

Raziskovalni prispevek/Research article

ZORENJE JAJČNIH CELIC IN VITRO (IVM) PRI BOLNICAH S PCOS

IN VITRO MATURATION OF OOCYTES (IVM) IN PCOS PATIENTS

Vilma Kovač, Veljko Vlajsavljević, Mojca Čížek-Sajko

Oddelek za reproduktivno medicino in ginekološko endokrinologijo, Klinika za ginekologijo in perinatologijo, Univerzitetni klinični center Maribor, Ljubljanska 5, 2000 Maribor

Izvleček

Izhodišča

In vitro maturacija (IVM) je sorazmerno nov postopek oploditve z biomedinsko pomočjo (OBMP), katerega osnova je zorenje nezrelih jajčnih celic v pogojih *in vitro*. Glavna prednost IVM v primerjavi z ustaljenima postopkoma IVF in ICSI je ta, da bolnice ne potrebujejo zdravljenja za kontrolirano ovarijsko hiperstimulacijo (KOH). S tem se v celoti izognemo tveganju za razvoj sindroma ovarijske hiperstimulacije (OHSS), kar je pomembno zlasti za bolnice s sindromom policističnih jajčnikov (PCOS), pri katerih je ta nevarnost večja. Postopek IVM je torej primeren zlasti za bolnice s PCOS, ki v okviru zdravljenja neplodnosti potrebujejo postopke OBMP.

Na procese zorenja jajčnih celic *in vitro* vplivajo dejavniki, kot so: izbira bolnic, endogeno hormonsko okolje, zdravljenje z gonadotropini in ovarijskimi steroidi, funkcija celic granulose ter kumulusa. Čeprav se je stopnja zanositve v zadnjih letih izboljšala, pa deleži ugnezditve ostajajo nizki (10–11 %). Poročila o otrocih, spočetih po IVM kažejo, da metoda ne zvišuje tveganja za prirojene malformacije, kljub temu je potrebno še naprej slediti rojstvom in razvoju teh otrok.

Zaključki

IVM je obetavna metoda OBMP, s katero lahko dosežemo dobre rezultate zlasti pri bolnicah s PCOS. Potrebne so nadaljnje raziskave, da bi uspešnost IVM izboljšali.

Ključne besede zorenje *in vitro*; IVM; PCOS

Abstract

Background

In vitro maturation (IVM) is a relatively new method of assisted reproduction. The basis of this method is maturation of immature oocytes in conditions *in vitro*. The main advantage of this method over the conventional IVF/ICSI technique is that patients don't need medications for controlled ovarian hyperstimulation and that ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) is avoided. The avoidance of OHSS is very important for patients with polycystic ovarian syndrome (PCOS), which have increased risk for OHSS. The IVM method is suitable for those patients with PCOS who require treatment with assisted reproductive technology (ART).

There are numerous factors which influence the maturation of human oocytes *in vitro* such as the nature of the patients, endogenous endocrine background, treatment with gonadotrophins and ovarian steroids, cumulus cell and granulosa cell function. In spite the fact that pregnancy rates have been improved in IVM patients last years, the implantation rates stay low (10–11 %). Reports on children born after IVM showed no increased risk for congenital malformations, however permanent follow-up of this children is needed.

Conclusions

IVM is a promising method of ART and offers good results for PCOS patients. Further investigations are needed to improve the success of IVM method.

Key words *in vitro* maturation; IVM; PCOS

Avtorica za dopisovanje / Corresponding author:

Vilma Kovač, Oddelek za reproduktivno medicino in ginekološko endokrinologijo, Klinika za ginekologijo in perinatologijo, Univerzitetni klinični center Maribor, Ljubljanska 5, 2000 Maribor

Uvod

In vitro maturacija (IVM) je sorazmerno nov postopek oploditve z biomedinsko pomočjo (OBMP), katerega osnova je zorenje nezrelih jajčnih celic v pogojih in vitro.

Ideja o zorenju nezrelih jajčnih celic v laboratorijskih pogojih pa ni nova. Že leta 1935 sta Pincus in Enzman opazila, da kunčje nezrele jajčne celice spontano dozori po osamitvi iz foliklov.¹ Edwards je leta 1965 ta pojav potrdil še na človeških nezrelih jajčnih celicah, opazil pa je, da procesi zorenja v primerjavi z živalskimi jajčnimi celicami potekajo pri človeških v bistveno manjšem obsegu. Uspešno oploditev in vitro dozorele človeške jajčne celice je prvič demonstriral že leta 1969.²

Prva nosečnost po postopku IVM je bila ugotovljena leta 1983. Nastopila je iz nezrele jajčne celice, ki ni dozorela po ovulacijskem odmerku hCG v klasičnem spodbujenem postopku IVF.³

Cha in sodelavci⁴ so leta 1991 poročali o prvi nosečnosti iz nezrelih jajčnih celic iz foliklov nespodbujenega jajčnika, ki je bil kirurško odstranjen. Trounson in sodelavci⁵ pa so leta 1994 prvi poročali o rojstvu otroka po IVM nezrelih jajčnih celic, dobljenih s transvaginalno aspiracijo jajčnika bolnice s PCOS.

Prednosti postopka IVM

Klasična postopka OBMP – IVF in ICSI sta ustaljeni in zelo uspešni metodi za simptomatsko zdravljenje določenih oblik neplodnosti. Da bi v postopkih IVF/ICSI pridobili večje število zrelih jajčnih celic in posledično večje število zarodkov, rast foliklov spodbujamo z eksogenimi gonadotropini (kontrolirana ovarijska hiperstimulacija – KOH). Dokončanje mejotskega zorenja dosežemo z enkratnim odmerkom hCG v pozni folikularni fazi. Uporaba eksogenih gonadotropinov lahko povzroči kratkotrajne stranske učinke, kot so povečanje telesne mase, slabost, bruhanje in spremembe razpoloženja. Najbolj nezaželen stranski učinek je sindrom ovarijske hiperstimulacije (OHSS), ki se pojavlja v 2–6 % vseh spodbujenih ciklusov. Za preprečevanje pojava OHSS poznamo več možnih protokolov, vendar trenutno še ni univerzalnega protokola ali metode, ki bi absolutno preprečil pojav OHSS, razen če odtegnemo hCG ali prekinemo cikel. Nekatere bolnice s PCOS so bolj občutljive za spodbujanje z eksogenimi gonadotropini. Pri njih se tveganje za pojav OHSS poveča.⁶ Uporaba eksogenih gonadotropinov zvišuje tudi invazivnost metode in ceno postopka.

V okviru postopka IVM punktiramo manjše antralne folikle in aspiriramo jajčne celice, ki so nezrele. Najpomembnejša razlika med postopkom IVM in klasičnim postopkom IVF/ICSI je, da za pridobitev večjega števila jajčnih celic in s tem večjega števila zarodkov bolnice ne potrebujejo zdravil za klasično KOH, s čimer odpravimo možnost, da se pojavi OHSS. Glede na poročila različnih avtorjev bolnice pred punkcijo foliklov bodisi ne prejmejo nikakršnih zdravil, bodisi jih minimalno spodbujamo z gonadotropini, bodisi prejmejo le pripravke horionskega gonadotropina (hCG).^{7–10} Odsotnost potrebe po KOH in s tem

možnosti pojava OHSS sta glavni prednosti postopka IVM pred klasičnim postopkom IVF/ICSI. Po mnenju nekaterih avtorjev bi pri določeni skupini bolnic v prihodnosti s postopkom IVM lahko zmanjšali ali celo odpravili uporabo eksogenih gonadotropinov, s čimer bi nedvomno odpravili ali vsaj zmanjšali tudi tveganje za stranske učinke, zmanjšali invazivnost metode in znižali ceno postopka.^{9,11}

Posebnosti postopka IVM

Zrele jajčne celice v klasičnih postopkih IVF/ICSI pridobimo z aspiriranjem foliklov s premerom 16–23 mm, nezrele jajčne celice pa v postopku IVM pridobimo iz antralnih foliklov s premerom 2–10 mm. Takšna punkcija in aspiracija nezrelih jajčnih celic, ki so čvrsto »potopljene« v celice kumulusa, se precej razlikuje od klasične punkcije v postopkih IVF/ICSI in je tehnično težja. Po mnenju nekaterih avtorjev je to deloma vzrok, da se postopek IVM med centri ni razširil hitreje in v večjem obsegu.¹² Pomembno je da, aspiracija poteka pri manjšem podtlaku, ki znaša približno 80–110 mm Hg. Prevelik podtlak bi nezrele jajčne celice lahko poškodoval, kar bi oslabilo njihovo razvojno sposobnost. Po aspiraciji foliklov gojimo nezrele jajčne celice različno dolgo v ustreznih gojiščih za zorenje. Na voljo imamo večje število komercialno pripravljenih gojišč. V Evropi pogosto uporabljajo gojišče IVM Medium (MediCult, Danska). V naši raziskavi o postopku IVM smo ga tudi sami uporabili.^{13,14} Poznamo pa še humani oocitni maturacijski medij (HOM, Avstralija), IVM Medium (Sage Cooper Surgical, Kanada), Ham F10, B2, EMEM in druga gojišča.^{9,15} Gojišča za zorenje nezrelih jajčnih celic običajno obogatimo z lastnim serumom bolnice, ki je vir potrebnih beljakovin. Zaradi možnega izvora kužnih agensov se uporaba serumskih dodatkov živalskega izvora zmanjšuje. Nekateri centri za proteinsko suplementacijo v gojiščih za IVM uporabljajo serum HSA (human serum albumin) ali sintetične serumske snovi.¹⁵

Gojiščem poleg seruma vedno dodamo še gonadotropine (FSH in LH ali hCG), ne glede na to, ali so bolnice pred punkcijo prejele hCG ali FSH ali pa niso prejele ničesar. Dodatek gonadotropinov je pomemben za preživetje zarodkov, opazili pa so tudi višji delež zorenja.^{9,11} Chian s sodelavci⁹ poroča, da je hitrost spontanega dokončanja mejoze v gojišču odvisna predvsem od tega, ali so bolnice pred punkcijo prejele eksogene gonadotropine, zlasti hCG. Pri 40 % jajčnih celic bolnic, ki so pred punkcijo prejele hCG, lahko že ob punkciji opazimo znamenja razpada zarodnega mešička, procesi zorenja pa se pri 80 % celic končajo že v 24 urah. Danes večina centrov za IVM v gojiščih za zorenje goji jajčne celice 24–28 ur.

Raziskave na živalih so pokazale, da zorenje nezrelih jajčnih celic v pogojih in vitro povzroči strukturne spremembe v coni pelucidi, ki lahko vodijo v slabše prodiranje semenčice in slabšo oploditev.¹⁶ Čeprav ta pojav pri človeških nezrelih jajčnih celicah še ni bil dokazan, danes večina raziskovalcev v okviru postopka IVM jajčne celice oplodi z metodo ICSI.

V postopku IVM punktiramo folikle v sredini folikularne faze. V tem času endometrija še ni pripravljen na

vgnezditve zarodkov, saj ni bil dovolj izpostavljen endogenemu estradiolu in progesteronu. Nižja implantacija je lahko posledica morfološko in funkcionalno neustreznega endometrija. Za sinhroniziranje implantacijskega okna in razvoja zarodkov je zato potrebna ustrežna hormonska priprava endometrija v obliki eksogenih estrogenov in progestagenov.^{9,17}

Uspešnost postopka IVM in otroci, spočeti po metodi IVM

Na procese zorenja jajčnih celic v postopku IVM vplivajo številni dejavniki. Med pomembnejšimi so izbor bolnic, velikost foliklov in atrezija, endogeno hormonsko okolje, faza menstruacijskega ciklusa, zdravljenje z gonadotropini in ovarijskimi steroidi, funkcija celic granulose in kumulusa.^{11, 12, 18} Trounson je s sodelavci¹² ugotovil, da aspiracija nezrelih jajčnih celic in/ali zorenje in vitro lahko oslabi(ta) razvojno sposobnost jajčne celice. Skupna ugotovitev zgodnjih raziskav je bila, da je uspešnost postopka IVM v primerjavi s klasičnim postopkom IVF/ICSI precej slabša. Izsledki novjših raziskav so bolj optimistični in kažejo, da sta se razvojna sposobnost nezrelih jajčnih celic in stopnja zanositve izboljšali, kar kaže na to, da mnoge dejavnike, ki vplivajo na postopek IVM, že poznamo in jih lahko kontroliramo. Deleži zanositev na prenos zarodkov se v mnogih centrih gibljejo med 17,1–33,9%, potrebno pa je vedeti, da je za takšno uspešnost potrebno prenesti večje število zarodkov, saj so deleži implantacije še vedno nizki in se gibljejo med 10–11%.¹⁸ Kljub boljšim rezultatom pa metoda IVM še vedno vzbuja določene pomisleke. Kot pri uvedbi vsake nove metode asistirane reprodukcije nas tudi pri postopku IVM zanima, kakšen je vpliv na pojavnost kongenitalnih anomalij pri otrocih in kakšen je perinatalni izid. Pri vseh postopkih OBMP skrb še vedno vzbujata podaljšano gojenje jajčnih celic in zarodkov v gojiščih ter uporaba eksogenih gonadotropinov. Pomemben vidik zorenja jajčnih celic je tudi vzpostavitev ustreznega epigenetskega stanja, saj se v času rasti in zorenja jajčnih celic dogajajo številne epigenetske spremembe. Pri metodi IVM v pogojih in vitro zorimo nezrele spolne celice, kar lahko vodi do nepravilnosti v epigenetskih modifikacijah.¹⁹ Mednarodnega registra otrok, rojenih po metodi IVM, še vedno ni, vendar ga pripravljajo. Do danes je bilo v svetu rojenih okrog 800 otrok, spočetih po metodi IVM. Zaenkrat ni podatkov, da je delež prirojenih nepravilnosti pri otrocih, spočetih po tej metodi, višji kot pri otrocih, spočetih po drugih metodah OBMP, vendar je število rojenih otrok še prenizko za oblikovanje dokončnih sklepov.^{11, 20, 21} Določeni zapleti v nosečnosti so lahko posledica PCOS, saj metodo IVM najpogosteje uporabljamo pri bolnicah s tem sindromom.²² Buckett s sodelavci²⁰ poroča o večji pogostnosti gestacijske sladkorne bolezni pri nosečnicah, ki so zanosile po postopku IVM, kar je vsaj deloma posledica povečane nevarnosti za nastanek sladkorne bolezni pri bolnicah s PCOS. Mnogi poročajo o visokem deležu spontanah splavov ob zanositvi po metodi IVM, ki se giblje med 26,5 in 42,3%. Deloma je tudi to lahko posledica PCOS, saj vemo, da je ta sindrom povezan s povišano prevalenco zgodnjih spontanah splavov.^{20, 22}

Izbira bolnic za postopek IVM

Postopek IVM je primeren zlasti za neplodne bolnice s PCOS, ki v poteku zdravljenja neplodnosti potrebujejo OBMP, saj se prednosti postopka IVM najbolj izrazijo pri teh bolnicah. Po drugi strani pa so bolnice s PCOS tudi primerne za postopek IVM, saj imajo večjo prostornino jajčnikov, veliko pa je tudi število foliklov, kar oboje olajša punkcijo.¹⁸ Dobre rezultate so zabeležili tudi pri neplodnih normoovulatornih bolnicah z rednimi menstruacijskimi cikli, a se postopek IVM pri njih manj izvaja.⁷ Opisanih pa je tudi nekaj primerov uporabe postopka IVM pri bolnicah z zmanjšano rezervo jajčnika.²³ V zadnjih letih se postopek IVM uspešno uporablja tudi za ohranjanje reproduktivne sposobnosti bolnic z rakom.²⁴

Zaključki

IVM je obetavna metoda OBMP, s katero lahko dosežemo dobre rezultate zlasti pri bolnicah s PCOS. Potrebno bo opraviti prospektivne randomizirane raziskave, ki bodo potrdile prednosti postopka IVM pred postopkoma IVF/ICSI pri bolnicah s PCOS, preden bo metoda IVM postala rutinska metoda OBMP za omenjene bolnice. Čeprav raziskave o otrocih, spočetih po IVM, kažejo, da metoda ne zvišuje tveganja za prirojene malformacije, je potrebno še naprej slediti rojstvom in razvoju teh otrok.

Literatura

1. Pincus G, Enzman EV. The comparative behaviour of mammalian eggs in vivo and in vitro. *J Exp Med* 1935; 62: 665–75.
2. Edwards RG. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature* 1965; 208: 349–51.
3. Veeck LL, Wortham JW Jr, Witmeyer J, Sandow BA, Acosta AA, Garcia JE, et al. Maturation and fertilization of morphological immature human oocytes in a program of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1983; 39: 594–602.
4. Cha KY, Koo JJ, Ko JJ, Choi DH, Han Sy, Yoon TK. Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program. *Fertil Steril* 1991; 55: 109–13.
5. Trounson A, Wood C, Kausche A. In vitro maturation and the fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. *Fertil Steril* 1994; 62: 353–62.
6. Whelan JG, Vlahos NF. The ovarian hyperstimulation sindrom. *Fertil Steril* 2000; 73: 883–96.
7. Mikkelsen AL, Smith SD, Lindenberg S. In-vitro maturation of human oocytes from regulary menstruating women may be successful without follicle stimulating hormone priming. *Hum Reprod* 1999; 14: 1847–51.
8. Mikkelsen AL, Lindenberg S. Benefit of FSH priming of women with PCOS to the in vitro maturation procedure and the outcome: a randomized prospective study. *Reproduction* 2001; 122: 587–92.
9. Chian RC, Buckett WM, Tulandi T, Tan SL. Prospective randomized study of human chorionic gonadotrophin priming before immature oocyte retrieval from unstimulated women with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* 2000; 15: 165–70.
10. Hreinsson J, Rosenlund B, Friden B, Levkov L, Ek I, Suikkari AM. Recombinant LH is equally effective as recombinant hCG in promoting oocyte maturation in clinical in-vitro maturation programme: a randomized study. *Hum Reprod* 2003; 18: 2131–6.
11. Mikkelsen AL. Strategies in human in-vitro maturation and their clinical outcome. *Reprod Biomed Online* 2005; 10: 593–9.

12. Trounson A, Anderiesz C, Jones G. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. *Reproduction* 2001; 121: 51-75.
13. Kovač V, Čížek Sajko M, Vlaisavljević V, Reljič M, Gavrič Lovrec V. A comparison of parameters affecting the success of IVM treatment in PCOS patients primed with FSH or hCG. *Hum Reprod* 2005; 20 Abstract book: 102.
14. Vlaisavljević V, Kovac V, Čížek Sajko M. Impact of insulin resistance on the developmental potential of immature oocytes retrieved from human chorionic gonadotropin primed women with polycystic ovary syndrome undergoing in vitro maturation. *Fertil Steril* 2009; 91: 957-9.
15. Mikkelsen AL, Smith SD, Lindenberg S. Possible factors affecting the development of oocytes in in-vitro maturation. *Hum Reprod* 2000; 15: 11-7.
16. Sathananthan AH. Ultrastructure of the human egg. *Hum Cell* 1997; 10: 21-38.
17. Child ZJ, Gulekli B, Sylvestre C, Tan SL. Ultrasonographic assessment of endometrial receptivity at embryo transfer in an in vitro maturation of oocyte program. *Fertil Steril* 2003; 79: 656-8.
18. Papanikolaou EG, Platteau P, Albano C, Nogueira D, Cortvrindt R, Devroy P et al. Immature oocyte in-vitro maturation: clinical aspects. *Reprod Biomed Online* 2005; 10: 587-92.
19. Lucifero D, Chaillet JR in Trasler JM. Potential significance of genomic imprinting defects for reproduction and assisted reproductive technology. *Hum Reprod Update* 2004; 10: 3-18.
20. Buckett WM. Pregnancy and neonatal outcome following IVM. In: Tan SL, Chian RC, Buckett WM. *In-vitro Maturation of Human Oocytes*. London: Informa Healthcare; 2007. p. 313-18.
21. Söderström-Anttila V, Salokorpi T, Pihlaja M, Serenius-Sirve S, Suikkari AM. Obstetric and perinatal outcome and preliminary results of development of children born after in vitro maturation of oocytes. *Hum Reprod* 2006; 21: 1508-13.
22. Homburg R. Polycystic ovary syndrome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynecol* 2008; 22: 261-74.
23. Requena A, Neuspiller F, Cobo AC, Aragonés M, Remohi J, Simon C, et al. The potential use of maturation in vitro of human oocytes in low responder patients. *J Assist Reprod Genet* 2000; 17: 239-44.
24. Huang JY, Tulandi T, Holzer H, Tan SL, Chian RC. Combining ovarian tissue cryobanking with retrieval of immature oocytes followed by in vitro maturation and vitrification: an additional strategy of fertility preservation. *Fertil Steril* 2008; 89: 567-72.

Prispelo 2009-09-03, sprejeto 2009-10-01