

# Embriószelekció: a kivétel erősíti a szabályt?!



Máté Gábor dr., Török Attila dr.

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

Mi kell ahhoz, hogy egy meddőségi kezelés sikerrel záruljon? Ha leegyszerűsítjük a választ és csak az embriológiai oldalt tekintjük, akkor egy jó minőségű embrió. A rendelkezésre álló embriószelekciós technikáknak köszönhetően ennek eldöntése nagyon egyszerű. A jó minőségű embrió ismérve zigóta állapotban a két pronucleus; az embriót alkotó blasztomerek duplázódó osztódása; az egy sejtmaggal rendelkező blasztomerek; minél kevesebb fragmentáció a blasztomerek között; a létrejött blasztociszta morfológiailag megfelelő trofoblasztja, blasztocölje és embriócsomója; illetve genetikai analízis esetén az euploidia. Mindazonáltal be kell látnunk, hogy nem mindig áll rendelkezésre jó minőségű embrió. Kéziratunkban arra keressük a választ, hogy szakirodalmi adatok és némi saját tapasztalat alapján vajon elképzelhető-e egy „abnormális”, „rossz minőségű” embrió visszaültetése, mik a terhességi esélyek?

*Kulcsszavak: meddőség, embriószelekció, asszisztált reprodukció*

## Embryo selection: does the exception prove the rule?!

What does it take for an infertility treatment to be successful? If we simplify the answer and look only at the embryological site, then it is a good quality embryo. Due to the available embryo selection techniques, the decision is very simple. A good quality embryo is characterized by two pronuclei in a zygote condition; doubling of the blastomeres that make up the embryo; blastomeres with only one nucleus; less fragmentation between blastomeres; morphologically compatible trophoblast, blastocoel and inner cell mass of the resulting blastocyst; and, in the case of genetic analysis, euploidy. However, we must realize that high quality embryos are not always available. In our manuscript, we are looking for the answer to the question whether, based on the literature and some of our own experience, is it possible to implant an “abnormal”, “poor quality” embryo, and what are the chances of pregnancy?

*Keywords: infertility, embryo selection, assisted reproduction*

## Bevezetés

Korábbi közleményünkben már részletesen tárgyaltuk a különféle embriószelekciós technikákat, azok előnyeit, hátrányait, etikai vonatkozásait [1]. Ezen a gondolatmeneten továbbhaladva, ezúttal a tárgyalt szelekciós módszerekkel már-már szembemennő, sok esetben megmagyarázhatatlan jelenségekről, kivételekről számolunk be, saját tapasztalatok és szakirodalmi adatok alapján.

Napjainkban – a világ szinte összes *in vitro* fertilizációs (IVF) laboratóriumában – a visszaültetésre kerülő embriók egy- vagy kétlépcsős osztályozáson esnek át. Az első lépcső gyakorlatilag minden esetben egy morfológiai osztályozás, ahol kiértékelésre kerülnek a

- zigóta pronukleuszai (PN);
- time-lapse technika alkalmazása esetén az anyasejt leánysejtekre történő osztódása;

- a preembriót alkotó blasztomerek száma, mérete, nukleálsága és a köztük látható fragmentáltság mértéke;
- valamint a blasztociszta embriócsomója, trofoblasztja és blasztocölje.

A második lépcső a preimplantációs genetikai vizsgálat (PGS), ahol a vizsgált embrió néhány sejtjéből meghatározható annak kromoszómális állapota, az aneuploidia esetleges fennállása. Amennyiben kellően nagy esetszámot tekintünk, akkor ezek az osztályozási módszerek szignifikánsan magasabb terhességi rátát eredményeznek, azonban a háttérben ott rejlik, egy ez idáig kevésbé ismert faktor, ami azt eredményezheti, hogy ezekkel az osztályozási elvekkel szöges ellentétben álló embriók is pozitív terhességi kimenetellel járhatnak. Az alábbiakban ezekből szeretnénk felsorakoztatni néhányat.

Érkezett: 2020. április 7. Közlésre elfogadva: 2020. május 18. Received: 7 April 2020 Accepted: 18 May 2020

Levelezési cím: Dr. Máté Gábor, Pannon Reprodukciós Intézet, 8300 Tapolca, Bartók Béla u. 1–3.

E-mail: mate.gabor@pri.hu

## A morfológiai osztályozás „ellentmondásai”

### Pronukleuszok

A petesejtek megtermékenyítése után 16-19 órával megfigyelhetőek a zigóta PN-ai, normális esetben két darab (2PN), amelyek közül az egyik az anyai kromoszóma készletet tartalmazza, a másik pedig az apait. Az esetek 3-11%-ában azonban előfordulhat, hogy csak egy, vagy éppenséggel több PN figyelhető meg, ami nem megfelelő termékenyülést jelent (1. ábra). 1PN zigótában általában haploid kromoszómakészlet figyelhető meg, amit okozhat a

- petesejt autoaktivációja,
- a bejutó spermium fejének elmaradó dekondenzációja,
- a PN-ok aszinkron megjelenése,
- illetve az anyai és apai PN-ok egy, nagy PN-ba történő fúziója [2, 3].

Azokban genetikai vizsgálatok alapján az 1PN-zigótából származó embriók akár fele diploid, visszaültetésre alkalmas, teljesen egészséges gyermek születhet a ciklusból, ahogyan azt számos szakirodalmi adat is bizonyítja; azonban rendkívül körültekintőnek kell lenni ilyen embriók visszaültetésével a fent említett genetikai abnormalitások lehetősége miatt [4-7].

A 3PN megjelenése rendszerint hibás termékenyülést jelent. Ennek leggyakoribb okai

- IVF esetén a di- vagy polispermia, amikor több spermium jut be a petesejtbe;
- a bejutó hímvarsejt diploid mivolta;
- illetve a második poláris test kilökődésének elmaradása.

Ennek hátterében az áll, hogy minden petesejt fejlődésének korai állapotában diploid, azonban a megtermékenyüléskor az egyik kromoszómakészlet egy poláris test formájában kilökődik, ha ez elmarad, akkor PN formájában megjelenik a zigótán belül. Eddigi tudásunk szerint az ilyen zigótákból képződő embriók aneuploidák, azaz vagy kevesebb, vagy mint jelen esetben is, több kromoszómát tartalmaznak [2, 3]. Azonban Yalçinkaya és mtsainak [8] 2016-os munkája teljesen más megvilágításba helyezi az eddig tudottakat. 3PN-zigótát tovább tenyésztettek, a harmadik napon blasztomer biopsziát hajtottak végre, elvégezték a genetikai analízist, ahol meglepetésükre euploid eredményt

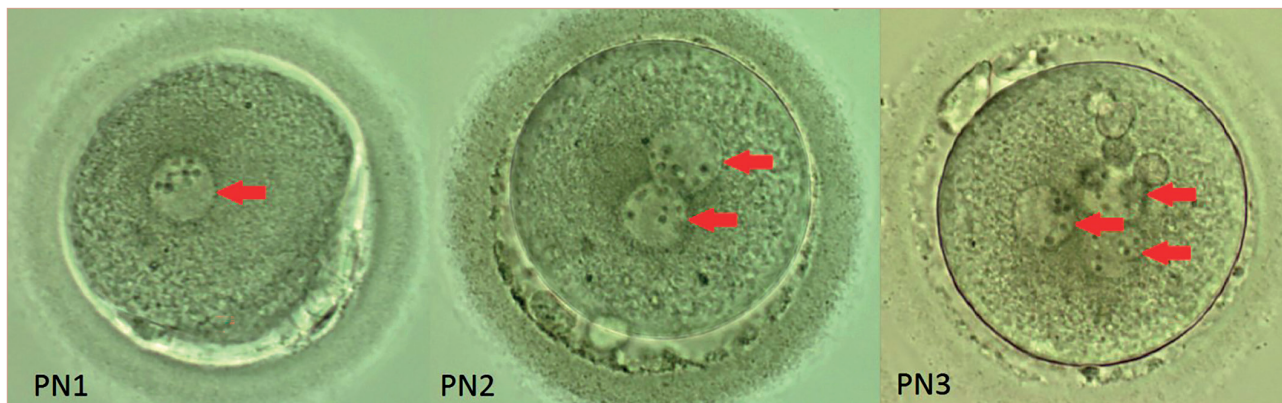
kaptak. Az ötödik napra a 3PN-zigótából hatchingelődő blasztociszta fejlődött. A párt tájékoztatták az eredményről, a lehetőségekről és a potenciális következményekről, akik hozzájárulásukat adták a visszaültetéshez. Az embrió visszaültetése a 39. héten szüléssel zárult, a világra jött gyermek kislány, egészséges, 3410 grammos és 51 cm-es volt.

### Abnormális sejtosztódás

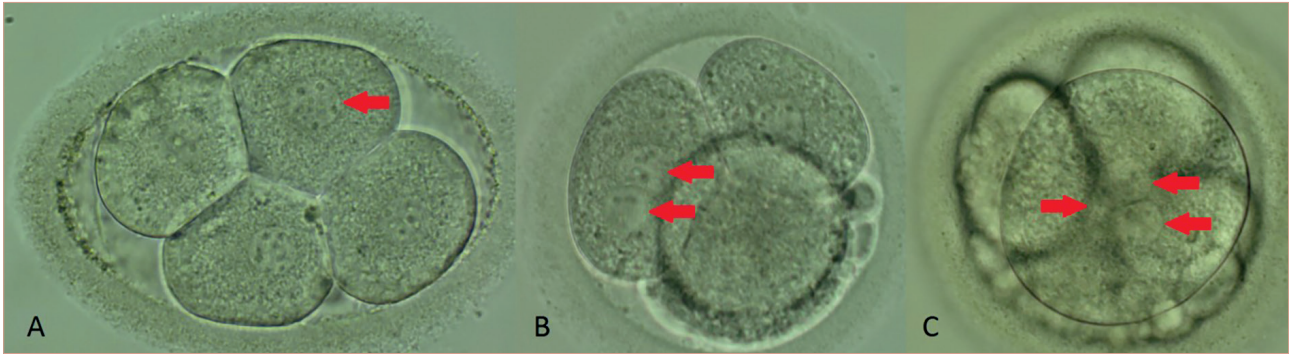
A time-lapse technika megjelenésének legnagyobb előnye, hogy segítségével nyomon követhető az embrió osztódásának kinetikája [9, 10]. A poszt-zigotikus mitózis során normál esetben megduplázódik az örökítő anyag, majd egyenlő arányban eloszlik a két leánysejt között [1, 11]. Ha az osztódás kinetikájában olyat tapasztalunk, hogy egy sejt nem ketté, hanem háromfelé osztódik, akkor joggal feltételezhetjük, hogy a csupán duplázódott örökítő anyag nem tud megfelelően eloszlni a három leánysejt között, genetikailag hibás, aneuploid embriót eredményez. Azonban Almagor és mtsai [12] 2015-ös munkájukban 16 olyan esetről számoltak be, amikor abnormális sejtosztódásból, 2-5 osztódásból származó blasztocisztát ültettek be. Hihetetlen módon három esetben sikeres szüléssel zárult a ciklus, egészséges gyermekekkel.

### Multinukleáritás

A mitózissal osztódó blasztomerekben normál esetben egy-egy sejtmag figyelhető meg. Ha ennél többet tapasztalunk (két sejtmag esetén binukleáritásról beszélünk, ennél több esetén pedig multinukleáritásról) (2. ábra), akkor az jelenthet sejtmagfragmentációt vagy nem megfelelő kromoszóma-szegregációt, aneuploidiát [11, 13]. Ugyanakkor retrospektív analízisek bizonyítják, hogy bár szignifikánsan alacsonyabb klinikai terhességi ráta társítható a bi- és multinukleált embriókhoz, azonban így is „elfogadható” implantációs potenciállal rendelkeznek és teljesen egészséges gyermekek születnek az ilyen embriók visszaültetéséből, továbbá a vetelési arány sem mutat szignifikánsan magasabb értéket a kontrollcsoporthoz viszonyítva [14]. Érdekesként megemlítendő, hogy különbség figyelhető



1. ábra: 1PN, 2PN és 3PN-zigóták



2. ábra: A: Normális, B: binukleált és C: multinukleált preembriók

meg a multinukleátság mértékével arányosan (Seikkula és mtsai [14] 2018-as munkájában a klinikai terhességi ráta a kontrollcsoportban 44,1%, binukleált embrióknál 30,1% és multinukleált embrióknál 26,3%). Hasonló eredményt tapasztaltak Aguilar és mtsai is [15].

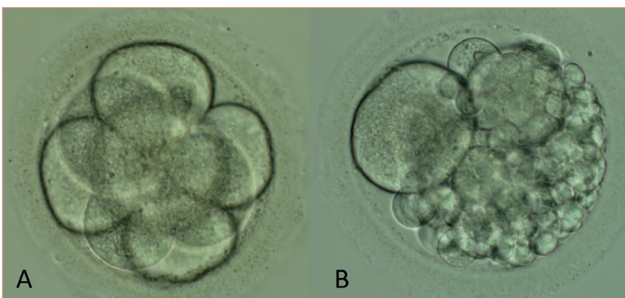
**Morfológia**

A fentiek mellett, ami a legtöbb laborban leginkább meghatározza, hogy az adott embrió beültetésre kerül-e vagy sem, az embrió morfológiája;

- preembrió esetén az embrió alkotó blasztomerek mérete és a köztük látható fragmentáltság;
- blasztociszta transzfernél pedig az embriócsomó, a trofoblaszt réteg és a blasztocöl szerkezete és mérete. Jellemzően a 30-50%-nál magasabb fragmentáció rossz minőségű embrióosztályzattal jár (3. ábra) [16]. Mindazonáltal mind saját, mind pedig szakirodalmi adatok alapján számtalan eset ismert, amikor szüléssel zárult egy nagymértékben fragmentált embriótranszfere [17–19].

**A genetikai osztályozás „ellentmondásai”**

A petesejt/embrió aneuploidijának kialakulása két részre különíthető el. Egyrészt kialakulhat a gametogenezis során, a meiózis folyamata alatt; másrészt pedig posztzigotikusan a mitózis alatt (4. ábra). Előbbit az aneuploidia életkor-függő kialakulásával társítják, utóbbit pedig az embriók mozaikosságával, amelyet sok esetben természetes folyamatként emlegetnek [20–26]. Analízisek alapján,



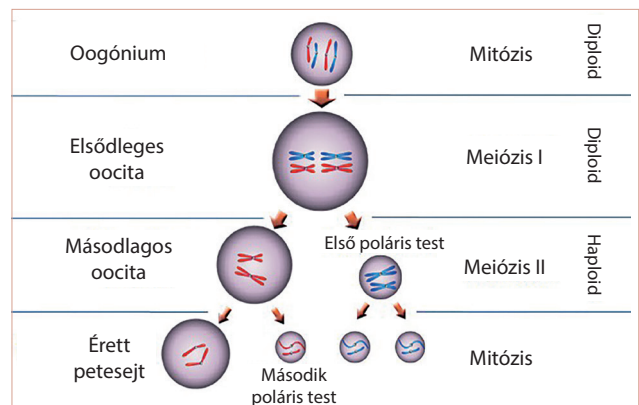
3. ábra: A: Normális morfológiájú és B: fragmentált preembriók

az életkor függvényében az in vitro embriók 20-80%-a aneuploid [27, 28].

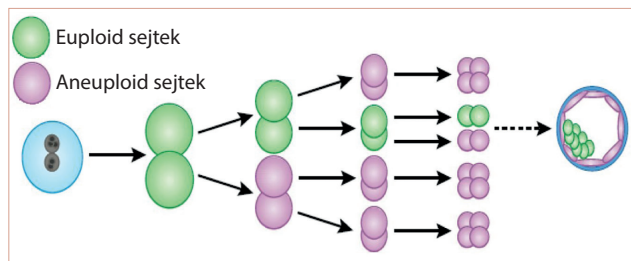
Mozaikosságnak nevezzük azt a jelenséget, amikor egy embrió belül legalább két különböző kariotípussal rendelkező sejtvonal megtalálható, általában egyik euploid, másik aneuploid, de olyan extrém esetek is lehetnek, amikor aneuploid az összes kariotípus. Kialakulásának hátterében az esetek nagy részében, a korai embrionális fejlődés során végbemenő mitotikus kromoszómavesztés, nyeres vagy nondiszjunkció áll [29]. Körülbelül 40 éves korra tehető, amikor a meióziszból származó aneuploidia és a mozaikosságból adódó előfordulási gyakorisága megegyezik (~25%), majd a meióziszból származó exponenciálisan megemelkedik [30].

Az Amerikai Egyesült Államokban egy kérdőívben felmérték, hogy az államok és a világ IVF-központjai milyen arányban használtak PGS-t/PGT-A-t, azok milyen arányban mutatták a vizsgált embriók aneuploidiját, illetve ültettek-e vissza feltételezhetően kromoszómáiban abnormalis embriókat [31]. Összesen 135 esetet rögzítettek, amikor abnormalis embrió került beültetésre, ebből 68 klinikai terhesség származott és 35 élve születés történt. Becslésük szerint napjainkban legalább 400 olyan gyermek van, aki ilyen abnormalis embrióból származik. Ez a szám lehet magasabb is, ha az aneuploidnak ítélt embriók visszaültetését nem vetnék el, illetve ha minden beültetésre kerülő embrió átesne genetikai vizsgálaton [31–33].

A jelenség hátterében két nemrég felfedezett folyamat állhat. Egyrészt a mozaikos embrióknál nagyon sok esetben csak a trofoblaszt-réteg tartalmaz aneuploid sejteket, az embriócsomó sejtei euploidok (5. ábra) [34]. Másrészről



4. ábra: Az érett petesejt kialakulása



**5. ábra: A mitotikus sejtosztódás során létrejött mozaikos, de egészséges embrió (Lee és Kiessling alapján, 2017)**

pedig bizonyították, hogy számos olyan mechanizmust tartalmaznak az embriók, amelyek az örökítő anyag integritását hivatottak védeni. Normál esetben, ha valamilyen sérülés éri a DNS-t, vagy például a sejtciklus során nem kettőződött meg megfelelően a kromoszómaszám, akkor bekapcsolnak ezek a javító mechanizmusok, megállítják a sejtciklust és akár a hibás sejtvonal apoptózisát, pusztulását indukálják [35]. Barbash-Hazan és mtsai [29] munkájukban bizonyították, hogy a harmadik napos genetikai analízis által aneuploidnak vagy mozaikosnak ítélt sejtek mintegy harmada korigálja magát a blasztociszta állapotig. Több esetben is hasonló eredményeket publikáltak [36–38]. Bolton és mtsai [39] a fenti eredményeket egy teljesen más szemszögből reprodukálta. Mesterséges módon hoztak létre aneuploid egér embriókat, amelyek sejtjeit különféle arányokban vegyítették euploid embriók sejtjeivel, kimérákat létrehozva. Az aneuploid sejteket fluoreszcens festékekkel jelölték és vizsgálták az osztódás kinetikáját. Azt tapasztalták, hogy a blasztociszta állapotig lényegesen csökkent a jelölt aneuploid sejtek száma, azok apoptózissal eliminálódtak, teljesen egészséges állatok fogantak és születtek.

## Következtetések

Összefoglalva a fentieket le kell szögezni, hogy közleményünk célja nem az volt, hogy feltételezhetően genetikailag hibás embriók visszaültetésére buzdítsuk kollégáinkat. A jelenleg elfogadott és alkalmazott embriószelekciós módszerek mindegyike statisztikailag magasabb terhességi rátát eredményezhet. Továbbá az abnormális embriók visszaültetésével egy időben nő a vetélés és a genetikailag sérült gyermek születésének kockázata. Mindazonáltal be kell látnunk, hogy ott lapul a háttérben több olyan eddig nem teljesen ismert mechanizmus, amit feltételezhetően hibás embriókból is sikeres terhességet eredményezhet, egészséges gyermekkel. Ebből kifolyólag minden meddőségi intézet életében adódhat olyan eset, amikor jó minőségű embrió hiányában, a beteg körületekintő tájékoztatását és beleegyezést követően fontolóra vehető az ilyen embriók beültetése. Azonban a szakirodalom adataiból az világosan leszűrhető, hogy jobb kizárólag a blasztociszta visszaültetésre szorítkozni, teret hagyva a tárgyalt javító mechanizmusoknak, ami nemcsak a feltételezhetően hibás embriókra alkalmazható, hanem a jó minőségűekre is egyaránt.

*A szerzőknek nincsenek anyagi érdekeltségeik.*

## IRODALOM

- Máté G, Török A. Embriószelekció: az elmúlt negyven év áttekintése. *Magyar Nőorvosok Lapja* 2018; 81: 244–252.
- Munné S, Cohen J. Chromosome abnormalities in human embryos. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 842–855.
- Scott L, Alvero R, Leondires M, Miller B. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod* 2000; 11: 2394–2403.
- Gras L, Trounson AO. Pregnancy and birth resulting from transfer of a blastocyst observed to have one pronucleus at the time of examination for fertilization: Case report. *Hum Reprod* 1999; 14: 1869–1871.
- Noyes N, Fino ME, Krey L, McCaffrey C, Adler A, Grifo J. Embryo biopsy: the fate of abnormal pronuclear embryos. *Reprod Biomed Online* 2008; 17: 782–788.
- Yan J, Li Y, Shi Y, Feng HL, Gao S, Chen ZJ. Assessment of sex chromosomes of human embryos arising from monopronuclear zygotes in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles of Chinese women. *Gynecol Obstet Invest* 2010; 69:20–23.
- Rosenbusch B. The chromosomal constitution of embryos arising from monopronuclear oocytes in programmes of assisted reproduction. *Int J Reprod Med* 2014; 2014: 418198.
- Yalçinkaya E, Özay A, Ergin EG, Öztel Z, Özörnek H. Live birth after transfer of a tripronuclear embryo: An intracytoplasmic sperm injection as a combination of microarray and time-lapse technology. *Turk J Obstet Gynecol* 2016; 13: 95–98
- Pribenszky C, Losonczi E, Molnár M, Lang Z, Mátyás S, Rajczy K, 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.
- Montag M, Toth B, Strowitzki T. New approaches to embryo selection. *Reprod Biomed Online* 2013; 27: 539–546.
- Nagy ZP, Janssenswillen C, Janssens R, De Vos A, Staessen C, Van de Velde H, 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.
- Almagor M, Or Y, Fieldust S, Shoham Z. Irregular cleavage of early preimplantation human embryos: characteristics of patients and pregnancy outcomes. *J Assist Reprod Genet* 2015; 32: 1811–1815.
- Meriano J, Clark C, Cadesky K, Laskin CA. Binucleated and micronucleated blastomeres in embryos derived from human assisted reproduction cycles. *Reprod Biomed Online* 2004; 9: 511–520.
- Seikkula J, Oksjoki S, Hurme S, Mankonen H, Polo-Kantola P, Jokimaa V. Pregnancy and perinatal outcomes after transfer of binucleated or multinucleated frozen-thawed embryos: a case-control study. *Reprod Biomed Online* 2018; 36: 607–613.
- Aguilar J, Rubio I, Muñoz E, Pellicer A, Meseguer M. Study of nucleation status in the second cell cycle of human embryo and its impact on implantation rate. *Fertil Steril* 2016; 106: 291–299.
- Bączkowski T, Kurzawa R, Głabowski W. Methods of embryo scoring in in vitro fertilization. *Reprod Biol* 2004; 4: 5–22.
- Alikani M, Cohen J, Tomkin G, Garrisi GJ, Mack C, Scott RT. Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. *Fertil Steril* 1999; 71: 836–842.
- Stone BA, Greene J, Vargyas JM, Ringler GE, Marrs RP. Embryo fragmentation as a determinant of blastocyst development in vitro and pregnancy outcomes following embryo transfer. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192: 2014–2019.
- Lahav-Baratz S, Blais I, Koifman M, Ishai D, Wiener-Megnazi Z, Peer G, et al. Live birth from the transfer of a severely fragmented embryo observed by morphokinetics. *Case Rep Obstet Gynecol*. 2018; 2018: 2152918.
- Munné S, Weier HU, Grifo J, Cohen J. Chromosome mosaicism in human embryos. *Biol Reprod* 1994; 51: 373–379.
- Delhanty JD, Harper JC, Ao A, Handyside AH, Winston RM. Multicolour FISH detects frequent chromosomal mosaicism and chaotic division in normal preimplantation embryos from fertile patients. *Hum Genet* 1997; 99: 755–760.
- Vanneste E, Voet T, Le Caignec C, Ampe M, Konings P, Melotte C, et al. Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nat Med* 2009; 15: 577–583.
- Baart EB, Martini E, van den Berg I, Macklon NS, Galjaard RJ, Fauser BC, et al. Preimplantation genetic screening reveals a high incidence of aneuploidy and mosaicism in embryos from young women undergoing IVF. *Hum Reprod* 2006; 21: 223–233.
- Mertzanidou A, Wilton L, Cheng J, Spits C, Vanneste E, Moreau Y, et al. Microarray analysis reveals abnormal chromosomal complements in over 70% of 14 normally developing human embryos. *Hum Reprod* 2013; 28: 256–264.
- van Echten-Arends J, Mastenbroek S, Sikkema-Raddatz B, Korevaar JC, Heineman MJ, van der Veen F, et al. Chromosomal mosaicism in human preimplan-

- tation embryos: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2011; 17: 620–627.
- 26.** McCoy RC, Demko ZP, Ryan A, Banjevic M, Hill M, Sigurjonsson S, et al. Evidence of selection against complex mitotic-origin aneuploidy during preimplantation development. *PLoS Genet* 2015; 11: e1005601.
- 27.** Cimadomo D, Scarica C, Maggiulli R, Orlando G, Soscia D, Albricci L, et al. Continuous embryo culture elicits higher blastulation but similar cumulative delivery rates than sequential: a large prospective study. *J Assist Reprod Genet* 2018; 35: 1329–1338.
- 28.** Frasiak JM, Forman EJ, Hong KH, Werner MD, Upham KM, Treff NR, et al. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophectoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. *Fertil Steril* 2014; 101: 656–663.
- 29.** Barbash-Hazan S, Frumkin T, Malcov M, Yaron Y, Cohen T, Azem F, et al. Preimplantation aneuploid embryos undergo self-correction in correlation with their developmental potential. *Fertil Steril* 2009; 92: 890–896.
- 30.** McCoy RC. Mosaicism in preimplantation human embryos: when chromosomal abnormalities are the norm. *Trends Genet* 2017; 33: 446–463.
- 31.** Patrizio P, Shoham G, Shoham Z, Leong M, Barad DH, Gleicher N. Worldwide live births following the transfer of chromosomally “Abnormal” embryos after PGT/A: results of a worldwide web-based survey. *J Assist Reprod Genet* 2019; 36: 1599–1607.
- 32.** Gleicher N, Vidali A, Braverman J, Kushnir VA, Albertini DF, Barad DH. Further evidence against use of PGS in poor prognosis patients: report of normal births after transfer of embryos reported as aneuploid. *Fertil Steril* 2015; 104:e59.
- 33.** Greco E, Minasi MG, Fiorentino F. Healthy babies after intrauterine transfer of mosaic aneuploid blastocysts. *N Engl J Med* 2015; 373: 2089–2090.
- 34.** Lee A, Kiessling AA. Early human embryos are naturally aneuploid—can that be corrected? *J Assist Reprod Genet* 2017; 34: 15–21.
- 35.** Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 2000, 408: 433–439.
- 36.** Allan J, Edirisinghe R, Anderson J, Jemmott R, Nandini AV, Gattas M. Dilemmas encountered with preimplantation diagnosis of aneuploidy in human embryos. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2004; 44: 117–123.
- 37.** Li M, DeUgarte CM, Surrey M, Danzer H, DeCherney A, Hill DL. Fluorescence in situ hybridization reanalysis of day-6 human blastocysts diagnosed with aneuploidy on day 3. *Fertil Steril* 2005; 84: 1395–1400.
- 38.** Munné S, Velilla E, Colls P, Garcia Bermudez M, Vemuri MC, Steuerwald N, et al. Self-correction of chromosomally abnormal embryos in culture and implications for stem cell production. *Fertil Steril* 2005; 84: 1328–1334.
- 39.** Bolton H, Graham SJL, Van der Aa N, Kumar P, Theunis K, Fernandez Gallardo E, et al. Mouse model of chromosome mosaicism reveals lineage-specific depletion of aneuploid cells and normal developmental potential. *Nat Commun* 2016; 7: 11165.