

Embriószelekció: az elmúlt negyven év áttekintése



Máté Gábor dr., Török Attila dr.

Pannon Reprodukciós Intézet, Tapolca (igazgató: Dr. Török Attila, egyetemi magántanár)

Idén, 2018-ban ünnepli negyvenedik születésnapját a világ első „lombik” gyermeke, Louise Joy Brown, maga a mesterséges megtermékenyítés hajnala pedig még korábbra, közel hatvan évvel ezelőtre tehető. Az ez óta eltelt időszakban számos, jelentős fejlődésen ment keresztül az in vitro fertilizáció. Kezdetben, hogy növeljék a teherbeesési esélyeket, jellemzően 3-4 embrió került visszahelyezésre. Ezzel ellentétben napjaink egyik legfőbb törekvése, hogy minimalizáljuk a beültetésre kerülő embriók számát, elkerülendő az ikerterhesség kialakulásának kockázatát. Ez azonban csak úgy lehetséges, ha minél mélyebb betekintést nyerünk az embriók genetikai, molekuláris és biokémiai folyamataiba, hogy kiválaszthassuk azt az (egy) embriót, amelyet visszaültetve a legnagyobb a teherbeesés esélye. Közleményünk célja, hogy bemutassuk az elmúlt évtizedek vívmányait, „trendjeit” az embriószelekció területén, megemlítve azok előnyeit, hátrányait, potenciális etikai vonatkozásait.

Kulcsszavak: meddőség, embriószelekció, asszisztált reprodukció

Embryo selection: overview of the last 40 years

In this year – in 2018 – there is the 40th anniversary of the birth of first child, Louise Joy Brown, born from in vitro fertilization (IVF). The dawn of IVF was a little earlier, approximately sixty years ago. During this time, IVF has gone through several significant developments. At an early stage, usually 3-4 embryos were transferred to increase the chance of pregnancy. In contrast with this, the most important effort of present days to reduce the number of transferred embryos, in order to minimize the incidence of twins and related risks. This can be performed by the holistic cognition of genetic, molecular and biochemical backgrounds of embryos; it may help us to choose that embryo (only one) which gives the greatest chance to obtain pregnancy. The aim of the present study was to introduce the most important achievements and trends of embryo selection in the last few decades including their advantages, disadvantages and their potential ethical concerns.

Keywords: infertility, embryo selection, assisted reproduction

Bevezetés

1959-ben, Min Chueh Chang volt az első, aki mesterséges megtermékenyítéssel próbálkozott állati modellszervezeteken, majd pedig újabb hét évbe telt, míg Edwards és munkatársai (1966) publikálták az első sikeres emberi petesejt megtermékenyítését [1]. Az első humán terhesség, amelyet asszisztált reprodukciós technikák (ART) segítségével sikerült elérni, Ausztráliában történt, azonban ennek a próbálkozásnak vetélés lett a vége [2]. Mintegy negyven éve, 1978. július 25-én, az angliai Oldhamben született meg a világon az első „lombikbébi”, Louise Joy Brown [3]. Magyarországon pedig valamivel kevesebb, mint 11 évvel később, 1989. május 24-én jött világra az első in vitro fertilizációból (IVF) fogant gyermek.

Annak ellenére, hogy közel 60 éves múltat tekint vissza az ART története, a mai napig sincs olyan 100%-os módszer, amellyel garantálni lehetne a terhesség sikerességét. Az asszisztált reprodukció korai időszakában alacsony terhességi arányokra lehetett számítani. A terhességi ráták emelésére ebben az időszakban az egyedüli lehetőség az volt, hogy egyszerre több embrió került visszahelyezésre, jellemzően 3-4. A több embrió visszahelyezése a javuló terhességi arányok mellett azonban jelentősen növelte az iker-, sok esetben a többes ikerterhességek számát. A technika fejlődése egyben azt is eredményezte, hogy ma már 3-4 embrió visszahelyezésére nincsen szükség. Megjegyzendő, hogy hazánkban a törvényi szabályozás nem követte a technikai fejlődést: napjainkban is 3, illetve speciális esetekben akár 4 embrió visszahelyezése is megengedett. Habár a beülte-

Levelezési cím: Dr. Török Attila, Pannon Reprodukciós Intézet, 8300 Tapolca, Bartók Béla u. 1–3., tel.: 06 87 510 365
E-mail: torok.attila@pri.hu

tett embriók számával arányosan nőnek a teherbeesési esélyek, azonban ezzel párhuzamosan nő az ikerterhesség kockázata is, amelynek következtében az anyai- és a magzati kockázat is nő. Valamennyi szülész-nőgyógyász számára ismert a Hellin-szabály, amely az ikerterhességek gyakoriságát mutatja. Minden n számú szülésre jut egy ikerterhesség, n^2 szülésre egy hármás ikerterhesség és n^3 szülésre pedig egy négyes ikerterhesség. Hazánkban az n értéke 1996-ig nem változott, átlagosan 89 volt. Az asszisztált reprodukciós módszerek elterjedésével az n érték folyamatosan csökkent, mélypontját 2007-ben érte el, ekkor 55 volt. Az elmúlt 10 évben lassú javulás következett be, de az n érték továbbra is 60 körül van [4]. Az asszisztált reprodukciós technikák fejlődésével napjainkban már egy darab háromnapos embrió visszaültetésével 10-30% körüli klinikai terhességi rátára lehet számítani; egy darab, ötnapos blasztociszta visszahegyezés esetén pedig 40-60% körüli eredményességre [5–9].

A lombikkezeltések sikeressége több tényezőtől függ:

- a helyesen kivitelezett petefészek-stimulációtól,
- a petesejt megtermékenyítésének technikájától,
- a tenyésztő tápoldat összetételétől,
- a megfelelő mikromanipulációtól és embriótranszfertől,
- végül pedig a megfelelő embrióselektiótól [5].

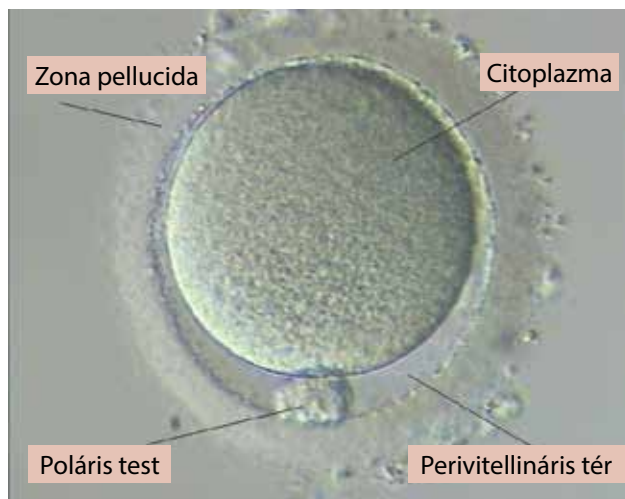
Az utóbbi időben az embriók megfigyelésében és a beültetésre kerülő embrió(k) kiválasztásában vallott nézetek nagymértékben megváltoztak. Mind az állatokon végzett modellkísérletek, mind pedig a humán klinikai vizsgálatok arra a kérdésre keresik a választ, hogy hogyan válasszuk ki azt az egy darab embriót, amelyet beültetve a teherbeesési esélyek növelhetőek. Ezek a kutatások alapvetően két célt szolgálnak. Egyrészt a visszaültetésre alkalmas embriók minőségéről és az adott embrióhoz társított terhességről nyújtanak információt, másrészt pedig igyekeznek a beültetésre kerülő embriók számát minimalizálni (eSET: elektív egyes embriótranszfer). Tovább bonyolítja a dolgot a betegek abbéli hibás meggyőződése, hogy egy embrió visszahelyezésével csökkennek az esélyeik. Figyelmen kívül hagyják, illetve, sok esetben nem is tudnak arról, hogy egy eSET-nél az élveszületési arány magasabb lehet, mint egy nemelektív, két embrióval végrehajtott transzfernél. Közleményünk célja, hogy az alábbiakban bemutassuk az utóbbi 40 év legfontosabb „trendjeit” az embrióselektív terén.

Morfológián alapuló osztályozási rendszerek

Tisztán morfológiai osztályozás

Az embriók vizuális – azok fejlődésén és morfológiáján alapuló – osztályozása a mai napig a legszélesebb körben elterjedt minősítési rendszer, amelyből a világon több elfogadott rendszer is létezik (CES, CSS, D3EQ, Gardner-skála, SART-rendszer stb.) [7, 10–12].

Minden jó minőségű embrió egy jó minőségű petesejttel indul. Petefészek hiperstimuláció esetén, a leszívott petesejtek átlagosan 85%-a termékenyítésre alkalmas ún.

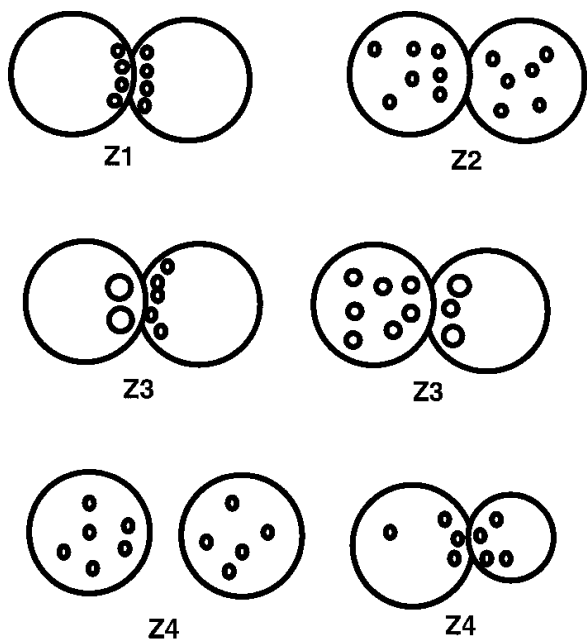


1. ábra. Petesejt az MII fázisban (Máté Gábor)

érett állapotban van (metafázis II; MII). A cumulus sejtek eltávolítása után a MII petesejtek egy darab jól látható poláris testet (PB) tartalmaznak a perivitellinális térben (PVS) (1. ábra). A petesejtek kb. 10%-a ún. germilális vezikula (GV, első meiotikus osztódás profázis I), amely egy intracitoplazmatikus sejtmagot tartalmaz, PB-t viszont nem. Végül pedig, 5%-os előfordulással, nem figyelhető meg sem PB, sem pedig intracitoplazmatikus sejtmag. Az ilyen petesejteket éretlen (metafázis I, MI) petesejtnak nevezzük. Megemlítendő még az óriás petesejtek is, amelyek bár kinézetre teljes mértékben az MII petesejtekre hasonlítanak, azonban méretüket tekintve lényegesen nagyobbak, mivel a normális kromoszómaszám dupláját tartalmazzák [13].

16-19 órával az intracitoplazmatikus spermiuminjektálás (ICSI) után – megfelelően termékenyült petesejtek esetén – a zigóták két pronucleust (PN) tartalmaznak, amelyek közül az egyik a petesejt, membránnal körülvett haploid kromoszóma-készletét tartalmazza; a másik pedig a spermium fejének dekondenzálódott kromatin állományát. IVF esetén a PN-ek megjelenése mintegy 4 órával későbbre tehető. A PN-ek megjelenésével párhuzamosan, a petesejt második meiotikus osztódásának köszönhetően, megfigyelhető a második PB (ideális esetben az első PB környezetében). A zigóták osztályozásánál fontos paraméter a

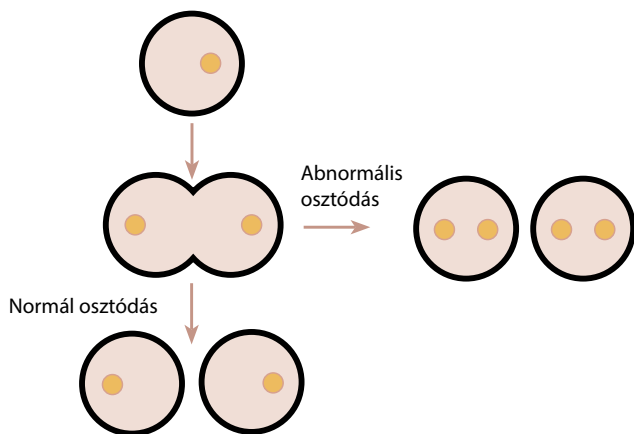
- PN-ek mérete. Normális esetben közel azonos méretűek, vagy csak kis különbség figyelhető meg. Amennyiben nagy különbség tapasztalható, akkor valószínűsíthető valamilyen kromoszomális rendellenesség, mint például az aneuploidia [14].
- Második klasszifikációs szempont a PN-ek lokalizációja. Normális elhelyezkedésről akkor beszélhetünk, amikor a citoplazma közepén, mintegy érintkezve, egyvonalban, appozícióban vannak a PN-ek. Ha az elhelyezkedés acentrikus, vagy a két PN egymástól távol található, akkor az valamilyen termékenyülési rendellenességet jelenthet.
- A PN-eken belül helyezkednek a nukleáris prekurzor testek (NPB). Ezek olyan sejtmagi organellumok, amelyekben a meiózishoz és a sejtosztódáshoz szükséges preriboszómális RNS-ek szintetizálódnak. Ideális esetben a számuk 3 és 10 közé tehető mindegyik PN-ben,



2. ábra. Zigóták klasszifikációs rendszere, Scott és munkatársai (2000) nyomán

és a maximális különbség a két PN között 1 és 3 között helyezkedik el [15]. A NPB-t osztályozva a zigóták négy csoportba különíthetők el (Z1, Z2, Z3, Z4). Z1 és Z2 képviseli a normális sejtmag-morfológiát, míg Z3 és Z4 az abnormális. A legjobb értéknek a Z1-kategória tekinthető, ahol a PN-ek és a NPB-k egyenlő méretűek és az NPB-k polarizált elhelyezkedésűek, valamint egyenlő számban vannak jelen. A második legjobb kategória a Z2, amelynél a PN-ek és NPB-k egyenlő méretűek és az NPB-k egyenlő számban vannak jelen, azonban azok elhelyezkedése nem polarizált. A Z3 és Z4 osztályok alá tartozó zigótákban vagy eltérő méretűek a PN-ek és/vagy az NPB-k; vagy nagymértékű eltérés tapasztalható az NPB-k számában, az egyes PN-ben; vagy pedig a PN-ek nincsenek appozícióban (2. ábra).

- Mind a petesejtekben, mind pedig a zigótákban előfordulhatnak vakuólumok, amelyek membránnal körülvett



3. ábra. Blastomerek normális és abnormális osztódásának sematikus ábrája (Máté Gábor)

citoplazmatikus PVS-zárványok. Számuk és méretük változó, azonban a nagyméretű vakuólumokat tartalmazó zigóták nagy gyakorisággal mutatnak hibás sejtosztódást [16].

- Mind a zigóták esetében, mind pedig a petesejtekénél – a vakuoláltságon felül – megfigyelhetők egyéb citoplazma abnormalitások. Normál esetben a citoplazma homogén közeget képez, azonban heterogén, szemcsés, granulált állapot is ismert, amelynek fejlődésre, beágyazódásra gyakorolt hatása egyelőre nem teljesen tisztázott [17].

A termékenyülés ellenőrzését követően, hogy elkerüljük a potenciális kromoszóma-rendellenességek egy részét, a második napon célszerű a preembrió alkotó sejtek (blasztomerek) nukleálságának ellenőrzése. A zigóta (2PN) állapotot követően, a mitózzissal osztódó embrió minden sejtje normálesenben egyetlen egy darab sejtmagot tartalmaz. Amennyiben valamilyen zavar támad a sejtosztódásban, akkor a sejt(ek) egynél több sejtmagot fog tartalmazni. Ez az állapotot multinukleált állapotnak nevezzük (3. ábra) [18]. Amennyiben multinukleált állapotot tapasztalunk akár 2, akár 3 napos fejlettségi állapotnál, akkor célszerű azt feljegyezni és az embriótranszferrél figyelembe venni, mert ez jelenthet akár sejtmagfragmentációt vagy hibás kromoszóma-szegregációt [19]. A zigóta állapot ellenőrzését követően a sejtek in vitro osztódásának osztályozására kerül sor, amelyet végrehajthatunk a második, a harmadik, a negyedik, az ötödik, illetve némely esetben a hatodik napokon egyaránt. A második és harmadik napon történő klasszifikáció alapvetően három paramétert vizsgál:

- a blasztomerek számát,
- a blasztomerek méretét,
- valamint az embriók fragmentáltságát.

Továbbá ez kiegészíthető a fentebb ismertetett vakuolizáltság, granuláltság és multinukleáltság ellenőrzéssel. Az ideális osztódási mintázat alapján az embriók 4 sejtet tartalmaznak a második napon, és 8 sejtet a harmadikon. Azonban megfigyelhetőek ettől eltérő számok is. Pl. 6-8 sejt a második napon, vagy 10-12, de akár 16 sejt a harmadik napon. Negatív irányban is tapasztalható eltérés: pl. 2 sejt a második napon, illetve 5 sejt a harmadikon (4. ábra). Az ilyen jellegű, kevesebb sejttel rendelkező, aszinkron embriókat lehetőség szerint nem választjuk ki embriótranszferre. A második paraméter, amellyel kategorizálhatunk egy embriót, a blasztomerek mérete. A méret, illetve az aktuális sejtszám között szoros korreláció figyelhető meg. 2-4-8 sejt esetén, a blasztomerek mérete ideális esetben megegyezik. Aszinkron osztódás esetén, pl. a 6 blasztomert tartalmazó preembrió szintén jó minőségűnek mondható, amennyiben az 2 nagyobb és 4 kisebb sejtet tartalmaz, ugyanis ebben az esetben 4 db, a harmadik osztódáson átesett sejtet láthatunk; illetve 2 db, még osztódás előtt állót. A 7 sejtes embrióknál ugyanez a logika alkalmazható: 6 kisebb, már osztódott; és 1 nagyobb, amely még nem tette ezt meg [20]. Végül a harmadik tulajdonság, amellyel a preembriókat osztályozhatjuk, az embrió fragmentáltsága, amely kisebb, anukleált, tehát sejtmagot nem tartalmazó törmeléknek jelent a blasztomerek között. Azon embriók, amelyek nem, vagy csak elhanyagolható mértékben tartalmaznak fragmentumokat, azok im-



4. ábra. 2-, 4-, 6- és 8 sejtés preembriók (Máté Gábor)

plantációs képessége nagyobb, szemben a fragmentált embriókkal. Minden embrió három karakterrel írható le: az első karakter a sejtszámot jelöli, a második a blasztomerek szimmetriájára utal (A: egyenlő, B: egyenlőtlen, C: citoplazma abnormalitások), a harmadik karakter pedig az embrió fragmentáltságát (1: nincs fragmentáció, 2: fragmentáció <20%, 3: fragmentáció 20-50%, 4: fragmentáció >50%). Ennek megfelelően az optimális minőségű embrió a harmadik napon 8A1 (5. ábra) [5].

Amennyiben negyedik napon történik az embriótranszfer, és a blasztomerek közötti határ már nem rajzolódnak ki rendesen, akkor kompaktálódó embrióról (C1), moruláról beszélünk, ha pedig teljesen eltűnt már, akkor kompaktálódott (C2). Némely esetben már a harmadik

napon is megfigyelhető a jelenség, ekkor a kompaktáltság feltűntetése plusz információval szolgálhat (6. ábra) [20]. Blasztociszta állapotban három paramétert rögzítünk: a blasztociszta fejlettségi állapotát, az embriócsomó fejlettségét, illetve a trofoblaszt réteg állapotát (7. ábra) [21]. A blasztociszták fejlettsége tulajdonképpen a központi üregnek, a blasztocölnek a méretét, valamint a peteburok intaktágát (hatchingelődött-e a blasztociszta vagy sem) jelenti. Ez alapján hat fejlettségi állapotot különböztethetünk meg:

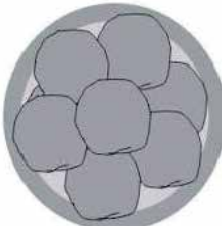
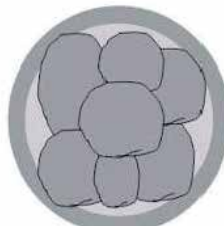

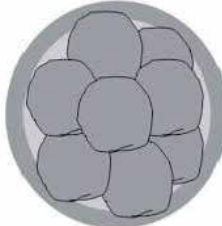
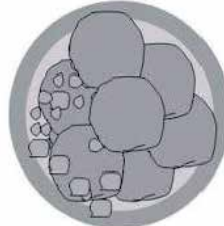
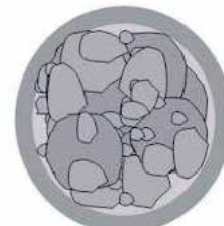
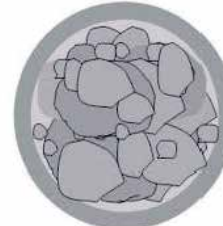
- 1 a blasztociszta ürege nem éri el az embrió térfogatának a felét;
- 2 a blasztocöl meghaladja az embrió térfogatának felét;
- 3 a blasztocöl teljesen kitölti az embriót. Amennyiben egy embrió ideálisan fejlődik, akkor az ötödik napra ezt a harmadik fejlettségi kategóriát el kell érnie.
- 4 Az embriónak méretbeli növekedése figyelhető meg, az embriót körülölelő zona pellucida pedig elvékonyodik;
- 5 a zona pellucida felreped (hatching), és a trofoblaszt néhány sejtje kitéremkedik azon;
- 6 az embrió teljes egészében kikerül a zona pellucida-n kívülre.

Az embriócsomót, felépítése alapján 4 csoportba sorolhatjuk:

- A az embriócsomót sok sejt alkotja, amelyek szorosan helyezkednek el;
- B az embriócsomót sok sejt alkotja, sejtjei laza csoportot képeznek;
- C az embriócsomó kevés sejtből áll;
- D embriócsomó nem látható.

A trofoblaszt osztályozására hasonló jelölés alkalmazható:

- A a trofoblaszt sok sejtből áll, összefüggő réteget alkotva;
- B a trofoblasztot már kevesebb sejt alkotja, laza réteget alkotva;
- C kevés, nagyméretű sejtből áll a trofoblaszt réteg;

A Egyenlő méretű blasztomerek 	B Nem egyenlő méretű blasztomerek 	C Citoplazma defektusok 	
1 Nincs fragmentáció 	2 Fragmentáció < 20% 	3 Fragmentáció 20-50% 	4 Fragmentáció > 50% 

5. ábra. Preembriók klasszifikációja a blasztomerek mérete és a fragmentáltság alapján (Bączkowski és munkatársai 2004)



6. ábra. Kompaktálódó (C1) és kompaktálódott (C2) morula (Máté Gábor)

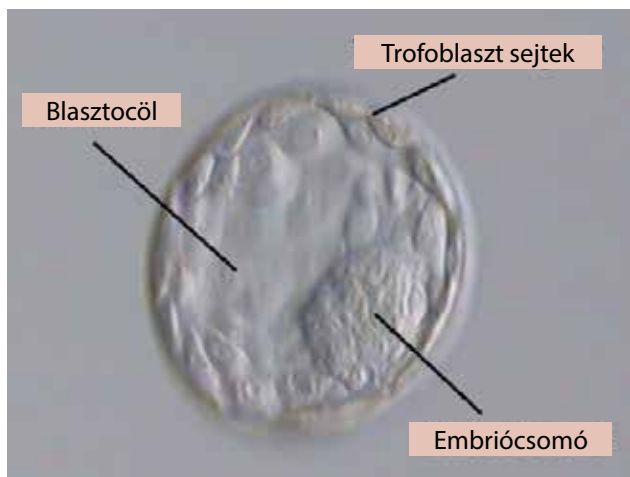
D abnormális trofoblaszt, látható sejt nélkül [5, 12, 22, 23] (8. ábra).

A SART-rendszer értelmében, az embriócsomót és a trofoblaszt sejteket értékelve – legalább 3-as értékű blasztociszta esetében – AA és AB a jó minőségű blasztociszta; BA, BB és BC a közepes minőségűek; CB és CC pedig a gyenge minőségű embriók [23].

Dinamikus morfológiai osztályozás – Time-lapse

A time-lapse képalkotás egy ugyancsak morfológiai értékelésen alapuló embrióselektív technika. A sejtek tenyésztése során – meghatározott időközönként – több ezer fotó készül az osztódó embriókról, amely később szoftveresen egy videóba összefűzhető, és kiértékelhető a fentebb ismertetett morfológiai paramétereket alapul véve. A technika előnye, hogy akár a termékenyítéstől egészen az embriótranszferig zavartalanul fejlődhetnek a sejtek, hiszen több gyártó is forgalmaz kifejezetten erre a célra speciális tápoldatokat. Több előnye is van a módszernek.

- Az állandó szoftveres megfigyelésnek köszönhetően nem szükséges a sejtek inkubátorból történő többszöri kivétele, amellyel különféle stresszfaktoroknak tennék ki az embriókat (hőmérsékletváltozás, gázkoncentráció megváltozása, fényhatás) [24].
- Ezáltal időt és energiát spórolhat meg az embriológus.



7. ábra. Az ötnapos blasztociszta felépítése (Máté Gábor)

- Végül talán a legfontosabb, hogy olyan osztódási rendellenességeket is megfigyelhetünk, amelyet más esetben nem.

Ez az 1-3 sejtosztódás. Normális esetben egy sejtől kettő lesz, kettőtől négy, négyből pedig nyolc, tehát duplázódik a sejtszám (nem feltétlenül szinkron a sejtosztódás). Azonban az is megtörténhet, hogy egy sejt háromfelé osztódik és nem kétfelé, ami kromoszomális rendellenességekre utalhat. A time-lapse megfigyelés alkalmazásával az ilyen embrió visszahelyezése kiküszöbölhető [25, 26]. Mindazonáltal megemlítendő, hogy egyetlen egy szakirodalmi adat sem támasztja egyértelműen alá, hogy szignifikánsan emelkedne az implantációs ráta, vagy az élve születési ráta a time-lapse technikának köszönhetően [27].

Biokémiai és immunológiai paramétereken alapuló osztályozási rendszerek

Oxigénfelvétel

Mint minden aerob szervezetnek, így a humán embrióknak is szükségük van oxigénre az életműködésükhez. A felvételre kerülő oxigén a mitokondriális légzés és az oxidatív foszforiláció során kerül hasznosításra, amely folyamat során energia (ATP) termelődik. Ennek a folyamatnak köszönhetően az embriók oxigénfelhasználása lehetőséget nyújthat az embriók minőségbeli osztályozásához. Sakagami és munkatársai 2015-ben publikált tanulmánya alapján a sertésembriók fejlettségével (kompaktálódott morula, korai blasztociszta, blasztociszta, expandálódott blasztociszta és hatchingelődött blasztociszta) egyenes arányban növekszik azok oxigénfelvétele is. Ezen felül megfigyelték, hogy az alacsony oxigénfelvételű embriók visszültetését követően mind a klinikai, mind pedig a biokémiai terhességi ráta nulla volt, szemben a magas oxigénfelvételű embriókkal [28]. Több esetben is hasonló megfigyeléseket publikáltak [29, 30].

Glükózhasznosítás

Az előbbieken ismertetett oxigénhasznosítás fő szubsztrátja valamilyen cukor. Az embrionális fejlődés első három napjában ez alapvetően piruvát és tejsav, majd pedig a kompaktálódástól kezdődően ezt a szerepet átveszi a glükóz. Ennek köszönhetően az embriók (morula és blasztociszta állapotokban) glükóz felvétele is lehetséges mérő száma az embriók minőségének. Kísérletes eredmények igazolják, hogy egy embrió visszahelyezését követően, a pozitív klinikai terhes csoportban szignifikánsan magasabb glükózhasznosítású embriók találhatóak mind a negyedik, mind pedig az ötödik napon [31].

A granulocita-kolónia stimuláló faktor

A granulocita-kolónia stimuláló faktor (G-CSF) egy citokin, amelyet különféle sejtek termelnek a szervezeten

belül (makrofágok, granulosa sejtek stb.), feladata pedig a csontvelő stimulációja granulociták és őssejtek termelése céljából. Ezen a funkción túl hatással van az idegrendszerre is (neurogenézis), illetve a fogantatásra [32]. Több szakirodalmi adat is tanúsítja, hogy pozitív korreláció figyelhető meg a G-CSF-érték, illetve a jó minőségű embriók között. Lédée és mtsai (2008) megfigyelték, hogy magas G-CSF-érték munkatársai (>20 pg/ml) az embriók mintegy 45%-a jó minőségű volt, míg alacsony G-CSF-érték mellett (<20 pg/ml) az embrióknak csak 20,45%-a volt jó minőségű. Ezen felül megfigyelték még a G-CSF-érték életkor függését is, 36 éves kor fölött szignifikánsan alacsonyabb G-CSF-érték mérhető, mint 30 éves kor alatt. Mindemellett a magas G-CSF-szint magasabb implantációs rátát és elveszülési arányt eredményezett. Egy darab két napos preembrió visszaujtetésekor, a magas G-CSF-csoportban az elveszülési arány 44% volt. Mindehhez az szükséges, hogy a folliculus punkció során a tüszők egyenként kerüljenek leszívásra, külön-külön csövekbe, hogy a nyert tüszőfolyadék és a hozzá tartozó petesejt egyértelműen azonosítható legyen. A tüszőfolyadékból a G-CSF-szint ún. „szendvics” ELISA meghatározható, amelynek értéke az embrió(k) visszahelyezésénél sok segítséget nyújthat [33–36]. A módszer hatalmas előnye, hogy a petesejtek leszívásakor begyűjtött tüszőfolyadékok G-CSF-tartalma meghatározható az embrió(k) visszahelyezéséig.

Humán leukocita antigén-G

A humán leukocita antigén-G (HLA-G) fontos szerepet játszik a magzat és az anya között kialakuló immunológiai kapcsolatban azáltal, hogy a citokinek szekrécióját szabályozza annak érdekében, hogy a trofoblaszt sejteinek megtapadásakor (behatolásakor) egy helyi immunszuppresszív, immuntoleráns állapot jöjjön létre. Egyfajta interakció alakul ki a trofoblaszt sejtejei által szekretált HLA-G (oldható formája: sHLA-G) és a méhüreg limfocita sejtejei között. Fő célpontjai az NK-sejtek, a CD4+ és CD8+ T-sejtek, a B-sejtek és a makrofágok. Több szakirodalmi adat is egyértelműen bizonyítja, hogy sikeres terhesség csak olyan embrióval jöhet létre, amely megfelelő mennyiségben szekretál sHLA-G-t, továbbá a sHLA-G koncentrációja és az embrió osztódottsági állapota között pozitív korreláció található [37–39]. Koncentrációja az embriót tenyésztő tápoldatból ELSIA-módszer segítségével meghatározható és segítségével minőségbeli következtetések vonhatók le az embriókra nézve. Rebmann és munkatársai (2010) munkájában az elveszülési ráta egy darab, három napos preembrió visszahelyezését követően a sHLA-G-t nem szekretáló csoportban 9,2%, míg a sHLA-G-t termelő csoportban 22,2% volt. Két embrió visszahelyezésénél 26,2%-ot és 37,4%-ot kaptak [40]. Az eddigi vizsgálatok hátránya, hogy a sHLA-G koncentrációjának meghatározás az embrió(k) visszahelyezését követően történt, utólag történt a terhességi kimenetek és sHLA-G koncentrációk összevetése. Valamint nem áll rendelkezésre eSET-ből származó adat.

Haptoglobin alfa-1 fragmens

A tenyésztő oldatok diagnosztikájában az egyik legújabb felfedezés a haptoglobin alfa-1 fragmens. A haptoglobin egy humán fehérje, amelyet az eritrociták bocsátanak ki a vérplazmába és magas affinitással kötődik a hemoglobinhoz, megakadályozva annak oxidatív aktivációját. Az embriók tenyésztéséhez használt tápoldatba valószínűsíthetően az oldat kiegészítéséhez használt tisztított albumin kontaminációjával kerül. A haptoglobin alfa-1 fragmens azáltal jön létre, hogy haptoglobin alfa-1 láncot a haptoglobin molekulához kötő diszulfid hidak redukálódnak. A fragmens szerepe egyelőre nem teljesen tisztázott. Feltételezhetően az apoptotikus/nekrotikus folyamatokon áteső életképtelen embriók, a megnövekedett plazmamembrán permeabilitásnak köszönhetően különféle enzimeket bocsátanak ki a tápközegbe, amelyek befolyásolják az oldat kémiai összetételét. Az egy bizonyos határértéket meghaladó haptoglobin alfa-1 fragmens szint esetén biokémiaileg életképtelennek minősíthető az embrió, amely esetben egyetlen egy terhesség sem alakult ki, míg a biokémiaileg életképes embriók (egy vagy két, háromnapos preembrió) transzfere mintegy 55%-os elveszülési rátát eredményezett (a vizsgálatban résztvevők átlag életkora 32,3±5,1 volt) [41]. A módszer hátrányai, hogy

- a haptoglobin alfa-1 fragmens analíziséhez szükséges (folyadékromatográf-tömegspektrométer) technológia a legtöbb labor számára nem elérhető annak jelentős szakember és költségvonzata miatt;
- az eddigi vizsgálatokban a tápközeg analízise és az ezáltal embrió klasszifikáció az embrió(k) visszaujtetését követően történt;
- nem eSET történt, ami miatt nincs információ arról, hogy egy embrió visszaujtetése hány százalékos elveszülést eredményez.

Genetikai tesztek

Preimplantációs genetikai eljárások

Annak, hogy egy beültetett embrióból nem alakul ki terhesség, több oka is lehet. Fontos követelmény, hogy az embrió genetikailag normális legyen és 23 pár kromoszómát tartalmazzon. Ennek tisztázására több ismert módszer is létezik, amelyekben közös, hogy mintegy előszűrőként morfológiai osztályozásokon esnek át. Először is tisztázunk kell a preimplantációs genetikai vizsgálat (PGS) és a preimplantációs genetikai diagnosztika (PGD) közötti különbséget. A PGS célja, hogy abnormalitásokat keressünk az embrió kromoszómáinak számában. Néhány esetben, az embrió sejtejei vagy több, vagy pedig kevesebb kromoszómával rendelkeznek, mint 23 pár. Ezek közül a legismertebb a *Down-szindróma*, amit 21. kromoszóma triszómiája okoz (2 helyett 3 kromoszóma); az *Edwards-szindróma* (18. kromoszóma triszómiája); és a *Patau-szindróma* (13. kromoszóma triszómiája). Ezeket a számbeli eltéréseket ösz-

szefoglaló nevükön aneuploidianak nevezzük, és általános-ságban véve negatív terhességi tesztet, vetélést és fejlődési rendellenességeket okoznak. Egyes felmérések szerint, a harmincas éveikben járó nők petesejtjeinek 20-60%-a tartalmaz genetikai hibákat, 45 éves korra pedig az aneuploidia eléri a 85%-ot [42]. Ennek oka, hogy a nők születésük pillanatában rendelkeznek a teljes petesejt-készletükkel, amely az évek során, a különféle behatásoknak köszönhetően (sugárzás, stressz, xenobiotikumok, toxinok stb.) sérülhet. A kromoszómaszám-változás kimutatására használt eljárás a fluorezcens in situ hibridizáció (FISH). A PB biopsziát, blasztomer biopsziát vagy trofoblaszt biopsziát követően az izolált kromoszómákat tárgylemezen fixálják, majd pedig különféle jelölők segítségével fluorezcensen festik, hogy fluorezcens mikroszkóppal kiértékelhetőek legyenek. A PGD sokkal összetettebb genetikai vizsgálat, mivel célzottabban tudunk genetikai eltéréseket kimutatni. Vizsgálhatunk kromoszomális átrendeződéseket, az örökítő anyag egyes részeinek elvesztését, megtöbbszöröződését, vagy pontmutációkat, de akár az embrió teljes genetikai állományát is megszekvenálhatjuk. Ennek köszönhetően számos betegség, vagy pedig a betegség hordozásának kimutatására alkalmas: Huntington-kór, cisztás fibrózis, Tay-Sach-betegség, β -thalassemia, hemofília stb. [43]. A PGD során használható diagnosztikai eljárások a FISH, a polimeráz láncreakció (PCR), a komparatív genomális hibridizáció (aCGH) és az új generációs szekvenálás (NGS).

A PGS-PGD eljárások több limitációval is rendelkeznek.

- Amennyiben a petesejteknek, vagy pedig a zigótának a PB-je kerül vizsgálatra, akkor az csak az anyai oldal genetikai állományát tükrözi, az apai oldalét nem.
- Háromnapos embriók blasztomer biopsziájánál, az analízisre kerülő 1-2 sejt nem feltétlenül tükrözi a teljes embrió genetikai profilját az ún. mozaikosság miatt [44]. Előnye, hogy nem szükséges az embriók fagyasztása, az ötödik napig továbbtenyésztve visszaültethetőek.
- Az ötödik napon elvégzett trofoblaszt biopszia a legmegbízhatóbb, hiszen akár 5-10 sejt analízisére is lehetőség nyílik, azonban a vizsgált blasztociszták minden esetben fagyasztásra kerülnek és csak egy következő ciklusban lehet őket visszaültetni; illetve itt is fennáll a fentiekben említett mozaikosság jelensége, mivel a trofoblaszt sejtjei nem biztos, hogy genetikailag megegyeznek az embrió-csomó sejtjeivel.
- A vizsgált embriók számának függvényében, egy PGD-FISH-PCR-vizsgálat ára 300 000 Ft-tól akár 1 000 000 Ft-ig is terjedhet, amely hogyha figyelembe vesszük az egy IVF-ciklus során felmerülő költségeket, akkor jelentős többletkiadásnak mondható, így sokak számára nem elérhető.
- Jelenleg nagyon kevés meddőségi centrum rendelkezik a vizsgálatokhoz szükséges infrastrukturális és szakember háttérrel.
- A PGD alkalmazása felvet több etikai aggályt is: segítségével akár szelektálhatunk különféle fenotípusok között (szemszín, hajszín, nem stb.), azonban ha az embriót, illetve a magzatot „személynek” tekintjük, akkor ez sérthet jogi, illetve vallási nézeteket. A PGD használata csak in-

dukolt esetben, genetikai betegségek és szelektív abortuszok elkerülésének érdekében elfogadott [45, 46].

Mitochondriális DNS-tartalom

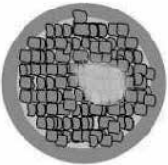
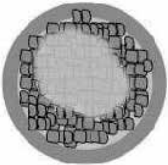
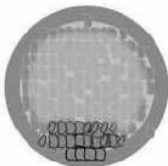
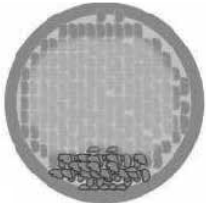
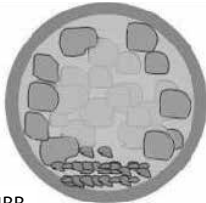
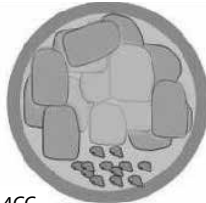
Az egyik legígéretesebb embrióminősítési rendszer a háromnapos preembrió blasztomerjeinek, illetve az ötnapos blasztociszta trofoblaszt sejtjeinek mitokondriális DNS (mtDNS) tartalmát méri, amelyet megelőző az adott embrió PGS-sel történő ploidia vizsgálata. Az euploidnak bizonyuló embriókból történt eSET, majd pedig a terhességi kimeneteleket vetették össze az adott embrió sejtjeinek mtDNS tartalmával. Azt tapasztalták, hogy a legmagasabb implantációt mutató embriók átlagos mtDNS kópiaszáma a háromnapos preembrióknál <34 volt, ahol az implantációs ráta 59%-nak adódott; az ötnapos blasztociszták esetében pedig az mtDNS kópiaszám <18,19 mellett 81% volt. Harmadik napos embriótranszfernél >160 kópiaszámmal, míg ötödik napos visszaültetésnél >60 kópiaszámmal egyetlen egy terhesség sem alakult ki. A fenti eredményekből egyértelműen megállapítható, hogy a blasztociszta állapotra szignifikánsan alacsonyabb mtDNS kópiaszám jellemző [47]. Ez annak köszönhető, hogy a mitokondriumoknak alapvetően a korai embriófejlődésben van meghatározó szerepe, a blasztociszta állapotban háttérbe szorul, hiszen a glikolízissel átáll glükózhasznosításra az embrió [31]. A magas mtDNS kópiaszám arra enged következtetni, hogy a petesejtek érése során ezek a sejtek kevesebb tartalék tápanyagra/energiára tettek szert, amit annál több mitokondriummal kompenzálnak a sejtek. Annak ellenére, hogy a mitokondriumok nagyszámban vannak jelen az emlős petesejtekben, azok felépítése merőben különbözik a többi szövet mitokondriumaitól. Ezek a sejtstruktúrák sokkal kevesebb krisztát tartalmaznak (belső membrán-betüremkedések, amelyek helyül szolgálnak az oxidatív foszforiláció fehérje komplexeinek), ami miatt az oxidatív foszforiláció folyamata kevésbé hatékony [48–50]. Eger blasztocisztákon végzett kísérletekben, az aneuploid embriók szignifikánsan magasabb mtDNS-tartalom volt kimutatható [51]. A módszer előnye, hogy az mtDNS-koncentráció mintavétele és a PGS-PGD mintavétele egyszerre megoldható. Hátrányaihoz felsorolhatjuk a PGS-PGD-módszer bemutatásánál felsoroltakat.

Következtetések

A Louise Brown születése óta eltelt négy évtizedben, az ART területén elért innovációknak köszönhetően számos, látszólag leküzdhetetlen akadály omlott le, párok milliót hozzásegítve a saját családjához. Az első évtized nagy áttörései [1978 – az első szülés IVF-ciklusból, 1983 – az első terhesség donor petesejttel; az első szülés fagyasztott embrióból, 1984 – a GIFT (gamete intrafallopian transfer) módszer bemutatása, 1987 – transzvaginális ultrahangvezérelt petesejtkinyerés] elvezettek oda, hogy nagyobb hatékonysággal és hozzáférhetőséggel nyílik bárkinek lehetősége egy

IVF-programra. Az ezt követő évtized felfedezéseinek és finomításainak köszönhetően leküzdhető a férfi infertilitás, illetve kiküszöbölhető számos genetikai probléma (1990 – a PGD bevezetése nemhez kötött betegségek kimutatására, 1991 – az első szülés ICSI-megtermékenyítésből, 1993 – az első szülés herebiopszia alkalmazásából, 1997 – az első szülés fagyasztott petesejtből, 2001 – PGD használata HLA-haplotípus egyezés vizsgálatára) [52]. Napjainkra kisebb lassulás figyelhető meg az IVF területén publikált felfedezésekben. A XXI. század egyik legfontosabb csapásiránya az embrióselekcio hatékonyságának növelése. Pusztán morfológiai osztályozáson alapuló szelekcióval a klinikai terhességi ráta 10-60% közé tehető, amely függ a visszahelyezésre kerülő embriók számától és fejlettségi állapotától: preembrió esetén 10-30%, blasztociszta esetén 40-60% [5–9]. A jobb összehasonlíthatóság kedvéért a következőkben csak az egy darab preembrió visszauttetéséből származó adatokat tüntetjük fel. Amennyiben megvizsgáljuk az embriók által szekretált sHLA-G koncentrációját, akkor körülbelül 22,2% implantációs ráta érhető el [40]. A tüszőfolyadék G-CSF-tartalmának figyelembevételével ez az

arányszám 44%-ra emelhető [34]. Ha vizsgáljuk a tenyésztő oldat haptoglobin alpha-1 fragmens tartalmát, akkor mintegy 55%-os elveszülést kapunk [41]. A fenti számokból láthatjuk, hogy a legjobb módszerrel is csak körülbelül 50-55% sikerességgel számolhatunk. Ennek feltehetően az az oka, hogy az embrióselekcio vizsgálatok, vagy csak valamilyen metabolikus, biokémiai paramétert vizsgálnak, vagy pedig csak genetikai hátteret. Így könnyen előfordulhat, hogy a környezetével megfelelő anyagcserét bonyolító életképes embrió aneuploid, vagy pedig egy euploid embrió metabolikus aktivitása közelít a nullához. Ahhoz, hogy az IVF sikerességét tovább növelhessük, jó lenne a jövőben a többes klasszifikáció bevezetése: morfológia + metabolizmus/biokémiai paraméter + ploidia. A szakirodalmat áttekintve erre az idáig csak néhány vizsgálat történt. Az egyik ilyen az euploid embriók mtDNS-tartalmának meghatározása. Egy darab preembrió visszahelyezésével (megfelelő kópiaszám esetén) 59%-os implantációs ráta figyelhető meg, azonban egy blasztociszta beültetésénél ez már eléri a 81%-ot [47]. Mindezeket figyelembe véve, amennyiben növelni akarjuk az IVF-kezelések sikerességét, illetve az ikerterhességi koc-

<p>1</p> <p>Korai blasztociszta</p> <p>A blasztocöl mérete kisebb mint a blasztociszta térfogatának fele</p>	 <p>1AA</p>		
<p>2</p> <p>Blasztociszta</p> <p>A blasztocöl nagyobb, mint a blasztociszta térfogatának fele</p>	 <p>2AA</p>		
<p>3</p> <p>Blasztociszta</p> <p>A blasztocöl nagyobb, mint a blasztociszta térfogatának fele</p>	 <p>3AA</p>		
<p>4</p> <p>Teljes blasztociszta</p> <p>Az embrió mérete nagyobb, a zona pellucida pedig elvékonyodott</p>	 <p>4AA</p>	 <p>4BB</p>	 <p>4CC</p>
<p>Embriócsomó</p>	<p>A</p> <p>Sok, szorosan elhelyezkedő sejt</p>	<p>B</p> <p>Sok, lazán elhelyezkedő sejt</p>	<p>C</p> <p>Kevés sejt</p>
<p>Trofoblaszt</p>	<p>A</p> <p>Sok sejt, összefüggő réteget alkotva</p>	<p>B</p> <p>Néhány sejt, laza réteget alkotva</p>	<p>C</p> <p>Kevés sejt</p>

8. ábra. Blasztociszták osztályozása (Bączkowski és munkatársai 2004)

kázatokat elkerülendő az eSET a jövőbeni kitűzött cél, úgy elengedhetetlen a beültetendő embrió minél szélesebb körű, morfológiai, biokémiai, genetikai kivizsgálása. Sajnálatos módon, egyelőre több gátja is van ezeknek a törekvéseknek.

- A fentiekben felvázolt embríoszelekciós eljárásokhoz gyakorlatilag egyetlen egy meddőségi centrum sem rendelkezik megfelelő infrastruktúrával.
- A szükséges infrastruktúra beszerzése, illetve a szükséges biokémiai, genetikai vizsgálatok elvégzése olyan anyagi terhet jelentene a jelenlegi finanszírozásban a centrumoknak, amelyet önmagukban vállalni nem tudnak, illetve ez a költség a beteg által sem mindig megfizethető, rájuk nem terhelhető.
- A beültetésre kerülő embriók ilyen mélyreható megismerése, illetve az emiatt történő, egy-egy embrióknak a visszaültetésre alkalmas embriók köréből történő kizárása, vagy éppen az előnyben részesítése nyilvánvalóan felvet súlyos etikai kérdéseket is.

A szerzőknek nincsenek érdekeltségeik.

IRODALOM

1. Ebner T. Micromanipulation techniques in IVF. *J Reprod Stem Cell Biotechnol* 2010; 1: 108–119.
2. De Kretzer D, Dennis P, Hudson B, et al. Transfer of human zygote. *Lancet* 1973; 7831, 728–729.
3. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978; 2: 366.
4. Központi Statisztikai Hivatal. Ikerszületések Magyarországon. *Statisztikai Tükör* 2014; 7: 1–7.
5. Bączkowski T, Kurzawa R, Głabowski W. Methods of embryo scoring in in vitro fertilization. *Reprod Biol* 2004; 4: 5–22.
6. Gardner DK, Vella P, Lane M, et al. Culture and transfer of human blastocysts increase implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfer. *Fertil Steril* 1998; 69: 84–88.
7. Gardner DK, Lane M, Stevens J, et al. Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. *Fertil Steril* 2001; 76: 1175–1180.
8. Jones GM, Trounson AO. Blastocyst stage transfer: pitfalls and benefits. *Hum Reprod* 1999; 14: 1405–1408.
9. Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, et al. Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer. *Hum Reprod* 1999; 14: 2345–2349.
10. Desai NN, Goldstein J, Rowland DY, et al. Morphological evaluation of human embryos and derivation of an embryoquality scoring system specific for day 3 embryos: a preliminary study. *Hum Reprod* 2000; 10: 2190–2196.
11. Qian YL, Ye YH, Xu CM, et al. Accuracy of a combined score of zygote and embryo morphology for selecting the best embryos for IVF. *J Zhejiang Univ Sci B* 2008; 8: 649–655.
12. Racowsky C, Vernon M, Mayer J, et al. Standardization of grading embryo morphology. *J Assist Reprod Genet* 2010; 27: 437–439.
13. Rienzi L, Balaban B, Ebner T, et al. The oocyte. *Hum Reprod* 2012; 27: 2–21.
14. Munné S, Cohen J. Chromosome abnormalities in human embryos. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 842–855.
15. Scott L, Alvero R, Leondires M, et al. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod* 2000; 11: 2394–2403.
16. Van Blerkom J. Occurrence and developmental consequences of aberrant cellular organization in meiotically mature human oocytes after exogenous ovarian hyperstimulation. *J Electron Microscop Tech* 1990; 16: 324–346.
17. Papale L, Fiorentino A, Montag M, et al. The zygote. *Hum Reprod* 2012; 27: 22–49.
18. Nagy ZP, Janssenswillen C, Janssens R, et al. Timing of oocyte activation, pronucleus formation and cleavage in humans after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with testicular spermatozoa and after ICSI or in-vitro fertilization on sibling oocytes with ejaculated spermatozoa. *Hum Reprod* 1998; 13: 1606–1612.
19. Meriano J, Clark C, Cadesky K, et al. Binucleated and micronucleated blastomeres in embryos derived from human assisted reproduction cycles. *Reprod Biomed Online* 2004; 9: 511–520.
20. Prados FJ, Debrock D, Lemmen JG, et al. The cleavage stage embryo. *Hum Reprod* 2012; 27: 50–71.
21. Gardner DK, Schoolcraft WB. In vitro culture of human blastocyst. In: Jansen, R., Mortimer, D., Eds., *Towards Reproductive Certainty: Infertility and Genetics Beyond*. Carnforth: Parthenon Press; 1999. p. 377–388.
22. Hardarson T, Van Landuyt L, Jones G. The blastocyst. *Hum Reprod* 2012; 27: 172–191.
23. Heitmann RJ, Hill MJ, Richter KS, et al. The simplified SART embryo scoring system is highly correlated to implantation and live birth in single blastocyst transfers. *J Assist Reprod Genet* 2013; 30: 563–567.
24. Feuer S, Rinaudo P. Preimplantation stress and development. *Birth Defects Res C* 2012; 96: doi:10.1002/bdrc.21022.
25. Pribenszky C, Losonczy E, Molnár M, et al. Prediction of in-vitro developmental competence of early cleavage-stage mouse embryos with compact time-lapse equipment. *Reprod Biomed Online* 2010; 20: 371–379.
26. Montag M, Toth B, Strowitzki T. New approaches to embryo selection. *Reprod Biomed Online* 2013; 27: 539–546.
27. Armstrong S, Arroll N, Cree LM, et al. Time-lapse systems for embryo incubation and assessment in assisted reproduction. *Cochrane Db Syst Rev* 2015. doi:10.1002/14651858.CD011320.pub2.
28. Sakagami N, Nishida K, Akiyama K, et al. Relationships between oxygen consumption rate, viability, and subsequent development of in vivo-derived porcine embryos. *Theriogenology* 2015; 83: 14–20.
29. Lopes AS. Oxygen consumption as an indicator of oocyte and embryo viability. In: *Practical Manual of In Vitro Fertilization*. Eds: Nagy ZsP, Varghese AC, Agarwal A. New York: Springer; 2012. pp. 413–420.
30. Trimarchi JR, Liu L, Porterfield DM, et al. Oxidative phosphorylation-dependent and -independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos. *Biol Reprod* 2000; 62: 1866–1874.
31. Gardner DK, Wale PL, Collins R, et al. Glucose consumption of single post-compaction human embryos is predictive of embryo sex and live birth outcome. *Hum Reprod* 2011; 26: 1981–1986.
32. Schneider A, Krüger C, Steigleder T, et al. The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *J Clin Invest* 2005; 115: 2083–2098.
33. Chimote NM, Nath NM, Chimote BN. Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) level in follicular fluid is a prognostic factor for embryo developmental potential in in-vitro fertilization cycles. *Fertil Steril* 2015; 104: e306.
34. Lédée N, Lombroso R, Lombardelli L, et al. Cytokines and chemokines in follicular fluids and potential of the corresponding embryo: the role of granulocyte colony-stimulating factor. *Hum Reprod* 2008; 23: 2001–2009.
35. Lédée N, Frydman R, Osipova A, et al. Levels of follicular G-CSF and interleukin-15 appear as noninvasive biomarkers of subsequent successful birth in modified natural in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* 2011; 95: 94–98.
36. Lédée N, Munaut C, Sérazin V, et al. Performance evaluation of microbead and ELISA assays for follicular G-CSF: a non-invasive biomarker of oocyte developmental competence for embryo implantation. *J Reprod Immunol* 2010; 86: 126–132.
37. Noci I, Fuzzi B, Rizzo R, et al. Embryonic soluble HLA-G as a marker of developmental potential in embryos. *Hum Reprod* 2005; 20: 138–146.
38. Rousseau RG, Coulam CB. HLA-G and its role in implantation (review). *J Assist Reprod Genet* 2007; 24: 288–295.
39. Verloes A, Van de Velde H, LeMaoult J, et al. HLA-G expression in human embryonic stem cells and preimplantation embryos. *J Immunol* 2011; 186: 2663–2671.
40. Rebmann V, Switala M, Eue I, et al. Soluble HLA-G is an independent factor for the prediction of pregnancy outcome after ART: a German multi-centre study. *Hum Reprod* 2010; 25: 1691–1698.
41. Montskó G, Zrinyi Z, Janáky T, et al. Noninvasive embryo viability assessment by quantitation of human haptoglobin alpha-1 fragment in the in vitro fertilization culture medium: an additional tool to increase success rate. *Fertil Steril* 2015; 103: 687–693.
42. Franasiak JM, Forman EJ, Hong KH, et al. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophoblast biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. *Fertil Steril* 2014; 101: 656–663.
43. Simoncelli TM. Pre-implantation genetic diagnosis: ethical guidelines for responsible regulation. *CTA International Center for Technology Assessment* 2003.
44. Lee A, Kiessling AA. Early human embryos are naturally aneuploid – can that be corrected? *J Assist Reprod Genet* 2017; 34: 15–21.
45. American Society of Reproductive Medicine. Ethics Committee, Ethical considerations of assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 1994; 62: 32–37.
46. Kass LR. *Life, liberty and the defense of dignity: the challenge for bioethics*. San Francisco, USA: Encounter Books; 2002.
47. Diez-Juan A, Rubio C, Marin C, et al. Mitochondrial DNA content as a viability score in human euploid embryos: less is better. *Fertil Steril* 2015; 104: 534–541.
48. Wai T, Teoli D, Shoubridge EA. The mitochondrial DNA genetic bottleneck results from replication of a subpopulation of genomes. *Nat Genet* 2008; 40: 1484–1488.
49. Fragouli E, McCaffrey C, Ravichandran K, et al. Clinical implications of mitochondrial DNA quantification on pregnancy outcomes: a blinded prospective nonselection study. *Hum Reprod* 2017; 32: 2340–2347.
50. Ravichandran K, McCaffrey C, Grifo J, et al. Mitochondrial DNA quantification as a tool for embryo viability assessment: retrospective analysis of data from single euploid blastocyst transfers. *Hum Reprod* 2017; 32: 1282–1292.
51. Tao X, Landis JN, Krisher RL, et al. Mitochondrial DNA content is associated with ploidy status, maternal age, and oocyte maturation methods in mouse blastocysts. *J Assist Reprod Genet* 2017; 34: 1587–1594.
52. Wang J, Sauer MV. In vitro fertilization (IVF): a review of 3 decades of clinical innovation and technological advancement. *Ther Clin Risk Manag* 2006; 2: 355–364.