

Ανασκόπηση**Μορφολογικά χαρακτηριστικά
αξιολόγησης της ποιότητας ωαρίων
και εμβρύων για εμβρυομεταφορά**

**Κ.Ε. Λουτράδη
Β.Κ. Ταρλατζής**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η δημιουργία υπεράριθμων εμβρύων κατά τη διάρκεια ενός κύκλου εξωσωματικής γονιμοποίησης οδήγησαν στην ανάπτυξη συστημάτων μορφολογικής αξιολόγησης, με σκοπό την επιλογή των ποιοτικά καλύτερων εμβρύων. Με τον τρόπο αυτό, επιτυγχάνεται η επιλογή αυτών με τις περισσότερες δυνατότητες εμφύτευσης, ενώ συγχρόνως ελαττώνεται ο αριθμός των εμβρύων που μεταφέρονται στην μήτρα, χωρίς να επηρεαστούν τα ποσοστά εγκυμοσύνης και εμφύτευσης. Ο πιο συνηθισμένος τρόπος ποιοτικής αποτίμησης στηρίζεται στην παρατήρηση της μορφολογίας του εμβρύου και περιλαμβάνει, μεταξύ άλλων, χαρακτηριστικά όπως τον αριθμό και τη θέση των προκυρήνων, τον ρυθμό ανάπτυξης και την παρουσία θραυσμάτων. Η επιλογή του ποιοτικά και γενετικά καλύτερου εμβρύου για εμβρυομεταφορά είναι καλό να γίνεται με βάση τον συνδυασμό των μορφολογικών χαρακτηριστικών που παρατηρήθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης και μέχρι την ημέρα της εμβρυομεταφοράς.

Όροι ευρετηρίου: έμβryo, εμβρυομεταφορά, κριτήρια αξιολόγησης, μορφολογία, ποιότητα.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ένας σημαντικός παράγοντας που συντέλεσε στην ανάπτυξη της εξωσωματικής γονιμοποίησης (in vitro fertilization – IVF) ήταν η χρήση των φαρμάκων ελεγχόμενης πρόκλησης πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας. Τα φάρμακα αυτά αυξάνουν τα επίπεδα γοναδοτροπινών στο αίμα, καταστέλλοντας τον φυσιολογικό μηχανισμό που επιλέγει το κυρίαρχο ωοθυλάκιο, με συνέπεια να προκαλούν την παραγωγή πολλαπλών ωοθυλακίων και ωοκυττάρων. Τα ωοκύτταρα αυτά μπορούν να γονιμοποιηθούν με τη μέθοδο IVF ή με ενδοωαριακή έγχυση σπερματοζωαρίου (intracytoplasmic sperm injection – ICSI). Τα έμβρυα που προκύπτουν μεταφέρονται στην μήτρα της γυναίκας με σκοπό την επίτευξη κύησης. Όμως, η μεταφορά πολλών εμβρύων στην προσπάθεια βελτίωσης των πιθανοτήτων εγκυμοσύνης, είχε ως αποτέλεσμα να αυξηθούν τα ποσοστά πολύδυμων κύσεων και κατά συνέπεια των επιπλοκών που συνεπάγονται για τη μητέρα και το νεογνό. Έτσι, στις μέρες μας πολλές ευρωπαϊκές χώρες, μεταξύ των οποίων και η Ελλάδα, έχουν καθιερώσει, με νόμο ή απόφαση άλλων οργάνων, τον περιορισμό του αριθμού των μεταφερόμενων εμβρύων σε δύο ή ακόμα και σε ένα. Η τακτική αυτή, όμως, προϋποθέτει τη μεταφορά των ποιοτικά καλύτερων εμβρύων, έτσι ώστε τα ποσοστά εγκυμοσύνης και εμφύτευ-

Μονάδα Ανθρώπινης Αναπαραγωγής,
Α' Μαιευτική – Γυναικολογική Κλινική
Α.Π.Θ, Γενικό Νοσοκομείο
Θεσσαλονίκης «Παπαγεωργίου»

Αλληλογραφία:
Βασίλειος Κ. Ταρλατζής
Μονάδα Ανθρώπινης Αναπαραγωγής,
Α' Μαιευτική – Γυναικολογική Κλινική
ΑΠΘ, Γενικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης
«Παπαγεωργίου»
Περιφερειακή Οδός
546 03 Νέα Ευκαρπία, Θεσσαλονίκη
Τηλ.: 2310 693131
Fax: 2310 991510
E-mail: tarlatzis@hol.gr
Κατατέθηκε: 20/3/2006
Εγκρίθηκε: 14/11/2006

σης να παραμείνουν αμετάβλητα. Υπάρχουν διάφορες τεχνικές με τις οποίες μπορεί να μελετηθεί η ποιότητα ενός εμβρύου. Η πιο συνηθισμένη και γρήγορη μέθοδος βασίζεται στην παρατήρηση της μορφολογίας του εμβρύου σε ένα απλό στερεομικροσκόπιο. Είναι γνωστό εδώ και αρκετά χρόνια ότι τα έμβρυα με καλά μορφολογικά χαρακτηριστικά συνδέονται με καλύτερα ποσοστά εμφύτευσης και εγκυμοσύνης.⁽¹⁾ Στην ανασκόπηση αυτή θα περιγραφούν τα διάφορα χαρακτηριστικά ποιοτικής αξιολόγησης των εμβρύων, προκειμένου να επιλεγούν τα πλέον κατάλληλα για εμβρυομεταφορά.

ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ ΩΑΡΙΟ

Σε ένα κύκλο εξωσωματικής γονιμοποίησης, η χορήγηση χοριακής γοναδοτροπίνης (human chorionic gonadotrophin – hCG), η οποία υποκαθιστά την ωχρινοτρόπο ορμόνη, αφού δρα μέσω των ίδιων υποδοχέων, προκαλεί, εκτός από τη ρήξη των ωοθυλακίων, και κάποιες σημαντικές αλλαγές στο ωάριο και στα κύτταρα της κοκκιώδους στιβάδας που το περιβάλλουν. Ο πυρήνας του ωαρίου ανταποκρίνεται στην hCG με την επανέναρξη της μειωτικής του διαίρεσης, την εξαφάνιση της πυρηνικής μεμβράνης (germinal vesicle breakdown - GVBD) και την εμφάνιση του πρώτου πολικού σωματίου (polar body I - PBI). Έτσι, το ωάριο φτάνει στη μετάφαση II (MII) της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται μειωτική ωρίμανση του πυρήνα και η ολοκλήρωσή της είναι απαραίτητη προκειμένου το ωάριο να γονιμοποιηθεί. Την ίδια στιγμή, στο κυτταρόπλασμα παρατηρείται μαζική σύνθεση πρωτεϊνών, οι οποίες είναι απαραίτητες για τη γονιμοποίηση και τα πρώτα στάδια ανάπτυξης του εμβρύου. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, οι αλλαγές αυτές συμβαίνουν ταυτόχρονα ή σχεδόν ταυτόχρονα και απαιτείται η ολοκλήρωση και των δύο προκειμένου το ωάριο να καταστεί γόνιμο. Οποιαδήποτε μεταβολή στη διαδικασία αυτή μπορεί να οδηγήσει σε γενετικές και λειτουργικές ανωμαλίες.^(2,3)

Η μορφολογία των ωαρίων κατά τη διάρκεια της ωληψίας μπορεί να δώσει σημαντικά στοιχεία σχετικά με το στάδιο ωρίμανσης του ωαρίου.⁽⁴⁾ Κατά πλειοψηφία, την ημέρα της λήψης τα ωάρια βρίσκονται στο στάδιο MII. Αυτό πιστοποιείται από την παρουσία του PBI και τη μορφολογία της κοκκιώδους στιβάδας, η οποία έχει αναπτυχθεί σε μεγάλο βαθμό. Τα ωάρια που βρίσκονται στο ενδιάμεσο στάδιο GVBD ή MI διαθέτουν μικρή και πυκνή στιβάδα κοκκιωδών κυττάρων, ενώ τα άωρα ωάρια ξεχωρίζουν λόγω της πολύ μικρής και σκουρόχρωμης στιβάδας κοκκιωδών κυττάρων που τα περιβάλλει (στάδιο GV). Αν και αυτή η μέθοδος αξιολόγησης προσφέρει κάποιες πληροφορίες σχετικά με το στάδιο ωρίμανσης του ωαρίου, δεν είναι πολύ ακριβής και, επιπλέον, δεν προσδίδει καμία πληροφορία σχετικά

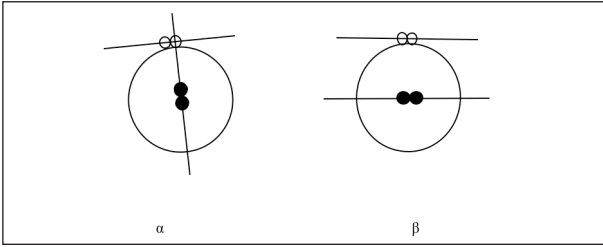
με την ποιότητα του γαμέτη.⁽⁵⁾ Επομένως, κατά τη διάρκεια ενός κύκλου κλασικής IVF, τα ωοκύτταρα συνήθως αναμειγνύονται με σπερματοζωάρια, ανεξάρτητα από τη μορφολογία της κοκκιώδους στιβάδας.

Αντίθετα, στη μέθοδο ICSI, η παρατήρηση των ποιοτικών χαρακτηριστικών είναι εφικτή πριν από την έγχυση, αφού τα κοκκιώδη κύτταρα αφαιρούνται προκειμένου να επιτραπεί η επέμβαση στα ωάρια με τα μικροχειριστήρια, αλλά και να εξεταστεί το στάδιο ωρίμανσής τους.^(6,7) Μόνον ωάρια που έχουν ολοκληρώσει την πρώτη μειωτική τους διαίρεση και έχουν φτάσει στη Μετάφαση II γονιμοποιούνται με τη μέθοδο ICSI.

Η μορφή του κυτταροπλάσματος και της διαφανούς ζώνης μπορούν να δώσουν στοιχεία σχετικά με την ποιότητα των ωαρίων και την ικανότητά τους να γονιμοποιηθούν και να εμφυτευτούν. Θεωρητικά, τα ωάρια με καλή μορφολογία πρέπει να έχουν λείο κυτταρόπλασμα, με σχετική κοκκίωση, μικρό περιληκνυθικό χώρο και άχρωμη, ομοιογενή διαφανή ζώνη.⁽⁸⁻¹⁰⁾ Παρ' όλα αυτά, περίπου τα μισά από τα ωάρια που λαμβάνονται κατά τη διάρκεια ενός κύκλου εξωσωματικής γονιμοποίησης υστερούν σε τουλάχιστον ένα από τα παραπάνω στοιχεία. Έτσι, ως ένα βαθμό, οι δυσμορφίες αυτές θεωρούνται φυσιολογικές,⁽¹¹⁾ αφού πιθανότατα δεν επηρεάζουν την ικανότητα γονιμοποίησης του ωαρίου.^(5,12)

Μέχρι και σήμερα δεν έχει αποσαφηνιστεί αν η μορφολογία του κυτταροπλάσματος του ωαρίου μπορεί να αποτελέσει κύριο χαρακτηριστικό κριτήριο για την επιλογή των ωαρίων με τις καλύτερες πιθανότητες γονιμοποίησης και εμφύτευσης. Σχετικές μελέτες έχουν δείξει ότι η μορφολογία του κυτταροπλάσματος του ωαρίου δεν σχετίζεται με τα ποσοστά γονιμοποίησης ή την ποιότητα των εμβρύων.^(8,13) Από την άλλη πλευρά όμως, σε εμβρυομεταφορές όπου τα έμβρυα προέρχονταν από ωάρια χωρίς κυτταροπλασματικές δυσμορφίες, παρατηρήθηκαν μεγαλύτερα ποσοστά εγκυμοσύνης.⁽²⁾ Για την ακρίβεια, τα ποσοστά εγκυμοσύνης από φυσιολογικά ωάρια αγγίζουν το 29,4%, ενώ τα ποσοστά εγκυμοσύνης από ωάρια με σκούρο κυτταρόπλασμα είναι μόλις 5,5%.⁽²⁾ Τα αποτελέσματα αυτά έχουν επιβεβαιωθεί και από μελέτες οι οποίες παρουσίασαν χαμηλά ποσοστά συνεχιζόμενης κύησης.⁽³⁾ Επίσης, έχει βρεθεί ότι τα ωάρια με μορφολογικές δυσμορφίες συνήθως συνοδεύονται από μεγάλα ποσοστά ανευπλοειδίας.^(3,5,12,14)

Αν και το PBI είναι ένα μη λειτουργικό κύτταρο, έχει βρεθεί ότι η μορφολογία του μπορεί να αποτελέσει ένδειξη για την ποιότητα του ωαρίου.⁽⁹⁾ Το μέγεθος, η παρουσία θραυσμάτων στην γύρω περιοχή και ο εκφυλισμός του σχετίζεται άμεσα με τη δυνατότητα γονιμοποίησης, εμβρυϊκής ανάπτυξης και εμφύτευσης.^(5,9,10,15) Οι δυσμορφίες του PBI αποτελούν ένδειξη πιθανής δυσλειτουργίας της μειωτικής ατράκτου, και κατά συνέπεια, ένδειξη πιθανών ανωμαλιών στα χρωμοσώματα του ωαρίου.⁽¹⁶⁾ Η συσχέτιση της μορφολογίας του PBI



Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση προσανατολισμού των προπυρήνων σε σχέση με το δεύτερο πολικό σωματίο: (α) φυσιολογική θέση προπυρήνων με τον άξονά τους κάθετο με το δεύτερο πολικό σωματίο, (β) προπυρήνες με το άξονά τους παράλληλο προς το δεύτερο πολικό σωματίο.

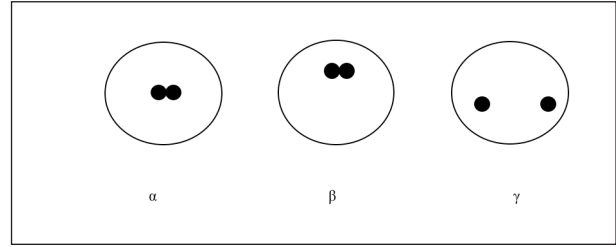
με την ποιότητα των ωαρίων έχει επιβεβαιωθεί ακόμα και σε ωάρια των οποίων η ωρίμανση έχει γίνει *in vitro*.⁽¹⁷⁾

ΖΥΓΩΤΟ

Προπυρήνες

Κατά τη διείσδυση ενός σπερματοζωαρίου μέσα από τη διαφανή ζώνη του ωαρίου, ξεκινάει μια αλληλουχία γεγονότων, η οποία είναι απαραίτητη προκειμένου να επιτευχθεί φυσιολογική γονιμοποίηση. Η κεφαλή του σπερματοζωαρίου διαλύεται και το γενετικό υλικό αποσυμπυκνώνεται δημιουργώντας τον άρρενα προπυρήνα, στο κέντρο του ωαρίου. Ταυτόχρονα, το ωάριο ολοκληρώνει τη μειωτική του διαίρεση, οπότε εμφανίζεται το δεύτερο πολικό σωματίο, και δημιουργείται ο θήλυς προπυρήνας. Κατόπιν, ο θήλυς προπυρήνας μετακινείται προς τον άρρενα, μέχρι οι δύο να συναντηθούν στο κέντρο του κυτταροπλάσματος.⁽⁵⁾ Η μετακίνηση του θήλεως προπυρήνα γίνεται με τη βοήθεια μικροσωληνίσκων που προέρχονται από το κεντρόσωμα του σπερματοζωαρίου και συγκεκριμένων πρωτεϊνών (dynein motor complex). Η μετατόπισή του ολοκληρώνεται με την τοποθέτηση του άξονα των δύο προπυρήνων σε γωνία κάθετη προς τον άξονα του δεύτερου πολικού σωματίου (εικόνα 1α). Οποιαδήποτε μεταβολή στη διαδικασία αυτή μπορεί να προκαλέσει ανωμαλίες στη διαίρεση του εμβρύου.⁽¹⁸⁾ Ένα φυσιολογικά γονιμοποιημένο ωάριο συνήθως περιέχει δυο ισομεγέθεις προπυρήνες οι οποίοι εφάπτονται μεταξύ τους στο κέντρο του ωοπλάσματος (εικόνα 2α).

Αν και στην πλειοψηφία τους τα έμβρυα με δυο προπυρήνες είναι καθ' όλα φυσιολογικά, έχει βρεθεί ότι μπορεί να περιέχουν χαοτικό γονιδίωμα.⁽¹⁹⁾ Επίσης, το σχήμα, το μέγεθος, ο αριθμός και η θέση των προπυρήνων αποτελούν καθοριστικά στοιχεία αξιολόγησης της ποιότητας του γονιμοποιημένου ωαρίου. Μελέτες



Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση φυσιολογικών και μη φυσιολογικών μορφών προπυρήνων: (α) γονιμοποιημένο ωάριο με δυο φυσιολογικούς προπυρήνες, (β) και (γ) γονιμοποιημένο ωάριο του οποίου οι προπυρήνες δεν βρίσκονται στο κέντρο του ωοπλάσματος.

έχουν δείξει ότι γονιμοποιημένα ωάρια των οποίων οι προπυρήνες δε βρίσκονται στο κέντρο του ωοπλάσματος (εικόνα 2β και 2γ) ή που δεν έχουν ίσο μέγεθος ή περιέχουν θραύσματα παρουσιάζουν μεγάλα ποσοστά χρωματοσωμικών ανωμαλιών.⁽²⁰⁾ Η ίδια ομάδα ερευνητών περιέγραψε ότι σε γονιμοποιημένα ωάρια των οποίων ο άξονας των προπυρήνων είναι παράλληλος προς τον άξονα του δεύτερου πολικού σωματίου (εικόνα 1β) ή όταν τα δυο πολικά σωματία βρίσκονται σε απόσταση μεταξύ τους, παρουσιάζουν μεγάλα ποσοστά χρωματοσωμικών ανωμαλιών.⁽²⁰⁾ Ακόμα, το 88,5% των εμβρύων από ICSI και το 50% των εμβρύων από IVF που εμφανίζουν ανισομεγέθεις προπυρήνες, παρουσιάζουν επιπρόσθετα και χρωματοσωμικές ανωμαλίες.⁽²¹⁾ Η εμφάνιση ενός ή τριών προπυρήνων θεωρείται μη φυσιολογική, αφού τα έμβρυα αυτά είναι ανευπλοειδικά και δεν χρησιμοποιούνται σε ένα κύκλο εξωσωματικής.

Πυρηνίσκοι

Οι πυρηνίσκοι συνήθως είναι μικροί σχηματισμοί στο εσωτερικό των προπυρήνων. Είναι το μέρος όπου δημιουργείται το προ-rRNA και είναι άμεσα συναπτόμενοι με τις περιοχές των χρωμοσωμάτων που κωδικοποιούν το rRNA.⁽²²⁾ Είναι προϊόντα αντιγραφής του προπυρήνα και συμμετέχουν στη διαδικασία εναπόθεσης του rRNA στην περιοχή όπου αντιγράφεται.^(23,24) Ακόμα, οι πυρηνίσκοι παρουσιάζουν διάφορους τύπους κατανομής μέσα στον προπυρήνα, ένα φαινόμενο που σχετίζεται άμεσα με τη διαίρεση και την ποιότητα του εμβρύου.^(25,26) Σχετικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα έμβρυα που παρουσιάζουν συγκέντρωση των πυρηνίσκων κοντά στο σημείο όπου εφάπτονται οι δυο προπυρήνες δίνουν καλύτερα ποσοστά εγκυμοσύνης και εμφύτευσης.⁽²⁷⁾ Μια άλλη ομάδα ερευνητών χώρισε τους προπυρήνες σε έξι κατηγορίες, ανάλογα με την κατανομή και τον αριθμό των πυρηνίσκων.⁽²⁸⁾ Το συμπέρασμα ήταν ότι τα γονιμοποι-

ημένα ωάρια που εμφανίζουν τον ίδιο αριθμό και την ίδια κατανομή πυρηνίσκων και στους δυο προπυρήνες (εικόνα 3) έχουν πολύ καλή πιθανότητα να αναπτυχθούν σε βλαστοκύστη και να εμφυτευτούν.^(5,16,26,29-31) Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν και από μελέτες οι οποίες ανέλυσαν το γονιδίωμα των εμβρύων και έδειξαν χαμηλά ποσοστά ανευπλοειδιών στα έμβρυα με τη συγκεκριμένη κατανομή πυρηνίσκων.⁽²⁰⁾

Από την άλλη πλευρά, υποστηρίζεται ότι η μορφολογία των πυρηνίσκων δεν έχει καμία σχέση με την ποιότητα των εμβρύων και τα ποσοστά εγκυμοσύνης. Μάλιστα κάτι τέτοιο αποδείχθηκε μετά από εμβρυομεταφορές ενός μόνου εμβρύου, όπου ήταν δυνατό να υπολογισθούν με ακρίβεια τα ποσοστά εμφύτευσης.⁽³²⁾

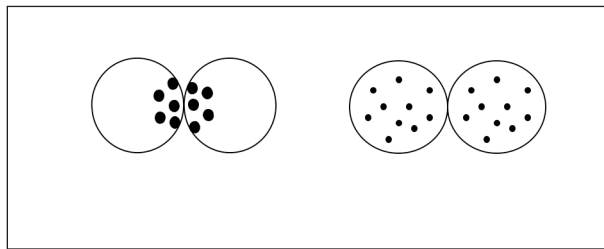
Παρ' όλα αυτά, η μορφολογία των πυρηνίσκων παραμένει ένα σημαντικό κριτήριο αξιολόγησης και επιλογής εμβρύων για εμβρυομεταφορά. Έχει το πλεονέκτημα ότι διεξάγεται γρήγορα και μάλιστα στα πλαίσια ελέγχου για τη γονιμοποίηση των ωαρίων. Για την παρατήρησή τους απαιτείται μικροσκοπιο μεγάλης μεγέθυνσης (συνήθως αναστροφο μικροσκοπιο) και αποτελεί μια αξιόπιστη και μη επεμβατική μέθοδο εκτίμησης της ποιότητας των εμβρύων, σε πολύ αρχικό στάδιο ανάπτυξης. Τέλος, είναι ιδιαίτερα χρήσιμη σε χώρες όπως η Γερμανία, όπου ο αριθμός των εμβρύων που μπορούν να καλλιεργηθούν μετά το στάδιο των προπυρήνων είναι περιορισμένος.

ΕΜΒΡΥΟ

Πρώωρη διαίρεση

Ένα ακόμη χαρακτηριστικό που επιτρέπει την ποιοτική αξιολόγηση των εμβρύων είναι η παρατήρηση του ρυθμού ανάπτυξής τους μετά τη γονιμοποίηση.^(33,34) Έχει παρατηρηθεί ότι τα γονιμοποιημένα ωάρια που έχουν υποστεί την πρώτη τους μιτωτική διαίρεση, 25 – 27 ώρες μετά τη γονιμοποίηση με τη μέθοδο IVF ή ICSI, συνδέονται με διπλάσια ποσοστά εγκυμοσύνης σε σχέση με αυτά που διαιρούνται αργότερα.^(35,36) Ακόμη, η ομάδα των Salumets και συν.⁽³⁷⁾ έδειξε ότι τα ταχέως εξελισσόμενα έμβρυα έχουν καλύτερη αναπτυξιακή ικανότητα. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι τα ποσοστά δημιουργίας βλαστοκύστης, εγκυμοσύνης και εμφύτευσης από εμβρυομεταφορές ενός ή δυο ταχέως αναπτυσσόμενων εμβρύων είναι σημαντικά υψηλότερα.⁽³⁸⁾ Τέλος, έχει παρατηρηθεί ότι τα έμβρυα με γρήγορο ρυθμό ανάπτυξης είναι κατά πλειοψηφία ευπλοειδικά.⁽³⁹⁾

Πρέπει να ληφθεί υπ' όψη ότι το φαινόμενο την πρώωρης διαίρεσης σχετίζεται άμεσα με την ηλικία την γυναίκας και παρατηρείται συχνότερα σε ωάρια που γονιμοποιούνται με τη μέθοδο ICSI. Αυτό, ίσως γιατί με τη μέθοδο ICSI παρακάμπτεται η διαδικασία προσκόλλησης και διεύθυνσης του σπερματοζωαρίου στη διαφανή ζώνη, λόγω της απευθείας έγχυσής του στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου. Κατά συνέπεια, η γονιμοποίηση



Εικόνα 3. Φυσιολογική κατανομή πυρηνίσκων, μέσα στους προπυρήνες.

συμβαίνει συντομότερα από ότι στην κλασική IVF.⁽⁵⁾

Ο λόγος για τον οποίο τα έμβρυα που διαιρούνται νωρίτερα είναι καλύτερης ποιότητας και δίνουν υψηλότερα ποσοστά εγκυμοσύνης και εμφύτευσης δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Πιθανολογείται, όμως, ότι μάλλον οφείλεται σε ενδο-ωαριακούς παράγοντες που συσχετίζονται με το συγχρονισμό της ωρίμανσης του πυρήνα και του κυτταροπλάσματος του ωαρίου, πριν τη γονιμοποίηση.^(5,40)

Μορφολογία εμβρύου κατά τις ημέρες 2, 3 και 4

Τα πλέον συνηθισμένα χαρακτηριστικά ποιοτικής αξιολόγησης των εμβρύων βασίζονται στην παρατήρηση του αριθμού και του σχήματος των βλαστομεριδίων, καθώς και στην παρουσία θραυσμάτων στη γύρω περιοχή.^(4,5) Σε γενικές γραμμές, το ποιοτικά καλύτερο έμβρυο πρέπει να παρουσιάζει συγκεκριμένο αριθμό κυττάρων σε κάθε στάδιο ανάπτυξης, να έχει βλαστομερίδια περίπου ίδιου μεγέθους και λίγα ή καθόλου θραύσματα. Σχετικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα έμβρυα που παρουσιάζουν 4-5 κύτταρα τη δεύτερη ημέρα μετά τη γονιμοποίηση και τουλάχιστον 6-8 κύτταρα την τρίτη, παρουσιάζουν θραύσματα σε λιγότερο από το 20% του συνολικού τους όγκου και δεν εμφανίζουν πολυπύρρινα βλαστομερίδια, έχουν περίπου 30% πιθανότητες να εμφυτευτούν.⁽⁴¹⁾ Τα αποτελέσματα αυτά επαληθεύτηκαν και σε κύκλους εξωσωματικής γονιμοποίησης όπου οι εμβρυομεταφορές περιελάμβαναν ένα μόνο έμβρυο, αν και στη συγκεκριμένη μελέτη ο πληθυσμός των ασθενών ήταν πολύ επιλεγμένος.⁽⁴²⁾

Ακόμα, η χρονική στιγμή κατά την οποία αξιολογούνται τα έμβρυα έχει μεγάλη σημασία. Έχει αποδειχθεί ότι ένα έμβρυο με τέσσερα κύτταρα και λίγα θραύσματα το πρωί της δεύτερης ημέρας έχει περισσότερες πιθανότητες εμφύτευσης από ένα άλλο που την ίδια χρονική στιγμή παρουσιάζει δύο κύτταρα και καθόλου θραύσματα.^(5,43)

Ένα πολύ συχνό φαινόμενο που παρατηρείται κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης είναι η άνηση διαίρεση των βλαστομεριδίων. Ο λόγος για τον οποίο συμβαίνει αυτό δεν είναι πλήρως κατανοητός, σίγουρα όμως γνωρίζουμε ότι έχει αρνητικές επιπτώσεις στο έμ-

βρου. Όπως προκύπτει από έρευνες με τη μέθοδο του φθορίζοντα υβριδισμού *in situ* (FISH), τα έμβρυα με ανισομεγέθη βλαστομερίδια παρουσιάζουν πολύ συχνά ανομοιογενή κατανομή του γενετικού υλικού και κατά συνέπεια αυξημένα ποσοστά χρωμοσωμικών ανωμαλιών.^(5,16,39) Επίσης, τα έμβρυα αυτά δεν έχουν πολλές δυνατότητες ανάπτυξης και εμφύτευσης σε σύγκριση με τα έμβρυα με ισομεγέθη βλαστομερίδια.⁽³⁹⁾ Τέλος, τα ανισομεγέθη βλαστομερίδια συνήθως προκύπτουν από την άνιση κατανομή του κυτταροπλάσματος κατά τη διάρκεια των πρώτων κυτταρικών διαιρέσεων και συχνά παρουσιάζουν περισσότερους από έναν πυρήνα στο κυτταρόπλασμά τους, με αποτέλεσμα η εμφυτευτική τους ικανότητα να είναι περιορισμένη.^(5,39)

Το πλέον ενδεικτικό μορφολογικό στοιχείο της ποιότητας του εμβρύου είναι η παρουσία θραυσμάτων. Οι ακριβείς αιτίες του θρυμματισμού των βλαστομεριδίων δεν είναι πλήρως κατανοητές, έχει αναφερθεί όμως ότι μπορεί να οφείλονται στη δημιουργία ελεύθερων ριζών οξυγόνου (reactive oxygen species – ROS) κατά τη διάρκεια της *in vitro* καλλιέργειας.⁽¹⁶⁾ Η παρουσία θραυσμάτων δεν επηρεάζει πάντα την ανάπτυξη του εμβρύου. Μάλιστα, τα ποσοστά εγκυμοσύνης και εμφύτευσης παραμένουν αμετάβλητα, όταν το ποσοστό θρυμματισμού δεν ξεπερνάει το 10%-20% του συνολικού του όγκου του εμβρύου. Έχει παρατηρηθεί από αρκετές ερευνητικές ομάδες, ότι τα μικρά ποσοστά θραυσμάτων μπορεί να εξαφανιστούν κατά τη διάρκεια της *in vitro* καλλιέργειας, είτε επειδή λύνονται, είτε επειδή πιθανόν απορροφώνται ξανά από τα βλαστομερίδια.^(5,12,39) Παλαιότερες μελέτες θεώρησαν ότι η αφαίρεση των θραυσμάτων με τη βοήθεια μικροχειριστηρίων μπορεί να βελτιώσει τη μορφολογία και τη διαίρεση του εμβρύου.^(5,44) Παρ' όλα αυτά, η μέθοδος αυτή θεωρείται εξαιρετικά επεμβατική για το έμβryo και δεν είναι απόλυτα σαφές αν πραγματικά βοηθά στη βελτίωση της ποιότητας των εμβρύων. Για τον λόγο αυτό έχει εγκαταλειφθεί εδώ και καιρό.

Μελέτες έχουν δείξει ότι σε έμβρυα με μεγάλα ποσοστά θραυσμάτων υπάρχει έκφραση κάποιων γονιδίων απόπτωσης, όπως το bax και το bcl-2, η αναλογία των οποίων καθορίζει εάν το κύτταρο θα εκφυλιστεί ή όχι.^(5,45) Επίσης, η πιθανή μείωση ζωτικών πρωτεϊνών, όπως η λεπτίνη και το STAT 3, από το κυτταρόπλασμα, κατά τη θραύση, μπορεί να προκαλέσουν προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο.^(5,46)

Ένα ακόμα ενδεικτικό χαρακτηριστικό της ποιότητας των εμβρύων είναι ο αριθμός των πυρήνων σε κάθε βλαστομερίδιο. Φυσιολογικά, το κάθε βλαστομερίδιο περιέχει έναν πυρήνα ο οποίος περικλείει το γενετικό υλικό. Παρ' όλα αυτά, έχει παρατηρηθεί ότι αρκετά βλαστομερίδια παρουσιάζουν πολλαπλούς πυρήνες. Αρχικά, το φαινόμενο αυτό είχε αποδοθεί σε μη φυσιολογική γονιμοποίηση, σύντομα όμως έγινε κατανοητό ότι μπορεί να εμφανιστεί και σε έμβρυα που έχουν γο-

νιμοποιηθεί κανονικά. Παρατηρείται κυρίως σε έμβρυα χαμηλής ποιότητας, αλλά και σε έμβρυα καλύτερης ποιότητας σε ποσοστό περίπου 15%.⁽⁴⁷⁾ Ο λόγος για τον οποίο συμβαίνει δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Σίγουρα όμως αποτελεί ένδειξη μωσαϊκισμού και σοβαρών χρωμοσωμικών ανωμαλιών. Παρουσιάζεται συχνότερα μετά την πρώτη και τη δεύτερη μιτωτική διαίρεση, υποδεικνύοντας έτσι ότι μπορεί να σχετίζεται με ανεπαρκή ωρίμανση του ωαρίου ή με ανωμαλίες του γενετικού υλικού στην κεφαλή του σπερματοζωαρίου.⁽⁴⁷⁾ Μελέτες έχουν δείξει ότι τα έμβρυα με πολυπύρηννα βλαστομερίδια παρουσιάζουν πολύ χαμηλά ποσοστά εγκυμοσύνης και εμφύτευσης και μάλιστα συνιστάται η αποφυγή μεταφοράς τέτοιων εμβρύων.^(16,41)

Η παρατήρηση των πολλαπλών πυρήνων στα βλαστομερίδια αποτελεί ένα σημαντικό χαρακτηριστικό αξιολόγησης της ποιότητας ενός εμβρύου. Παρ' όλα αυτά δε χρησιμοποιείται συστηματικά ως κριτήριο για την επιλογή εμβρύων για εμβρυομεταφορά. Είναι γεγονός πως η παρατήρηση των πυρήνων αυτών είναι αρκετά δύσκολη αφού μπορεί να μη φαίνονται λόγω της συνεχούς διαδικασίας διαίρεσης ή λόγω της υψής του κυτταροπλάσματος και της παρουσίας θραυσμάτων.⁽⁴⁷⁾

Το πιο δύσκολο στάδιο αξιολόγησης της ποιότητας του εμβρύου είναι το στάδιο του μοριδίου, αφού θεωρείται περισσότερο ένα μεταβατικό στάδιο ανάπτυξης, πριν τη δημιουργία βλαστοκύστης. Στο στάδιο αυτό, το έμβryo θα πρέπει να φαίνεται ως μια ομοιόμορφη μάζα, τα κύτταρα της οποίας δεν πρέπει να ξεχωρίζουν, λόγω των στενών κυτταρικών δεσμών που δημιουργούνται μεταξύ τους. Η δημιουργία μοριδίου την τέταρτη ημέρα μετά τη γονιμοποίηση προδιαγράφει τη δημιουργία βλαστοκύστης με αυξημένες πιθανότητες εμφύτευσης.⁽¹⁶⁾

ΒΛΑΣΤΟΚΥΣΤΗ

Τα έμβρυα που φθάνουν στο στάδιο της βλαστοκύστης είναι συνήθως τα ποιοτικά καλύτερα και αυτά που έχουν τις περισσότερες πιθανότητες εμφύτευσης. Ο λόγος για τον οποίο συμβαίνει αυτό είναι ότι τα ανθρώπινα έμβρυα, στο αρχικό στάδιο ανάπτυξης, ελέγχονται αποκλειστικά από το μητρικό γονιδίωμα, αφού το εμβρυϊκό γονιδίωμα ενεργοποιείται μετά από τη δεύτερη κυτταρική διαίρεση.⁽⁴⁸⁾ Κατά συνέπεια, οι κύριες βλάβες του εμβρύου συνήθως εμφανίζονται μετά το στάδιο των οκτώ κυττάρων ή του μοριδίου. Έτσι, η παρατεταμένη *in vitro* καλλιέργεια εμβρύων προσφέρει έναν τρόπο φυσικής επιλογής των ποιοτικά καλύτερων εμβρύων.

Η μορφολογία των βλαστοκύστων διαφέρει ανάλογα με την ποιότητά τους. Κατά γενική ομολογία, όταν μια βλαστοκύστη παρουσιάζει διάταση, ομοιογενή τροφobλάστη και ευκρινή, συμπαγή έσω κυτταρική μάζα την πέμπτη ημέρα μετά τη γονιμοποίηση έχει περίπου 50% πιθανότητες να εμφυτευθεί.⁽⁴⁹⁾ Διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι τα ποσοστά εμφύτευσης των βλαστο-

κύστεων κυμαίνονται από 60%⁽⁵⁰⁾ έως και 67%.⁽⁵¹⁾ Πρόσφατες προοπτικές τυχαίοποιημένες μελέτες, στις οποίες μεταφέρετο μια μόνο βλαστοκύστη σε κάθε γυναίκα, παρουσίασαν ποσοστά εγκυμοσύνης από 42% έως και 61%.^(52,53)

Μελέτες έχουν δείξει ότι η μορφολογία της βλαστοκύστης, ως μεμονωμένο χαρακτηριστικό, δεν μπορεί να αποκλείσει την πιθανότητα ύπαρξης γενετικών ανωμαλιών στο έμβρυο. Έχει αναφερθεί ότι οι βλαστοκύστες μπορεί να παρουσιάσουν μεταζυγωτικό χρωματοσωμικό μωσαϊκισμό με τριπολικές και τετραπολικές μιτωτικές ατράκτους στον πυρήνα ορισμένων κυττάρων.⁽⁵⁴⁾ Επίσης, είναι γνωστό ότι ακόμη και τα ανευπλοειδικά έμβρυα μπορούν να αναπτυχθούν σε βλαστοκύστη σε ποσοστό που ανέρχεται στο 37%.⁽⁵⁵⁾

Η καλλιέργεια εμβρύων *in vitro* μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης επιτρέπει τη μείωση του αριθμού των εμβρύων που μεταφέρονται στη μήτρα, περιορίζοντας τις πολύδυμες κησείς χωρίς να μειώνει τα ποσοστά εγκυμοσύνης και εμφύτευσης, μετά από εξωσωματική γονιμοποίηση.^(5,33,53)

Μελέτες έχουν δείξει ότι η δημιουργία βλαστοκύστης εξαρτάται από τον αριθμό των διαθέσιμων ωαρίων και από τον αριθμό των βλαστομεριδίων κατά την τρίτη ημέρα καλλιέργειας.⁽⁵¹⁾

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η ανάπτυξη των ωαρίων και των εμβρύων είναι μια πολύπλοκη, δυναμική και πολυπαραγοντική διαδικασία. Οποιαδήποτε διαταραχή στη διαδικασία αυτή μπορεί να προκαλέσει ανωμαλίες ή ακόμα και τη διακοπή της ανάπτυξης του εμβρύου. Κάθε στάδιο ανάπτυξης παρουσιάζει χαρακτηριστικά που είναι ενδεικτικά της ποιότητας και της δυνατότητας γονιμοποίησης και εμφύτευσης των εμβρύων. Κανένα από τα παραπάνω κριτήρια δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί από μόνο του για την αξιολόγηση της ποιότητας. Η επιλογή του ποιοτικά και γενετικά καλύτερου εμβρύου την ημέρα της εμβρυομεταφοράς πρέπει να γίνεται συνδυάζοντας τα κριτήρια αξιολόγησης, καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξής του και όχι με βάση ένα μόνο από τα χαρακτηριστικά μιας συγκεκριμένης ημέρας. Τέλος, είναι γεγονός ότι κάποια μορφολογικά χαρακτηριστικά είναι ενδεικτικά των δυνατοτήτων ανάπτυξης ενός εμβρύου. Η καλύτερη κατανόησή τους έχει οδηγήσει στη μείωση του αριθμού των μεταφερόμενων εμβρύων, περιορίζοντας τις πολύδυμες κησείς, χωρίς να επηρεαστούν τα ποσοστά εμφύτευσης και εγκυμοσύνης.

Summary

Loutradi K, Tarlatzis B.

Morphological characteristics for quality assessment of ova and embryos in embryo transfer

Helen Obstet Gynecol 18(4):279-286, 2006

The production of supernumerary embryos during a cycle of assisted reproduction led to the development of embryo grading systems for the evaluation of their quality. These systems facilitate the selection of embryos with the best implantation potential and also aid to reduce the number of embryos transferred, without influencing the pregnancy and implantation rates. The most usual way of qualitative evaluation is based on the observation of embryo morphology, which includes characteristics such as the number and the position of pronuclei, the rate of development and the presence of fragments. The choice of the morphologically and genetically optimal embryo for transfer should be carried out based on the morphological characteristics that have been observed during embryo development and until the day of transfer.

Key words: embryo, embryo quality, embryo transfer, morphology, quality assessment.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Edwards RG, Fishel SB, Cohen J, Fehilly CB, Purdy JM, Slater JM, Steptoe PC, Webster JM. Factors influencing the success of in-vitro fertilization for alleviating human infertility. *J In Vitro Fert Emb Transf* 1984; 1, 3-23.
2. Loutradis D, Drakakis P, Kallianidis K, Milingos S, Dendrinis S, Michalas S. Oocyte morphology correlates with embryo quality and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1999; 72(2):240-4.
3. Kahraman S, Yakin K, Donmez E, Samli H, Bahce M, Cengiz C et al. Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection. *Hum Rprod* 2000; 15:2390-3.
4. Veeck LL. The morphological assessment of human oocytes and early conception. In: Keel BA, Webster BW(eds). *Handbook of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility*. CRC Press, Boca Raton, Boston, 1990; pp. 353-69.
5. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Tews G. Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: a review. *Hum Reprod Update* 2003; 9(3):251-62.
6. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340:17.
7. Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smits J et al. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Rprod* 1992; 8:1061-6.
8. De Sutter P, Dozortev D, Qian C et al. Oocyte morphology does not correlate with fertilization rate and

- embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Rprod* 1996; 11:595-597.
9. Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Feichtinger O, Tews G. Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection. *Hum Rprod* 2000; 15(2):427-30.
 10. Xia P. Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. *Hum Rprod* 1997; 12:1750-5.
 11. Meriano JS, Alexis J, Visram-Zaver S, Cruz M, Casper RF. Tracking of oocyte dysmorphism for ICSI patients may prove relevant to the outcome in subsequent patient cycles. *Hum Rprod* 2001; 16:2118-23.
 12. Van Blerkom J, Henry G. Oocyte dysmorphism and aneuploidy in meiotically- mature human oocytes after ovarian stimulation. *Hum Reprod* 1992; 7:379-90.
 13. Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R. Oocyte morphology does not affect fertilization rate, embryo quality and implantation rate after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Rprod* 1998; 13(12):3431-343.
 14. Plachot M, Veigha A, Montagut J, de Grouchy J, Calderon G, Lepretre S et al. Are clinical and biological parameters correlated with chromosomal disorders in early life: a multicentric study. *Hum Rprod* 1988; 3:627-33.
 15. Ebner T, Moser M, Yaman C, Feichtinger O, Hartl J, Tews G. Elective embryo transfer of embryos selected on the basis of polar body morphology is associated with increased rates of implantation and pregnancy. *Fertil Steril* 1999; 72(4):599-603.
 16. Tucker KE, Jansen CAM. Why should we assess oocyte and embryo morphology? Proceedings 2nd International workshop for Embryologists: Troubleshooting Activities in the ART lab, 2002; pp.1-11.
 17. Mikkelsen AL, Lindenberg S. Morphology of in vitro matured oocytes: impact on fertility potential and embryo quality. *Hum Rprod* 2001; 16(8):1714-8.
 18. Edwards RG, Beard HK. Oocyte polarity and cell determination in early mammalian embryos. *Molecular Hum Rprod* 1997; 3:863-905.
 19. Lim AS, Goh VH, Su CL, Yu SL. Microscopic assessment of Pronuclear embryos is not definitive. *Hum Gen* 2000; 107:62-8.
 20. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Fortini D, Grieco N. Pronuclear morphology and chromosomal abnormalities as scoring criteria for embryo selection. *Fertil Steril* 2003; 80(2):341-9.
 21. Manor D, Drugean A, Stein D, Pillar M, Itskovitz-Elidor J. Unequal Pronuclear size – A powerful predictor of embryonic chromosomal anomalies. *J Assist Reprod Gen* 1999; 16:385-9.
 22. Hernandez-Verdun D, Roussel P, Gebrane-Younes J. Emerging concepts of nucleolar assembly. *J Cell Sci* 2002; 115:2265-70.
 23. Jiminez-Garcia L.F, Segura-Valdez L, Ochs RL, Rothblum LI, Hannan R, Spector DL. Nucleologenesis: U3 snRNA containing prenucleolar bodies move to sites of active Pre-rRNA transcription after mitosis. *Molecular Biology of the Cell* 1994; 5:955-66.
 24. Tesarik J, Kopecny V. Assembly of the nucleolar precursor bodies in human male pronuclei is correlated with an early RNA synthetic activity. *Exp Cell Res* 1990; 191:153-6.
 25. Scott L, Alvero R, Leondires M, Bradley M. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Rprod* 2000; 15:2394-403.
 26. Tesarik J, Junca AM, Hazout A, Aubriot FX, Nathan C, Cohen-Bacrie P et al. Embryos with high implantation potential after intracytoplasmic sperm injection can be recognized by a simple, noninvasive examination of PN morphology. *Hum Rprod* 2000; 15:1396-9.
 27. Scott LA, Smith S. The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Hum Rprod* 1998; 13(4):1003-13.
 28. Tesarik J GE. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Rprod* 1999; 14:1318-23.
 29. 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 Rprod* 2001; 16:2357-61.
 30. Montag M, Van der Ven H. Evaluation of pronuclear morphology as the only selection criterion for further embryo culture and transfer: results of a prospective multicentre study. *Hum Rprod* 2001; 16(2384):2389.
 31. Wittemer C, Bettahar-Lebugle K, Ohl J, Rongieres C, Nisand I, Gerlinger P. Zygote evaluation: an efficient tool for embryo selection. *Hum Rprod* 2000; 15:2591-7.
 32. Salumets A, Hyde Bn-Granskog C, Suikkari AM, Tiitinen A, Tuuri T. The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality. *Hum Rprod* 2001; 16:2177-81.
 33. Sakkas D, Gardner DK. Non-invasive methods to assess embryo quality. *Cur Op Obs & Gyn* 2005; 17:283-8.
 34. Bavister BD. Timing of embryo development. In: Van Soom A BM, editor. Assessment of mammalian embryo quality: invasive and non-invasive techniques. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer's Academic

- Publishers, 2002; pp.139-55.
35. Sakkas D, Shoukir Y, Chardonnens D, Bianchi PG, Campana A. Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability. *Hum Rprod* 1998; 13:182-7.
 36. Shoukir Y, Campana A, Marley T, Sakkas D. Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Hum Rprod* 1997; 12:1531-6.
 37. Salumets A, Hyden-Granskog C, Makinen S et al. Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures. *Hum Rprod* 2003; 18:821-5.
 38. Van Montfoort APA, Dumoulin JCM, Kester ADM, Evers JLH. Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfers. *Hum Rprod* 2004; 19:2103-8.
 39. Hardarson T, Hanson C, Sjogren A, Lundin K. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum Rprod* 2001; 16:313-8.
 40. Sakkas D, Percival G, D'Arcy Y, Sharif K, Afnan M. Assessment of early cleaving in vitro fertilized human embryos at the 2- cell stage before transfer improves embryo selection. *Fertil Steril* 2001; 76:1150-6.
 41. Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Valkenburg M, Van de Meerssche M, Ryckaert G et al. Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer. *Hum Rprod* 1999; 14:2345-9.
 42. De Neubourg D, Gerris J, Mangelschots K, Van Royen E, Vercruyssen M, Elseviers M. Single top quality embryo transfer as a model for prediction of early pregnancy outcome. *Hum Rprod* 2004; 19:1476-9.
 43. Ziebe S, Petersen K, Lindenberg S, Andersen AG, Gabrielsen A, Andersen AN. Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. *Hum Rprod* 1997; 12:1545-9.
 44. Alikani M, Palermo G, Adler A, Bertoli M, Blake M, Cohen J. Intracytoplasmic sperm injection in dysmorphic human oocytes. *Zygote* 1995; 3:283-8.
 45. Warner CM, Cao W, Exley GE, McElhinny AS, Alikani M, Cohen J, Scott RT, Brenner CA. Genetic regulation of egg and embryo survival. *Hum Rprod* 1998; 13(Suppl 3):178-90.
 46. Antczak M, Van Blerkom J. Oocyte influences on early development: the regulatory proteins leptin and STAT3 are polarized in mouse and human oocytes and differentially distributed within the cells of the preimplantation embryo. *Reprod Fert Dev* 1996; 8:235-41.
 47. Ziebe S, Petersen K, Lindenberg S, Andersen AG, Gabrielsen A, Andersen AN et al. The frequency and developmental capability of human embryos containing multinucleated blastomeres. *Hum Rprod* 1997; 12 (4):800-4.
 48. Braude P, Bolton V, Moore S. Human gene expression first occurs between the four- and eight cell stage of preimplantation development. *Nature* 1988; 332:459-61.
 49. Gardner DK, Schoolcraft WB, Wagley L, Schlenker T, Stevens J, Hesla J. A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. *Hum Rprod* 1998; 13:3434-40.
 50. Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril* 2000; 73:1155-8.
 51. Langely DT, Marek DM, Gardner DK, Doody KM, Doody KJ. Extended embryo culture in human assisted reproduction treatments. *Hum Rprod* 2001; 16:902-8.
 52. Gardner DK, Surrey E, Minjarez D, Leitz A, Stevens J, Schoolcraft WB. Single blastocyst transfer: a prospective randomized trial. *Fertil Steril* 2004; 81:551-5.
 53. Papanikolaou EG, Camus M, Kolibianakis EM, Van Landuyt L, Van Steirteghem A, Devroey P. In vitro fertilization with single blastocyst-stage versus single cleavage-stage embryos. *NEJM* 2006; 354:1139-46.
 54. Chatzimeletiou K, Morrison EE, Prapas N, Prapas Y, Handyside AH. Spindle abnormalities in normally developing and arrested human preimplantation embryos in vitro identified by confocal laser scanning microscopy. *Hum Rprod* 2005; 20(3):672-82.
 55. Sandalinas M, Sadowy S, Alikani M, Calderon G, Cohen J, Munni S. Developmental ability of chromosomally abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage. *Hum Rprod* 2001; 16:1954-8.