

Strokovni prispevek/Professional article

KAKOVOST BLASTOCIST IN VITRO IN VEČPLODNA NOSEČNOST

QUALITY OF BLASTOCYST IN VITRO AND MULTIPLE PREGNANCIES

Borut Kovačič, Mojca Čížek-Sajko, Veljko Vlasisavljević

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

Prispelo 2003-05-14, sprejeto 2003-06-19; ZDRAV VESTN 2003; 72: Supl. II: 89-92

Ključne besede: morfologija blastocist; oploditev in vitro; implantacija; večplodna nosečnost

Izvleček – Izhodišča. Blastociste, ki jih dobimo v postopku oploditve z biomedicinsko pomočjo (OBMP), imajo različne morfološke značilnosti. Namen raziskave je ugotoviti, kako morfologija blastocist, prenesenih v maternico, vpliva na zanositev in večplodno zanositev.

Metode. Kakovost blastocist smo ocenjevali s štirimi parametri: deležem zarodka, preoblikovanega v blastocisto, razširjenostjo blastocela, obliko notranje skupine celic in z razrastjo celic trofektoderma. V prvo skupino smo uvrstili blastociste, ki so imele optimalne vse parametre, v drugo skupino blastociste z enim neoptimalnim parametrom in v tretjo skupino blastociste z več neoptimalnimi parametri. Retrospektivno smo analizirali rezultate 175 prenosov dveh blastocist iz prve skupine, 65 prenosov dveh blastocist iz druge skupine in 20 prenosov dveh blastocist iz tretje skupine.

Rezultati. Delež blastocist, ki so se ugnezdile v maternici, je bil najvišji v prvi skupini in se je statistično značilno razlikoval v primerjavi z drugo in tretjo skupino (54,7% oz. 31,5% oz. 7,5%; $p < 0,05$). Po prenosu dveh optimalnih blastocist smo v primerjavi z ostalima skupinama dosegli največ zanositev (62,3% oz. 40% oz. 15%; $p < 0,05$). Delež večplodnih nosečnosti je bil v prvi skupini 56,9%, v drugi 23%, v tretji skupini pa večplodne nosečnosti ni bilo.

Zaključki. Pri izboru blastocist za prenos v maternico je koristno upoštevati njihove morfološke značilnosti. Z našo ocenjevalno lestvico je možno izbrati blastociste z najvišjo kakovostjo. Ker je pri njih verjetnost ugnezditve več kot 50%, lahko brez tveganja vrnemo samo eno takšno blastocisto in se izognemo večplodnim nosečnostim.

Uvod

Razvoj novih gojišč za kulture in vitro je omogočil spremljanje razvoja zarodkov zunaj telesa matere do petega dneva od njihovega spočetja, tj. do stadija blastociste (1). Zarodke gojimo dalj časa v pogojih in vitro z namenom, da bi med njimi

Key words: blastocyst morphology; in vitro fertilization; implantation; multiple pregnancy

Abstract – Background. The blastocysts, obtained from in vitro fertilization, have different morphologic characteristics. The aim of the study is to investigate the effect of morphology of transferred blastocysts on pregnancy and multiple pregnancy rate.

Methods. The quality of blastocysts was evaluated by four parameters: amount of embryo mass transformed into the blastocyst, blastocoel expansion, shape of inner cell mass and proliferation of trophoctoderm cells. In the first group the blastocysts with four optimal parameters were arranged. The second group was formed from blastocysts with one nonoptimal parameter and the third group from blastocysts with more nonoptimal parameters. The results of 175 transfers of two blastocysts from first group, 65 transfers of two blastocysts from second and 20 transfers of two blastocysts from third group were analysed retrospectively.

Results. Implantation rate was the highest in the first group of transfers and differed significantly in comparison to second and third group (54.7% vs. 31.5% vs. 7.5%; $p < 0.05$). Most pregnancies were achieved after the transfer of two optimal blastocysts in comparison to other groups of transfers (62.3% vs. 40% vs. 15%; $p < 0.05$). Multiple pregnancy rate was 56.9% in the first group, 23% in the second group, while in the third group of transfers there was no multiple pregnancy.

Conclusions. By selecting the blastocysts for transfer into the uterus it is advantageous that blastocyst morphology characteristics are taken into the consideration. Using our blastocyst scoring system it is possible to select out the high quality blastocysts. The probability of implantation by them is more than 50%, for that reason only one such blastocyst could be transferred without any effect on pregnancy rate.

lahko izbrali najprimernejše za prenos v maternico. Izbor ne temelji zgolj na morfoloških merilih, temveč delno tudi na osnovi vitalnosti, saj se do blastociste uspe razviti samo od 40 do 70% spočetih zarodkov (2).

Prenos blastocist v maternico je omogočil višjo ali vsaj enako stopnjo zanositve v primerjavi s prenosom zgodnejših embri-

onalnih stadijev. Razlika pa je nastala v številu vrnjenih zarodkov, saj smo v preteklosti vračali tudi štiri zarodke, sedaj pa samo eno ali dve blastocisti (2). Kljub temu se večplodnim nosečnostim ne moremo izogniti.

Vrnjene blastociste imajo višjo sposobnost vgnezditev v primerjavi z zgodnjimi zarodki, vendar pa se ta sposobnost razlikuje tudi med blastocistami samimi. Verjetnost vgnezditev posamezne blastociste je za terapevta pomemben podatek, še zlasti ko se med več razpoložljivimi blastocistami odloča za prenos samo ene.

Različne metode za izbiro optimalne blastociste z dobrimi razvojnimi sposobnostmi so že bile objavljene, od biokemijskih do morfometrijskih. Določanje koncentracij posameznih rastijskih faktorjev in hormonov, ki bi jih naj v svojo okolico izločale blastociste, so obetavne, vendar zapletene in drage ter za vsakdanjo rabo še neuporabne metode (3–6). Ocenjevanje morfologije je zato zaenkrat še vedno najpogostejše uporabljena metoda pri izbiri blastocist za prenos v maternico, vendar pa se morfološka merila med posameznimi centri IVF zelo razlikujejo.

Najenostavnejši ocenjevalni sistem uporablja le eno merilo, tj. prisotnost blastocela. Ta ocenjevalni sistem je poznan iz testa za določanje kakovosti pogojev laboratorijskega dela postopka OBMP z mišjimi zarodki, ki se morajo v čim večjem deležu razviti do blastocist (7–8).

Najpogostejše je za oceno morfologije blastocist uporabljen Gardnerjev model ocenjevanja velikosti blastocela, oblike notranje skupine celic (ICM) in razrasti celic trofektoderma hkrati (1). Model opredeljuje optimalno blastocisto, ne vemo pa, kakšna je biološka kakovost ostalih tipov blastocist.

V naši raziskavi smo uporabili različico Gardnerjevega modela ocenjevanja. Retrospektivno smo ugotavljali, kakšna je sposobnost vgnezditev treh morfoloških tipov blastocist. Zanimalo nas je tudi, kakšna je vrednost našega modela ocenjevanja kakovosti blastocist pri napovedovanju zanositve in večplodne nosečnosti po prenosu dveh blastocist.

Material in metode

Zasnova raziskave

V statistiko smo zajeli vse zaporedne hormonsko spodbujane cikle IVF/ICSI ($n = 260$) v letih 2001 in 2002, v katerih smo opravili prenos 2 enako kakovostnih blastocist. Kakovost prenešenih blastocist smo ocenili po modificiranih Gardnerjevih merilih in oblikovali tri razrede, v katere smo jih razvrstili. Retrospektivno smo analizirali izid postopka OBMP glede na kakovost prenešenih blastocist.

Bohnice in zdravljenje

V analizo smo vključili samo ženske, ki so se zdravile zaradi neplodnosti s postopkom OBMP in so bile mlajše od 40 let. Vključitveno merilo za spodbujanje ovulacije pri ženski je bila koncentracija folikle spodbujajočega hormona (FSH), ki je morala biti pod 10 mIE/ml, in koncentracija estradiola (E_2) pod 0,1 nmol/l. Vse ženske so med prvim in sedmim dnevom menstruacijskega cikla dobile oralne kontraceptive, 0,05 mg etinil estradiola in 0,5 mg norgestrela (Stediril, Krka, Novo mesto, Slovenija), ki so jih jemale najmanj 18 in največ 35 dni. Celotna skupina žensk je prenehala z jemanjem kontraceptivov na isti dan. Sedmi dan pred zadnjo tableto stedirila so ženske začele dobivati gonadotropine sproščajoči hormon (GnRH α) triptorelin (Decapeptyl 0,1mg) ali goserelin (Zoladex 3,6 mg, Zeneca, Cheshire, Velika Britanija). Spodbujanje z gonadotropini (150 ali 225 IE dnevno, Gonal F, Serono, Ženeva, Švica) se je začelo sedmi dan po zadnji tableti stedirila. Prvi ultrazvočni pregled smo opravili osmi dan zdravljenja z gonadotropini. Spodbujanje smo zaključili z 10.000 IE huma-

nega horionskega gonadotropina (Profasi, Serono, Aubonne, Švica), ko je vodilni folikel dosegel 18 mm. Pukcijo foliklov smo opravili 36–37 ur kasneje.

Kulture jajčnih celic in zarodkov in vitro

Za kulture smo uporabili gojišča firme MediCult (Jyllinge, Danska). Vsa gojišča smo preli s parafinskim oljem in pred uporabo za 24 ur izpostavili atmosferi s 37 °C, 95-odstotno relativno vlažnostjo in 5-odstotnim CO $_2$. Jajčne celice smo zbrali v gojišču za izpiranje (Flushing medium) in jih nato prestavili v gojišče za zgodnje zarodke (BlastAssist, Medium 1). V postopku klasične zunajtelesne oploditve smo jajčne celice osemnili s 150.000 do 250.000 gibljivimi semenčicami. Jajčnim celicam, namenjenim za oploditev z vnosom semenčice v njihovo citoplazmo (ICSI), smo odstranili celice kumulusa oophorusa in jih oplodili mehansko. Tretji dan smo zarodke prenesli v gojišče za blastociste (BlastAssist System, Medium 2), kjer smo jih pustili do petega dneva.

Za prenos blastocist v maternico smo uporabili mehki kate-ter (Labotect, Gottingen, Nemčija).

Morfološka ocena blastocist

Morfologijo blastocist smo ocenjevali pet dni po osemenitvi, najprej na stereo mikroskopu (SMZU, Nikon, Japonska) pri povečavah med 7,5- do 75-krat, ki je omogočal tudi obračanje blastocist s pomočjo pipetiranja. Oceno smo preverili še na invertnem mikroskopu (IMT-2, Olympus, Japonska) pri 100- do 300-kratni povečavi. Vse blastociste na dan 5 smo ocenjevali prvič zjutraj ob 7.30, ko smo pripravljali poročilo laboratorija o prenosih zarodkov, in nato še enkrat čez tri ure, ob samem prenosu.

Morfologijo blastocist smo ocenjevali s štirimi parametri hkrati.

Prvi je bil delež zarodka znotraj zone pelucide, preoblikovanega v kompaktno morulo oz. blastocisto, ki smo ga izrazili z odstotki.

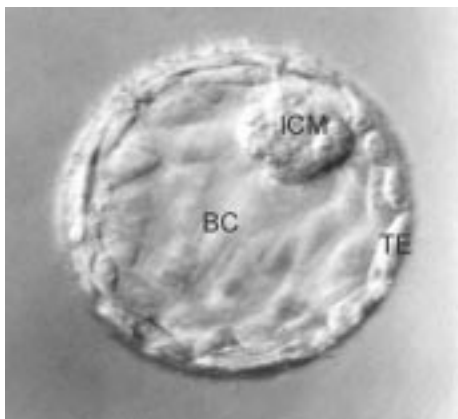
Drugi parameter je bil zrelost blastociste. Blastocisto smo ocenili kot zrelo, če je blastocel popolnoma izpolnjeval zarodek. Kot zgodnjo blastocisto smo smatrali tisto, ki je imela opazen blastocel, vendar le-ta ni izpolnjeval celotnega zarodka. V to kategorijo smo uvrstili tudi kompaktne morule, pri katerih smo na obodu embrija lahko opazili, da so formirane iz več kot 10 blastomer, ki so med seboj tesno povezane v kompaktno tvorbo. Nekompaktnih morul na dan 5 nismo uvrščali med zgodnje blastociste.

S tretjim parametrom smo ocenili notranjo skupino celic (ICM - inner cell mass), vendar le pri zrelih blastocistah. Ta je bila normalna, če je bila okrogla ali ovalna. Kot neoptimalne smo šteli vse ICM, ki so bile fragmentirane, ali pa so celo manjkale. Četrty parameter je služil za oceno trofektoderma. Normalen trofektoderm je bil iz številnih elipsastih, med seboj povezanih celic. Trofektoderm, ki je med sploščenimi celicami vseboval številne okrogle celice ali z membrano obdane citoplazemske vključke, nismo ocenili kot normalen.

Na osnovi upoštevanja vseh parametrov hkrati smo postavili tri morfološke razrede: prvega, v katerega smo uvrstili blastociste z vsemi štirimi optimalnimi parametri drugega, z enim neoptimalnim parametrom in tretjega z več neoptimalnimi parametri hkrati (sl. 1–3).

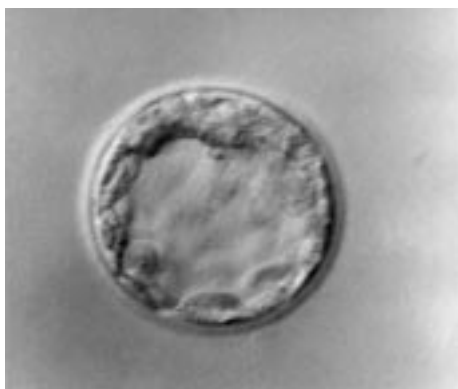
Ugotavljanje nosečnosti

Nosečnost smo dokazovali 14 dni po prenosu zarodkov v maternico s kvantitativnim določanjem beta horionskega gonadotropina v serumu in 14 dni kasneje potrdili z ultrazvočnim dokazovanjem prisotnosti rumenjakovega mehurčka in srčne akcije.



Sl. 1. Optimalna blastocista. V blastocisto se je preoblikoval celoten zarodek, blastocel (BC) izpolnjuje večji del blastociste, notranja skupina celic (ICM) je povezana s tesnimi medceličnimi stiki in je ovalne oblike, celice trofektoderma (TE) tvorijo mnogocelični epitel.

Figure 1. Optimal blastocyst. Blastocyst is formed from all embryonic blastomers, blastocoel (BC) fills whole blastocyst, inner cell mass (ICM) is a compact and oval form, trophoblast (TE) is a multicellular cohesive epithelium.



Sl. 2. Povprečna blastocista s pomanjkljivo notranjo skupino celic (ICM). ICM je večcelična, vendar je fragmentirana in ne tvori homogene celične mase.

Figure 2. Fair blastocyst with nonoptimal inner cell mass (ICM). ICM is multicellular, but fragmented and noncompact form.

Statistična analiza

Za vsak opravljeni cikel smo podatke o značilnostih bolnic, hormonskem zdravljenju in laboratorijskem delu postopka vnesli v računalniški statistični program Statistica, Statsoft (USA). Razlike v frekvencah med primerjanimi skupinami smo ovrednotili s hi kvadrat testom. Razliko smo imeli za statistično značilno, če je blia p vrednost enaka ali manjša od 0.05.

Rezultati

V razpredelnici 1 smo primerjali izid prenosa 2 blastocist z različnimi morfološki ocenami. Primerjane skupine ciklov se med seboj niso razlikovale po povprečni starosti žensk, indikacijah, številu porabljenih ampul gonadotropinov in načinu osemenitve jajčnih celic.

Med cikli z dvema prenešenima blastocistama je statistično značilno izstopala le skupina ciklov z dvema dobrima pre-



Sl. 3. Slaba blastocista. V blastocisto (BL) se je preoblikovalo le okoli 60% blastomer. Blastocista kljub petdnevnemu gojenju še nima obsežnega blastocela. V blastocisti so opazni celični fragmenti.

Figure 3. Poor blastocyst. Only 60% of blastomers were transformed into the blastocyst (BL). Blastocoel is not expanded in spite of five days of culture. Many cellular fragments are visible in the blastocyst.

nešenima blastocistama. V njej smo v primerjavi z drugimi skupinami zabeležili statistično značilno višje število jajčnih celic ($9,6 \pm 4,1$ vs. $8,1 \pm 4,2$ vs. $7,9 \pm 4,7$; $P < 0,05$), zarodkov ($7 \pm 3,1$ vs. $5,2 \pm 2,7$ vs. $5,1 \pm 2,6$; $P < 0,05$) in višji delež razvitih blastocist ($71,2\%$ vs. $52,5\%$ vs. $33,8\%$; $P < 0,0001$).

Razpr. 1. Vpliv kakovosti prenesenih blastocist na ugnestitev, zanositev in večplodno nosečnost.

Table 1. Effect of quality of transferred blastocysts on implantation, pregnancy and multiple pregnancy rate.

	Prenos dveh blastocist Two transferred blastocysts		
	Optimalni Good	Povprečni Fair	Slabi Poor
Št. ciklov (n) No. of cycles (n)	175	65	20
Pozitivni beta hCG (n) Positive beta hCG (n)	116	32	3
Ugnestitev (n) Implantations (n)	197	41	3
Stopnja implantacije (%) Implantation rate (%)	54,7*	31,5	7,5
Spontanih redukcij (n) Spontaneous reductions (n)	20	9	0
Nosečnosti (n) Ongoing pregnancies (n)	109	26	3
Večplodnih nosečnosti (n) Multiple pregnancies (n)	62	6	0
Delež zanositev (%) Pregnancy rate (%)	62,3*	40	15
Delež večplodne nosečnosti (%) Multiple preg. rate (%)	56,9*	23,1	0

* Statistično značilna razlika ($p < 0,05$).

Med skupinami ciklov z dvema prenešenima blastocistama, ki so se razlikovali po kakovosti, smo zabeležili razlike v stopnji implantacije ($P < 0,05$) in zanositve ($P < 0,05$).

Pri prenosu dveh dobrih blastocist smo dosegli 62,3% zanositev, od tega 56,9% večplodnih nosečnosti. S prenosom dveh

povprečno kakovostnih blastocist smo dosegli manj zanositev v primerjavi s prenosom dveh optimalnih blastocist (40% oz. 62,3%; $P < 0,005$). Delež večplodnih nosečnosti pa se je v primerjavi s prej naštetimi primeri zmanjšal za več kot polovico in znašal 23%. Po prenosu dveh slabih blastocist je zanosilo le 15% žensk, večplodnih nosečnosti pa ni bilo.

Razpravljanje

V raziskavah o razvojnih sposobnostih blastocist so ugotovili, da se bolj zrele blastociste vgnezdijo v maternico v višjem deležu v primerjavi z nezrelimi blastocistami (9). Delež ugnezditve je še višji po prenosu blastocist, ki so že zapustile ovojnico – zono pelucido (10, 11). Boljše razvojne možnosti imajo tudi blastociste z večjo ICM (12) in mnogoštevilčnim trofektodermom (10, 13).

V našem centru smo uporabili metodo podaljšanega kultiviranja jajčnih celic pri vseh bolnicah, saj smo v dosedanjih raziskavah dokazali, da s podaljšanim kultiviranjem ne poslabšamo biološke kakovosti zarodkov niti v ciklih z majhnim številom zarodkov (14–15). Zato smo bili pogosto prisiljeni vračati tudi morfološko neoptimalne blastociste, kar je omogočilo tudi nastavitev študije o ugotavljanju vgnezditvene sposobnosti različnih morfoloških tipov blastocist.

Retrospektivna analiza prenosov različno kakovostnih blastocist v naši raziskavi dokazuje, da je vrednost naše nove tristo-penjske ocenjevalne lestvice v napovedovanju ugnezditve, nosečnosti in večplodne nosečnosti zelo visoka. Upoštevajoč zgornje izsledke nam je uspelo določiti morfološke značilnosti optimalne blastociste z največjo razvojno sposobnostjo. Verjetnost, da se bo po prenosu v maternico takšna blastocista tudi ugnezdila, je kar 55%. S prenosom dveh takšnih blastocist se verjetnost za zanositev poveča le za 7% in znaša 62%, vendar pa lahko kar v 57% pričakujemo večplodno nosečnost. V primerih, ko imamo na razpolago optimalno blastocisto, se tako lahko brez tveganja za manjši uspeh odločimo za prenos ene same blastociste. Pri tej odločitvi je potrebno upoštevati tudi druge klinične dejavnike, kot sta na primer število dotedanjih neuspešnih postopkov OBMP in starost. Optimalne blastociste starejših žensk imajo namreč tudi slabše razvojne sposobnosti. Prav tako se lahko razvojna sposobnost morfološko optimalnih blastocist precej razlikuje med centri, zato je priporočljivo, da si vsak center izračuna svojo verjetnost za zanositev. Morfologijo blastociste je potrebno ocenjevati natančno in pod veliko povečavo. Priporočamo, da jo oceni le izkušen embriolog. Odločitev o prenosu ene ali dveh blastocist pa mora biti rezultat posveta ginekologa in embriologa. V ciklih, kjer med več razvitimi blastocistami nismo imeli na razpolago nobene optimalne, smo s prenosom dveh suboptimalnih dosegli 40% zanositev. Delež večplodnih nosečnosti pa se je v primerjavi s prej naštetimi primeri zmanjšal za polovico in znašal 23%.

Pri vračanju dveh morfološko slabih blastocist nismo zabeležili nobene večplodne nosečnosti, zato bi lahko brez večjega tveganja prenesli tudi več kot dve blastocisti.

Zaključki

Naš sistem ocenjevanja blastocist je narejen na hkratnem upoštevanju štirih morfoloških parametrov. Iz primerjave implantacijske sposobnosti različnih morfoloških tipov blastocist lahko zaključimo, da ocenjevanje morfologije po našem sistemu omogoča izbiro blastociste z največjo implantacijsko sposobnostjo. To so blastociste, pri katerih so optimalni vsi štirje parametri. Pomanjkljivost v enem samem parametru že pomeni nižjo implantacijsko sposobnost.

V primerih, ko imamo na razpolago optimalno blastocisto, se lahko brez tveganja za nižjo stopnjo zanositve odločimo za prenos ene same blastociste, da se izognemo večplodnim nosečnostim.

Literatura

- Gardner DK, Schoolcraft WB. In vitro culture of human blastocysts. In: Jansen R, Mortimer D eds. Toward reproductive certainty: fertility and genetics beyond 1999. Carnforth, UK: Parthenon Publishing, 1999: 378–88.
- Gardner DK, Vella P, Lane M, Wagley L, Schlenker T, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil Steril* 1998; 68: 84–8.
- Diaz-Cueto L, Gerton GL. The influence of growth factors on the development of preimplantation mammalian embryos. *Arc Med Res* 2001; 32: 619–26.
- Hardy K, Hooper MA, Handyside AH, Rutherford AJ, Winston RM, Leese HJ. Non-invasive measurement of pyruvate and glucose uptake and lactate production by single human preimplantation embryo. *Hum Reprod* 1989; 4: 188–91.
- Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schoolcraft WB. Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. *Fertil Steril* 2001; 76: 1175–80.
- Houghton FD, Hawkhead JA, Humpherson PG, Hogg JE, Balen AH, Rutherford AJ, Leese HJ. Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Hum Reprod* 2002; 17: 999–1005.
- Ackerman SB, Swanson RJ, Stokes GK, Veck LL. Culture of mouse preimplantation embryos as a quality control assay for human in vitro fertilization. *Gamete Res* 1984; 9: 145–52.
- Vlaisavljević V, Kovačić B. Procjena embriotoksičnosti materijala upotrebljavanih u radu IVF laboratorija. *Jugosl ginekol perinatol* 1991; 3: 45–8.
- Shoukir Y, Chardonnens D, Campana A, Bischof P, Sakkas D. The rate of development and time of transfer play different roles in influencing the viability of human blastocysts. *Hum Reprod* 1998; 13: 676–81.
- Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R. Blastocyst quality affects the success of blastocyst-stage embryo transfer. *Fertil Steril* 2000; 74: 282–7.
- Yoon HG, Yoon SH, Son WY, Im KS, Lim JH. High implantation and pregnancy rates with transfer of human hatching day 6 blastocysts. *Fertil Steril* 2001; 75: 832–3.
- Richter KS, Harris DC, Daneshmand ST, Shapiro BS. Quantitative grading of a human blastocyst: optimal inner cell mass size and shape. *Fertil Steril* 2001; 76: 1157–67.
- Hartshorne GM, Elder K, Crow J, Dyson H, Edwards RG. The influence of in-vitro development upon post-thaw survival and implantation of cryopreserved human blastocysts. *Hum Reprod* 1991; 6: 136–41.
- Vlaisavljević V, Kovačić B, Reljić M, Gavrić Lovrec V, Čížek-Sajko M. Is there any benefit from the culture of a single oocyte to a blastocyst-stage embryo in unstimulated cycles? *Hum Reprod* 2001; 16: 2379–83.
- Kovačić B, Vlaisavljević V, Reljić M, Gavrić Lovrec V. Clinical outcome of day 2 versus day 5 transfer in cycles with one or two developed embryos. *Fertil Steril* 2002; 77: 529–36.