

Strokovni prispevek/Professional article

VPLIV MORFOLOGIJE PRONUKLEUSOV V ZIGOTI NA RAZVOJ ČLOVEŠKEGA ZARODKA V POGOJIH *IN VITRO*

THE INFLUENCE OF ZYGOTE PRONUCLEAR MORPHOLOGY ON *IN VITRO* HUMAN EMBRYO DEVELOPMENT

Lidija Križančič-Bombek¹, Veljko Vlajsavljević²

¹ Inštitut za fiziologijo, Medicinska fakulteta Maribor, Slomškov trg 15, 2000 Maribor

² Oddelek za reproduktivno medicino in ginekološko endokrinologijo, Univerzitetni klinični center Maribor, Ljubljanska ul. 5, 2000 Maribor

Izvleček

- Izhodišča** *Pomemben del postopka zunajtelesne oploditve je izbira najbolj kakovostnih zarodkov za prenos v maternico. V zadnjih letih se kot selekcijsko merilo poleg morfologije zarodkov in blastocist navaja ocenjevanje lege in orientacije pronukleusov (PN) glede na lego polarnih teles ter velikost, število in razporeditev nukleolarnih prekursorjskih teles (NPT). V študiji smo proučevali vpliv izgleda in lege pronukleusov ter razporeditve NPT na razvoj manjceličnih zarodkov in blastocist.*
- Metode** *Pri 113 bolnicah, mlajših od 40 let, zdravljenih s postopki oploditve z biomedicinsko pomočjo (z dodajanjem semenčic k jajčni celici – IVF [angl. in vitro fertilization] ali z neposrednim vnosom semenčice v jajčno celico [angl. intracytoplasmic sperm injection] – ICSI), smo 18–20 ur po inseminaciji ocenili 653 zigot. Optimalne zigote Z1 so imele centralno ležeče, dotikajoče PN in enakoštevilna, poravnana NPT. Ostali tipi so od Z1 odstopali po naslednjih značilnostih: Z2 – neporavnana NPT v obeh PN; Z3 – neporavnana NPT v enem PN; Z4 – nedotikajoča se PN. Za vsak tip zigote smo določili delež morfološko normalnih manjceličnih zarodkov in optimalnih blastocist, ki so se razvile iz njih.*
- Rezultati** *Med zigotami je bilo 21,8 % Z1, 29,1 % Z2, 34,6 % Z3 in 14,5 % Z4 zigot. Delež morfološko normalnih manjceličnih zarodkov je upadal od tipa Z1 proti Z4 (70,4 % oz. 55,3 % oz. 59,7 % oz. 45,3 %; $p < 0,05$), prav tako tudi delež razvitih blastocist (63,4 % oz. 55,3 % oz. 58,8 % oz. 43,2 %). Deleži optimalnih blastocist pa se med skupinami statistično niso razlikovali (11,3 % oz. 11,1 % oz. 8,4 % oz. 6,3 %).*
- Zaključki** *Boljši razvoj manjceličnih zarodkov in blastocist iz zigot z dobro morfološko oceno PN kaže na to, da je morfologija pronukleusov pomemben napovedni dejavnik za nadaljnji razvoj zigote in skupaj z morfologijo zarodkov in blastocist omogoča izbor najprimernejših zarodkov za prenos v maternico.*
- Ključne besede** *oploditev z biomedicinsko pomočjo; morfologija pronukleusov; nukleolarna prekursorjska telesa; morfologija zarodka; morfologija blastociste*

Avtor za dopisovanje / Corresponding author:

Lidija Križančič-Bombek, Inštitut za fiziologijo, Medicinska fakulteta Maribor, Slomškov trg 15, 2000 Maribor

Raziskava je bila izvedena na Oddelku za reproduktivno medicino in ginekološko endokrinologijo, Univerzitetni klinični center Maribor, Ljubljanska ul. 5, 2000 Maribor

Abstract

- Background** *The selection of embryos with largest implantation potential is an important part in assisted reproduction. Besides the embryo or blastocyst morphology, selection criteria such as position and orientation of pronuclei (PN) in relation to polar body positioning and the number, size and distribution of nucleolar precursor bodies (NPB) have been proposed. In our study, a correlation between PN and NPB morphology with the development of early embryos (day 2 of cultivation) and blastocysts (day 5) was investigated.*
- Methods** *653 zygotes from 113 IVF (in vitro fertilization) and ICSI (intracytoplasmic sperm injection) patients, younger than 40 years, were assessed 18–20 hours post-insemination. Optimal zygotes (Z1) had touching centrally located PN with equal numbers of alligned NPB. Other zygote types differed from Z1 in having scattered NPB in both PN (Z2) or alligned NPB in one PN (Z3) or in PN being distant from one another (Z4). For each zygote type a percentage of normal early embryos and blastocysts was calculated.*
- Results** *Among 653 assessed zygotes 21.8 % were Z1; 29.1 % Z2, 34.6 % Z3 and 14.5 % Z4. The percentage of normal early embryos decreased from Z1 to Z4 zygote type (70.4 % vs. 55.3 % vs. 59.7 % vs. 45.3 %; $p < 0.05$) as well as the percentage of developed blastocysts (63.4 % vs. 55.3 % vs. 58.8 % vs. 43.2 %). However, the percentages of optimal blastocysts in the four groups did not differ (11.3 % vs. 11.1 % vs. 8.4 % vs. 6.3 %).*
- Conclusions** *Best grade zygotes result in better early embryo and blastocyst development suggesting that zygote morphology can be used in combination with embryo and/or blastocyst evaluation as a method for embryo selection prior to embryo transfer.*
- Key words** *assisted reproduction; pronuclear morphology; nucleolar precursor bodies; embryo morphology; blastocyst morphology*

Uvod

V zadnjih 20 letih je zdravljenje neplodnosti doživelo velik napredek. Uspeh pri zdravljenju različnih vzrokov neplodnosti se zrcali predvsem v večjem številu in boljši kakovosti zarodkov, vzgojenih v pogojih *in vitro*, ter njihovi boljši vgnezditevni sposobnosti. Posledica je povečan delež večplodnih nosečnosti, ki pa z vidika medicinskih zapletov v nosečnosti in po njej niso zaželene. Prevladujoča težnja na področju oploditve z biomedicinsko pomočjo je doseči čim več zanositev s čim manjšim deležem večplodnih nosečnosti. Da bi omejili pogostost večplodnih nosečnosti, je potrebno omejiti število zarodkov, ki jih v postopku zunajtelesne oploditve prenesemo v maternico bolnice.

V večini primerov temelji izbor najprimernejših zarodkov za prenos v maternico na morfološki oceni zarodkov na dan 2 ali 3, pri čemer se upoštevajo število in velikost blastomer ter količina brezjedrnih citoplazemskih fragmentov.^{1,2} Primerne zarodke je mogoče izbrati tudi na podlagi ocene blastociste ali morule 5. oziroma 6. dan gojenja, ko imajo pomembno vlogo: delež zarodka, ki se je razvil v blastocisto (brezjedrni fragmenti običajno ostanejo pod zono pelucido), razvitost oziroma ekspanziranost blastociste, oblika in velikost znotrajcelične mase, izgled in integriteta trofektoderma in prisotnost fragmentov in/ali nekrotičnih celic v blastocisti.³

Pomemben dejavnik pri razvoju zarodka je tudi zgodnja delitev, ki jo običajno ocenjujemo 24–27 ur po

inseminaciji.^{4–6} Nekatere raziskave so pokazale,^{5,6} da so deleži kakovostnih zarodkov, zanositev in vgnezditev večji pri tistih zigotah, ki so se začele deliti bolj zgodaj (22 % vseh zigot), v primerjavi s tistimi, ki se po 26 urah še niso prvič razdelile. Lundqvist in sod.⁶ poročajo tudi, da je v skupini bolnic, zdravljenih z metodo neposrednega vnosa semenčice v citoplazmo jajčne celice (ICSI; angl. intracytoplasmic sperm injection), za 14 % več zigot, ki se začno deliti zgodaj, kot v skupini bolnic, zdravljenih s klasičnim IVF (angl. *in vitro* fertilization) postopkom, pri katerem k jajčni celici dodamo ustrezno koncentracijo gibljivih semenčic. Teh rezultatov Wharf in sod.⁵ niso potrdili, saj so ugotovili, da med IVF in ICSI postopki ni statistično značilnih razlik.

Razvoj zarodka je mogoče predvideti že na razvojni stopnji zigote, 14–20 ur po osemenitvi jajčne celice. V tem stadiju sta v središču jajčne celice vidna moški in ženski pronukleus (PN), ki vsebujeta genetski material jajčne celice in semenčice. V obeh PN se nahajajo zgostitve kromatina, imenovane nukleolarna prekursorzorska telesa (NPT; angl. nucleolar precursor bodies), ki kasneje v razvoju sodelujejo pri tvorbi jedra. V perivitelinskem prostoru pod zono pelucido sta opazni prvo (PT1) in drugo polarno telo (PT2). Če jajčno celico pod mikroskopom obrnemo tako, da sta PN v isti ravnini, lahko določimo lego obeh PT glede na ravnino PN. Oba PN kot tudi obe PT se običajno stikata, lahko pa sta oddaljena drug od drugega. Od lege PN glede na lego PT naj ne bi bil odvisen le razvoj zarodka, temveč tudi vgnezditev in zanositi-

tev.⁷⁻⁹ Gianaroli in sod.^{8,9} so pokazali, da se iz zigot s PT1 in PT2 ležečima v isti ravnini kot oba PN ali pravokotno na njo (39 % in 41 % vseh zigot) razvije statistično večji delež zarodkov (86 % in 83 %) kot iz zigot z nedotikajočima se PN (57 % zigot). Prav tako poročajo o statistično večjem deležu kromosomsko normalnih zarodkov v prvih dveh skupinah (40 % in 32 % evploidnih zarodkov) v primerjavi s tretjo (7 %).

Pomemben vpliv na razvoj zarodka imajo tudi medsebojna lega PN ter velikost, število in razporeditev NPT.^{4,10-14} Scott¹⁰ ter Scott in sod.¹⁴ poročajo o razvoju manjšega deleža optimalnih zarodkov (okrog 50 %) iz zigot, pri katerih se PN ne stikata ali sta različno velika v primerjavi z zigotami, pri katerih sta PN enake velikosti in stikajoča se (okrog 75 %). Tudi druge raziskave kažejo, da se iz zigot z optimalno morfologijo PN (centralno ležeči, dotikajoči, enako veliki) in NPT (enako številčni in veliki ter poravnani v obeh PN) razvije večji delež morfološko pravih zarodkov, manj zarodkov pa se v zgodnjem razvoju zaustavi. Tudi vgnezditev in zanositev je statistično več kot pri zigotah s slabo morfologijo.^{4,6,11,12}

V študiji smo analizirali razvoj zarodkov iz zigot, ki smo jih razvrstili v štiri kategorije glede na lego in velikost PN ter število in razporejenost NPT. Primerjali smo tudi deleže vseh blastocist in optimalnih blastocist, ki so se razvile iz posameznih vrst zigot.

Metode

Bolnice, hormonsko spodbujanje jajčnikov in postopki OBMP

V prospektivno študijo smo vključili 113 bolnic, starih od 22–39 let, s povprečno starostjo $32,7 \pm 4,0$ leta, zdravljenih zaradi neplodnosti s postopki oploditve z biomedicinsko pomočjo (OBMP) IVF ($n = 22$) ali ICSI ($n = 91$) med januarjem in majem 2004. Najpogostejši vzrok ženske neplodnosti je bil tubarni (40/113), manj pogosti pa so bili ovarialni (14/113) in uterini (11/113) vzrok, endometrioza (12/113) in idiopatska neplodnost (5/113). Izmed moških vzrokov neplodnosti je bila najpogostejša težka oligozoospermija z manj kot 5×10^6 semenčic na mililiter semenskega izliva (30/113), sledile pa so ji lažja oligozoospermija z astenozoospermijo (14/113), lažja oligozoospermija z manj kot 20×10^6 semenčic na mililiter (11/113) in normoastenozoospermija (11/113). Vse oblike slabe kakovosti semenskega izliva so bile pogosto povezane s teratozoospermijo (nepravilno morfologijo semenčic). Pojavili so se tudi posamezni primeri kriptozoospermije (5/113), azoospermije (2/113) in imunološkega vzroka neplodnosti (2/113).

Pri bolnicah smo sinhronizirali menstrualne cikle z oralnimi kontraceptivi, ki so jih jemale od drugega dne menstrualnega ciklusa do določenega datuma. Sedem dni pred zadnjo tableto kontraceptiva so pričele s podkožno aplikacijo antagonist gonadotropin sproščujočega hormona (GnRHa) (Diphereline; Ipsen Pharma Biotech, Signes, Francija). Rast jajčnih mešičkov (foliklov) smo začeli spodbujati z gonadotropini sedem dni po zadnji tableti kontraceptivov z vi-

soko prečiščenim rekombinantnim folitropinom alfa (r-FSH) (Gonal-F; Serono, Aubonne, Švica) in smo jo redno preverjali z ultrazvokom. Pri velikosti vodilnega jajčnega mešička 18 mm smo določili dan aplikacije humanega horionskega gonadotropina (hCG) (Ovitrelle; Serono, Aubonne, Švica).

Jajčne celice smo pridobili z ultrazvočno vodeno punkcijo jajčnika skozi nožnico 34–36 ur po aplikaciji hCG. Nato smo v folikularni tekočini, posrkani iz jajčnih mešičkov, mikroskopsko poiskali jajčne celice, obdane s celicami kumulusa (cumulus oophorus), in jih do osemenitve shranili v petrijevki z gojiščem (Flushing medium, MediCult, Danska).

Iz semenskega izliva partnerja smo izločili gibljive semenčice s postopkom »swim up«, pri čemer smo semenski izliv najprej pomešali z gojiščem (Sperm preparation medium, MediCult, Danska) in ga centrifugirali. Usedlino smo prelili s svežim gojiščem in vzorec pustili v inkubatorju, da so vitalne, dobro gibljive semenčice splavale iz usedline.

Pri klasičnim postopku IVF smo kumuluse z jajčnimi celicami prenesli posamično v 4-prekatne petrijevke (Nunc, Danska) v sveže gojišče (Blast Assist System M1, MediCult, Danska) in dodali pripravljene semenčice do končne koncentracije $3-5 \times 10^5$ /ml. Postopek ICSI smo izvedli na način, kot smo ga že opisali.¹⁵

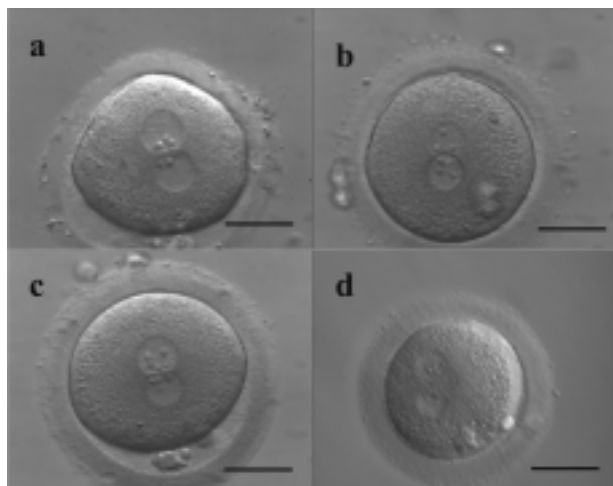
Po 18–20 urah smo jajčnim celicam iz postopkov IVF s pipetiranjem skozi tanko stekleno kapilaro odstranili celice kumulusa in jih prenesli v sveže gojišče (Blast Assist System M1, MediCult, Danska). Prav tako smo v sveže gojišče prenesli celice iz postopkov ICSI. Pri vseh jajčnih celicah smo 18–20 ur po osemenitvi ocenili prisotnost in morfologijo PN, po 48 urah pa smo ocenili morfologijo nastalih zarodkov. Tretji in četrti dan smo zarodke prenesli v gojišče za gojenje do blastocist (Blast Assist System M2, MediCult, Danska) in peti dan ponovno ocenili morfologijo. Eno ali dve primerni blastocisti smo s katetrom (Labotect, Goettingen, Nemčija) prenesli v maternico bolnice, morebitne preostale kakovostne blastociste in/ali morule pa zamrznili.

Ocenjevalni parametri

Ocena pronukleusov

Oplojenost jajčnih celic smo ocenili 18–20 ur po osemenitvi. V pravilno oplojenih jajčnih celicah sta bila jasno vidna moški in ženski PN. Celice, z manj ali več kot dvema PN, smo smatrali za nepravilno oplojene in jih nismo vključili v študijo. Glede na izgled in lego PN in NPT smo oplojene jajčne celice razdelili v 4 skupine. V skupini Z1 so bile zigote z enako velikima, centralno ležečima in dotikajočima se PN, s 3–7 NPT v vsakem od njiju, pri čemer se število NPT ni razlikovalo za več kot 1. V vsakem PN so bila NPT poravnana v ravnini stikanja PN ali so se začenjale poravnnavati (Sl. 1a). V skupino Z2 smo uvrstili zigote z enakima, centralno ležečima, dotikajočima se PN, v katerih je bilo enako število (3–7) in velikost enakomerno razpršenih NPT ali se je to število razlikovalo za največ 1 (Sl. 1b). Skupino Z3 so sestavljale zigote z enakima, centralno ležečima, dotikajočima se PN. Število in/ali velikost NPT sta se razlikovala ali pa sta

bila število in velikost NPT enaka, vendar so bili NPT v enem PN razpršeni, v drugem pa poravnani (Sl. 1c). V skupini Z4 so bile zigote z različno velikimi PN in/ali ležečimi na periferiji jajčne celice in/ali nedotikajočimi PN (Sl. 1d).

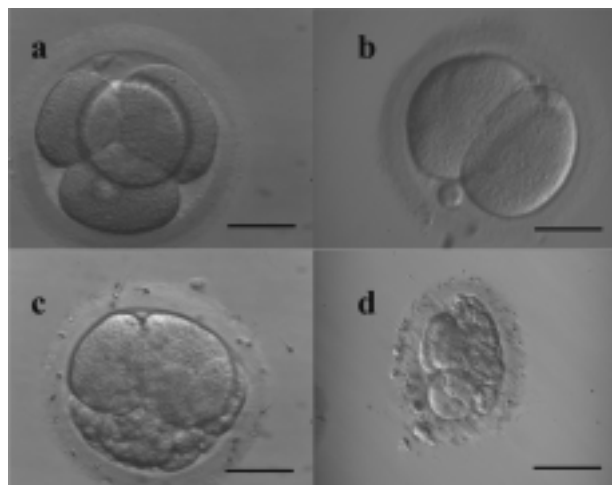


Sl. 1. Morfologija pronukleusov v zigoti. a) Zigota najvišje kakovosti (Z1) z dotikajočima se, centralnima PN in poravnanimi, enako številnimi nukleolarnimi prekursorjskimi telesci (NPT); b) Zigota druge kakovosti (Z2) z dotikajočima se, centralnima PN in razpršenimi, enako številnimi NPT; c) Zigota tretje kakovosti (Z3) z dotikajočima se, centralnima PN in NPT poravnanimi v enem PN; d) Zigota slabe kakovosti (Z4) z nedotikajočima se perifernima PN. Merilo: 50 μ m.

Figure 1. Zygote pronuclear morphology. a) Best grade zygote (Z1) with touching centrally positionned PN with equal number of alligned nucleolar precursor bodies (NPB) in both PN; b) Second grade zygote (Z2) with touching centrally positionned PN with equal number of scattered NPB; c) Third grade zygote (Z3) with touching centrally positionned PN with scattered NPB in one PN; d) Lowest grade zygote (Z4) with distant PN located at the periphery of the oocyte. Bar: 50 μ m.

Ocena zarodkov

Razvoj zarodkov smo spremljali dnevno. Na dan 2 smo zarodke razdelili v štiri kakovostne skupine od 1-4 glede na njihov morfološki izgled: E1 - zarodke dobre kakovosti, ki so se razvijali hitro in so bili vsaj 3-celični z nič ali manj kot 20 % fragmentov (Sl. 2a); E2 - zarodke dobre kakovosti, ki so se razvijali počasi in so bili 2-celični z nič ali manj kot 20 % fragmentov (Sl. 2b); E3 - zarodke slabe kakovosti, ki so se razvijali hitro in so bili vsaj 3-celični z več kot 20 % fragmentov (Sl. 2c); ter E4 - zarodke slabe kakovosti, ki so se razvijali počasi in so bili 2-celični z več kot 20 % fragmentov (Sl. 2d). Na dan 3 in 4 smo ocenili število celic in fragmentiranost zarodkov. Pri statistični analizi vpliva morfologije PN na kakovost zarodkov smo združili dobre počasne zarodke in slabe zarodke v eno skupino (E2 - 4), drugo skupino pa so predstavljali optimalni zarodki (E1).

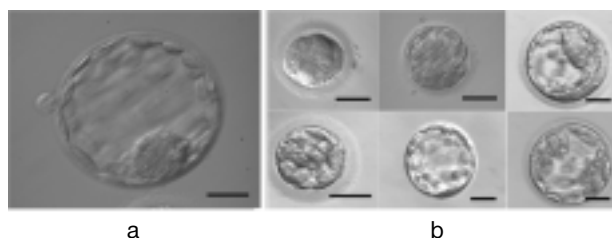


Sl. 2. Morfologija 2 dni starih zarodkov. a) Optimalni zarodek (E1) z več kot 2 celicama in manj kot 20 % fragmentov; b) Zarodek druge kakovosti (E2) z 2 celicama in manj kot 20 % fragmentov; c) Zarodek tretje kakovosti (E3) z več kot 2 celicama in več kot 20 % fragmentov; d) Zarodek najslabše kakovosti (E4) z 2 celicama in več kot 20 % fragmentov. Merilo: 50 μ m.

Figure 2. Day 2 embryo morphology. a) Optimal embryo (E1) with more than 2 cells and less than 20 % fragmentation; b) Grade 2 embryo (E2) with 2 cells and less than 20 % fragmentation; c) Grade 3 embryo (E3) with more than 2 cells and more than 20 % fragmentation; d) Grade 4 embryo (E4) with 2 cells and more than 20 % fragmentation. Bar: 50 μ m.

Ocena blastocist

Na dan 5 smo ocenili kakovost blastocist oziroma morul, kot je opisano.³ Zaradi preglednosti smo blastociste razdelili na optimalne in neoptimalne. Optimalne blastociste so imele razširjen blastocel, stanjšano zono pellucido, okroglo ali ovalno znotrajcelično maso, mnogocelični trofektoderm in niso bile nekrotične. Vse ostale blastociste in morule smo združili v skupino neoptimalnih blastocist (Sl. 3).



Sl. 3. Morfologija 5 dni starih blastocist. a) Optimalna blastocista: v levitvi v razširjenim blastocelom in okroglo znotrajcelično maso, nenekrotična; b) Blastociste slabše kakovosti. Merilo: 100 μ m.

Figure 3. Day 5 blastocyst morphology. a) Optimal blastocyst: hatching, with expanded blastocoele, round inner cell mass (ICM) non-necrotic; b) Suboptimal blastocysts. Baro: 100 μ m.

Statistična analiza

Podatke smo obdelali s statističnim programom Statistica Ver. 5 (Stat Soft, ZDA). S testom hi-kvadrat smo primerjali razvoj optimalnih zarodkov, blastocist in optimalnih blastocist med skupinami Z1, Z2, Z3 in Z4.

Rezultati

Od 113 bolnic s povprečno starostjo $32,5 \pm 4,0$ leta smo s punkcijo jajčnih mešičkov pridobili 1107 jajčnih celic (povprečno $9,8 \pm 4,7$ jajčne celice na bolnico). Iz njih se je razvilo 693 zarodkov (povprečno $6,1 \pm 2,8$ zarodkov na bolnico) in 366 blastocist (povprečno $3,4 \pm 2,3$ blastociste na bolnico). Na dan 2 (48 ur po punkciji) smo ocenili morfološki izgled vseh zarodkov, vendar jih 40 nismo vključili v študijo zaradi manjkajočega podatka o morfologiji PN v zigoti, ki v času 18–20 ur po punkciji več niso bili jasno vidni.

V analizo vpliva morfolologije PN na kakovost zarodkov in blastocist smo tako vključili 653 zarodkov (150 nastalih po IVF in 503 nastale po ICSI metodi). Iz zigot z najboljšo morfolologijo (Z1), ki so predstavljale 21,8 % vseh zigot, se je razvilo 70,4 % zarodkov optimalne kakovosti. 63,4 % zigot iz skupine Z1 je doseglo razvojno stopnjo blastociste, delež blastocist optimalne kakovosti pa je bil 11,3 %. Preostalih 36,6 % zarodkov se ni razvilo do blastocist. V skupini Z2 (29,1 % zigot) se je v optimalne zarodke kot tudi blastociste razvilo 55,3 % zigot. Delež optimalnih blastocist v tej skupini je bil 11,1 %. Izmed zigot z morfološko oceno Z3 (34,6 % vseh zigot) se jih je 59,7 % razvilo v optimalne zarodke, 58,8 % v blastociste in 8,4 % v optimalne blastociste. Zigot z najslabšo morfološko oceno Z4 je bilo med vsemi ocenjenimi zigotami 14,5 %. V optimalne zarodke se jih je razvilo 45,3 %, v blastociste 43,2 %, v optimalne blastociste pa le 6,3 % (Razpr. 1).

Delež optimalnih zarodkov, ki so se razvili iz zigot Z2, Z3 in Z4, je bil statistično manjši kot delež optimalnih zarodkov, razvitih iz zigot Z1 ($p < 0,05$), medtem ko se deleži optimalnih zarodkov med skupinami Z2, Z3 in Z4 statistično niso razlikovali.

Primerjava razvoja blastocist na dan 5 je pokazala upadanje deleža blastocist s slabšanjem morfološke ocene zigote (od 63,4 % v skupini Z1 do 43,2 % v skupini Z4). Razlika je bila statistično značilna med skupinami Z1 in Z4 ($p < 0,01$) ter Z3 in Z4 ($p < 0,01$), primerjava Z2 in Z4 pa statistično ni bila značilna ($p = 0,0539$). Med skupinami Z1, Z2 in Z3 statistične razlike ni bilo.

Razpravljanje

Mnogo avtorjev poroča o pomenu medsebojne lege PN ter velikosti, števila in razporeditve NPT na razvoj zarodka.^{4, 10–14} Pokazali so, da se iz zigot s centralno ležečima dotikajočima se PN ter poravnanimi in enako številnimi NPT razvije večji delež optimalnih zarodkov, ki so 48 ur po inseminaciji vsaj 3-celični z nič ali manj kot 20 % fragmentov, kakor iz zigot, kjer sta PN pomaknjena iz centra zigote ali se ne dotikata ali pa so NPT razpršena oz. poravnana le v enem od obeh PN.^{1, 4, 6, 16}

Razpr. 1. *Deleži zarodkov različnih kakovosti in blastocist glede na morfološko oceno pronukleusov v zigoti.*

Table 1. *The percentage of different grade embryos and blastocysts in relation to zygote pronuclear morphology.*

		Morfologija pronukleusov v zigoti Zygote pronuclear morphology			
		Z1	Z2	Z3	Z4
Zigote					
Zygots (%)		142 / 653 21,8	190 / 653 29,1	226 / 653 34,6	95 / 653 14,5
Kakovost zarodkov	1 (%)	100 / 142 ^{abc} 70,4	105 / 190 ^a 55,3	135 / 226 ^{bd} 59,7	43 / 95 ^{cd} 45,3
Embryo grade	2 (%)	21 / 142 ^{ef} 14,8	51 / 190 ^e 26,8	47 / 226 20,8	24 / 95 ^f 25,3
	3 (%)	10 / 142 ^g 7,0	18 / 190 9,5	27 / 226 11,9	15 / 95 ^g 15,8
	4 (%)	11 / 142 7,7	16 / 190 8,4	17 / 226 7,5	13 / 95 13,7
Blastociste					
Blastocysts		90 / 142 ^h 63,4	105 / 190 ⁱ 55,3	133 / 226 ⁱ 58,8	41 / 95 ^{hi} 43,2
Optimalne blastociste					
Optimal blastocysts		16 / 142 11,3	21 / 190 11,1	19 / 226 8,4	6 / 95 6,3

^{a-i} Vrednosti z isto označbo se statistično razlikujeta (hi-kvadrat test; $p < 0,05$).

Values with the same superscript differ significantly (chi-square test; $p < 0,05$).

^j Vrednosti se statistično ne razlikujeta (hi-kvadrat test; $p = 0,0539$).

Values are not statistically different (chi-square test; $p = 0,0539$).

Tesarik in Kopecny¹⁷ sta že leta 1989 proučevala nastajanje PN in njihovo ultrastrukturo v jajčnih celicah oplojenih *in vitro*. Ugotovila sta, da je nastanek PN, kakršne danes opazujemo pri ocenjevanju zigot, postopen proces, ki vključuje strukturne spremembe kromatina in jedrne ovojnice. S postopnim koncentriranjem kromatina okrog gostih znotrajjedrnih teles nastanejo najprej majhni skupki kromatina, ki nato z združevanjem tvorijo NPT. Zsolt in sod.¹³ menijo, da je razporejanje NPT, ki vsebujejo velike količine alfa-satelitne DNK, značilne za centromerne regije kromosomov, posledica delovanja mikrotubulov, odgovornih tudi za premikanje kromosomov.

Na hitrost razvoja PN in poravnavanje NPT vplivajo kromosomske nepravilnosti, ki so neposredno povezane s pravilnim podvajanjem genskega materiala in celično delitvijo (pripenjanje kromatid na mikrotubule delitvenega vretena, razdvajanje sestrskih kromatid). Tesarik in sod.¹¹ ter Tesarik in Greco¹² so pokazali, da je pri zigotah s centralno ležečima dotikajočima PN ter enako številnimi poravnanimi NPT (Z1) bistveno manj kromosomskih nepravilnosti kot pri zigotah z drugačno morfolologijo.

Ker se morfološki izgled PN s časom spreminja, se v rezultatih različnih študij deleži zigot tipa Z1 razlikujejo, saj so odvisni od časa, v katerem so bile zigote v posamezni študiji ocenjene (12–22 ur po inseminaciji). Ne glede na te razlike se večina avtorjev strinja, da se iz zigot Z1 razvije več optimalnih zarodkov, ki imajo tudi večji vgnezditen potencial od zarodkov iz zigot s slabšo morfološko oceno.^{4, 5, 8} Kljub temu morfološki izgled PN sam ne zadostuje za kakovostno iz-

biro optimalnih zarodkov. Nagy in sod.¹³ so pokazali, da se stopnji zanositve po prenosu zarodkov, izbranih samo na podlagi morfološke ocene PN ali samo na podlagi morfološke ocene zarodkov na dan 3, statistično ne razlikujeta, pri kombinaciji obeh ocen pa je stopnja zanositve statistično večja.

Tudi v naši študiji smo ugotovili, da se je iz zigot Z1 razvil podobno visok delež optimalnih zarodkov (70,4 %) kakor v študijah drugih avtorjev,^{1, 4, 6, 17} in da je bil ta delež statistično večji kot v skupinah zigot s slabšo morfologijo (Z2, Z3 in Z4).

Izgled PN v zigoti ni povezan samo z razvojem zarodkov, ampak tudi z nastankom blastocist.^{4, 9, 14, 18} Primerjava razvoja blastocist med skupinami Z1, Z2, Z3 in Z4 v naši študiji je pokazala trend k zmanjševanju deleža nastalih blastocist s slabšanjem morfološke ocene zigote (od 63,4 % v Z1 do 43,2 % v Z4 skupini). Pri analizi je izstopala le skupina Z4, kjer je bil delež nastalih blastocist statistično manjši kot v preostalih treh skupinah. Podoben trend upadanja deleža blastocist s slabšanjem morfologije zigot (od 45 % do 15 %) je ugotovila tudi Scott,¹⁰ vendar so v študiji prikazane le blastociste in morule, ki so bile primerne za prenos v maternico ali zamrzovanje. V naši študiji so v rezultate vključene vse blastociste in morule, razvite na dan 5.

Podobno kot delež vseh blastocist se je s slabšanjem morfologije zigot zmanjševal tudi delež optimalnih blastocist, vendar razlike niso bile statistično značilne. Pri tem je potrebno upoštevati dejstvo, da se vse zigote ne razvijajo enako hitro. Kot so ugotovili Zsolt in sod.,¹⁵ se zigote pri postopkih ICSI oblikujejo približno 4 ure prej kot pri klasičnem postopku IVF, zaradi česar lahko pride do sprememb v morfologiji tudi po tem, ko je bila zigota že ocenjena. Na ta način se lahko iz zigote s slabo morfološko oceno razvije tudi optimalna blastocista, ki se uspešno implantira.

Zaključki

Razvoj blastocist je neposredno povezan z razvojem zarodkov in je rezultat kakovosti in kromosomskega stanja jajčne celice in semenčice, postopka gojenja *in vitro*, pravilne časovne usklajenosti nastanka PN in drugih še neznanih dejavnikov. Boljši razvoj zarodkov in blastocist v skupini Z1 in manjšanje deleža dobrih zarodkov in blastocist v skupinah Z2–Z4 kaže na to, da je morfologija PN napovedni dejavnik za nadaljnji razvoj zigote. Zaradi dejstva, da se morfologija zigot s časom spreminja in da se zigote s slabo morfološko oceno tudi lahko razvijejo v optimalne zarodke in blastociste, menimo, da ni smiselno izbirati zarodkov za prenos v maternico zgolj na podlagi morfološke ocene zigot. Pri izboru zarodkov za prenos v maternico je koristno upoštevati morfološko oceno zi-

gote v kombinaciji z morfološko oceno zarodka¹⁵ ali blastociste.¹⁶

Literatura

1. Scott L. The biological basis of non-invasive strategies for selection of human oocytes and embryos. *Hum Reprod Update* 2003; 9: 237–49.
2. Vlaisavljević V, Kovačič B, Gavrić-Lovrec V, Reljić M, Petrović V, Čížek-Sajko M, Kovač V. Vpliv izbire zarodkov, spočetih z vnosom semenčice v citoplazmo jajčne celice, na vgnezditev zarodkov po prenosu v maternico. *Zdrav Vestn* 2002; 71 Suppl. 1: 7–11.
3. Kovacic B, Vlaisavljevic V, Reljic M, Cizek-Sajko M. Developmental capacity of different morphological types of day 5 human morulae and blastocysts. *RBM Online* 2004; 8: 687–94.
4. Balaban B, Urman B, Isiklar A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R, et al. The effect of pronuclear morphology on embryo quality parameters and blastocyst transfer outcome. *Hum Reprod* 2001; 16: 2357–61.
5. Wharf E, Dimitrakopoulos A, Khalaf Y, Pickering S. Early embryo development is an indicator of implantation potential. *RBM Online* 2004; 8: 212–8.
6. Lundqvist M, Johansson U, Lundkvist Ö, Milton K, Westin C, Simberg N. Does pronuclear morphology and/or early cleavage rate predict embryo implantation potential? *RBM Online* 2001; 2: 12–6.
7. Kattera S, Chen C. Developmental potential of human pronuclear zygotes in relation to their pronuclear orientation. *Hum Reprod* 2004; 19: 294–9.
8. Ginaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Fortini D, Grieco N. Pronuclear morphology and chromosomal abnormalities as scoring criteria for embryo selection. *Fertil Steril* 2003; 80: 341–9.
9. Ginaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Lapi M, Borghi E, Ermini B. Oocyte euploidy, pronuclear zygote morphology and embryo chromosomal complement. *Hum Reprod* 2007; 22: 241–9.
10. Scott, L. Pronuclear scoring as a predictor of embryo development. *RBM Online* 2003; 6: 201–14.
11. Tesarik J, Junca AM, Hazout A, Aubriot FX, Nathan C, Cohen-Bacrie P, Dumont-Hassan M. Embryos with high implantation potential after intracytoplasmic sperm injection can be recognized by a simple, non-invasive examination of pronuclear morphology. *Hum Reprod* 2000; 15: 1396–9.
12. Tesarik J, Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod* 1999; 14: 1318–23.
13. Nagy ZP, Dozortsev D, Diamond M, Rienzi L, Ubaldi F, Abdelmassih R, Greco E. Pronuclear morphology evaluation with subsequent evaluation of morphology significantly increases implantation rates. *Fertil Steril* 2003; 80: 67–74.
14. Scott L, Alvero R, Leondires M, Miller B. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod* 2000; 15: 2394–403.
15. Vlaisavljević V, Kovačič B. Naše prve izkušnje s tehniko direktnega vnosa semenčice v citoplazmo jajčne celice pri zdravljenju moške neplodnosti. *Zdrav Vestn* 1995; 64: 677–9.
16. Balaban B, Yakin K, Urman B, Isiklar A, Tesarik J. Pronuclear morphology predicts embryo development and chromosome constitution. *RBM Online* 2004; 8: 695–700.
17. Tesarik J, Kopečný V. Development of human male pronucleus: ultrastructure and timing. *Gamete Research* 1989; 24: 135–49.
18. Sjöblom P, Menezes J, Cummins L, Mathiyalagan B, Costello MF. Prediction of embryo developmental potential and pregnancy based on early stage morphological characteristics. *Fertil Steril* 2006; 86: 848–61.