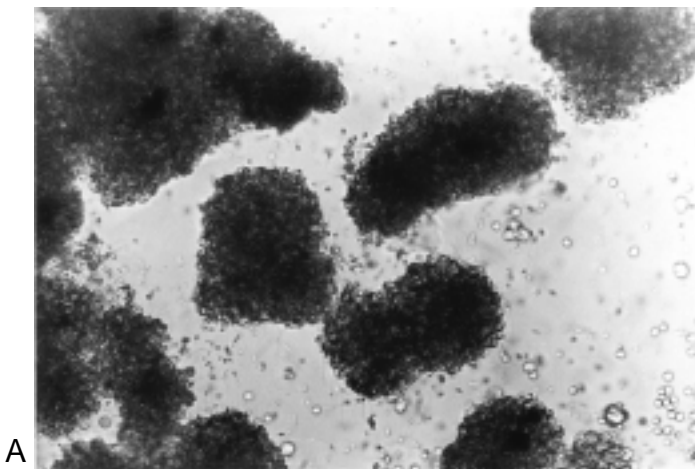
Rezultati

Kumulusne celice v kulturi so zrcalile različno sposobnost spreminjanja oblike in razmnoževanja. Po enem dnevu kultiviranja smo opazili naslednje morfološke različice: (I.) Pri 87,0% (60/69) pregledanih vzorcev so kumulusne celice iz kroglaste oblike prehajale v zvezdasto. Viskozni medcelični matriks se je razgradil, kumulusna masa se je delno razpršila in celice so se pritrdile na podlago. (II.) Kulture celic so se pritrdile na podlago, vendar so ohranile kroglasto obliko. Takšno stanje smo opazili pri 5,8% (4/69) vzorcev. Kumulusne celice so se delno razpršile po podlagi, delno pa so ostale v obliki manjših in večjih skupkov. (III.) Pri 7,2% (5/69) vzorcev so kumulusne celice ostale v suspenziji, praviloma kot velik kompakten skuppek. Za statistično obdelavo smo kumulusne celice na podlagi morfoloških lastnosti, izraženih v kulturi po enem dnevu, razdelili v dve skupini: 1. kulture celic z nespremenjeno, kroglasto obliko; 2. kulture celic z zvezdasto obliko.



Sl. 1. Svetlobnomikroskopski posnetki morfoloških sprememb kumulusnih celic in razmnoževanja. (a) Morfologija kumulusnih celic, ocenjena po enem dnevu kultiviranja. Kumulusne celice so ostale v suspenziji. Povečava 100-krat. (b) Pritrjanje kumulusnih celic na podlago po enem dnevu kultiviranja brez vidnih morfoloških sprememb. Povečava 150-krat. (c) Morfološke spremembe kumulusnih celic po enem dnevu kultiviranja. Opazno izrazito spreminjanje kroglaste oblike v zvezdasto. Povečava 200-krat. (d) Kumulusne celice po treh dneh kultiviranja z izrazitim spreminjanjem oblike in razmnoževanjem (vzorec A). Celice so se razrastle v povezan enosloj. Povečava 200-krat. (e) Kumulusne celice po treh dneh kultiviranja z neznatnim spreminjanjem oblike in razmnoževanjem ali brez razmnoževanja (vzorec B). Povečava 200-krat.

Fig. 1. Light photomicrographs of morphological transformations and proliferation of cumulus cells. (a) Cumulus cell morphology evaluated after one day of culture. Cumulus cells remained in suspension as compact clumps. Magnification $\times 100$. (b) Cumulus cells adhered to the culture dish after one day of culture, without evident morphologic changes. Magnification $\times 150$. (c) Morphologic changes of cumulus cells after one day of culture. Evident transformation from spherical to stellate form. Magnification $\times 200$. (d) Cumulus cells after three days of culture with extensive transformation and proliferation (Pattern A). The cells grow in confluent monolayer. Magnification $\times 200$. (e) Cumulus cells after three days of culture with minimal transformation and minimal proliferation or without (Pattern B). Magnification $\times 200$.



Tretji dan kultiviranja smo ovrednotili sposobnost kumulusnih celic za spreminjanje kroglaste oblike v zvezdasto, razpršenost kumulusnih celic in razmnoževanje. Na podlagi tega smo opisali dva vzorca razmnoževanja: pri 65,2% (45/69) vzorcev so se celice dobro razmnoževale. Kumulusna masa je bila delno ali povsem razpršena, prej kroglaste celice so iztegovale svoje citoplazemske izrastke in tako dobile zvezdasto obliko (vzorec A). Pri nekaterih kulturah iz te skupine so se celice razrastle v povezan enosloj. Pri 34,8% (24/69) vzorcev pa so se kumulusne celice slabo razmnoževale oziroma se sploh niso razmnoževale, kumulusna masa je ostala v obliki enega ali več kompaktnih skupkov. Opaziti je bilo le neznatno spreminjanje kroglaste oblike v zvezdasto ali pa je ostala oblika nespremenjena (vzorec B).

Pri podaljšanju kultiviranja kumulusnih celic na pet dni (pri 53/69 vzorcev) oziroma na 7 dni (pri 29/69 vzorcev) se vzorec razmnoževanja ni spreminjal. Večinoma pa smo opazili naraščajočo luteinizacijo celic, združevanje v skupke in odlepljanje od podlage ter končno degeneracijo celic.

Morfološke spremembe kumulusnih celic in razmnoževanje je prikazano na sliki 1.

Morfologijo kumulusnih celic, ocenjeno po enem dnevu kultiviranja, smo primerjali z razmnoževanjem, ocenjenim po treh dneh kultiviranja. Pokazalo se je, da sta pojava značilno povezana ($\chi^2 = 6,40$, $p < 0,02$). Rezultate prikazuje tabela 1.

Razmnoževanje kumulusnih celic dominantnega folikla smo primerjali tudi s sposobnostjo jajčne celice tega folikla, da se oplodi. Primerjava ni pokazala njune medsebojne povezanosti ($\chi^2 = 0,74$, $p = 0,39$).

Zanimal nas je tudi odnos med sposobnostjo razmnoževanja kumulusnih celic in kakovostjo zarodka, ki se je pokazal statistično značilen ($\chi^2 = 4,61$, $p < 0,04$). Frekvence pojavljanja zarodkov dobre kakovosti (skupina A) in zarodkov slabe kakovosti (skupina B) glede na vzorec razmnoževanja kumulusnih celic so prikazane v tabeli 1.

Razpravljanje in sklep

Gregory in Walker (13) prva poročata o morfološkem spreminjanju in razmnoževanju kumulusnih celic v *in vitro* pogojih in o njegovi povezanosti z uspehom postopka IVF. V obsežnejši študiji iz leta 1994 Gregory in sod. (11) ugotavljajo, da razmnoževanje kumulusnih celic ni povezano z oploditveno sposobnostjo jajčne celice in kakovostjo zarodka, zrcali pa se v sposobnosti zarodka, da se vgnezdijo v steno maternice. Rezultati naše raziskave teh ugotovitev ne potrjujejo. Nasprotno smo ugotovili, da so kumulusne celice jajčnih celic, ki so se po oploditvi razvile v zarodek boljše kakovosti, izražale v kulturi drugačen vzorec razmnoževanja kot kumulusne celice jajčnih celic, ki so se razvile v kakovostno slabše zarodke. Se pa naša opažanja ujemajo z izsledki Goldmana in sod. (10), ki so prav tako ocenjevali morfoložijo in razmnoževanje kumulusnih celic po enem in po treh dneh kultiviranja. Ugotovili so slabše razmnoževanje granuloznih celic in slabšo kakovost zarodka pri cističnih foliklih kot pri foliklih normalne velikosti.

Postavlja se vprašanje, s katerimi parametri opisati zarodek, da bo ta informacija ustrezen napovedni dejavnik za vgnezditev. Nekateri avtorji poleg fragmentiranosti in splošnega izgleda blastomer upoštevajo še njihovo število (14, 15), drugi se omejujejo samo na morfološke lastnosti (11, 16). Mi smo kakovost zarodka opredelili na podlagi morfološke ocene zarodka in dinamike delitve blastomer. V prejšnji študiji (17) smo namreč ugotovili, da posamezna merila, kot so morfoložija zarodka, število blastomer in hitrost delitve blastomer, ne zadoščajo za opisovanje kakovosti zarodka. Kot dober napovedni dejavnik za vgnezditev je bila kakovost zarodka le v primeru, če smo jo določili na osnovi morfoložije in dinamike delitve blastomer hkrati. Pri tako definirani kakovosti imajo

Tab. 1. Primerjava kliničnih parametrov in morfoložije kumulusnih celic z razmnoževanjem kumulusnih celic *in vitro*. ^a Kakovost zarodka: skupina A – zarodki z nefragmentiranimi ali rahlo fragmentiranimi blastomerami in povečanjem števila blastomer z dneva 2 na dan 3 za vsaj 2 blastomeri; skupina B – zarodki z močno fragmentiranimi blastomerami in/ali z neustrezno hitrostjo delitve blastomer (povečanje števila blastomer z dneva 2 na dan 3 za manj kot 2 blastomeri). ^b Morfoložija kumulusnih celic: ocenjena po enem dnevu kultiviranja. ^c Razmnoževanje kumulusnih celic (ocenjeno po treh dneh kultiviranja): vzorec A – kumulusne celice z izrazitim spreminjanjem oblike in razmnoževanjem; vzorec B – kumulusne celice z neznatnim spreminjanjem oblike in razmnoževanjem ali brez razmnoževanja.

Tab. 1. Comparison of clinical parameters and cumulus cell morphology with proliferation of cumulus cells *in vitro*. ^a Embryo quality: Group A – embryos with little or no fragmentation of blastomeres and increase in number of blastomeres from day 2 to day 3 by at least 2; Group B – embryos with heavily fragmented blastomeres and/or inadequate cleavage rate (increase in number of blastomeres from day 2 to day 3 by less than 2). ^b Cumulus cell morphology: evaluated after one day of culture. ^c Proliferation of cumulus cells (evaluated after three days of culture): Pattern A – cumulus cells with extensive transformation and proliferation; Pattern B – cumulus cells with no or little evidence for morphological transformation and proliferation.

	Razmnoževanje kumulusnih celic Cumulus cell proliferation	
	Vzorec A Pattern A	Vzorec B Pattern B
Naravni postopki IVF z jajčno celico (n) Natural IVF procedures with oocyte (n)	45	24
Oplojene jajčne celice (n/%) Fertilized oocytes (n/%)	34/75,6	15/62,5
^a Kakovost zarodka: * (n/%) ^a Embryo quality: * (n/%)		
Dobra (skupina A) Good (Group A)	26/53,1	6/12,2
Slaba (skupina B) Poor (Group B)	8/16,3	9/18,4
Število nosečnosti Number of pregnancies	6	2
^b Morfologija kumulusnih celic: * (n/%) ^b Cumulus cell morphology: * (n/%)		
Kroglasta oblika Spherical form	2/2,9	7/10,1
Zvezdasta oblika Stellate form	43/62,3	17/24,6

* – Statistično pomembna razlika glede na vzorec razmnoževanja kumulusnih celic ($p < 0,05$).

* – Statistically significant difference in relation to pattern of cumulus cell proliferation ($p < 0,05$).

dobri zarodki 3,43-krat večje obete za vgnezditev kot slabi zarodki.

Zakaj se boljši in slabši zarodki razlikujejo glede mitotske sposobnosti pripadajočih kumulusnih celic? Mogoče je odgovor v različni plasti folikularnega mikrookolja, ki daje različne pogoje za razvoj jajčne celice po oploditvi do večceličnega zarodka. Podobno razmišljajo tudi Goldman in sod. (10), da lahko razmnoževanje granuloznih celic, ki je soodvisno s kakovostjo zarodka, določeni dejavniki v folikularni tekočini zavrejo, drugi pa pospešijo.

Primerjava morfoložije celic kumulusne mase po enem dnevu kultiviranja in razmnoževanja kumulusnih celic po treh dneh v kulturi je pokazala, da se je mitotski potencial kumulusnih celic izrazil že v prvih 24 urah kultiviranja s sposobnostjo preoblikovanja celic v zvezdasto obliko.

Podaljšanje kultiviranja kumulusnih celic na pet oziroma sedem dni ni vplivalo na vzorec razmnoževanja. Opazili pa smo postopno degeneracijo celic, kar je bila najverjetneje posledica neprimernih pogojev za ohranjanje rasti v kulturi.

Rezultati naše študije so pokazali, da so kumulusne celice v *in vitro* pogojih različno sposobne spreminjati obliko in se razmnoževati in da se ta sposobnost zrcali v različni kakovosti zarodka. Načeloma bi lahko to ugotovitev uporabili kot dodatni parameter pri izbiranju kakovostnih zarodkov v primeru spodbujenih ciklov IVF. Vendar pa bi s tem otežili postopek kultiviranja zarodkov, saj bi vsak zarodek in njemu pripadajoče kumulusne celice morali kultivirati posebej.

Zanimivo bi bilo ugotoviti tudi odnos med razmnoževanjem kumulusnih celic in kakovostjo zarodka, ki jo po novem ocenjujemo kot sposobnost zarodka za razvoj do blastociste. Vprašanje za obravnavo v naslednjih raziskavah je tudi, ali obstaja kakšna povezava med razpršenostjo kumulusa oziroma razmnoževanjem kumulusnih celic in apoptotskimi procesi pri njih. Hialuronan naj bi namreč zaviral apoptozo kumulusnih in muralnih granuloznih celic (18).

Literatura

1. Channing CP, Schaerf FW, Anderson LD, Tsafiri A. Ovarian follicular and luteal physiology. *Int Rev Physiol* 1980; 22: 117-201.
2. Vlaisavljević V, Breznik R. Procjena zrelosti jajne stanice na osnovi analize citokemijskih promjena u stanicama granulose. VII jugoslovenski simpozijum o aktualnim problemima u fertilitetu i sterilitetu. Zbornik radova. Novi Sad: Matica Srpska, 1984.
3. Salustri A, Yanagishita M, Underhill C, Laurent TC, Hascall VC. Localization and synthesis of hyaluronic acid in the cumulus cells and mural granulosa cells of the preovulatory follicles. *Dev Biol* 1992; 151: 541-51.
4. Eppig JJ, Chesnel F, Hirao Y et al. Oocyte control of granulosa cell development: how and why. *Hum Reprod* 1997; 12: Suppl 2: 127-32.
5. Salustri A, Camaioni A, D'Alessandris C. Endocrine and paracrine regulation of cumulus expansion. *Zygote* 1996; 4: 313-5.
6. Testart J, Frydman R, De Mouzon J, Lasalle B, Belaisch JC. A study of factors affecting the success of human fertilization in vitro. I. Influence of ovarian stimulation upon the number and condition of oocytes collected. *Biol Reprod* 1983; 28: 415-20.
7. Salustri A, Hascall VC, Camaioni A, Yanagishita M. Oocyte-granulosa cell interactions. In: Adashi EY, Leung PCK eds. *The ovary*. New York: Raven Press, 1993: 209-25.
8. Cherr GN, Yudin AI, Li MW, Vines CA, Overstreet W. Hyaluronic acid and the cumulus extracellular matrix induce increases in intracellular calcium in macaque sperm via the plasma membrane protein PH-20. *Zygote* 1999; 7: 211-22.
9. Bar-Ami S, Gitay-Goren H, Brandes JM. Different morphological and steroidogenic patterns in oocyte/cumulus-corona cell complexes aspirated at *in vitro* fertilization. *Biol Reprod* 1989; 41: 761-70.
10. Goldman S, Dirnfeld M, Gonen Y, Koifman M, Lissak A, Abramovici H. Different morphology and proliferative ability of cumulus and granulosa cells originating from cystic follicles aspirated from stimulated *in vitro* fertilization patients. *Fertil Steril* 1993; 59: 601-5.
11. Gregory L, Booth AD, Wells C, Walker SM. A study of the cumulus-corona cell complex in *in-vitro* fertilization and embryo transfer; a prognostic indicator of the failure of implantation. *Hum Reprod* 1994; 9: 1308-17.
12. Gersak K, Tomazevic T. Subpopulations of human granulosa-luteal cells in natural and stimulated *in vitro* fertilization-embryo transfer cycles. *Fertil Steril* 1996; 65: 608-13.
13. Gregory L, Walker SM. Observations on the cells of the corona radiata in IVF culture related to outcome. In: Abstract book (Part II). Proc. 26th British Congr. Obstet. and Gynaecol., Manchester. Cambridge: Blackwell Scientific Press, 1992: 351-1.
14. Giorgetti C, Terriou P, Auquier Pascal et al. Embryo score to predict implantation after *in-vitro* fertilization: based on 957 single embryo transfers. *Hum Reprod* 1995; 10: 2427-31.
15. Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D et al. Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer. *Hum Reprod* 1999; 14: 2345-9.
16. Minaretzis D, Harris D, Alper MM, Mortola JF, Berger MJ, Power D. Multivariate analysis of factors predictive of successful live births in *in vitro* fertilization (IVF) suggests strategies to improve IVF outcome. *J Assist Reprod Genet* 1998; 15: 365-71.
17. Čížek-Sajko M, Vlaisavljević V, Kovačić B, Reljić M, Gavrić-Lovrec V. Prediction of implantation in unstimulated IVF cycles by determining the embryo score. Abstracts of the 16th Annual Meeting of the ESHRE, Bologna, Italy, June 25-28, 2000. *Hum Reprod* 2000; 15: 161-1.
18. Ohta N, Saito H, Kuzumaki T et al. Expression of CD44 in human cumulus and mural granulosa cells of individual patients in *in-vitro* fertilization programmes. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 22-8.