

# 1 Επισκόπιση πρώιμης προεμφυτευτικής ανάπτυξης του ανθρώπου *in vitro*

## Επαγωγή ωοθυλακιορρηξίας για την υποβοηθούμενη αναπαραγωγή

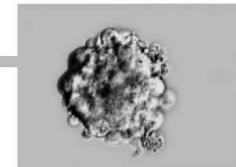
Ο ακρογωνιαίος λίθος της επιτυχούς τεχνολογίας υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (ART, assisted reproductive technology) είναι η ικανότητα προς τοποθέτηση στη μήτρα ποικίλων, επιλεγμένων προεμβρύων που αποκτήθηκαν ύστερα από συλλογή και γονιμοποίηση πολλών ωοκυττάρων. Έτσι, αν και η πρώτη επιτυχής *in vitro* γονιμοποίηση (IVF, *in vitro* fertilization) και κύηση ανθρώπου έγινε ύστερα από λήψη ενός ωοκυττάρου κατό τη διάρκεια του φυσιολογικού, καταμήνιου κύκλου<sup>(1)</sup>, η σύγχρονη πρακτική της ART παγκοσμίως χρησιμοποιεί ελεγχόμενη υπερδιέγερση των ωοθηκών με στόχο την αύξηση των ποσοστών κύησης. Αυτή η στρατηγική, αν και αυξάνει τις επιτυχείς κυήσεις, συνοδεύεται από τον κίνδυνο πολλαπλών κυήσεων. Μεγάλος αριθμός παραγόντων έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως προς επαγωγή ωοθυλακιορρηξίας κατά την ART, συμπεριλαμβανομένων κιτρικού χλωμιφαιανίου, ανθρωπίνων εμμηνοπαυσιακών γοναδοτροπινών (hMG, human menopausal gonadotropins) και παρασκευασμάτων ανασυνδυασμένων γοναδοτροπινών, με ή χωρίς συμπληρωματική χρήση αγωνιστών και ανταγωνιστών της εκλυτικής ορμόνης των γοναδοτροπινών (GnRH). Πρόσφατα, η επικρατούσα προσέγγιση στην επαγωγή ωοθυλακιορρηξίας για IVF συνδυάζει εξωγενείς γοναδοτροπίνες (hMG), καθαρή ή ανασυνδυασμένη ωοθυλακιοτροπίνη (FSH) με αγωνιστές της GnRH.

Αν και το κιτρικό χλωμιφαιάνιο χρησιμοποιόταν αρχικά εκτεταμένα για την ART είτε μόνο του είτε σε συνδυασμό με γοναδοτροπίνες, η πρόσφατη επικράτηση των πρωτοκόλλων καθαρών γοναδοτροπινών υποκινήθηκε από την εκτίμηση ότι αυτή η προσέγγιση ήταν πιο φυσιολογική και απέφευγε τα καταστρεπτικά αποτελέσματα του κιτρικού χλωμιφαιανίου στα ωοκύτταρα

και στο ενδομήτριο. Τα υπάρχοντα εμπορικά παρασκευάσματα περιλαμβάνουν: hMG, σε φιαλίδια που περιέχουν από 75 IU FSH και LH, καθαρή FSH, που εμπεριέχει 75 IU FSH και λιγότερο από 1 IU LH, και πρόσφατα ανασυνδυασμένη FSH. Οι γοναδοτροπίνες που απομονώνονται από ούρα είναι ετερογενείς σε σχέση με τη γλυκοζυλίωση και την παρουσία θραυσμάτων, τα οποία μπορούν να οδηγήσουν σε ποικιλία βιοδυναμικοτήτων μεταξύ διαφορετικών παρασκευασμάτων, ενώ οι ανασυνδυασμένες γοναδοτροπίνες είναι ομοιογενείς.

Έχουν συντεθεί περισσότεροι από 2.000 αγωνιστές της GnRH. Η ενδογενής GnRH αποδομείται ταχέως με διάσπαση στις θέσεις Gly<sup>6</sup>-Leu<sup>7</sup> και Pro<sup>9</sup>-Gly<sup>10</sup> και χρόνο ημιζωής λιγότερο από 10 λεπτά. Η επιλεγμένη αντικατάσταση των αμινοξέων στις θέσεις 6 και 10 του μορίου της GnRH έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγγένειας με τον υποδοχέα της, και την ελάττωση της διάσπασής της από ενδοπεπτιδάσες, οπότε αυξάνεται ο χρόνος ημιζωής της και συνεπώς η βιολογική δράση της. Η φαρμακολογική απόκριση σε χορήγηση αγωνιστών της GnRH είναι διφασική, με ένα αρχικό κύμα έκλυσης γοναδοτροπίνης από την αδενούπόρφυση, αλλά η μακρόχρονη κατάληψη του υποδοχέα της απολήγει σε απευαισθητοποίηση και μειορύθμιση των γοναδοτρόπων, με αποτέλεσμα αντιστρεπτό υπογοναδισμό. Η συμπληρωματική χρήση αγωνιστών της GnRH κατά την IVF έχει ποικίλα, καταφανή πλεονεκτήματα, όπως είναι η μείωση στην άκαιρη έκλυση μεγάλων ποσοτήτων ωχροτροπίνης (LH) και πρόωρη ωχρινοποίηση, η ικανότητα προγραμματισμού της έναρξης διεγέρσεων έτσι ώστε να επιτρέπεται μια πιο ομαλή κατανομή του κλινικού έργου, και πιο σημαντικό, μια γενική βελτίωση του επιτυχούς ποσοστού IVF, ένα εύρημα που επιβεβαιώθηκε από μια δημοσιευμένη μετα-ανάλυση τυχαιοποιημένων, ελεγχόμενων δοκιμών<sup>(2)</sup>.

Κατά την IVF οι αγωνιστές της GnRH μπορεί να χο-



ρηγηθούν ύστερα από ένα εκτεταμένο ή ένα βραχύ πρωτόκολλο. Στο εκτεταμένο πρωτόκολλο, το οποίο εφαρμόζεται σήμερα από τα περισσότερα κέντρα IVF, η επίδραση των αγωνιστών της GnRH αρχίζει στο μέσο της ωχρινικής φάσεως του προηγούμενου καταμήνιου κύκλου. Η μειορύθμιση της υπόφυσης αρχίζει σε 5-10 ημέρες και γίνεται αντιληπτή από την έμμηνο ρύση. Τότε αρχίζει αγωγή με γοναδοτροπίνες και τυπικώς αρχίζει την τρίτη ημέρα του κύκλου ή μόλις επιβεβαιωθεί ικανοποιητική καταστολή της οιστραδιόλης. Η δόση των γοναδοτροπίνων ποικίλλει από 2-4 φιαλίδια ημερησίως, ενώ ορισμένες φορές δίδονται μεγαλύτερες δόσεις σε άτομα που αναμένονται να έχουν ασθενή απόκριση. Ο κύκλος παρακολουθείται με ημερήσιους προσδιορισμούς της οιστραδιόλης που αρχίζουν 2-3 ημέρες μετά την έναρξη της αγωγής. Όταν η οιστραδιόλη υπερβεί ένα καθορισμένο όριο πραγματοποιείται σειρά υπερηχογραφημάτων ωθηκών, εν γένει κατά την έκτη/έβδομη ημέρα του κύκλου. Η ημερήσια δόση των γοναδοτροπίνων μπορεί να προσαρμοσθεί ανάλογα με την απόκριση της κάθε ασθενούς, για παράδειγμα με ελάττωση, εάν έχουν διεγερθεί ωθυλάκια, σε μια προσπάθεια να επιτευχθεί μεγαλύτερος συγχρονισμός στην ωρίμανση ωθυλακίων και να μειωθεί ο κίνδυνος για ανάπτυξη συνδρόμου ωθηκικής υπερδιέγερσης. Ο κατάλληλος χρόνος χορήγησης της ενδεδειγμένης δόσης ανθρώπινης χοριονικής γοναδοτροπίνης (hCG, human chorionic gonadotropin) είναι κρίσιμος για τη λήψη κατάλληλου αριθμού άριστης ωρίμανσης ωκυττάρων, και καθορίζεται από παραμέτρους που περιλαμβάνουν τη μέση διάμετρο του μεγαλύτερου ωθυλακίου (τυπικά >16mm), την απόλυτη συγκέντρωση οιστραδιόλης (π.χ. >500pg/ml) και το πρότυπο αύξησης της οιστραδιόλης και ανάπτυξης του ωθυλακίου. Η χορήγηση του αγωνιστού της GnRH διακόπτεται την ημέρα χορήγησης της hCG. Η διαδικασία λήψης του ωκυττάρου η οποία πραγματοποιείται διαφέσου του κόλπου με την καθοδήγηση υπερήχων, τυπικώς διεξάγεται 34-36 ώρες ύστερα από τη χορήγηση hCG.

Κατά το βραχύ ή «αστραπιαίο» πρωτόκολλο αγωνιστών της GnRH, ο αγωνιστής εισάγεται κατά την πρώιμη ωθυλακική φάση, συνήθως τη 2<sup>η</sup> ή 3<sup>η</sup> ημέρα του κύκλου. Παράλληλη αγωγή με γοναδοτροπίνες αρχίζει μία έως τρεις ημέρες αργότερα. Αυτή η διαδικασία εκμεταλλεύεται την αγωνιστική φάση της αγωγής με αγωνιστές της GnRH, ελαττώνοντας συνεπώς την ολική απαιτούμενη δόση για γοναδοτροπίνες και μειώνοντας τη διάρκεια της διέγερσης. Αν και τα δύο πρωτόκολλα (εκτεταμένο και βραχύ) έχουν αρκετή συνάφεια, η εκτεταμένη προσέγγιση είναι πιο διαδεδομένη. Πολύ πρόσφατα έχουν εισαχθεί ανταγωνιστές της GnRH οι οποίοι επιτρέπουν όψιμη ωθυλακική καταστολή της αύξησης της LH, εξουδετερώνοντας την ανάγκη για μακρόχρονη μειορύθμιση πριν από την αγωγή.

Ο στόχος όλων των πρωτοκόλλων επαγωγής ωθυλα-

κιορρηξίας για ART είναι να επιτρέψουν τη συγκέντρωση ικανού αριθμού προ-ωθυλακιορρηξιακών ωοκυττάρων, ώστε να μεγιστοποιηθεί η κλινική απόδοση. Συνεπώς, τα ποσοστά εγκυμοσύνης μπορεί να αυξηθούν με επιλογή και μεταφορά των «καλύτερης ποιότητας» προεμβρύων, με τη δυνατότητα κατάψυξης μεγάλου αριθμού δυνητικώς βιώσιμων προεμβρύων.

## Γαμέτες

Στα περισσότερα ζωικά είδη, υπάρχουν δύο τύποι ριζικώς διαφορετικών γαμετών. Πέραν των κινητικών νευρώνων με τους πολύ επιμήκεις άξονές τους, το ωοκύτταρο κατατάσσεται μεταξύ των μεγαλυτέρων κυττάρων του ανθρώπου. Αντίθετα, τα σπερματοζωάρια και τα ερυθροκύτταρα συγκαταλέγονται μεταξύ των μικροτέρων.

Η διάμετρος του ώριμου, ανθρώπινου ωοκυττάρου είναι περίπου 110-115 μμ και περιβάλλεται από πλασματική μεμβράνη που καλείται και ωδλημα. Το ωοκύτταρο περιβάλλεται από έναν γλυκοπρωτεΐνικό φάκελο, τη διαφράτιστη ζώνη, πάχους περίπου 15-20 μμ (λεπταίνει λίγο μετά τη γονιμοποίηση) η οποία προστατεύει το ωοκύτταρο κατά την πορεία του και τη γονιμοποίηση. Μεταξύ ωολήμματος και διαφράτιστης ζώνης υπάρχει ο γεμάτος υγρό περιβιτελλινικός χώρος. Ο όρος αυτός εξακολουθεί να χρησιμοποιείται, παρότι στον άνθρωπο και στα άλλα θηλαστικά δεν υπάρχει βιτελλίνη=λέκιθος, η οποία είναι άφθονη σε αργά ερπετών και πτηνών. Το κυτταρόπλασμα του ωοκυττάρου των θηλαστικών συνήθως χαρακτηρίζεται ως ωόπλασμα, όρος πιο κατάλληλος για την περιγραφή του ενεργού τμήματος του ανθρώπινου γαμέτη. Τα κυριότερα οργανίδια του ωοπλάσματος είναι τα μιτοχόνδρια, το ενδοπλασματικό δίκτυο και το σύστημα Golgi.

Όταν είναι πλήρως ικανό να υποστεί τη διαδικασία της φυσιολογικής γονιμοποίησης, το δευτερογενές ωοκύτταρο σταματά για λίγο τη διαδικασία της ωρίμανσής του στη μετάφραση II της μείωσης. Η πυρηνική ωρίμανση συνήθως ακολουθείται στενά από μια γενική ωρίμανση του κυτταρόπλασματος και χαρακτηρίζεται από αύξηση του αριθμού των οργανιδίων μέσα στο ωόπλασμα. Η παρουσία του πρώτου πολικού σωματίου δείχνει ότι η πυρηνική ωρίμανση έφθασε ήδη αυτό το στάδιο. Τότε η συνολική (μαζί με διαφράτιστη ζώνη και περιβιτελλινικό χώρο) διάμετρος του ώριμου, ανθρώπινου ωοκυττάρου είναι περίπου 150 μμ.

Ένα ωοκύτταρο το οποίο «επωάζεται» μαζί με σπερματοζωάρια πριν φθάσει στη μετάφραση II μπορεί να ενσωματώσει ένα σπερματοζωάριο μέσα στο ωόπλασμα, ωστόσο αδυνατεί να πυροδοτήσει διαδικασίες που οδηγούν σε αποσυσπείρωση του DNA του σπερματοζωαρίου. Ένα τέτοιο «ζυγωτό» δεν διαθέτει τελικά λειτουργικό, αρσενικό προπυρήνα<sup>(3)</sup>. Μια μελέτη εξέτασης 518 μη γονιμοποιημένων ωοκυττάρων

έδειξε ότι το 22% είχε διατρηθεί από σπερματοζωάρια, αλλά χωρίς ενεργοποίηση του ωοκυττάρου ή σχηματισμό προπυρίνων<sup>(4)</sup>. Πολλά από αυτά τα ωοκύτταρα μάλλον θα ήταν άωρα όταν αναμίχθηκαν με σπερματοζωάρια.

Πέραν της απαίτησης για ωρίμανση του πυρίνα, πιστεύεται ότι μια βραχεία περίοδος μετά την αποβολή του πρώτου πολικού σωματίου είναι απαραίτητη για να αποκτήσει το ωοκύτταρο την πλήρη κυτταροπλασματική ικανότητα. Ένα ωοκύτταρο το οποίο είναι μειωτικώς ώριμο αλλά ελαφρώς υποανάπτυκτο ή υπεραναπτυγμένο όσον αφορά στο κυτταρόπλασμά του μπορεί να είναι περισσότερο επιρρεπές να διαθέτει έναν, τρεις ή περισσότερους προπυρίνες. Εάν το κυτταρόπλασμα είναι ανώριμο, ο αριθμός των φλοιοικών κυστιδίων και η απόκριση μπορεί να μην είναι κατάλληλες. Με υπερώριμο κυτταρόπλασμα η απελευθέρωση των φλοιοικών κυστιδίων μπορεί να παρεμποδιστεί λόγω μετακίνησης των κυστιδίων προς το εσωτερικό του κυττάρου. Σε οποιαδήποτε περίπτωση, υπάρχουν ενδείξεις ότι η αντίδραση της διαφωτιστής ζώνης είναι επίσης συχνά ανεπαρκής λειτουργικά όταν η αλληλεπίδραση ωοκυττάρου-σπερματοζωαρίου δεν συμβεί στον κατάλληλο χρόνο σε σχέση με την ωρίμανση του πυρίνα και του κυτταροπλάσματος του ωοκυττάρου<sup>(5)</sup>.

Τα ωοκύτταρα που συλλέγονται για IVF περιβάλλονται γενικώς από ποικιλά κυτταρικά στρώματα, που συνιστούν τον ωοφόρο λοφίσκο. Τα κύτταρα του λοφίσκου είναι ουσιώδη, διότι μέσω χασμοσυνδέσμων διατρέφουν τα ωοκύτταρα κατά την ανάπτυξη και πιθανώς να παρέχουν ανασταλτικούς παράγοντες (π.χ. κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη, cAMP) απαραίτητους για την αποτροπή της επανέναρξης της μείωσης<sup>(6)</sup>. Η πλέον εσωτερική κυτταρική στιβάδα καλείται στεφάνη ή στεφανωτή στρώση. Αυτή η στρώση εκτείνεται και εκθέτει ένα ακτινωτό πρότυπο καθώς τα ωοκύτταρα ωριμάζουν ως απόκριση στην εξωγενή hCG ή σε μια μεσοκύκλια αύξηση της LH. Κοντά στο σημείο ωορρηξίας, καθώς τα ωοκύτταρα χαλαρώνουν και εκτείνονται, κύτταρα του λοφίσκου φαίνονται να αποσπώνται από τη διαφωτιστή ζώνη του ωοκυττάρου, προφανώς με διακοπή της μέχρι εκείνη τη στιγμή σημαντικής κυτταρο-ωοκυτταρικής επικοινωνίας. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι ωοκύτταρα, που δεν συσχετίζονται με πολλαπλασιαστικές κυτταρικές μεταβολές πλησίον του χρόνου ωορρηξίας διαθέτουν πολύ περιορισμένο δυναμικό εμφύτευσης, παρά τη γονιμοποίηση και τη φαινομενικώς φυσιολογική ανάπτυξη *in vitro*<sup>(7)</sup>.

Στα περισσότερα είδη θηλαστικών που έχουν μελετηθεί *in vivo*, το ωοκύτταρο φθάνει στην περιοχή γονιμοποίησης, στη λήκυθο του ωογωγού, περιβαλλόμενο ακόμη από κύτταρα του λοφίσκου. Ο λοφίσκος ίσως διαδραματίζει επικουρικό ρόλο και βοηθά το ωοκύτταρο να μετακινηθεί μέσα στον ωογωγό, μέσω αλ-

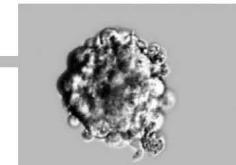
ληλεπιδράσεων του λοφίσκου με τους κροσσούς του ωογωγού. Μια ακόμα πιθανή δράση του λοφίσκου μετά την ωρίμανση του ωοκυττάρου είναι το ότι τα ακτινωτώς διατεταγμένα κύτταρά του βοηθούν τα σπερματοζωάρια να προσανατολισθούν προς το ωοκύτταρο για να το γονιμοποιήσουν. Ωστόσο, δεν υπάρχουν σαφείς αποδείξεις περί αυτής της άποψης. Τα σπερματοζωάρια φέρουν ένζυμα τα οποία διασπούν την εκ βλεννώδους υαλουρονικού οξέος θεμέλια ουσία του λοφίσκου, και έτσι περνούν ανάμεσα από τα κύτταρα.

Σε ωοθυλάκια που έχουν εισροφηθεί για IVF διαπιστώνεται η παρουσία κοκκιωδών κυττάρων, διαφορετικών εκείνων του λοφίσκου. Ο αριθμός αυτών των συλλεγομένων κυττάρων ποικίλλει από θυλάκιο σε θυλάκιο ανάλογα με την έκταση της υποπίεσης που εξασκείται κατά την εισρόφηση, το μέγεθος της βελόνας και τη γενική ωριμότητα του ωοθυλακίου. Όπως και με τα κύτταρα του ωοφόρου λοφίσκου, η συσχέτιση μεταξύ μορφολογίας των ελεύθερων κοκκιωδών κυττάρων και της πυρηνικής ωριμότητας του ωοκυττάρου δεν είναι ακριβής, αλλά κύτταρα που δείχνουν ώριμα (μεγάλα, καλά διασκορπισμένα) εν γένει συλλέγονται μαζί με ώριμα ωοκύτταρα. Αντίθετα, μαζί με ανώριμα ωοκύτταρα συναπομονώνονται κοκκιώδη κύτταρα που δείχνουν ανώριμα (μικρά, συσσωματωμένα). Τα κοκκιώδη κύτταρα μπορεί να μελετηθούν κατά τον χρόνο συλλογής του ωοκυττάρου για να βοηθήσουν στην εκτίμηση της ωριμότητας του ωοθυλακίου. Στη συνέχεια, χρησιμοποιούνται συνήθως για *in vitro* μελέτες μεταβολικών δραστηριοτήτων ή σύνθεσης στεροειδών.

Το ωοκύτταρο που παρατηρείται ενώ τα χρωμοσώματά του ευρίσκονται στη μετάφαση I της μείωσης απαιτεί ορισμένο χρόνο σε καλλιέργεια προτού αποκτήσει πλήρη μειωτική ικανότητα<sup>(8)</sup>. Περισσότερα από 98% αυτών των ωοκυττάρων θα περατώσουν το ταξίδι τους προς τη μετάφαση II και την αποβολή του πρώτου πολικού σωματίου. Ωοκύτταρα με χρωμοσώματα στην πρόφαση I της μείωσης είναι ανώριμα. Περισσότερα από 80% αυτών θα συνεχίσουν μέσω της μετάφασης I στη μετάφαση II, εάν απομονωθούν και καλλιεργηθούν σε κατάλληλο υλικό για 24 ώρες.

## Εκτίμηση της ωριμότητας

Κατά παράδοση, η εκτίμηση της ωριμότητας του ωοκυττάρου έχει βασιστεί στην επέκταση και στην ακτινωτή δομή του συμπλέγματος ωοφόρου λοφίσκου-ακτινωτής στεφάνης που περιβάλλει τα συλλεγέντα ωοκύτταρα<sup>(9,10)</sup>. Με αυτή την εκτίμηση τα ωοκύτταρα ταξινομούνται ταχέως ως ώριμα (συγκρινόμενα με τη μετάφαση II της μείωσης), όταν διαθέτουν εκτεταμένη και ωχρινομένη ουσία του λοφίσκου και εμφανώς ανεπιτυγμένη ακτινωτή στεφάνη. Ένα λιγότερο εκτεταμένο σύμπλεγμα λοφίσκου-στεφάνης χαρακτηρίζει ένα ενδιάμεσο στάδιο ωριμότητας (σαν τη μετάφαση



Ι της μείωσης), ενώ η απουσία εκτεταμένου λοφίσκου γενικά συσχετίζεται με ανωριμότητα (π.χ. πρόφαση Ι της μείωσης). Ενώ αυτός ο τύπος ανάλυσης συνήθως προσεγγίζει αρκετά την πραγματική, πυρηνική κατάσταση του ωοκυττάρου, είναι συχνά αρκετά ανακριβής και μπορεί να οδηγήσει σε επακόλουθα εργαστηριακά σφάλματα στον χειρισμό των γαμετών. Στην πραγματικότητα, η ωρίμανση του πυρήνα του ωοκυττάρου και η ωρίμανση των κυττάρων του λοφίσκου συχνά αποκλίνουν<sup>(11-15)</sup>. Σε περίπτωση απόκλισης μπορεί να συμβεί πρόωρη ενσπερμάτωση σε άωρα ωοκύτταρα, οπότε η έκβαση δεν είναι ευνοϊκή. Πέραν της αποτυχίας της γονιμοποίησης και άλλες καταστροφικές παρενέργειες συνοδεύουν την ένωση ωορίου-σπερματοζωαρίου σε ακατάλληλο χρόνο. Π.χ. τα πρωτόκολλα επαγγήγεις ωορρηξίας μπορεί να μην έχουν εκτιμηθεί κατάλληλα, ενώ είναι δύσκολη η ερμηνεία της συμμετοχής του αρσενικού παράγοντα, με βάση αποτελέσματα ανεπαρκούς γονιμοποίησης.

Με βάση τέτοιες αποτυχίες έχουν αναπτυχθεί τεχνικές προς ακριβέστερη εκτίμηση της μειωτικής κατάστασης του ωοκυττάρου. Μια συστηματική προσέγγιση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να δημιουργηθεί μια κλίμακα ωριμότητας μετρώντας το μέγεθος του ωοθυλακίου, την επέκταση της μάζας του λοφίσκου, την ακτινωτή διάταξη των κυττάρων της στεφάνης, το μέγεθος/συνοχή των συνοδών, κοκκιωδών κυττάρων και το σχήμα/χρώμα του ιδίου του ωοκυττάρου, εάν είναι ορατό μέσα από τη μάζα των περιβαλλόντων κυτταρικών στρωμάτων. Εναλλακτικά, για γνήσια οπτικοποίηση του ωοκυττάρου και του αναπαραγωγικού κυττιδίου ή του πολικού σωματίου, μπορεί να γίνει προσπάθεια διασποράς της μάζας του λοφίσκου, ή πλήρης ενζυμική απομάκρυνση αυτής.

Αφού τα ωοκύτταρα είναι σαφώς ορατά ή απογυμνωμένα από τα περιβάλλοντα κύτταρα, ταξινομούνται ανάλογα με την παρουσία ή απουσία του πρώτου πολικού σωματίου/αναπαραγωγικών κυττιδίων και υφίστανται ενσπερμάτωση/ένεση ως ακολούθως:

**Μετάφραση II (MII)** Το πρώτο πολικό σωμάτιο είναι παρόν, δεν υπάρχει αναπαραγωγικό κυττίδιο, ένεση ή ενσπερμάτωση 3-5 ώρες μετά τη συλλογή.

**Μετάφραση I (MI)** Δεν υπάρχουν πολικό σωμάτιο και αναπαραγωγικό κυττίδιο. Ένεση ή ενσπερμάτωση 1-5 ώρες ύστερα από την αποβολή του πρώτου πολικού σωματίου.

**Πρόφραση I (PII)** Υπάρχει το αναπαραγωγικό κυττίδιο. Ένεση ή ενσπερμάτωση 26-29 ώρες μετά τη συλλογή.

Σύμφωνα με την εμπειρία μας, ωοκύτταρα που έχουν ληφθεί σε πιο προχωρημένα στάδια *in vivo* ωρίμανσης εκδηλώνουν τη μεγαλύτερη ικανότητα σχηματισμού δύο προπυρήνων ύστερα από ενσπερμάτωση<sup>(8,9,11)</sup>. Τα ποσοστά γονιμοποίησης μειώνονται ελαφρά όταν

τα ωοκύτταρα απαιτούν μια περίοδο από 5-15 ώρες παραμονής σε καλλιέργεια πριν από την αποβολή του πρώτου πολικού σωματίου, αλλά η γονιμοποίηση μειώνεται σημαντικά εάν περάσουν περισσότερες από 15 ώρες πριν από την πλήρη περάτωση της διαδικασίας της ωρίμανσης. Το αίτιο αυτής της παρατήρησης είναι πιθανόν η λειτουργικότητα του σπέρματος καθώς επίσης και η ωρίμανση του ωοκυττάρου, αφού το επεξεργασμένο σπέρμα μπορεί να είναι «ηλικίας» μεγαλύτερης των 24 ωρών πριν τοποθετηθεί σε ένα ωοκύτταρο της MΙ ή PΙ φάσεως. Κάτω απ' αυτές τις συνθήκες είναι δύσκολο να διαπιστωθεί η ακριβής αιτία των μειωμένων ποσοστών γονιμοποίησης πολύ άωρων ωοκυττάρων<sup>(8)</sup>.

Εάν διατρυπηθούν μικρά ωοθυλάκια, περίπου το 20-30% των ωοκυττάρων που συλλέγονται για IVF είναι μειωτικώς άωρα κατά τη στιγμή της συλλογής από την ωθήση. Αυτό οφείλεται αναφιβολα στη διέγρηση πολλαπλών ωοθυλακίων κατά την κλινική επαγγγή ωοθυλακιορρηξίας, ορισμένα ευμεγέθη και καλώς αγγειωμένα, και ορισμένα μικρά, με αργοπορημένη επιστράτευση. Εάν όλα τα ωοκύτταρα τοποθετηθούν ταυτόχρονα σε σπέρμα, τότε ένα ποσοστό ελαφρώς μεγαλύτερο του 30% δεν γονιμοποιείται κανονικά. Είναι ευλογοφορές ότι, εάν τα ωοκύτταρα τοποθετηθούν μαζί με σπέρμα αρμέσως μετά την πλήρη ωρίμανση τους, τότε τα αποτελέσματα γονιμοποίησης είναι πολύ καλύτερα.

Τα ποσοστά ανώμαλης γονιμοποίησης (ένας προπυρήνας, περισσότεροι των τριών προπυρήνες) δεν διαφέρουν μεταξύ ωοκυττάρων MII και ωοκυττάρων MΙ και PΙ, τα οποία έχουν ωριμάσει σε καλλιέργεια πριν από την ενσπερμάτωση ή ένεση<sup>(8-10)</sup>. Οι πιθανότητες εγκυμοσύνης ύστερα από μεταφορά προεμβρύων που αναπτύχθηκαν από MII και MΙ ωοκύτταρα είναι ίδιες, ανεξάρτητα από το εάν χρειάστηκαν 0 ή 20 ώρες μέχρι την πλήρη ωρίμανση πριν από την ένεση ή ενσπερμάτωση<sup>(16)</sup>. Μόνον τα προέμβρυα που αναπτύχθηκαν από PΙ ωοκύτταρα δείχνουν σημαντική εξασθένηση δυναμικού εμφύτευσης και γέννησης ζωντανού παιδιού, αν και τέτοιοι τοκετοί είναι βεβαίως εντός των πλαισίων των πιθανοτήτων<sup>(17-20)</sup>.

## Ωοκύτταρο μετάφρασης II

Το MII ωοκύτταρο (Εικόνα 1.1) χαρακτηρίζεται συχνά ως ωριμό, γνομένο ή προ-ωορρηκτικό. Ωστόσο, αυτοί οι όροι δεν αποδίδουν επιτυχώς την ακριβή μειωτική κατάσταση του γαμέτη. Αυτό το ωοκύτταρο ευρίσκεται σε κατάσταση ηρεμίας της μείωσης II μετά την αποβολή του πρώτου πολικού σωματίου και την άμεση μετάβαση στη MII. Τα χρωμοσώματα έχουν διανεμηθεί μεταξύ ωοκυττάρου και πολικού σωματίου (23 χρωμοσώματα, 46 χρωματίδες, 2n DNA στο καθένα). Τα χρωμοσώματα του ωοκυττάρου έχουν συνδεθεί με τους μικροσωληνίσκους της ατράκτου<sup>(3)</sup> (Εικόνα 1.2).

Για λίγο χρόνο μετά τον σχηματισμό του, το πρώτο πολικό σωμάτιο παραμένει συνδεδεμένο στο ωοκύτταρο με τη μειωτική άτρακτο, που σχηματίζει μια κυτταροπλασματική γέφυρα. Τα χρωμοσώματα μέσα στο πρώτο πολικό σωμάτιο παραμένουν κολλημένα μαζί, μπορεί να υποστούν μια δεύτερη μειωτική διαίρεση ή μπορεί να διασκορπιστούν μέσα στο κυτταρόπλασμα. Συνήθως δεν σχηματίζεται πυρήνας<sup>(3,23)</sup>. Το πρώτο πολικό σωμάτιο εμπεριέχει φλοιϊκά κυστίδια, διότι σχηματίζεται πριν από την ενσπερμάτωση και διάρρηξη των φλοιϊκών κυστίδιων. Στην περιφέρεια του ωοκυττάρου υπάρχουν 1-3 στρώσεις φλοιϊκών κυστίδιων. Στο φωτονικό μικροσκόπιο, το ωοκύτταρο χαρακτηρίζεται από το σφαιροειδές, λείο σχήμα του και διαθέτει ανοικτόχρωμο ωόπλασμα ομοιογενούς κοκκιότητας. Ευρίσκεται μαζί με έναν εκτεταμένο, ωχρινοποιημένο λοφίσκο και την ακτινωτή στεφάνη. Τα κύτταρα της κοκκιώδους στιβάδας συλλέγονται μαζί με το MII ωοκύτταρο, συνδέονται χαλαρά μεταξύ τους και δείχνουν χαρακτηριστικά ωριμότητας<sup>(8,10,14,20)</sup>.

## Ωοκύτταρο μετάφασης I

Το MII ωοκύτταρο (Εικόνα 1.3) θεωρείται σχεδόν ώριμο ή ενδιάμεσης ωριμότητας. Το ωοκύτταρο έχει περατώσει την πρόφαση της μείωσης I. Το αναπαραγωγικό κυστίδιο και ο πυρηνίσκος του έχουν εξαφανιστεί. Κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου σχηματίζεται μία άτρακτος, και τα ανακατεμένα πατρικά και μητρικά χρωμοσώματα διατάσσονται τυχαίως προς τους δύο πόλους. Αργότερα, κατά την τελόφαση, ολόκληρα χρωμοσώματα διαμοιράζονται ανεξάρτητα στο ωοκύτταρο και στο πολικό σωμάτιο.

Ένα MII ωοκύτταρο χρειάζεται 1-24 ώρες σε καλλιέργεια πριν αποκτήσει πλήρη ωριμότητα. Εκείνα τα οποία χρειάζονται λιγότερο από 15 ώρες θεωρούνται όψιμης ωριμότητας, ενώ εκείνα που χρειάζονται περισσότερες από 15 ώρες θεωρούνται πρώιμης<sup>(8-11,14,15)</sup>.

Στο φωτονικό μικροσκόπιο το MII ωοκύτταρο χαρακτηρίζεται από απουσία τόσο πρώτου πολικού σωματίου όσο και αναπαραγωγικού κυστίδιου. Ένα όψιμο MII ωοκύτταρο είναι στρογγυλό και λείο, με ομοιογενή κοκκιώση και ανοικτόχρωμο ωόπλασμα. Τα πρώιμα MII ωοκυττάρα μπορεί να εκδηλώνουν λιγότερη κεντρική κοκκιότητα. Κύτταρα του λοφίσκου με ώριμη εμφάνιση συνήθως ανευρίσκονται σε όψιμα στάδια ωριμανσης του ωοκυττάρου.

Επειδή η αποβολή του πρώτου πολικού σωματίου μπορεί να συμβεί σε οποιονδήποτε χρόνο μετά τη συλλογή, είναι αναγκαίο να εξετάζεται το ωοκύτταρο σε τακτά χρονικά διαστήματα προς καθορισμό του σωστού χρόνου για την ενσπερμάτωση. Εάν το σπερματοζωάριο χορηγηθεί στο ωοκύτταρο πριν από την πλήρη πυρηνική και κυτταροπλασματική ωριμανση, είτε θα γίνει ανώμαλη γονιμοποίηση είτε το σπερμα-

τοζωάριο δεν θα αποσυμπυκνωθεί μέσα στο κυτταρόπλασμα. Εάν η ενσπερμάτωση καθυστερήσει πολύ, μπορεί να συμβεί *in vitro* «γήρανση», με δυσμενείς συνέπειες<sup>(3,8)</sup> (Εικόνες 1.4 και 1.5).

## Ωοκύτταρο πρόφασης I

Το ΠΙ ωοκύτταρο (Εικόνα 1.6) συχνά χαρακτηρίζεται ως άωρο ή ανάριμο. Διαθέτει τετραπλοειδικό ποσό DNA λόγω της ύπαρξης 46 διπλών χρωμοσωμάτων. Αυτό το ωοκύτταρο αρχίζει να ωριμάζει ως απόκριση στην αύξηση των γοναδοτροπινών και στην ελάττωση παραγόντων που αναστέλλουν την ωρίμανση. Το αναπαραγωγικό κυστίδιο, το οποίο υπάρχει κατά τις προηγούμενες αναπτυξιακές φάσεις, αρχίζει να αποδομείται (GVBD, germinal vesicle breakdown), και το μέγεθος του ωοκυττάρου αυξάνεται. Τα περισσότερα ωοκύτταρα που συλλέγονται για IVF έχουν διεγερθεί προς επανέναρξη της μείωσης είναι στα τελικά στάδια της πρώτης μειωτικής πρόφασης και έχουν ήδη αποκτήσει πλήρες μέγεθος. Εάν ένα σπερματοζωάριο εισέλθει μέσα σε ένα άωρο ωοκύτταρο, δεν θα επιτύχει ενεργοποίηση επειδή το ωοκύτταρο δεν είναι μειωτικός ώριμος και τα χρωμοσώματά του θα υποστούν πρόωρη συμπύκνωση. Η αποδόμηση του αναπαραγωγικού κυστίδιου (GVBD) μπορεί να συμβεί εντός λεπτών, ή να χρειαστεί πολλές ώρες μετά τη συλλογή. Η διάρκεια του χρόνου φαίνεται να εξαρτάται από το πόσο έχουν προοδεύσει οι διαδικασίες ωριμανσης μέσα στο ωοθυλάκιο πριν από τη συλλογή. Περισσότερα από 80% θα φθάσουν στο πλήρες ώριμο στάδιο MII αφού περάσουν το MII.

Το αναπαραγωγικό κυστίδιο (δηλαδή ο πυρήνας) του ανθρώπινου ωοκυττάρου είναι σφαιρικός και εμπεριέχει ένα μεγάλο, διαθλαστικό, έκκεντρο πυρηνίσκο. Επιμελέστερη παρατήρηση ίσως αποκαλύψει την παρουσία και δεύτερου πυρηνίσκου. Το αναπαραγωγικό κυστίδιο ευρίσκεται στο κέντρο του ωοπλάσματος νεαρών ΠΙ ωοκυττάρων και όσων εκδηλώνουν διακοπή της ανάπτυξης. Στα υγιή ωοκύτταρα, πριν από την GVBD μεταναστεύει στην περιφέρεια. Η GVBD σηματοδοτεί την πρώτη πρακτική, μικροσκοπική ένδειξη περί επανέναρξης της μείωσης. Καθώς ωριμάζει το ωοκύτταρο, αναπτύσσονται αμυντικοί μηχανισμοί προς αποφυγή της πολυσπερμίας, υπό τη μορφή συνάθροισης και τοποθέτησης φλοιϊκών κυστίδιων στην περιφέρεια του ωοκυττάρου. Σε όωρα ωοκύτταρα τα φλοιϊκά κυστίδια είναι λίγα και ασυνεχή<sup>(3)</sup>.

Στο μικροσκόπιο, το ΠΙ ωοκύτταρο χαρακτηρίζεται από το διάκριτο αναπαραγωγικό κυστίδιο και τον διαθλαστικό πυρηνίσκο. Σχεδόν πάντοτε εμφανίζονται ανώμαλα σχήματα, σκουρόχρωμο κέντρο και κοκκιώδες ωόπλασμα. Τα συνυπάρχοντα κύτταρα του λοφίσκου είναι συνήθως συμπαγή και σε πολλές στιβάδες, αλλά μπορεί να πολλαπλασιάζονται. Τα ελεύθερα κοκκιώδη κύτταρα μέσα στο άωρο ωοθυλάκιο είναι

