

Új irányzatok az in vitro fertilizációs kezelések laboratóriumi gyakorlatában

Doktori értekezés

Lehner Ádám

Semmelweis Egyetem
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Fancsovits Péter PhD, tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Szilágyi András PhD, egyetemi tanár
Dr. Magyar Attila PhD, egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Gimes Gábor PhD, egyetemi docens

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Tóth Sára PhD, egyetemi docens
Dr. Bazsáné Dr. Kassai Zsuzsa PhD,
tudományos főmunkatárs

Budapest

2017

Tartalomjegyzék

| | |
|--|-----------|
| Tartalomjegyzék | 1 |
| Rövidítések jegyzéke | 5 |
| 1. Bevezetés | 7 |
| 1.1. Az in vitro fertilizációs kezelések rövid történeti áttekintése..... | 7 |
| 1.2. Az in vitro fertilizációs kezelések laboratóriumi folyamatai..... | 12 |
| 1.3. Az in vitro fertilizációs kezelések embriológiai laboratóriumi módszereinek új irányzatai | 15 |
| 1.3.1. A megtermékenyítés módja – az ICSI kezelések javallatainak felülvizsgálata..... | 16 |
| 1.3.2. Embriók csoportos tenyésztése..... | 19 |
| 1.3.3. Embriók fejlődésének monitorozása time-lapse rendszerek segítségével | 21 |
| 1.3.4. Számfeletti embriók hatékony krioprezervációja vitrifikációval | 23 |
| 1.3.5. Minőségbiztosítás az embriológiai laboratóriumban..... | 25 |
| 1.3.6. Óriás petesejtek indikátorszerepe az in vitro fertilizációs kezelésekben.. | 26 |
| 2. Célkitűzések | 28 |
| 3. Módszerek | 29 |
| 3.1. Petefészek-stimuláció | 29 |
| 3.1.1. GnRH-analóg kezelés | 29 |
| 3.1.2. Gonadotropin-stimuláció | 29 |
| 3.1.3. Ovulációindukció | 30 |
| 3.2. Petesejtnyerés..... | 30 |
| 3.3. Az ondóminta feldolgozása..... | 31 |
| 3.3.1. Sűrűséggradiens centrifugálás | 31 |
| 3.3.2. Mosás és kiüsztatás..... | 32 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.3.3. | Swim-up módszer..... | 32 |
| 3.4. | Megtermékenyítés..... | 33 |
| 3.4.1. | Hagyományos in vitro fertilizáció..... | 33 |
| 3.4.2. | Intracitoplazmatikus spermiuminjekció..... | 33 |
| 3.5. | A megtermékenyülés ellenőrzése..... | 35 |
| 3.6. | Embriótenyésztés..... | 35 |
| 3.6.1. | Embriók egyedi tenyésztése..... | 35 |
| 3.6.2. | Embriók csoportos tenyésztése..... | 35 |
| 3.7. | Embriók morfológiai értékelése..... | 36 |
| 3.8. | Embrióbeültetés..... | 39 |
| 3.8.1. | A beültetett embriók száma..... | 39 |
| 3.8.2. | Az embrióbeültetés időpontja..... | 40 |
| 3.8.3. | Az embrióbeültetés folyamata..... | 40 |
| 3.9. | Számfeletti embriók krioprezervációja..... | 40 |
| 3.9.1. | Programozott lassú fagyasztás..... | 41 |
| 3.9.2. | Vitrifikáció..... | 41 |
| 3.10. | Krioprezervált embriók felolvasztása..... | 42 |
| 3.10.1. | Hagyományos technikával fagyasztott embriók felolvasztása..... | 42 |
| 3.10.2. | Vitrifikációt követő felolvasztás..... | 43 |
| 3.11. | A kezelések kimenetele..... | 43 |
| 3.12. | Adatok értékelése..... | 44 |
| 3.12.1. | Az embriók minőségének összehasonlítása..... | 44 |
| 3.12.2. | Az ICSI és IVF megtermékenyítési módszerek vizsgálata..... | 44 |
| 3.12.3. | Az embriók egyedi és csoportos tenyésztésének vizsgálata..... | 45 |
| 3.12.4. | Az embriódenzitás vizsgálata..... | 46 |

| | |
|--|------------|
| 3.12.5. Embriók hagyományos mélyfagyasztásának, valamint vitrifikációjának összehasonlítása..... | 46 |
| 3.12.6. Óriás petesejtek vizsgálata..... | 47 |
| 3.13. Statisztikai vizsgálatok..... | 49 |
| 4. Eredmények | 50 |
| 4.1. A hagyományos IVF és ICSI kezelések összehasonlításának eredményei..... | 50 |
| 4.1.1. Megtermékenyülési arányok..... | 51 |
| 4.1.2. A fejlődő embriók minősége | 53 |
| 4.1.3. A beültetett embriók minősége..... | 61 |
| 4.1.4. Embrióbeültetés és a kezelések kimenetele..... | 64 |
| 4.2. A csoportos tenyésztés vizsgálatának eredményei | 64 |
| 4.3. Az embriódenzitás vizsgálatának eredményei..... | 66 |
| 4.4. A különféle fagyasztási módszerek összehasonlításának eredményei..... | 69 |
| 4.5. Az óriás petesejtek vizsgálatának eredményei..... | 71 |
| 5. Megbeszélés | 74 |
| 5.1. Az intracitoplazmatikus spermiuminjekció alkalmazása..... | 75 |
| 5.2. Embriók csoportos tenyésztése | 80 |
| 5.3. Az embriódenzitás szerepe csoportos embriótenyésztés során..... | 84 |
| 5.4. Embriók biztonságos krioprezervációja zárt rendszerű vitrifikációval | 86 |
| 5.5. Óriás petesejtek indikátorszerepe | 88 |
| 6. Következtetések | 91 |
| 7. Összefoglalás | 93 |
| 8. Summary | 94 |
| 9. Irodalomjegyzék | 95 |
| 9.1. Internetes hivatkozások: | 114 |
| 10. A doktori értekezés alapjául szolgáló saját közlemények jegyzéke | 116 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 10.1. | Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények | 116 |
| 10.2. | A tudományos munkásságot megalapozó egyéb közlemények | 116 |
| 10.3. | Tudományos közlemények:..... | 117 |
| 11. | Köszönetnyilvánítás..... | 118 |

Rövidítések jegyzéke

| | |
|----------|---|
| E2: | Estradiol |
| EBSS: | Earl's balanced salt solution |
| ESHRE: | European Society of Human Reproduction and Embryology |
| ET: | Embriótranszfer |
| FSH: | Folliculus stimuláló hormon |
| GIFT: | Gaméta intrafallopian transzfer |
| GnRH: | Gonadotrophin releasing hormone |
| GV: | Germinális vezikulum |
| hCG: | Human chorion gonadotrophin |
| hMG | Human menopausal gonadotrophin |
| HSA: | Humán szérum albumin |
| ICMART: | International Committee Monitoring Assisted Reproductive Technologies |
| ICSI: | Intracitoplazmatikus spermiuminjekció |
| IU: | International Unit (nemzetközi egység) |
| IVF: | In vitro fertilizáció (szervezeten kívüli megtermékenyítés) |
| Krio-ET: | Embriók fagyasztását-felolvasztását követő embriótranszfer |
| MI: | Metafázis I (a meiotikus osztódás első fázisának metafázisa) |
| MII: | Metafázis II (a meiotikus osztódás második fázisának metafázisa) |
| MOPS: | 3-(3-morfolino) propán-szulfonsav |
| PB: | Polar body (sarkitest) |
| PI: | Profázis I (a meiotikus osztódás első fázisának profázisa) |
| PGD: | Preimplantációs genetikai diagnosztika |
| PGS: | Preimplantációs genetikai szűrés |
| PN: | Pronucleus (előmag) |
| PZD: | Részleges zona disszekció |
| SART: | Society for Assisted Reproductive Technology |
| SUZI: | Szubzonális inszemináció |
| TESE: | Hereszövetből történő spermiumnyerés (Testicular sperm extraction) |

WOW: Well-of-the-well Petri-csésze (mikrovájatokat tartalmazó Petri-csésze)
ZD: Zona drilling
ZIFT: Zygote intrafallopian transfer

1. Bevezetés

1.1. Az in vitro fertilizációs kezelések rövid történeti áttekintése

Az in vitro fertilizáció (IVF) az a folyamat, amely során a petesejteket a szervezeten kívül, laboratóriumi körülmények között termékenyítik meg, majd a fejlődő embriót beültetik a méhüregbe. Jóllehet ezek az embriók valójában még beágyazódás előtti, úgynevezett preembriók, azonban mind a hazai, mind a nemzetközi szakirodalom egyszerűsítve embrióként hivatkozik rájuk, ezért dolgozatomban konzekvensen az embrió megnevezést alkalmazom.

Robert G. Edwards professzor és Patrick Steptoe nőgyógyász közös munkássága eredményeként 1978. július 25-én az Oldhami Általános Kórházban megszületett az első szervezeten kívül fogant gyermek, Louise Brown (Steptoe és Edwards 1978). Az általuk létrehozott módszer jelentőségét mi sem bizonyítja jobban, mint hogy az azóta eltelt közel négy évtizedben már világszerte több, mint 6,5 millió gyermek ennek a módszernek köszönheti életét (focusonreproduction.eu 2016), a fejlett országokban az in vitro fertilizációval fogant gyermekek aránya pedig az 5%-ot is elérheti (Kovács 2014). Edwards professzor neve 2010-ben vált hazánkban is szélesebb körben ismertté, miután „a szervezeten kívüli megtermékenyítés módszerének kifejlesztéséért” elnyerte az orvostudományi Nobel-díjat (Nobelprize.org 2016).

Louise Brown születése természetesen nem volt minden előzmény nélküli. Az első sikeres szervezeten kívüli megtermékenyítésről már 1878-ban számoltak. Schenk nyúl és tengeri malac petesejteket termékenyített meg in vitro körülmények között sikeresen (Schenk 1878). Több, mint fél évszázadnak kellett elteltie ahhoz, hogy emberek esetében is hasonló eredmények szülessenek. Rock és Menkin 1944-ben számolt be először humán petesejték sikeres szervezeten kívüli megtermékenyítéséről (Rock és Menkin 1944). Eredményüket hat év kutatómunka után érték el. A petesejteket laparotómia útján nyerték a páciensek menstruációs ciklusának tizedik napja körül. A létrehozott embriókat nem ültetültették vissza. Raoul Palmer francia nőgyógyász volt az első, akinek sikerült emberi petesejtet nyernie laparoszkoós technika segítségével (Nezhat 2016). Az első in vitro fogant humán embriók beültetésével létrejött terhességre 1973-ig kellett várni (De Kretzer és mtsai 1973). De Kretzer és munkatársai 5 tüsző leszívását követően egy petesejtet nyertek, amelyet sikeresen megtermékenyítettek, majd az így létrehozott

embrió 74 órával később, nyolc sejtes állapotban juttatták a méhürbe. A létrejött terhesség azonban vetéléssel végződött.

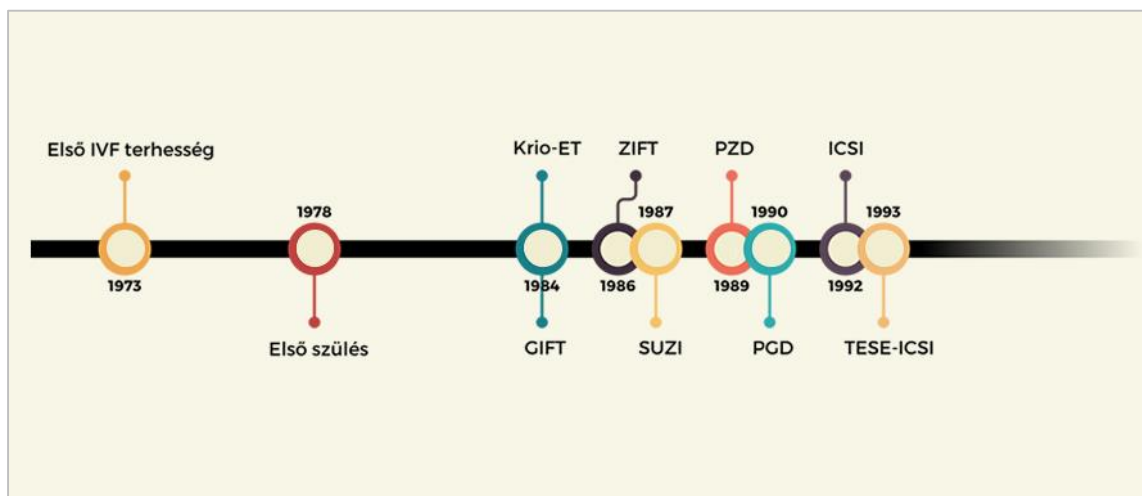
A későbbi Nobel-díjas Robert Edwards fontos úttörő munkát végzett. Először 1965-ben próbálkozott humán embriók szervezeten kívüli megtermékenyítésével (Edwards és mtsai 1966), sikeres fertilizációról, és a megtermékenyített petesejtek osztódásáról 1970-ben számolt be (Edwards és mtsai 1970). 1976-ban, munkatársával Patric Steptoe nőgyógyással közösen in vitro fogant embrió beültetését követő méhen kívüli terhességről adtak hírt (Steptoe és Edwards 1966). Az áttörést az 1978-as év hozta el. Lesley Brown 9 éve küzdött meddőséggel, mivel petevezetékét eltávolították. Spontán ciklusból egyetlen petesejtet nyertek laparoszkoپیával, amelyet megtermékenyítve nagyjából egy órával azt követően, hogy a nyolc sejtes állapotot elérte, beültettek. A létrejött terhesség ezúttal az első szervezeten kívül fogant gyermek születésével végződött.

Edwards és kortársai a petesejteket a ma hagyományos in vitro fertilizációnak nevezett módszerrel termékenyítette meg. E módszer lényege, hogy a leszívott petesejteket, az azokat körülvevő cumulus sejtekkel közösen, a valamilyen módon megfelelően előkészített ondómintával meghatározott ideig inkubálják. A létrejött embriókat néhány napos in vitro tenyésztést követően a méhürbe ültették vissza.

A beültetésre nem került, ún. számfeletti embriók egy későbbi időpontban történő felhasználásnak igénye már korán felmerült, hiszen így a kezelések hatékonysága növelhető. A sejtek fagyasztásának és mélyhűtve tárolásának módszerét már az 1970-es években ismerték (Mazur 1970), és hamarosan sikeresen alkalmazták humán embriók esetében is. Az első fagyasztott-felolvasztott embrió beültetését követő szülésről Zeilmaker és munkatársai számoltak be (1984). Az első petesejtfagyasztást követő terhességig sem kellett sokat várni (Chen 1986), noha a technika csak az utóbbi időkben vált a klinikai rutin részévé.

Az első sikeres IVF-ET kezelést követő 15 évben további módszereket dolgoztak ki a meddőség különböző formáinak célzott kezelésére. A szervezeten kívüli megtermékenyítéssel végzett kezelések fejlődését az I. Ábra szemlélteti. Shettles (1979) leszívott petesejtet juttatott frissen helyreállított petevezetékbe. Sikeres in vivo megtermékenyülést követően a kezelés szüléssel végződött. 1983-ban Tesarik és munkatársai Shettles példáját követve kidolgozták az általuk „in vitro inszemináció és

méhkürt transzfernek” nevezett eljárást (Perone 1991), amely során a leszívott petesejtek és spermiumok keverékét juttatták a petevezetékbe annak helyreállító műtete alatt (Tesarik és mtsai 1983). Négy kezelt nőbetegből kettőnél jött létre terhesség, melyek közül egy végződött szüléssel. Ezen eljárások utódként vezették be az úgynevezett gaméta intrafallopian transzfer (GIFT) kezelést, amely segítségével létrejött terhességről először 1984-ben számoltak be Asch és munkatársai (1984). GIFT kezelés során a petesejteket és spermiumokat egyidejűleg juttatták a méhkürtbe egyetlen laparoszkópos műtét alatt.



| | |
|---|--|
| GIFT: Gaméta intrafallopian transzfer | PGD: Preimplantációs genetikai diagnosztika |
| ICSI: Intracitoplazmatikus spermiuminjekció | PZD: Részleges zona disszekció |
| IVF: In vitro fertilizáció (szervezeten kívüli megtermékenyítés) | SUZI: Szubzonális inszemináció |
| Krio-ET: Embriók fagyasztását-felolvasztását követő embriótranszfer | TESE: Hereszövetből történő spermiumnyerés (Testicular sperm extraction) |
| | ZIFT: Zygote intrafallopian transfer |

I. Ábra Az in vitro fertilizációs kezelések mérföldkövei (magyarázat a szövegben)

A következő lépést a zigóták méhkürtbe történő beültetése jelentette (zygote intrafallopian transfer – ZIFT). Az állatkísérletekben már eredményes módszer első sikeres humán alkalmazásáról Devroey és munkatársai számoltak be (1986). A módszer bonyolultabb és költségesebb volt, mint a hagyományos méhürbe történő embrióbeültetés, ugyanakkor kezdetben eredményesebbnek bizonyult. A hagyományos

IVF-ET kezelések fejlődésével ez a különbség eltűnt a két technika között, és a 2000-es évek elejére ZIFT kezeléseket már csak ritkán végeztek (Weissman és mtsai 2004).

Míg korábban a petesejtnyerést, embrióbeültetést, a GIFT és ZIFT kezeléseket is laparoszkópia segítségével végezték, az ultrahangos technikák fejlődésével lehetőség nyílt kevésbé invazív módszerek alkalmazására. Wickland és munkatársai (1987) kidolgoztak egy ultrahang segítségével, hüvelyen keresztül végzett petesejtnyerési technikát, míg egy évvel később Jansen és Anderson (1988) számoltak be nem operatív embrióbeültetésről.

A fejlődés természetesen nem csak a klinikai, de az embriológiai laboratóriumi módszerekben is végbement. A hagyományos in vitro fertilizációs kezelések sikerességéhez fontos volt, hogy megfelelő mennyiségű és minőségű spermium álljon rendelkezésre a petesejtek megtermékenyítéséhez. Amennyiben az ondóminta valamelyik minőségi paramétere a normálnál alacsonyabb volt, az alacsony megtermékenyülési arány miatt a módszer nem működött hatékonyan, így andrológiai eredetű meddőség esetén csak rossz hatásfokkal volt alkalmazható. Eleinte úgy próbáltak jobb megtermékenyülési arányt elérni, hogy a denudált, cumulus sejtektől megtisztított petesejt zona pellucidáját valamilyen mikromanipulációs technika segítségével megnyitották a spermiumok számára. Ezt először kémiai úton, savas Tyrode-oldattal (zona drilling – ZD), később mechanikai úton érték el (partial zona dissection – PZD) (Gordon és mtsai 1988, Malter és Cohen 1989). Egyik módszerrel sem sikerült azonban megfelelően jó eredményeket elérni, az ily módon létrehozott zigóták esetében különösen magas volt a polispermia aránya.

Laws-King és munkatársai (1987) közölték azt a módszert, amely során egyetlen mozgó spermiumot injektáltak a zona pellucida alá a perivitellinális térbe, ez volt a szubzonális inszemináció (SUZI). A spermiumokat az injektálás előtt 20-24 órán keresztül kalciumot nem tartalmazó tápoldatban tartották, mielőtt kalciumot tartalmazó tápoldatban reszuszpendátlák, így segítve elő a kapacitációt. A 20% körüli megtermékenyülési arány továbbra is túl alacsonynak bizonyult, ahhoz, hogy az eljárás megfelelően hatékonyan alkalmazható legyen andrológiai eredetű meddőség kezelésére és a klinikai rutin részévé váljon (Wang és Sauer 2006), és napjainkra ez az arány 70% körüli.

Az áttörést az intracitoplazmatikus spermiuminjekció (ICSI) megjelenése hozta el. Ennek során egyetlen spermiumot injektálnak a petesejt citoplazmájába. A módszert már az

1980-as évek végén kidolgozták (Lanzendorf és mtsai 1988), de az első sikeres kezeléstről csak 1992-ben számoltak be (Palermo és mtsai 1992). A korábbi technikákkal ellentétben (ZD, PZD, SUZI) a petesejteket nem csak mozgó, de akár arra alkalmas mozgásképtelen spermiumokkal is meg lehet termékenyíteni. Az ICSI lehetővé tette petesejtek megtermékenyítését hereszövetből nyert spermiumokkal is (Craft és mtsai 1993). Az ICSI eljárás eredményességének köszönhetően hamar elterjedt, és ma is sikeresen alkalmazzák súlyos fokú andrológiai eredetű meddőség kezelésére.

Fejlődés természetesen nem kizárólag a megtermékenyítés módszereiben ment végbe. Noha az életképes embriók kiválasztása szinte minden laboratóriumban az embriók morfológiai bírálatával történik, több más módszer is a kutatások témája lett. Kiemelendő ezek közül a preimplantációs genetikai szűrés (PGS), amelynek célja elsősorban, hogy segítségével az aneuploid embriók kiszűrhetőek. Alkalmazásával elméletileg magasabb élve születési arány érhető el. Számos tanulmány eredménye vonja azonban kétségbe ezt a feltételezett pozitív hatást. Például az Egyesült Államokban 2011-2012 között végzett asszisztált reprodukciós kezeléseinek adatai azt mutatják, hogy a PGS alkalmazása nem növelte, hanem csökkentette az élve születések esélyét (Kushnir és mtsai 2016). Költséghatékonysági vizsgálatok is kimutatták, hogy 38-40 éves nőbetegek esetében az egy újszülöttre eső költségek PGS-sel végzett IVF kezeléseknél magasabbak, mint PGS nélkül (Mersereau és mtsai 2008). Annak, hogy az eredmények mégsem tükrözik az elvárásokat, több oka lehet. Jóllehet az alkalmazott módszerek pontossága sokat javult az utóbbi időben, a legnagyobb problémát azonban a mozaikos embriók okozzák. Ezek az embriók több kariotípusos sejtpopulációval rendelkeznek. Esetükben a PGS eredménye lehet fals pozitív (Gleicher és mtsai 2016) vagy fals negatív is. Mindezek miatt, egyes szerzők szerint PGS-t ma még csak kísérleti jelleggel szabadna alkalmazni, a betegek részletes tájékoztatásával (Orvieto és mtsai 2016).

A kutatások, fejlesztések az asszisztált reprodukciós kezeléseknél minden aspektusára kiterjednek, és annyira szerteágazóak, hogy ezek mindegyikét itt nem áll módomban bemutatni. Fontos kiemelni azonban néhány területet, amelyek az utóbbi időben kerültek a vizsgálatok középpontjába. Ilyenek többek között a megtermékenyítés módjának kiválasztása, az embriók *in vitro* tenyésztése egyedileg vagy csoportosan, embriók fejlődésének vizsgálata *time-lapse* rendszerek segítségével, illetve az embriófagyasztás módja.

1.2. Az in vitro fertilizációs kezelések laboratóriumi folyamatai

Az első sikeres IVF kezelések óta a kutatásoknak, fejlesztéseknek köszönhetően az embriológiai laboratóriumban folyó munka képe sokat változott, noha az alapvető lépések ma is ugyanazok maradtak. Ahhoz, hogy egy kezelés eredményeképpen nagyobb eséllyel jöjjön létre terhesség, egyszerre több petesejtre is szükség van, hiszen így valószínűbb, hogy lesz legalább egy, amely megtermékenyülést követően továbbosztódik és beültethető. Ezt a petefészkek hormonális stimulációjával érik el, többszörös tüszőnövekedést előidézve. Az érett tüszőkből a tüszőfolyadékot a hüvelyboltozaton keresztül, ultrahangvezérlés mellett, egy üreges tű segítségével leszívják. A petesejteket összegyűjtik, majd a megtermékenyítésig megfelelő tápoldatban 37°C-on inkubálják.

A pár férfi tagja az ondómintát általában a petesejtnyerés napján adja. A spermiumkoncentráció és motilitás vizsgálata után, a megtermékenyítés előtt a minta feldolgozásra kerül. A spermaminta feldolgozása annak minősége, illetve a felhasználási cél, a petesejtek megtermékenyítésének módja szerint több módszer segítségével történhet. Mindegyik megegyezik azonban abban, hogy a feldolgozás célja a jól mozgó spermiumok kinyerése, vagy legalább arányuk megnövelése a mintában, illetve az ondóplazma eltávolítása.

Az in vitro fertilizációs kezelések során a petesejtek megtermékenyítésére napjainkban szinte kizárólag két módszert alkalmaznak. A hagyományos in vitro fertilizáció (IVF) során a feldolgozott spermaminta – mely a feldolgozás után már legnagyobb részben progresszívan mozgó spermiumokat tartalmaz – megfelelő mennyiségét a petesejtekkel közösen inkubálják, általában 16-18 óráig, noha léteznek rövid inkubációs időt előíró protokollok is. A másik, intracitoplazmatikus spermiuminjekciónak nevezett technikát eredetileg súlyos fokú andrológiai meddőség kezelésére fejlesztették ki. Lényege, hogy a denudált, cumulus sejtektől megtisztított petesejt citoplazmájába mikromanipulátor segítségével egyetlen spermiumot injektálnak. A módszer esélyt adott olyan pároknak is arra, hogy saját gyermekük legyen, akiknél az ondóminta rendkívül gyenge minősége miatt a hagyományos IVF módszer nem jöhetett szóba, vagy nem vezetett eredményre. Az ICSI megnyitotta a lehetőséget arra, hogy mellékheréből, vagy hereszövetből sebészeti úton nyert spermiumokkal is megtermékenyíthessenek petesejteket.

A megtermékenyülést az inszemináció után 16-18 órával ellenőrzik. Ekkor a normális megtermékenyülést mutató petesejtekben az apai és anyai előmagok láthatóak. A fejlődő

embriók morfológiai paramétereit ezután hagyományosan naponta egy alkalommal vizsgálják. Az embriók bírálatának módjairól, az életképesség vizsgálatával a későbbiekben részletesen foglalkozunk.

Az embriók tenyésztése speciális szén-dioxid gázt tartalmazó inkubátorokban történik, melyek belső hőmérséklete 37 °C. A petesejteket körülvevő cumulus sejtek pH-szabályozó funkcióval is rendelkeznek, ezért eltávolításuk után a petesejtek pH-szabályozó képessége csökken (FitzHarris és Baltz 2006), különösen fontos tehát a tápoldatok megfelelő pH-értékének biztosítása. Az osztódási fázisú embriók számára optimális pH értéket a tápoldatokban található bikarbonát (HCO_3^-) puffer hivatott biztosítani. Ehhez azonban a légkörinél magasabb szén-dioxid (CO_2) tartalom szükséges, ezért az inkubátorokban lévő levegő szén-dioxid koncentrációja 5-6%. Az általánosan használt embriótenyésztő tápoldatok pH-értéke az embriók belső pH-értékénél némileg magasabb, pH 7.3-7.4 értékre vannak állítva, az embriók anyagcseréjének következtében fellépő savasodás ellensúlyozására (Turner 2013). Sok inkubátorban van ezenkívül lehetőség a légkörinél alacsonyabb oxigén (O_2) koncentráció biztosítására. Az oxigén embriókra gyakorolt toxikus hatása állatkísérletekből ismert (Catt és Henman 2000), ugyanakkor a humán eredmények nem támasztják egyértelműen alá az 5%-os O_2 -szint szükségességét (Sobrinho és mtsai 2011), jóllehet az embriók szedercsíra (blasztociszta) állapotig történő tenyésztése esetén előnyös lehet (Gardner 2016, Kovačič és Vlaisavljević 2008, Meintjes és mtsai 2009).

Az embriók tenyésztésére használt tápoldatok a pH-pufferen kívül általában különböző sókat, tápanyagokat és fehérjeforrást tartalmaznak. A tenyésztés történhet egyedileg, elkülönített tápoldatcseppekben, vagy csoportosan. A tápoldatra steril ásványi olajat rétegeznek, amely megakadályozza a folyadék párolgását, stabil ozmotikus viszonyokat biztosítva. Hasonló szerepe van az inkubátorok magas páratartalmának is.

Az embriók beültetése különböző időpontokban és állapotokban történhet. Elterjedt az inszeminációt követő 3. napon osztódási fázisban, illetve az 5. napon blasztociszta állapotban történő transzfer is. Utóbbi előnye, hogy a blasztociszta állapot elérése már önmagában az életképesség egyik indikátora, ezért blasztociszta transzfert követően a beültetésekre vonatkoztatott klinikai terhességi arány magasabb lehet, mint osztódási fázisú embriók beültetése esetén (Gardner és mtsai 1998, Milki és mtsai 2000), ugyanakkor hátránya, hogy az olyan kezelések száma magasabb, amelyekben valamilyen

okból, például az embriók elégtelen fejlődése következtében, embrióbeültetésre (és fagyasztásra) nem kerül sor. A meghosszabbított tenyésztés továbbá eszköz-, idő- és munkaigényesebb is.

Egynél több embrió beültetése – amennyiben lehetséges – növeli a teherbe esés esélyét, ugyanakkor a többes terhesség létrejöttének, illetve az ezzel együttjáró neonatális szövődményeknek a kockázata is magasabb. Általánosan elterjedt gyakorlat két embrió egyidejű beültetése, jóllehet egyre több helyen alkalmazzák a tervezetten egyetlen embrió beültetésének stratégiáját (SART és ASRM 2012). Ezt leginkább blasztociszta állapotig történő tenyésztést követően alkalmazzák. Amennyiben a nőbeteg életkora magas, meghaladja a 38-40 évet, a teherbe esés és a terhesség kihordásának esélye drámaian csökken (Templeton 1996, te Velde és Pearson 2002, ESHRE 2005). Ilyenkor, illetve amennyiben korábbi sikertelen IVF kezelések indokolják, gyakran 3, vagy akár 4 embrió is beültetésre kerül, hiszen ilyen esetekben az ikerterhesség létrejöttének valószínűsége igen alacsony. A kiválasztott embrió(ka)t a tápoldat egy kis térfogatával, lágú katéter segítségével juttatják a méhbe.

Asszisztált reprodukciós kezelést követően lehetőség van a terhesség korai felismerésére, mivel a megtermékenyülés időpontja pontosan ismert. A szérumban hCG-szint (human chorionic gonadotropin) alkalmas arra, hogy terhesség létrejöttét kimutassa, ezért azt általában 11-12 nappal az embrióbeültetést követően levett szérumminták teljes β -hCG-szintjének vizsgálatával állapítják meg (Bjerkce és mtsai 1999, Poikkeus és mtsai 2002). Amennyiben 20-23 nappal az embrióbeültetést követően egy vagy több petezsák, illetve a terhesség definitív klinikai jelei ultrahanggal láthatók, klinikai terhességről beszélhetünk (Zegers-Hochschild 2009). Abban az esetben, ha a hCG-szint emelkedést követően a terhesség ultrahanggal nem igazolható, biokémiai terhességről beszélünk. Ezt a terminológiát használja többek között a legnagyobb európai asszisztált reprodukciós társaság (European Society of Human Reproduction and Embryology - ESHRE), valamint az Amerikai Gyógyszer- és Élelmiszerügyi Hatóság (Food and Drug Administration - FDA) is.

A beültetésre kerülő embriókon túl gyakran rendelkezésre állnak olyan embriók is, amelyek életképessége megfelelő lehet ahhoz, hogy beágyazódjanak és terhességet hozzanak létre. Az igény ezen embriók megőrzésére egy későbbi időpontban történő beültetéséhez már korán felmerült. Az embriók mélyfagyasztásának, fagyasztva

tárolásának, majd felolvasztásának (krioprezerváció) és későbbi beültetésének számos előnye van. Ilyen kezelés végzése esetén nincs szükség újabb gonadotropinstimulációra, és a kumulatív, azaz a páciens összes kezelésére vonatkoztatott terhességi arány is magasabb lehet (Kuwayama és mtsai 2005, Balaban és mtsai 2008), miközben bonyolult és költséges laboratóriumi módszerekre sincs szükség.

Élő sejtek sikeres fagyasztva tárolásához néhány nehézséget azonban le kellett küzdeni. Egyrészt a 80% körüli víztartalmú sejtek fagyása során keletkező jégkristályok közvetlenül is károsítják azokat (mechanikai károsodás), másrészt az oldott anyagok koncentrációjának növekedése, miközben egyre több jég keletkezik, ozmotikus sokkot idézhet elő (Pegg 2002). Polge és munkatársai (1949) egy véletlen felfedezésnek köszönhetően ismerték fel a glicerin fagyvédő hatását. Ez nyitotta meg az utat először az emberi spermiumok sikeres fagyasztásához (Sherman és Bunge 1953), majd a kriobiológia fejlődése lehetővé tette, hogy nem sokkal az első sikeres in vitro fertilizációs kezelést követően már az első krioprezervációt túlélte embrió beültetéséből létrejött terhességről is beszámoljanak (Trounson és Mohr 1983).

1.3. Az in vitro fertilizációs kezelések embriológiai laboratóriumi módszereinek új irányzatai

Az embriológiai laboratóriumban alkalmazott módszerek rendkívül szerteágazóak, a fejlődés is több irányban halad. A kezelések eredményességének szempontjából alapvető fontosságú, hogy megfelelő minőségű embriók álljanak rendelkezésre, amelyek aztán beágyazódhatnak és terhességet hozhatnak létre. Az embriók minőségét különböző tényezők befolyásolják, melyek közül kettő emelendő ki. Az egyik a petesejtek megtermékenyítésének módja és körülményei, a másik az in vitro embriótenyésztés. A kumulatív eredményesség szempontjából kulcsfontosságú az embriók sikeres mélyfagyasztása későbbi beültetés céljából, illetve a kezelések színvonalának folyamatosságát, az esetleges nem várt események felismerését és kiküszöbölését lehetővé tevő minőségbiztosítási rendszerek. Noha az alapelvek változatlanok, az utóbbi időszakban mindegyik részfolyamatban új irányzatok jelentek meg, vagy kerültek újra a figyelem középpontjába. Jelen fejezet célja ezek közül a legfontosabbaknak, a mindennapi rutin szempontjából leginkább érintetteknek az áttekintése.

1.3.1. A megtermékenyítés módja – az ICSI kezelések javallatainak felülvizsgálata

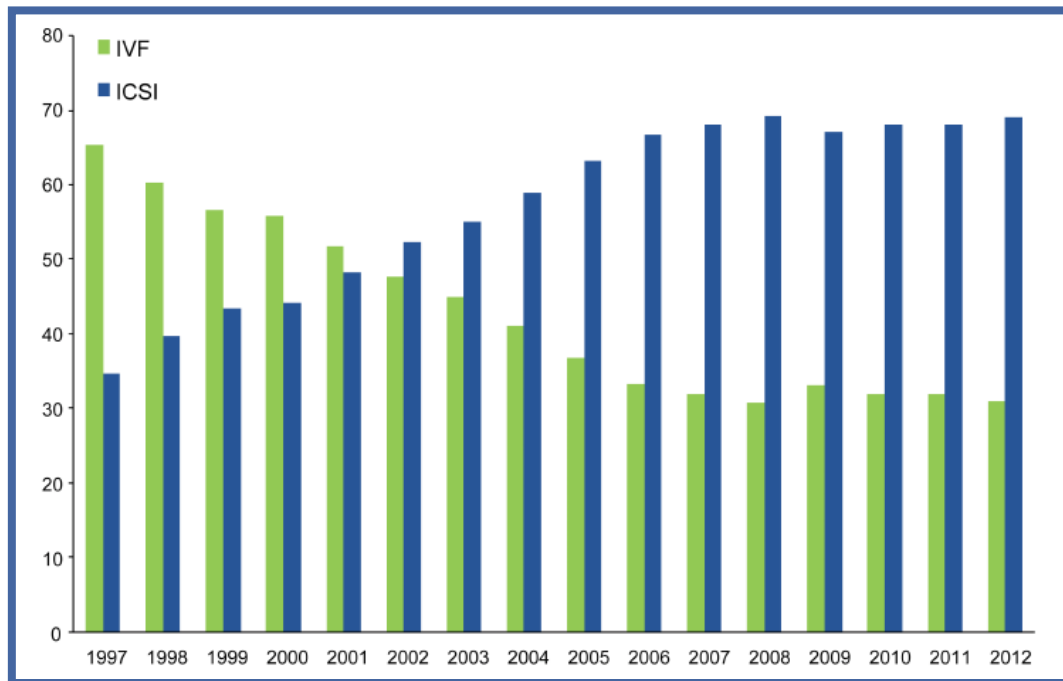
Ma a szervezeten kívüli megtermékenyítést szinte kizárólag a korábban említett két módszer, a hagyományos IVF és az eredetileg andrológiai eredetű meddőség kezelésére kidolgozott intracitoplazmatikus spermiuminjekcióval végzik, mely 1992-es bevezetése után világszerte elterjedt. Míg 1995-ben a kezelések 11%-át végezték ICSI-vel, 2003-ra, már a megtermékenyítések több mint fele, 55,6 %-a a módszer segítségével történt (Wang és Sauer, 2006).

Nem szabad azonban megfeledkezni arról, hogy mint minden beavatkozásnak, az intracitoplazmatikus spermiuminjekcióval végzett meddőségi kezeléseknél is vannak bizonyos kockázataik, noha ezek mértékéről az irodalmi adatok ellentmondásosak. Egyes szerzők a fejlődési rendellenességek előfordulásának magasabb kockázatáról számolnak be ICSI-t követően (Davis és mtsai 2012), míg mások ebből a szempontból nem találtak különbséget a két megtermékenyítési módszer kockázatai között (Devroey és Van Steirteghem 2004, Lie és mtsai 2005, Wen és mtsai 2012, Fauser és mtsai 2014)

Bizonyosnak tűnik azonban, hogy az intracitoplazmatikus spermiuminjekcióval fogant gyermekek esetében magasabb az imprinting zavarok esélye (Devroey és Van Steirteghem 2004) és a nemi kromoszómák de novo aberrációja is nagyobb mértékben fordul elő (Bonduelle és mtsai 2002a, Devroey és Van Steirteghem 2004). Az sem zárható ki, hogy ICSI, vagy akár hagyományos IVF kezeléssel fogant gyermekek olyan epigenetikai eltéréseket hordoznak, amelyek a korai életszakaszban még nem észlelhetők. Nehéz ugyanakkor megállapítani, hogy a fennálló egészségügyi kockázatok az alkalmazott asszisztált reprodukciós technikák következményei, vagy a meddőség okát képező betegség velejárói (Ciapa és mtsai 2011, Wong és Ledger 2013).

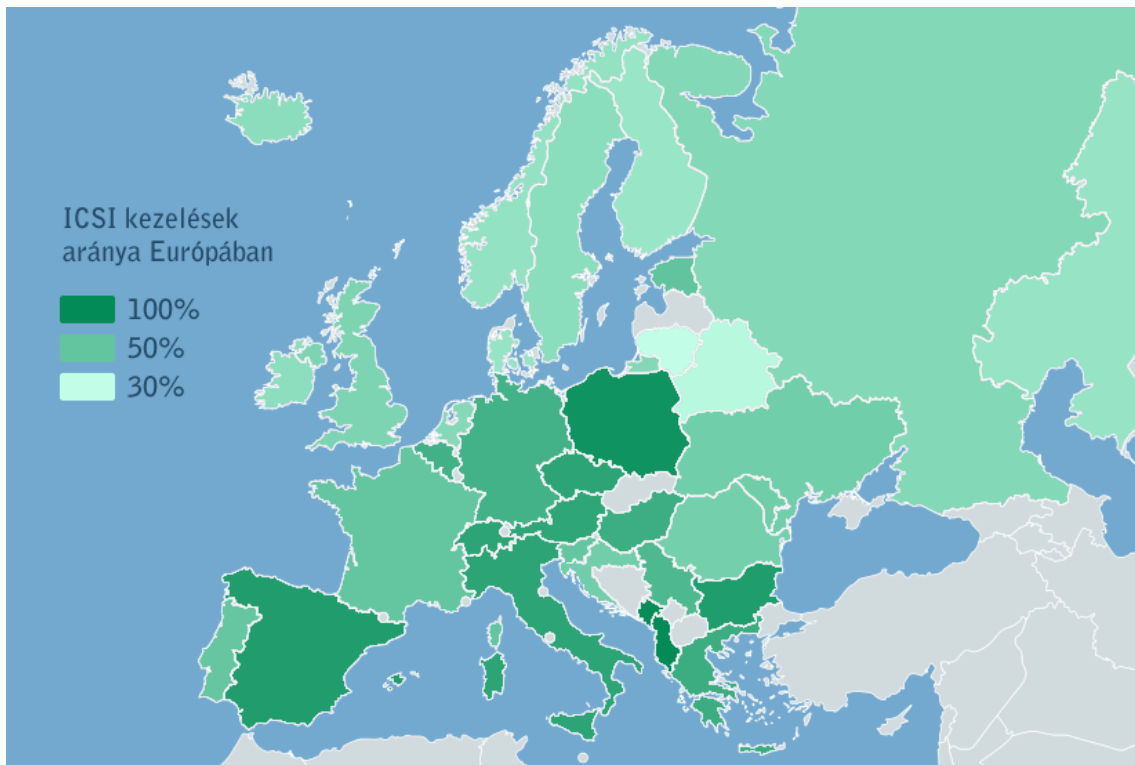
A spermiumok és petesejtek membránjai közötti interakciók, amelyek a természetes fogamzás, vagy a hagyományos IVF kezelés során végbemennek, ICSI esetén elmaradnak (Ciapa és mtsai 2011). Továbbá a spermiumok mikroinjekciója során idegen anyagok, például tápoldat, exogén DNS vagy fertőző ágensek juthatnak a petesejtekbe (Chan és mtsai 2000). Mivel az injektálásra kerülő spermiumok, noha az ondóminta feldolgozását követően, objektív szempontok szerint, mégis a megtermékenyítést végző embriológus által kerülnek kiválasztásra, további aggodalomra adhat okot az esetlegesen genetikai vagy strukturális hiányosságokkal rendelkező spermiumok injektálása (Palermo és mtsai 2008). Nem szabad elfeledkeznünk arról a tényről sem, hogy az ICSI kezelés

alatt az ivarsejtek hosszabb ideig vannak szubopitmális körülményeknek kitéve, mint hagyományos IVF végzése esetén.



II. Ábra Az IVF és ICSI kezelések megoszlásának aránya Európában 1997-2012 (Calhaz-Jorge és mtsai 2016)

A fent említett kockázatok ellenére a módszer világszerte töretlen népszerűségnek örvend. A legfrissebb adatgyűjtés szerint, amelyben 2008-2010-es időszak asszisztált reprodukciós kezeléseit vizsgálták az egész világra kiterjedően, az elvégzett IVF kezelések 66%-ában a megtermékenyítés ICSI-vel történt (Dyer és mtsai 2016). A trend jól látható a legnagyobb európai asszisztált reprodukciós szervezet (European Society of Human Reproduction and Embryology – ESHRE) által közétett ábrán (II. Ábra). Jelentős eltérések mutatkoznak azonban az egyes területek között. A Közel-Keleten a kezelések közel 100%-a ICSI-vel történik, míg ez az arány Ázsiában 55% körüli (Dyer és mtsai 2016). Európában a legfrissebb adatok szerint 69,1% az ICSI-vel végzett kezelések aránya (Calhaz-Jorge és mtsai 2016). Magyarországon az európai átlagnál nagyobb arányban, a kezelések 79,2%-ában választják a megtermékenyítés módjának, szemben több észak-európai állammal, ahol a kezeléseknek átlagosan kevesebb, mint felét végzik ICSI-vel (Calhaz-Jorge és mtsai 2016). A III. Ábra mutatja az ICSI-vel végzett kezelések arányait az egyes európai országokban.



III. Ábra Az ICSI-vel végzett kezelések megoszlásának aránya Európában 2012-ben (Calhaz-Jorge és mtsai 2016 adatai alapján)

Az intracitoplazmatikus spermiuminjekció elsődleges javallata a súlyos andrológiai eredetű meddőség. Irodalmi adatok alapján a meddőség az estek 40%-ában vezethető vissza valamilyen andrológiai okra (Dyer és mtsai 2016), ráadásul ezek egy részében elegendő lehet – amennyiben egyéb ok, például a pár nőtagjának oldaláról, azt nem zárja ki – IUI-t vagy hagyományos IVF-kezelést végezni. Jóllehet az ICSI csökkentheti a megtermékenyülés teljes elmaradásának esélyét (Verheyen és mtsai 1999, Kastrop és mtsai 1999, Fishel és mtsai 2000, Bhattacharya és mtsai 2001, Khamsi 2001, Plachot és mtsai 2002), ezért végzése javasolt korábbi sikertelen hagyományos IVF kezelés esetén is, azonban ez sem indokolja az e módszerrel végzett megtermékenyítések magas számát. Erre utalhat az a tény is, hogy az Egyesült Államokban nem andrológiai eredetű meddőség estén az ICSI alkalmazásának aránya a 1996-2012 időszakban több mint négyszeresére, 15,4%-ról 66,9%-ra emelkedett (Boulet és mtsai 2015). A módszer általánosan elfogadott javallatai között szerepel a nőbetegek magas életkora, illetve a kezelések során nyert petesejtek alacsony száma is, noha az alkalmazásával járó előnyök

ezekben az esetekben nem bizonyítottak (Luna és mtsai 2001, Xi és mtsai 2012). Egyes szerzők szerint az ICSI túl gyakori alkalmazása indokolatlan (Ola és mtsai 2001, Andersen és mtsai 2008, Evers 2016), és nem csak költségesebb a hagyományos megtermékenyítési módszernél (Hollingsworth és mtsai 2007), de felesleges kockázatnak teszi ki a pácienseket. Nem véletlen, hogy az ICSI indokolatlanul gyakori alkalmazásának kérdése újra az érdeklődés középpontjába került (Evers 2016).

1.3.2. Embriók csoportos tenyésztése

Humán embriók szervezeten kívüli tenyésztése – már csak a folyamat hossza miatt is – kulcsfontosságú tényezője a szervezeten kívüli megtermékenyítéssel végzett meddőségi kezelések eredményességének. Igen lényeges, hogy megfelelő tenyésztési körülményeket biztosítsunk, mivel azok hatással vannak az embriók fejlődésére és minőségére. Az in vitro tenyésztés körülményeit többféleképpen befolyásolhatjuk, például különböző összetételű és fajtájú tápoldatok (Mantikou és mtsai 2013, Chronopoulou és Harper 2014), eltérő típusú inkubátorok alkalmazásával (French 1997), vagy a tenyésztés módszerének megválasztásával, mint az embriók egyedileg vagy csoportosan történő tenyésztése. Jóllehet ez utóbbi módszer a szervezeten kívüli megtermékenyítéssel nagyjából egyidős, ugyanakkor az elmúlt években, az úgynevezett time-lapse rendszerek elterjedésével kezdett igazán népszerű lenni.

Egyedi tenyésztés során az embriók külön-külön tápoldatcseppbe kerülnek. Ilyenkor megváltoztathatják mikrokörnyezetüket saját egyedi igényeiknek megfelelően autokrin jelátvitellel (Reed és mtsai 2006). Az egyedi tenyésztés további fontos előnye, hogy lehetővé teszi a petesejtek és embriók egyedi azonosítását, ezáltal fejlődésük nyomon követhető. Az embriók összefüggő tápoldatcseppben történő tenyésztése lehetővé teszi az embriók közötti parakrin kommunikációt is. Feltehetően egy úgynevezett „effektív zóna” képződik, egy embriotróf faktorokból, tápanyagokból, oldott oxigénből, káliumból és kalciumból álló felhalmozódás az embriók körül, amely elősegítheti az embriók fejlődését (Reed és mtsai 2012). Embriók csoportban történő tenyésztésekor egyfajta stresszvédő hatás is megjelenhet (Hughes és mtsai 2009). Ugyanakkor több szerző is felhívja a figyelmet arra, hogy a pozitív hatások mellett, az embriotoxikus anyagok, vagy más kedvezőtlen faktorok embriók körüli akkumulációja hátráltathatja is azok fejlődését (Ebner és mtsai 2010, Minasi és mtsai 2015, Reed és mtsai 2006, 2012.) A negatív hatások ellenére úgy tűnik, hogy humán embriók csoportos tenyésztésével az egyedi tenyésztésnél

jobb eredmények érhetőek el (Moessner és Dodson 1995). Csoportos tenyésztés esetén nem volt azonban lehetőség az embriók egyedi nyomon követésére, egészen az úgynevezett well-of-the-well (WOW) tenyésztőedények megjelenéséig (Vajta és mtsai 2000). Ezekben, az eredetileg négyosztatú edényekben egy vékony tű segítségével mikrovájatokat alakítottak ki a nagyobb vájatokon belül az edények alján, amelyek minden egyes embrió helyét kijelölik. A technikát eredetileg zona nélküli petesejtek tenyésztésére használták.

A fentiek miatt, és az olyan time-lapse képalkotó rendszerek elterjedése miatt, mint amilyen a PrimoVision (Vitrolife, Göteborg, Svédország) is, egyre több IVF központ használ mikrovájatokat tartalmazó edényeket az embriók tenyésztésére.

Csoportos tenyésztés esetén fontos, hogy az embriókat a tápoldat megfelelő térfogatában inkubáljuk, amely térfogat elég nagy ahhoz, hogy elegendő tápanyagot és oxigént biztosítson minden embrió számára, és a lehető legkisebbre csökkentse a kedvezőtlen csoporthatásokat, ugyanakkor elég kicsi ahhoz, hogy a csoportos tenyésztés előnyeit megtartsa. A tápoldatcsepp térfogatát elosztva az embriók számával megkapjuk az embriódenzitást. A gyakorlatban egy meghatározott embriódenzitás kétféleképpen érhető el. Változtathatjuk az embriók számát adott térfogatú tápoldatcseppben, vagy a médium mennyiségét változatlan számú embrió mellett. Megfelelő denzitás választása elősegítheti az embriók fejlődését, ezért egy könnyen alkalmazható, ugyanakkor tenyésztési körülmények optimalizálásának hatékony módszere lehet, elősegítve az embriók minőségének javulását (Reed 2012).

Jóllehet a jelenséget és hatását sokan vizsgálták állatok esetében (Lane és Gardner, 1992, Salahuddin és mtsai 1995, Fujita és mtsai 2006, Hoelker és mtsai 2009, Pribenszky és mtsai 2010, Sananmuang és mtsai 2011, Vutyavanich és mtsai 2011), mindmáig csak néhány közlemény foglalkozik jelentőségével humán embriók tenyésztése esetén (Rijnders és Jansen 1999, Reed és mtsai 2012, Lehner és mtsai 2013). Egy optimális embriódenzitás meghatározása tehát még várat magára, és ma is viták tárgyát képezi (De Munck és mtsai 2015, Minasi és mtsai 2015), noha korábban Gardner és Lane (2004) nem több mint négy embrió együtt tenyésztését ajánlották 50 μ l-es tápoldatcseppben (azaz 12,5 μ l-es denzitás mellett).

1.3.3. Embriók fejlődésének monitorozása time-lapse rendszerek segítségével

Az embriók tenyésztésének tárgyalásakor nem mehetünk el szó nélkül az utóbbi idők egyik innovatív megoldása mellett, amely forradalmasíthatja az embriók fejlődésének vizsgálatát, miközben hatással van az in vitro tenyésztés körülményeire is (Meseguer és mtsai 2012).

A sikeres in vitro fertilizációs kezelések egyik kulcsfontosságú tényezője a megfelelő embrió(k) kiválasztása a beültetéshez. Csak az életképes embrióknak van esélyük beágyazódni a méhnyálkahártyába, és terhességet létrehozni. Ehhez a mai napig elsődlegesen alkalmazott módszer az embriók statikus morfológiai vizsgálata, mely az embriók morfológiai megjelenése, fejlődési állapota és életképessége közötti összefüggésen alapul. Az elmúlt évtizedekben az embriológiai kutatások egyik fő témája volt azoknak a morfológiai paramétereknek a meghatározása, amelyek lehetővé teszik az embriók életképességének megállapítását, értékelését. Kidolgozták az embriók általánosan elfogadott bírálati rendszerét, melyet azóta az új ismereteknek köszönhetően folyamatosan finomítanak (Veeck 1991, Gardner és mtsai 2000, Balaban és mtsai 2011, Magli és mtsai 2012), noha sok laboratórium ezektől eltérő minősítést használ. A legfontosabb paraméterek azonban osztódási fázisú embriók esetében kétség kívül a blasztomérák száma és mérete, a fragmentáltság mértéke, vakuólumok, multinukleáció előfordulása, míg hólyagcsíra (blasztociszta) állapot esetén a belső sejtréteg, a trofektoderma és a blasztocöl nagysága, illetve az expandáltság foka. Az embriók életképességének jobb megismerése érdekében egyéb területek vizsgálata, mint például aneuploida szűrés, O₂-fogyasztás vizsgálata, metabolikus profil meghatározása, génextpressziós analízis is a kutatások tárgya lett (Kirkegaard és mtsai 2012).

Az embriók morfológiai bírálata azonban egyszerűsége és költséghatékonysága miatt továbbra is az életképesség vizsgálatának általánosan alkalmazott módszere maradt. Az embriók osztályozása a fejlődés adott szakaszaiban, meghatározott időközönként (a petesejtek megtermékenyítését követő második naptól általában naponta egyetlen alkalommal) történik. A bírálatok között eltelt idő alatt zajló események azonban így rejtve maradnak. Az embriók fejlődése ugyanakkor dinamikus folyamat, morfológiájuk akár néhány óra alatt is jelentősen megváltozhat (Lemmen és mtsai 2008). A probléma áthidalására kezdték el alkalmazni az úgy nevezett time-lapse rendszereket, melyek lényege, hogy a vizsgálandó tárgyról meghatározott időközönként felvételek készülnek,

amelyek utólag mozgóképpé alakíthatók. Ilyen rendszert már 1929-ben is alkalmaztak nyúlembriók fejlődésének vizsgálatára (Lewis és Gregory 1929). A humán embriológiai gyakorlatban a 1990-es évek végén, 2000-es évek elején kezdett felbukkanni (Payne és mtsai 1997, Hardarson és mtsai 2002), de a módszer csak az elmúlt években terjedt el széleskörűen.

Ma már azonban különböző rendszerek is elérhetőek a piacon. A két leggyakrabban használt készülék, a PrimoVision és az Embryoscope (Vitrolife) is világos látóterű technológiát alkalmaz, a megvilágítást mindkettő esetében alacsony intenzitású led fény adja, amely a PrimoVision esetében zöld, míg az EmbryoScope esetében piros színű. Egyes rendszerek (pl. EEVA – Early Embryonic Viability Assessment, Auxogyn, Menlo Park, USA) ezzel ellentétben sötét látóterű technológiát használnak, amely lehetővé teszi a sejtmembránok jobb elkülöníthetőségét, ugyanakkor kevesebb információt ad a sejtek morfológiájáról (Kovács 2014). Fontos különbség az egyes rendszerek között az embriótenyésztés módja is. Az eltérő technikai megoldások miatt az EmbryoScope esetében az embriók egy speciális Petri-csészében egyedileg, elkülönült cseppekben, addig más rendszerek (pl. PrimoVision, EEVA, Geri) esetében az embriók csoportosan vannak inkubálva. Ez fontos különbség, amelynek nem csak a képek felbontására, de az embriók fejlődésére is kihathat. Az embriók egyedi és csoportos tenyésztésével a későbbiekben részletesen foglalkozunk.

A time-lapse rendszerek bevezetése lehetővé teszi az embriók fejlődésének pontosabb vizsgálatát. Segítségükkel megismerhetők a sejtosztódások időpontjai, a sejt- és osztódási ciklusok hossza és szinkronitása, és olyan események is detektálhatóvá válnak, amelyek a hagyományos, statikus morfológiai vizsgálatok során egyébként rejtve maradtak volna. Az első sejtosztódás indikátorszerepe ugyan régóta ismert (Edwards és mtsai 1984, Shoukir és mtsai 1997, Sakkas és mtsai 1998, Lundin és mtsai 2001, Sakkas és mtsai 2001), ezt mára time-lapse vizsgálatokkal is alátámasztották (Cruz és mtsai 2012). Korai osztódást mutató embriók, amelyek a két sejtes állapotot 25-27 órával az inszeminációt követően elérik, nagyobb eséllyel ágyazódnak be és hoznak létre terhességet (Fancsovits és mtsai 2005, Van Montfoort és mtsai 2004). Time-lapse felvételek segítségével vált ismertté, hogy a második sarkitést kilökődésének ideje, az előmagok megjelenésének szinkronitása és összeolvadása pozitív összefüggést mutatnak a harmadik napi embrióminőséggel (Payne 1997). Lemmen és munkatársai (2008) megállapították, hogy

az első sejtosztódást követően a sejtmagok újramegjelenésének szinkronitása az embriók életképességének egyik prediktora lehet, és az ilyen embriók beültetése nagyobb eséllyel vezet terhességhez. Meseguer (2011) és munkatársai azt találták, hogy a második sejtciklus hossza, valamint a második és harmadik sejtosztódások szinkronitása a beágyazódás fontos indikátorai. Megállapításaik egybevágóak Wong és munkatársainak (2010) korábbi eredményeivel. Megjegyzik, hogy az 5 sejtes állapotot követő osztódási események időpontjai még inkább utalhatnak az embriók beágyazódási potenciáljára, jóllehet a sejtszám növekedésével azok pontos detektálása egyre nehezebbé válik. Mára ismertté vált az is, hogy azok az embriók, amelyek a normálistól eltérő sejtosztódási mintázatot követnek, nagyobb eséllyel aneuploidak (Meseguer 2011).

Noha a time-lapse rendszereknek köszönhetően tanulmányozhatóvá vált az embriók morfológiájának fejlődése, az eredmények nem minden esetben támasztják alá alkalmazásuk indokoltságát. Nem készült még olyan randomizált klinikai tanulmány, amely e rendszerek élve szülési arányra vagy a születési rendellenességek gyakoriságcsökkenésére gyakorolt pozitív hatását támasztotta volna alá (Polanski 2014). A sejtosztódások normális időpontjai és a sejtciklusok optimális hossza megismerésének eredményeképpen azonban a fejlesztések egyik fő irányát ma már olyan algoritmusok létrehozása adja, amelyek a felvételek segítségével automatikusan értékelik az egyes embriók fejlődési potenciáljait. Ez nem csak egyszerűbbé, de objektívebbé is teszi az embriók osztályozását, a legéletképesebbek kiválasztását.

1.3.4. Számfeletti embriók hatékony krioprezervációja vitrifikációval

Lehetőség van a számfeletti embriók fagyasztva történő tárolására, amely segítségével lehetővé válik az arra alkalmas embriók egy későbbi időpontban történő felhasználása. Segítségével időt, költséget megtakaríthatunk meg, miközben a betegek számára is kevésbé megterhelő, mint a petefészek hormonális stimulációjával végzett kezelések. Az utóbbi években a fagyasztás technikája komoly fejlődésen ment keresztül, ezzel még hatékonyabbá téve az eljárást. A korábban szinte kizárólagosan alkalmazott hagyományos módszer során az embriókat először sejtmembránon átjutó és át nem jutó fagyvédő oldatokban inkubálják, majd számítógéppel vezérelt fagyasztókészülék segítségével lassan és szabályozott módon, általában $-0,3^{\circ}\text{C}/\text{perc}$ körüli sebességgel hűtik -30°C -ig, ahonnan közvetlenül a -196°C -os folyékony nitrogénbe kerülnek a minták. A hagyományos technikát mára egyre több helyen váltja ki az ultragyors fagyasztás, a

vitifikáció, amelynek eredményeképpen az embrió sejtjeinek víztartalma üvegszerű állapotba kerül. Ahhoz, hogy ez létrejöjjön, a sejtek víztartalmának csökkentése és a citoplazma nagy viszkozitásúvá tétele szükséges (Rall és Fahy 1985), ezért az embriókat rövid ideig magas koncentrációjú fagyvédő oldatba teszik, majd közvetlenül folyékony nitrogénbe merítik. Így a fagyasztásra kerülő minták nagyon gyorsan, kevesebb, mint egy másodperc alatt hűlnek le szobahőmérsékletéről -196°C -ra, a hűtési sebesség pedig akár $-23000^{\circ}\text{C}/\text{perc}$ is elérheti (Kuwayama és mtsai 2005). A vitifikáció nem igényel költséges felszerelést és sokkal rövidebb időt vesz igénybe, mint a hagyományos fagyasztás. Bár egérembriók esetében már 1985-ben eredményesen alkalmazták (Rall és Fahy 1985), az első kevésbé sikeres kísérleteket követően (Quinn és Kerin 1986) a 90-es évek második felében sikerült humán embriók vitifikációja után terhességet elérni (Ohta és mtsai 1996, Mukaida és mtsai 1998). Az utóbbi években pedig egyre több helyen váltotta fel a hagyományos módszert a vitifikáció, és számos közlemény született eredményességéről és biztonságosságáról (Kuleshova és Lopata 2002, Vajta és Nagy 2006, Loutradi és mtsai 2008, Son és Tan 2009, Edgar és Gook 2012, Vajta és mtsai 2015).

Kezdetben vitifikáció során az embriókat valamilyen kisméretű, könnyen lehűthető hordozón közvetlenül helyezték folyékony nitrogénbe, így érve el minél nagyobb hűtési sebességet. Ez a nyílt rendszer azonban magában hordozza a folyékony nitrogénben túlélő kórokozók általi fertőzések és keresztfertőzések lehetőségét. Bár lehetőség van a nitrogén sterilizálására (Parmegiani 2010), biztonságosabb és egyszerűbb megoldást jelent a zárt rendszerű vitifikáció, amelynek során a hordozó és az azon lévő embriók nem érintkeznek közvetlenül a folyékony nitrogénnel. A módszer hátránya, hogy alkalmazásával a hűtési sebesség jelentősen, akár $-1220^{\circ}\text{C}/\text{perc}$ körüli értékre is csökkenhet (Desai és mtsai 2013). Ennek ellenére úgy tűnik, hogy a zárt rendszerű vitifikációs módszerek eredményessége nem marad el a nyílt rendszerekétől (Desai és mtsai 2013). Ennek oka lehet, hogy a fagyasztással kapcsolatos sérülések feltehetően inkább kapcsolatba hozhatók a visszamelegítés során kialakuló átkristályosodással, mint az üvegszerű állapot elérésének sikertelenségével (Seki és Mazur 2009, AbdelHafez 2011).

1.3.5. Minőségbiztosítás az embriológiai laboratóriumban

A biztonságos és magas színvonalú betegellátás folyamatos biztosítására, ahogyan az más területeken is szokásos, az asszisztált reprodukciós intézetekben is minőségbiztosítási rendszereket alkalmaznak, melyek az ellátás minden részére kiterjednek. Magukba foglalják többek között a megfelelő infrastruktúra és munkakörnyezet, szakképzett személyzet biztosítását, a megfelelő dokumentációt, erőforrás-menedzsmentet, valamint a nem várt események kezelésének protokollját.

Az embriológiai laboratórium szerepe a kezelések sikerességében kulcsfontosságú, ezért kiemelten fontos az egyenletesen jó és reprodukálható eredmények biztosításához az eltérések gyors felismerése, illetve az okok mielőbbi feltárása. A minőségbiztosítás szerepe korábban is ismert volt, azonban a fejlődés ezen a területen is érezhető. Napjainkban kezd elterjedni az úgynevezett KPI-k (Key Performance Indicator) használata. Ezek a kezelések, laboratóriumi folyamatok olyan minőségi indikátorai, amelyek segítségével a csökkenő tendenciák időben detektálhatók, amennyiben megfelelő időközönként vizsgálják őket. Ez általában havi rendszerességgel történik. A vizsgálandó KPI-k kiválasztása, illetve a teljesíteni kívánt célértékek meghatározása minden laboratóriumnak a saját feladata. Tíznél nagyobb számú KPI menedzselése azonban már problémás lehet, csökkentve hatékonyságukat. Fontos, hogy a célok korábbi eredményeken alapuljanak, és reálisan teljesíthetők legyenek, ezért javasolt őket évente felülvizsgálni (Currie és Craig 2013). Az alkalmazni kívánt KPI-knek pontosan és egyszerűen meghatározhatónak, könnyen értékelhetőnek kell lennie. Ilyenek például a petesejtek érettsége, a normálisan megtermékenyült petesejtek aránya, a polispermia aránya hagyományos IVF-et követően, illetve a degenerálódott petesejtek aránya ICSI-t követően, a sikertelen megtermékenyítések száma adott időszak alatt, illetve az embriók fejlődésére, minőségére vonatkozó jellemzők. Ilyenek például az osztódó embriók aránya, a 4-sejtes embriók aránya az inszeminációt követő második, illetve a 8-sejtes embriók aránya a harmadik napon, a jó minőségű embriók aránya, fragmentáltság mértéke, blasztociszta-képződés aránya. Gyakorta alkalmazott KPI a „felhasznált” embriók aránya, azaz azoknak az embrióknak a száma, amelyek vagy beültetésre, vagy fagyasztásra kerültek. Krioprezervációt követően a fagyasztás-felolvasztást túlélő embriók aránya is lényeges visszacsatolás. Fontos indikátor jellemzők továbbá a

beágyazódási arány, illetve terhességi arányok, jóllehet ezek inkább klinikai, mint embriológiai indikátorok.

A széles körben, általánosan használt KPI-ken túl lehetséges olyan további események vagy jellemzők figyelembe vétele is, amelyek valamilyen módon utalhatnak például valamelyik klinikai vagy laboratóriumi folyamat sikerességére, illetve nem várt események bekövetkezésére. Ezeket néhányan úgynevezett „őrszem-indikátoroknak” (sentinel indicators) nevezik, noha a kifejezés értelmezése nem egységes (Mortimer és Mortimer 2015).

1.3.6. Óriás petesejtek indikátorszerepe az in vitro fertilizációs kezeléseknél

Az IVF kezeléseknél szóróványosan előfordulnak olyan petesejtek, amelyek citoplazmájának térfogata nagyjából a normális petesejtek duplája (Austin 1960). Ezeknek az úgynevezett óriás petesejteknek előfordulási gyakorisága változó, 0,12-0,3% közötti (Balakier és mtsai 2002, Rosenbusch és mtsai 2002, Machtinger 2011), ugyanakkor jelenlétük jelezheti a petefészek hormonális stimulációjának hatékonyságát és utalhat a beteg többi petesejtjének minőségére.

Citogenetikai vizsgálatok szerint a meiotikus sejtosztódás második fázisának metafázisában (MII) lévő óriás petesejtek diploidok, amelyek megtermékenyítést követően normális zigótának tűnhetnek, amelyben két pronucleus látszik, valójában azonban valamilyen kromoszóma-rendellenességgel rendelkeznek (Rosenbusch és mtsai 2002). Ezek a zigóták a beágyazódás előtti időszakban teljesen életképesek lehetnek, néhányuk a blasztociszta állapotot is elérheti. Természetesen a belőlük fejlődött embriók az esetleges kromoszóma-rendellenességek veszélye miatt nem ültethetők vissza (Balakier és mtsai 2002, Balaban 2011).

A Baltz és Tartia (2010) által leírt sejttérfogat-szabályozó mechanizmusok, amelyekben az 1-es típusú glicin transzporter (GlyT1) által közvetített glicin transzport kulcsszerepet játszik, nem adnak magyarázatot ilyen mértékű térfogat-növekedésre. Óriás petesejt létrejöttéhez vezethet a citoplazma kettéosztódásának elmaradása az oogonium mitotikus osztódás során, vagy két szomszédos oogonium összeolvadása az oogenezis alatt (Austin 1960). Ugyanakkor még a normálméretű petesejtek is lehetnek diploidok. Ennek egyik oka az lehet, hogy két éretlen tüsző vagy petesejt a fejlődés korábbi szakaszában olvad össze, mint óriás petesejtek létrejötte esetén (Hardarson és mtsai 2002). Éretlen, a meiotikus sejtosztódás első fázisában (PI vagy GV állapot) lévő óriás

petesejtekben gyakran két egyforma nagyságú germinális vezikulum, majd érett állapotban két sarki test látható. Az ilyen két maggal rendelkező (binukleáris) GV állapotban lévő óriás petesejtek érése kétféleképpen mehet végbe. Az egyik eset, amikor az MII stádiumú óriás petesejt egy diploid kromozómakiegészítéssel és egyetlen diploid sarkitesttel rendelkezik. Ennek oka a GV állapotú petesejt két haploid kromozóma készletének egyesülése. A másik eset, amikor az óriás petesejtnak két haploid kromozóma készlete, valamint két haploid sarki teste van (Rosenbusch és mtsai 2002). Óriás petesejtek jelenléte indikátorszerepükön túl hasznos információkkal szolgálhat a tüszők környezetéről, hozzájárulva a petefészek biológiai folyamatainak jobb megértéséhez, amely akár hatékonyabb stimulációs protokollok tervezését is segítheti.

2. Célkitűzések

A meddőség kezelésben szerteágazó fejlesztések, újítások zajlanak, melyek a klinikai embriológia valamennyi területére kiterjednek. Egyetemi klinikaként feladatunk a lehető legtöbb, legfontosabb irányokban történő kutatás, jóllehet minden új irányzat és módszer követése és vizsgálata nem áll módunkban. Dolgozatom főbb célkitűzései ezért a következők:

1. Feltárni, hogy milyen esetekben érhetőek el hagyományos IVF kezeléssel hasonló, vagy akár még jobb eredmények is, mint intracitoplazmatikus spermiuminjekciót követően, így csökkentve az esetlegesen indokolatlanul végzett ICSI kezelések számát.
2. Megvizsgálni, hogy az embriók mikrovájatokat tartalmazó tenyésztőedényben történő csoportos tenyésztése befolyásolja-e a megtermékenyülési arányt ICSI-t követően, illetve megnézni, hogy a tenyésztés módja milyen hatással van az embriók minőségére, illetve azon embriók számára, amelyek vagy beültetésre vagy fagyasztásra kerülnek. Megvizsgálni továbbá a beültetést követően beágyazódott embriók arányát, valamint a klinikai terhességi arányt.
3. Megvizsgálni, hogy befolyásolja-e az embriódenzitás a mikrovájatokat tartalmazó tenyésztőedényben csoportosan tenyésztett embriók fejlődését, illetve a különböző embriódenzitások milyen hatással vannak az embrióminőségre.
4. Megnézni, hogyan befolyásolja a zárt rendszerű vitrifikáció a programozott lassú fagyasztással összehasonlítva az osztódási fázisú embriók túlélését a felolvasztást követően, illetve milyen hatással van a krioprezervált embriókkal végzett IVF kezelések eredményességére.
5. Feltárni, hogy mit jelez az óriás petesejtek jelenléte, és jelenlétük utal-e a kezelés többi petesejtjének, illetve a belőlük fejlődő embrióknak a minőségére, az IVF kezelések kimenetelére.

3. Módszerek

Jelen tanulmányunkhoz a Semmelweis Egyetem I. sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika Asszisztált Reprodukciós Osztályán 2008. és 2015 között elvégzett in vitro fertilizációs kezelések adatait dolgoztuk fel. Vizsgálatainkhoz különböző időszakokban végzett kezelések klinikai, illetve embriológiai adatait értékeltük, melyeket az Adatok értékelése alfejezetben részletesen ismertettünk.

3.1. Petefészek-stimuláció

Többszörös tüszőérést a petefészek kontrollált hormonális stimulációjával értünk el. Ez gonadotropin-releasing hormon (GnRH) agonista + gonadotropin „hosszú protokoll” szerint, vagy többszöri dózisú flexibilis kombinált GnRH-antagonista + gonadotropin kezeléssel történt.

3.1.1. GnRH-analóg kezelés

Hosszú protokoll alkalmazása során a hypophysis gonadotropin-termelésének reverzibilis felfüggesztése (desensitizatio) történt. Ehhez a nőbetegek az IVF-kezelést megelőző menstruációs ciklusuk sárgatest-fázisának közepétől (20. ciklusnap) GnRH-agonista kezelésben részesültek, 0,1 mg/nap subcutan triptorelin injekció (Decapeptyl; Ferring, Kiel, Németország) adásával mindaddig, amíg a szérum ösztadiol szintje (E_2) 50 pg/ml, az luteinizáló hormon (LH) értéke pedig 5 IU/l alatti értékre nem csökkent. Amennyiben az előkezelés kezdetét követő 10-16. napi első kontrollvizsgálaton ez nem teljesült, az előkezelést 7 nappal meghosszabbítottuk. Ezt követően került sor a gonadotropin stimulációra.

Rövid protokoll, azaz többszöri dózisú flexibilis GnRH-antagonista kezelés (Diedrich és mtsai 1994) során 0,25 mg/nap Cetrotide (Cetrorelix; Serono, Róma, Olaszország) kezelésre került sor, az ovulációindukció napjáig. A gonadotropin stimulációt ebben az esetben a menstruációs ciklus 2. vagy 3. napján indítottuk.

3.1.2. Gonadotropin-stimuláció

A gonadotropin-stimuláció indítását követő 5. vagy 6. naptól 1-2 naponta ultrahangvizsgálattal ellenőriztük a fejlődő tüszők számát és méretét, illetve meghatároztuk a szérum E_2 -szintet. A szükséges további gonadotropin-mennyiséget ezek

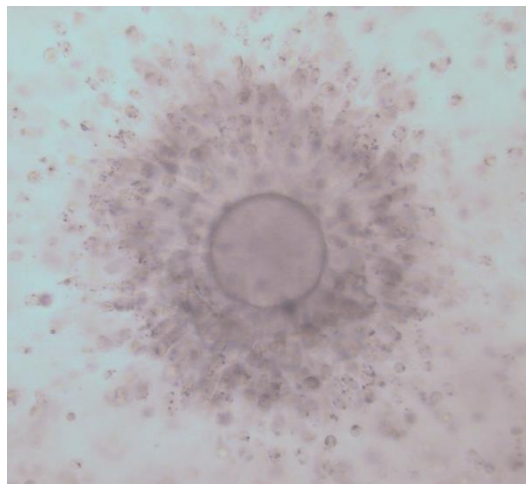
alapján határoztuk meg. A gonadotropin-kezelést az ovulációindukciót megelőző napig folytattuk.

3.1.3. Ovulációindukció

Az ovuláció kiváltására 5 000-10 000 IU human Chorionic Gonadotropin (hCG) (Choragon; Ferring) adásával került sor, amennyiben legalább egy tüsző átmérője elérte a 18 mm-t és legalább három további tüszőé a 15-16 mm-t, illetve az ösztradiol-koncentráció meghaladta a 200-300 pg/ml/növekvő tüsző értéket.

3.2. **Petesejtnyerés**

A petesejtnyerésre 36 órával a hCG injekció adása után került sor. A transzvaginális ultrahangvezérelt tüszőpunkció során került sor a tüszőfolyadék leszívására. A punkciót követően a punkciós tűt heparinnal (Heparibene Na 25 000 NE; Ratiopharm, Ulm, Németország) kiegészített EBSS-H (Lonza; Verviers, Belgium) oldattal öblítettük át. A tüszőfolyadékot az embriológiai laboratóriumba szállítottuk, ahol a cumulus oophorus sejtekkel körülvett petesejteket (petesejt-cumulus komplexeket – IV. Ábra) sztereomikroszkóp segítségével, 6-30-szoros nagyítással kerestük. Az összegyűjtött petesejteket G-MOPS Plus (Vitrolife) tápoldattal mostuk, majd a megtermékenyítést megelőzően 4-6 órán keresztül 37°C-on inkubáltuk Forma Scientific 3141 típusú inkubátorban (Forma Scientific; Waltham, MA, USA), 6%-os CO₂-szint, valamint 96%-os relatív páratartalom mellett, steril ásványi olajjal (Ovoil, Vitrolife) fedett G-IVF Plus (Vitrolife) tápoldatban.



IV. Ábra Cumulus-petesejt komplex a tüszőleszívást követően

Az IVF kezelések során alkalmazott tápoldatok nevét, felhasználási körét, illetve az oldatok gyártóit az I. Táblázat tartalmazza.

I. Táblázat Az IVF kezelések során laboratóriumi gyakorlatunkban alkalmazott tápoldatok

| Felhasználás célja | | Oldat neve | Gyártó |
|---------------------------------------|------------------------|--------------------------|------------------|
| Tüszőpunkció | | EBSS-H+ Heparibene Na | Lonza/Ratiopharm |
| Petesejtkeresés | | G-MOPS Plus | Vitrolife |
| Spermapreparálás | Gradiens centrifugálás | SpermGrad | Vitrolife |
| | Mosás | G-MOPS Plus | Vitrolife |
| | | EBSS-H+1% HSA | Lonza/Vitrolife |
| Petesejtek előinkubálása | | G-IVF Plus | Vitrolife |
| Hagyományos IVF megtermékenyítés | | G-IVF Plus | Vitrolife |
| Intracitoplazmatikus spermiuminjekció | | G-MOPS Plus | Vitrolife |
| Embriótenyésztés | | G-1 Plus | Vitrolife |
| Embrióbeültetés | | G-2 Plus | Vitrolife |
| | | EmbryoGlue | Vitrolife |

3.3. Az ondóminta feldolgozása

A meddő pár férfi tagja az ondómintát a petesejtnyerés napján, délelőtt adta. A spermaminták vizsgálatára az Egészségügyi Világszervezet (WHO) érvényben lévő ajánlása alapján (WHO 1999, 2010), 30-60 perccel a mintaadást követően került sor. A spermamintákat minden esetben feldolgoztuk. A feldolgozás célja az ondóplazma eltávolításán túl, elsősorban a mintában a progresszíven mozgó spermiumok arányának növelése volt. Ehhez az ondóminta minőségének függvényében a következő módszereket alkalmaztuk.

3.3.1. Sűrűséggradiens centrifugálás

A leggyakrabban alkalmazott spermafeldolgozási módszer a sűrűséggradiens centrifugálás volt. Ehhez 1% humán szérum albuminnal (HSA; FertiPro, Beernem,

Belgium) kiegészített EBSS-H tápoldattal hígított SpermGrad (Vitrolife) spermareparáló oldat 90%-os, illetve 45%-os koncentrációját használtuk. Kúpos centrifugacső aljára rétegeztünk először 0,8-1,0 ml térfogatú sűrűbb, majd ugyanennyi hígabb médiumot, végül az így létrejött gradiens tetejére került a natív ondóminta. Húsz perces, 400 g-vel történő centrifugálást követően a centrifugacső alján összegyűlt pelletet üveg Pasteur-pipetta segítségével egy másik csőbe pipettáztuk, majd kb. 4 ml 1% HSA-val kiegészített EBSS-H vagy G-MOPS Plus tápoldattal mostuk. Ehhez a tápoldattal összekevert pelletet 400 g-vel 10 percen keresztül centrifugáltuk, majd a felülúszó eltávolítását követően a mosást még egyszer megismételtük, végül a nyert pelletet annak mennyiségétől függően 0,1-0,5 ml G-IVF Plus tápoldatban reszuszpendáltuk.

3.3.2. Mosás és kiúsztatás

Kiugróan gyenge minőségű ondóminták (oligo-astheno-teratozoospermia maxima, illetve cryptozoospermia) esetében, amikor a natív ondóminta vizsgálata során a Makler-kamra látóterében mindössze legfeljebb néhány mozgó és/vagy nem mozgó spermiumot sikerült megfigyelni, a mintát a korábban leírtakhoz hasonló módon mostuk. Az alacsony spermiumkoncentráció miatt azonban az ilyen mintákat nagyobb, 800 g erővel centrifugáltuk, és a reszuszpendálás is kisebb, legfeljebb 0,1 ml-es oldatmennyiséggel történt.

Olyan esetekben, amikor a feldolgozott minta vizsgálatát követően sem sikerült mozgó spermiumokat detektáltunk, a megtermékenyítés előtt sor került a minták kiúsztatására. Ehhez egy ICSI-hez használt Petri-csészében (Falcon, Hunter Scientific, Essex, Egyesült Királyság) négy darab, egyenként körülbelül 25 µl-es G-Mops Plus tápoldatcseppet készítettünk, amelyeket steril ásványi olajjal (Ovoil) fedtünk. Ezekbe cseppentettük a feldolgozott spermaminta különböző térfogatait (10-20 µl), majd az elkészült Petri-csészét 1-2 órán át inkubáltuk. Amennyiben a mintában voltak progresszív spermiumok, azok egy része ez idő alatt elérte az oldatcseppek szélét, ahonnan az ICSI-hez használt üvegapilláris segítségével gyűjtöttük össze őket.

3.3.3. Swim-up módszer

Nagyszámú progresszív spermiumot tartalmazó ondóminták esetén alkalmazott módszer. Lényege, hogy az ondóplazmától mosás segítségével megtisztított mintára, amelyet nem reszuszpendáltunk, óvatosan 0,8-1,2 ml térfogatú G-IVF Plus tápoldatot rétegeztünk. Egy

órán át történő inkubálás után a felülúszó részből 0,5-0,8 ml oldatot leszívtunk, amely nagyrészt jól mozgó hímivarsejteket tartalmazott. A megtermékenyítéshez ezt a leszívott térfogatot használtuk fel, szükség esetén további hígítást követően. A swim-up módszert legtöbbször sűrűséggradiens centrifugálással kombinálva alkalmaztuk, így érve el még jobb motilitást.

3.4. Megtermékenyítés

3.4.1. Hagyományos in vitro fertilizáció

Hagyományos IVF kezelésre az osztályunkon alkalmazott protokoll szerint abban az esetben került sor, amennyiben az ondóminta motilitása a feldolgozást követően a 85-90%-ot elérte, illetve a benne található progresszíven mozgó spermiumok száma legalább 1 millió volt, valamint legalább 4 petesejtet sikerült nyerni, illetve amennyiben a nőbeteg életkora a 40 évet nem érte el. Negyven év felett hagyományos IVF kezelésre csak megfelelő mennyiségű petesejt és jó minőségű ondóminta esetén, egyedi elbírálás alapján kerülhetett sor. A megtermékenyítéshez egy négyosztatú Petri-csészét (NUNC, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) előre elkészítettünk és inkubáltunk, hogy az oldatok hőmérséklete és pH-ja megfelelő legyen. Minden vájatba 700 µl G-IVF Plus megtermékenyítő oldat került, melyet 300 µl ásványi olajjal (Ovoil) fedtünk. Egy vájatba legfeljebb 4-6 cumulus-petesejt komplex került. Az inszeminációs koncentráció minden esetben 300 ezer progresszív spermium/ml volt, függetlenül az egyes vájakban lévő petesejtek számától. Az ivarsejteket 16-18 órán keresztül inkubáltuk, majd a megtermékenyülés ellenőrzését megelőzően, az addigra fellazult cumulus sejtréteget mechanikai úton, 150 µm átmérőjű műanyag kapilláris (The Stripper; Origio, Trumbull, USA) segítségével eltávolítottuk, és a zigótákat, illetve meg nem termékenyült petesejteket embriótenyésztő tápoldatba helyeztük.

3.4.2. Intracitoplazmatikus spermiuminjekció

A spermiumok egyedi injektálását megelőzően a petesejteket denudáltuk, azaz eltávolítottuk a petesejteket körülvevő cumulus sejtréteget. Ehhez hialuronidáz enzimmel történő emésztést alkalmaztunk 80 NE/ml koncentrációjú oldattal (Hyaluronidase, FertiPro), amelyet G-Mops Plus oldatban történő tisztítás követett öt lépcsőben. A petesejteket a megtermékenyítéshez egy arra alkalmas Petri-csésze (Falcon ICSI Petri-

csésze) egyenként 5 μ l térfogatú G-Mops Plus tápoldatcseppeibe helyeztünk, míg a feldolgozott spermamintából polyvinylpyrrolidon (ICSI, Vitrolife) oldatcseppbe csöppentettünk. Utóbbi egy olyan viszkózus anyag, amely a spermiumok gyors mozgását hivatott lelassítani, lehetővé téve mozgásuk, morfológiájuk jobb megfigyelését, valamint megkönnyítve összegyűjtésüket. Az injektálást invert mikroszkópra (Diaphot 200; Nikon, Tokyo, Japán) szerelt, Narishige (Narishige, Tokyo, Japán), majd 2013-tól Eppendorf Transferman NK2 (Eppendorf, Hamburg, Németország) mikromanipulátor segítségével végeztük, 200-szoros nagyítás mellett. A megtermékenyítésre vizuális szelekciót követően kiválasztott spermium farkán egy vékony üvegapilláris (ICSI Micropipette; Origio) segítségével membránsérülést ejtettünk, majd a farki rész felől a kapilláris elülső részébe szívtuk. A petesejtet egy nagyobb belső átmérővel rendelkező üvegapilláris (Holding Micropipete, Origio) végén, vákuum segítségével rögzítettük oly módon, hogy az első sarki test 6 óra irányába álljon (V. Ábra). Az injektálás során kis mennyiségű citoplazmát kiszívtunk, így biztosítva az oolemma átszakadását, majd a spermiumot azzal együtt juttattuk a petesejtbe. A beavatkozást minden érett, a meiotikus sejtosztódás második fázisában lévő petesejt esetén, ahol az első sarki test már kilöködött, megismételtük. Ez alól kizárólag az óriás petesejtek képeztek kivételt. A megtermékenyítést követően a petesejtek közvetlenül a tenyésztő tápoldatba kerültek.



V. Ábra A tartó kapillárisához rögzített denudált MII petesejt az injektálást megelőzően

3.5. A megtermékenyülés ellenőrzése

A megtermékenyülés ellenőrzésére 16-18 órával a megtermékenyítést követően került sor. Akárcsak a későbbiekben végzett embrióbírálatokat, a megtermékenyülés vizsgálatát is invert mikroszkóp segítségével, 200-szoros nagyításon végeztük. Abban az esetben, ha a petesejt citoplazmájában két előmag (pronucleus) volt látható, a petesejtet normálisan, egy, illetve kettőnél több előmag esetén pedig rendellenesen megtermékenyültnek tekintettük. Amennyiben előmag nem volt látható, a megtermékenyülés elmaradását regisztráltuk. Normálisan megtermékenyült petesejtek esetén értékeltük az előmagokban látható magvacskák (nuclear precursor body, NPB) elhelyezkedését is.

3.6. Embriótenyésztés

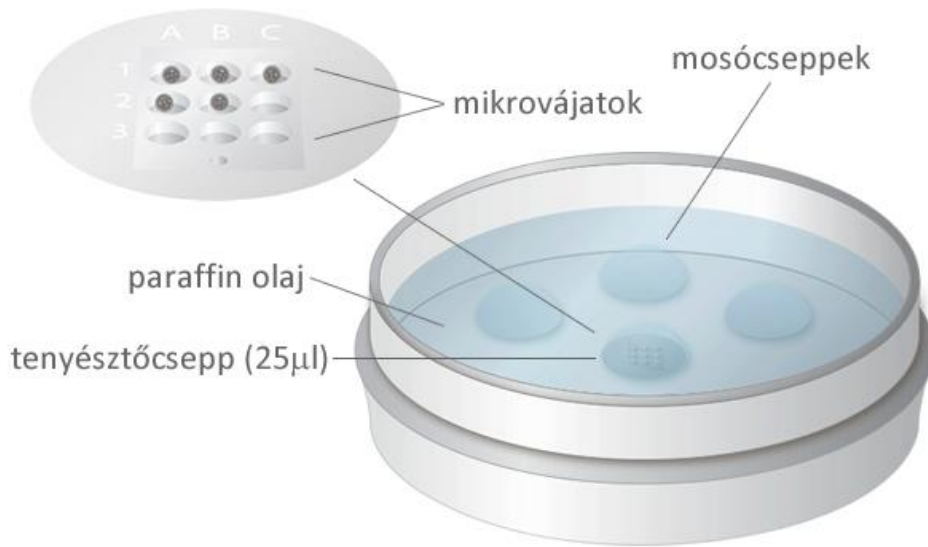
Az embriók in vitro tenyésztése ICSI esetén a megtermékenyítéstől, hagyományos IVF kezelés esetén a cumulus sejtek eltávolításától az inszeminációt követő második, illetve harmadig napi embrióbeültetésig tartott. Az embriók tenyésztése minden esetben Ovoil ásványi olajjal fedett G-1 Plus (Vitrolife) embriótenyésztő tápoldatban történt, azonban különböző módszerek szerint.

3.6.1. Embriók egyedi tenyésztése

Embriók egyedi tenyésztésére 60 mm átmérőjű Falcon 3004 (Becton Dickinson, Erembodegem, Belgium) Petri-csészét használtunk. Minden embrió egy különálló 25 µl térfogatú tápoldatcseppbe került. Egy edénybe legfeljebb 12 petesejtet, illetve embriót helyeztünk.

3.6.2. Embriók csoportos tenyésztése

Az embriók csoportos tenyésztésére 9-vájatú Primo Vision Dish (Vitrolife) WOW típusú Petri-csészében került sor (VI. Ábra). A mikrovájatokat 150 µm átmérőjű műanyag kapilláris (The Stripper, Origio) segítségével egyenként töltöttük fel, majd 25 µl térfogatú tápoldatot cseppentettünk rá. Amennyiben egy beteg esetében több mint 9 petesejt állt rendelkezésre, a petesejteket és embriókat a két, illetve három tenyésztőedényben egyenlően osztottuk el. A tenyésztés ideje alatt a tápoldat cseréjére egyik esetben sem került sor.



VI. Ábra Embriók csoportos tenyészte mikrovájatokat tartalmazó Primo Vision Dish Petri-csészében

3.7. Embriók morfológiai értékelése

A fejlődő embriók bírálatát a megtermékenyítést követő második és harmadik napon egyaránt 1-1 alkalommal végeztük. Ennek során az embriók morfológiai értékelése történt, korábban a Veeck-féle bírálati rendszer (Veeck 1991) szerint, amelyet 2012-től az ESHRE és ALPHA szervezetek által kiadott ajánlás szerint módosítottunk (ESHRE és ALPHA 2011). Mindkét esetben az embriókat öt minőségi osztály valamelyikébe osztottuk (A-E). A II. és III. Táblázat mutatja az osztályozás alapját a két eltérő bírálati rendszer szerint.

II. Táblázat Veeck-féle embrióbírálati rendszer (Veeck 1991, Fancsovits 2006 után)

| Morfológiai kategória | Blasztomérák jellemzői | Fragmentáció mértéke |
|------------------------------|--|---|
| A | Egyforma méretű blasztomérák | Fragmentáció egyáltalán nincs |
| B | Egyforma méretű blasztomérák | Néhány kisebb fragmentum (<25%) |
| C | Eltérő méretű blasztomérák | Fragmentumok mennyisége 25-50% között van |
| D | Blasztomérák méretétől függetlenül | Jelentős mennyiségű fragmentáció (50-80%) |
| E | Blasztoméra egyáltalán nem vagy alig ismerhető fel | Súlyos fokú vagy teljes fragmentáltság (>80%) |

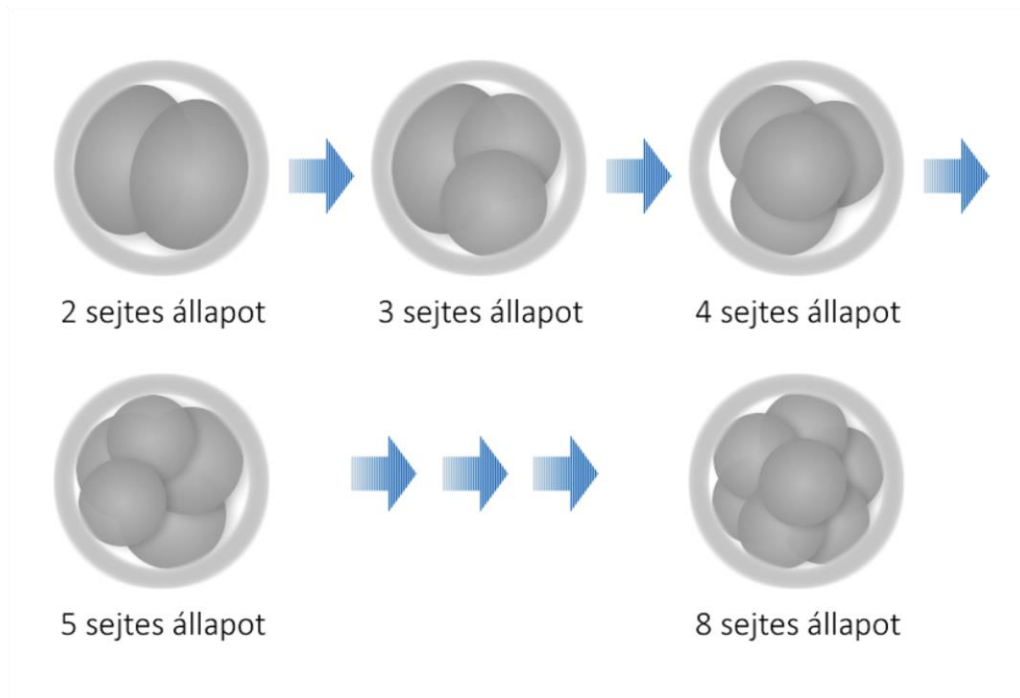
A fragmentáció mértékét az embrió teljes térfogatának %-ában adtuk meg. A fragmentumok olyan membránnal körülhatárolt citoplazmacseppek, amelyek nem tartalmaznak DNS-t (Magli és mtsai 2012), jöllehet a nagyobb fragmentumok megkülönböztetése a kisebb, sejtmagot tartalmazó blasztoméráktól problémás, ezért az érvényben lévő ajánlások alapján (Johansson és mtsai 2003) minden olyan intakt képletet, amely átmérője nem érte el a 45 μm -et a második, illetve a 40 μm -et a harmadik napon, fragmentumnak tekintettünk.

Azokat az embriókat, amelyek legalább egy blasztomérájában több sejtmag is látható volt, D minőségűnek tekintettünk, mivel ismeretes, hogy az ilyen embriók jelentős hányada valamilyen kromoszóma-rendellenességet hordoz (Kligman és mtsai 1996). Ezen embriókat nem tekintettük fagyasztásra alkalmasnak, és beültetésükre is csak azokban a ciklusokban került sor, amelyekben nem állt rendelkezésre jobb minőségi pontértékkel rendelkező embrió.

III. Táblázat Az osztályunkon 2012-től alkalmazott embrióbírálati rendszer

| Morfológiai kategória | Blasztomérák jellemzői | Fragmentáció mértéke | Egyéb |
|------------------------------|--|---|--|
| A | Blasztomérák mérete a fejlődési állapotnak megfelelő (tipikus) | Minimális mértékű fragmentáció vagy fragmentáció teljes hiánya ($\leq 5\%$) | |
| B | Blasztomérák mérete a fejlődési állapotnak megfelelő (tipikus) | Néhány kisebb fragmentum (6-20%) | |
| C | Fejlődési állapottól függetlenül | Fragmentumok mennyisége 21-45% között van | |
| D | Fejlődési állapottól függetlenül | Jelentős mennyiségű fragmentum (46-80%) | Több magot tartalmazó sejt; Jelentős mennyiségű, nagyméretű vakuólum |
| E | Blasztoméra egyáltalán nem vagy alig ismerhető fel; A megtermékenyült petesejt nem osztódott vagy degenerálódott | Súlyos fokú vagy teljes fragmentáltság ($>80\%$) | |

Kismértékű vakuolizáció nem tekintethető az embrióminőség negatív indikátorának (ESHRE és ALPHA 2011, Fancsovits 2006), azonban embriók jelentősebb mértékű és/vagy méretű vakuolumossága esetén alacsonyabb morfológiai pontértéket ítélünk. Hasonlóan befolyásolta az embriók osztályozását a citoplazma intenzív szemcsézettsége is.



VII. Ábra Osztódási fázisú embriók néhány tipikus fejlődési állapota

Lényeges bírálati szempont volt a blasztomérák mérete. Korábbi bírálati rendszerek nem vették figyelembe aényt, hogy meghatározott sejtszámú embriók esetében az azonos sejtméret rendellenes osztódásra utalhat, ezért 2012-től az embriókat a blasztomérák mérete alapján a fejlődési állapotnak megfelelően tipikus, illetve nem tipikus kategóriákba soroltuk. Az embriók tipikus fejlődési állapotait a VII. Ábra mutatja.

3.8. Embrióbeültetés

3.8.1. A beültetett embriók száma

A beültetésre kerülő embriók számát saját protokollunk szerint tett javaslatot követően minden esetben a beteggel egyeztetve határoztuk meg. Leggyakrabban 2 embrió beültetését javasoltuk, amennyiben a beteg életkora nem érte el a 40 évet. Ez alól kivételt képeztek azok az esetek, amikor a beteg már legalább két olyan embriótranszferen volt túl, amely klinikai terhesség létrejöttét nem eredményezte. Ilyenkor 3 embrió beültetését javasoltuk. Amennyiben a nőbeteg életkora a petefészek hormonális stimulációjának kezdetekor elérte a 40 évet, a beágyazódás esélyének drasztikus csökkenése miatt 4 embrió beültetését javasoltuk. Minden olyan esetben, amikor nem állt rendelkezésre a

protokollunk szerint beültethető számú megfelelő minőségű embrió, értelem szerűen az összes rendelkezésre álló embrió beültetését javasoltuk.

3.8.2. Az embrióbeültetés időpontja

Az embriók beültetésére a petesejtnyerést általában követő harmadik napon került sor. Kivételt képeztek azok az esetek, amikor valamilyen okból nem volt lehetőségünk szelekcióra. Ilyenkor az embriók transzfere a megtermékenyítést követő második napon történt.

3.8.3. Az embrióbeültetés folyamata

A beültetésre kerülő embriók kiválasztása a harmadik napi bírálatot követően, elsődlegesen az embriók harmadik napi sejtszáma, valamint morfológiai pontértéke alapján történt. A legéletképesebbnek ítélt embriók kiválasztásánál további szempontot jelentett – különösen azonos sejtszám és pontérték esetén – a fragmentáció mértéke, a második napi sejtszám és morfológiai pontérték, illetve a megtermékenyítést követő 24-26 órával végzett korai osztódás vizsgálatának eredménye. Fontos szempont volt továbbá a fejlődés ütemének figyelembe vétele is. Szükség esetén az előmagok mageloszlásainak értékelése is segítette a döntést. A három vagy több előmagot tartalmazó zigótából fejlődő embriók semmilyen esetben sem kerültek beültetésre.

A beültetést megelőzően az embriókat G-2 Plus (Vitrolife), vagy EmbryoGlue (Vitrolife) embriótranszfer tápoldatban 5-15 percen keresztül inkubáltuk. Az embriókat ezt követően a tápoldat minimális térfogatával, a tápoldattal történő átöblítést követően lágy transzferkatétrebe (Wallace, Smith-Medical, Dublin, OH, USA), vagy merev TDT katéter (Set TDT, Laboratoire CCD, Párizs, Franciaország) lágy belső részébe szívtuk fel, attól függően, hogy a kezelőorvos által lágy katéterrel végzett próbatranszfer sikeres volt-e. A transzfert követően a katétereket átmostuk, és amennyiben volt olyan embrió, amely valamilyen oknál fogva a katéterben maradt, a transzfert megismételtük.

3.9. Számfeletti embriók krioprezervációja

Azok az embriók, amelyek nem kerültek beültetésre, de szabályos fejlődést mutattak, a hatályos jogszabályok értelmében fagyasztásra kerültek, amennyiben a kezelés alatt álló pár ehhez írásbeli beleegyezését adta. Az embriók krioprezervációja 2013 előtt minden

esetben programozott lassú fagyasztással, majd 2013. január 1-jét követően vitrifikációval történt.

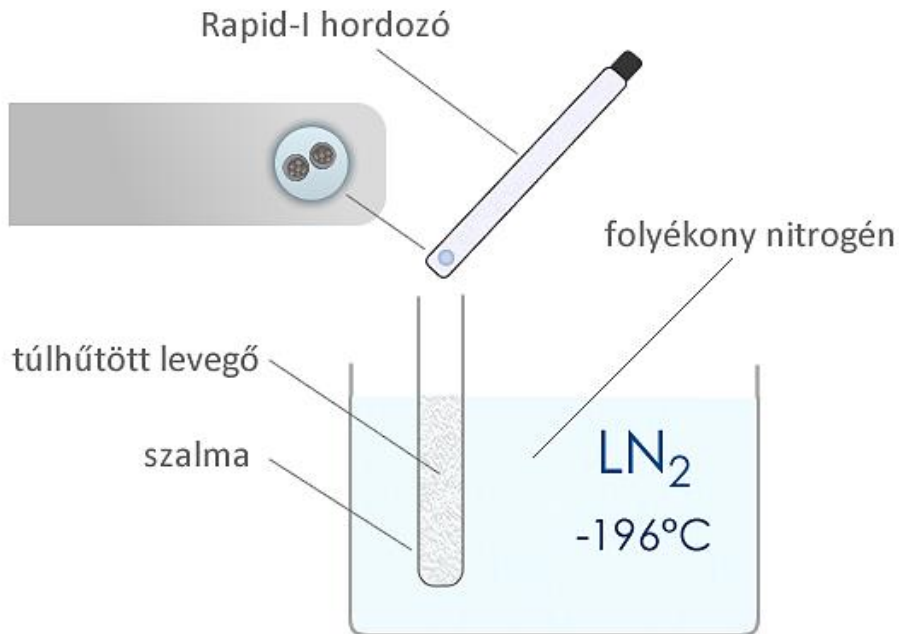
3.9.1. Programozott lassú fagyasztás

Hagyományos fagyasztást megelőzően a sejtek víztartalmának kivonására az embriókat erre a célra általunk készített, vagy gyári fagyvédő oldatsoron vittük végig. Előbbi esetben az embriókat 5-5 percig 0,5M és 1M 1,2-propán-diolt tartalmazó, 10 percig 1,5M 1,2-propán-diolt tartalmazó, végül 1-2 percig 1,5M-os, szukrózzal kiegészített fagyasztóoldatban inkubáltuk. 2011 után FreezeKit 1 (Vitrolife) oldatsort használtunk. A gyártó protokollja szerint az embriókat először 2-5 percig fagyvédő anyagot nem tartalmazó foszfáttal pufferelt sóoldatban (PBS), 10-20 percig 1,5M 1,2-propán-diolt tartalmazó, végül 15 percig 1,5M-os, szukrózzal kiegészített oldatban inkubáltuk. Mind a két módszer Lassalle (1985) protokollján alapul. Az embriók 1,5 ml-es fagyasztócsövekben (Nunc, Rochester, USA) kerültek lefagyasztásra és tárolásra (2-4 embrió/cső). A fagyasztás Planer (Planer, Sunbury-On-Thames, UK) fagyasztókészülékkel az alábbi hűtési körülmények között történt: +22°C-tól -7°C-ig, -2°C/perc, -7°C-tól -30°C-ig -0,3°C/perc hőmérsékletcsökkenéssel. A -7°C-os hőmérsékleten kiváltottuk a jégkristályképződést (seeding). A számítógéppel vezérelt szakasz után a fagyasztócsövek a -30°C-ról közvetlenül a -196°C-os folyékony nitrogénbe kerültek.

3.9.2. Vitrifikáció

Az embriók ultragyors hűtését Rapid-I (Vitrolife) zárt vitrifikációs rendszerrel végeztük, amelyhez VitriFreeze ES (FertiPro, Beernem, Belgium) fagyvédő oldatsort használtunk. A fagyasztást szobahőmérsékleten végeztük, az embriókat először egy sóoldatban 2 percig előinkubáltuk, majd 5 és 4 percet töltöttek 5% és 10%, végül 40-60 másodpercet 20% dimetil-szulfoxidot (DMSO) és etilén-glikolt (EG) tartalmazó fagyvédő oldatokban. Ezt követően az embriókat maximum 30nL-es oldatmennyiségben a vitrifikációs pálcán lévő 400 µm átmérőjű lyukba cseppentettük, majd közvetlenül a már folyékony nitrogénben álló Rapid-I csőbe helyeztük, amelyben ekkorra már túlhűtött levegő volt (VIII. Ábra). A Rapid-i pálcát tartalmazó műanyagcsövet hermetikusan lezártuk, folyékony nitrogénbe helyeztük. A fagyasztott embriók tárolása minden esetben MVE

XLC 500 tárolóban (Chart Industries, Garfield Heights, Ohio, USA), ellenőrzött körülmények között, folyékony nitrogén gőzében történt.



VIII. Ábra Az embriók zárt rendszerű vitrifikációjához használt Rapid-I hordozó

3.10. Krioprezervált embriók felolvasztása

A tervezett Krio-ET-t megelőző ciklus sárgatest-fázisának közepétől 10-14 napos GnRH-agonista előkezelést követően ösztadiol és LH meghatározással igazoltuk a desensitisation létrejöttét, majd a GnRH-agonista analóg folytatása mellett kombinált transzdermalis ösztadiol és intravaginális progeszteronkészítmény szekvenciális adásával endometriumfelépítést kezdtünk. Embrióbeültetésre akkor került sor, ha a nőbeteg szérum ösztadiol szintje legalább 150 pg/ml, az endometrium vastagsága >9 mm volt.

3.10.1. Hagyományos technikával fagyasztott embriók felolvasztása

A hagyományos módszerrel lefagyasztott embriók felolvasztásához Vitrolife Thaw Kit-1 felolvasztó oldatsort használtunk. A fagyasztócsöveket 30°C-os vízfürdőbe helyeztük, majd a csőben lévő oldatot a jégkristályok eltűnését követően Petri-csészébe pipettáztuk. Az oldatban lévő embriókat a gyártó által megadott protokoll szerint végigvittük a felolvasztó oldatsoron. Az embriók 5-5 percet töltöttek a szobahőmérsékletű 0,2M

szukrózt és 1,0M, 0,5M, 0M 1,2-propán-diolt tartalmazó oldatokban, majd további 6 percet szobahőmérsékletű, illetve 4 percet 37°C-os melegítőlapra helyezett, fagyvédő anyagot nem tartalmazó PBS oldatban.

3.10.2. Vitrifikációt követő felolvasztás

A vitrifikációval lefagyasztott minták felolvasztásához DMSO és EG, valamint PBS, szukróz, ficoll és humán szérum albumin (HSA) tartalmú VitriThaw ES (FertiPro) vitrifikációs felolvasztó oldatsort használtunk. Az embriókat a -196°C-os folyékony nitrogénben lévő pálcáról közvetlenül 37°C-os médiumba helyeztük 1 percre, majd a gyártó protokollja szerint végigvittük az embriókat a további 5 szobahőmérsékletű oldaton.

Az embriók túlélését és minőségét mindkét esetben közvetlenül a felolvasztást követően, inverz mikroszkóp segítségével, 200-szoros nagyításon értékeltük. A túlélés megállapításához a sértetlen és a fagyasztás-felolvasztás során degenerálódott sejtek számát vettük figyelembe. A felolvasztást követően az embriókat G-2.5+ (Vitrolife) tápoldat 25µl-es cseppjeiben tenyésztettük további 2-4 órán keresztül. Az embriók minőségét a beültetés előtt újra értékeltük. Az embriók beültetése a friss ciklusok esetén is alkalmazott, fentebb tárgyalt protokoll szerint történt.

3.11. A kezelések kimenetele

A terhesség létrejöttét mind a friss IVF-ciklusok, mind pedig a fagyasztott-felolvasztott embriók beültetésével végzett kezelések esetében 11 és 13 nappal az embrióbeültetést követően levett szérumminták teljes β -hCG-szintjének meghatározásával állapítottuk meg. Amennyiben az az első vizsgálat során meghaladta a 25 IU/l értéket, illetve a második vérvétel során tovább emelkedett, terhességet állapítottunk meg. Klinikai terhesség létrejöttét 7-10 nappal a második hCG-tesztet követően elvégzett ultrahangvizsgálat során látható petezsák igazolta. Ebben az esetben a beágyazódott embriók számát is regisztráltuk.

3.12. Adatok értékelése

3.12.1. Az embriók minőségének összehasonlítása

Az embriók minőségének vizsgálatakor összehasonlítottuk a blasztomérák számát, a fragmentáció mértékét, illetve a morfológiai pontértéket. Azért, hogy az embriók morfológiai paraméterei összehasonlíthatóak legyenek, a morfológiai osztályzatot morfológiai pontértékké alakítottuk. A leggyengébb osztályzat, az „E” 0 pontot kapott, míg minden egyre magasabb osztályzat egyel több pontot, a következők szerint: E-0, D-1, C-2, B-3, A-4, A magasabb pontérték tehát jobb minőséget jelent. Összevetésre került a legéletképesebb embriók aránya is. A második napon azokat az embriókat tekintettük jó minőségűnek, amelyek morfológiai pontértéke 3 vagy 4 volt, fragmentáció aránya nem haladta meg a 20%-ot, illetve a blasztomérák száma a második napon legalább 4, a harmadik napon legalább 7 volt.

3.12.2. Az ICSI és IVF megtermékenyítési módszerek vizsgálata

A hagyományos IVF kezelés és az intracitoplazmatikus spermiuminjekció eredményességének összehasonlításához 1132 IVF kezelés adatait értékeltük retrospektív módon, melyeket 2009. és 2014. között végeztünk. Azért, hogy a megtermékenyítés eredményét esetlegesen torzító tényezőket kiszűrjük az adatértékeléshez kizárólag a betegek első, illetve második IVF ciklusainak adatait használtuk fel. Adományozott petesejtekkel, illetve donor spermamintával, valamint hereszövet mintából nyert spermiumokkal végzett beavatkozások eredményei nem kerültek kiértékelésre. Az IVF ciklusokat az ondóminták minősége szerint 3 csoportba soroltuk. Mivel az ondóminták minőségük és a megtermékenyítés módja szerint különböző módon kerültek feldolgozásra, a felosztásnál a natív minta progresszív spermiumszámát vettük alapul, amely paraméter jól jellemzi a spermaminták minőségét (Fancsovits és mtsai 2013, Hamilton és mtsai 2015). Az SPI csoportba kerültek a <15 millió, az SPII csoportba a 15-30 millió, az SPIII csoportba a ≥ 30 millió progresszív spermiumot tartalmazó minták felhasználásával végzett kezelések. Az IVF ciklusokat a nőbetegek életkora szerint (ÉK1: ≤ 31 , ÉK2: 32-36, ÉK3: 37-40, ÉK4: ≥ 41), valamint a nyert petesejtek száma szerint is osztályoztuk (PS1: 1-3, PS2: 4-6, PS3: 7-9, PS4: ≥ 10).

Összehasonlítottuk a megtermékenyülési arányokat, az embriók minőségét, valamint a beültetésre került embriók minőségét a két megtermékenyítési mód esetén a különböző

spermakategóriákban a nőbetegek életkora, illetve a petesejtek száma szerint. A megtermékenyülési arányokat az összehasonlíthatóság kedvéért a hagyományos IVF és az ICSI megtermékenyítés esetében is a normálisan megtermékenyült (2PN) petesejtek száma, valamint az összes petesejt számának hányadosaként számítottuk. Megvizsgáltuk a beágyazódási arányokat, illetve az embrióbeültetésre vonatkoztatott klinikai terhességi arányokat, valamint az élveszülések arányait is. A klinikai terhességi arányokat – a továbbiakban is – minden esetben embriótranszferre vonatkoztatva adtuk meg. Összehasonlítottuk továbbá a felhasznált, illetve a krioprezervált embriók arányát, mindkét esetben a normális megtermékenyülést mutató petesejtek összegére vonatkoztatva.

3.12.3. Az embriók egyedi és csoportos tenyésztésének vizsgálata

A kétféle embriótenyésztési módszer összehasonlítása prospektív randomizált vizsgálattal történt. Ehhez 2012. szeptember és 2015. április között 532 IVF ciklus esetében a tenyésztés módját véletlenszerűen választottuk meg. A vizsgálatba csak olyan kezelések kerülhettek, amelyek esetében legalább egy petesejtet sikerült nyerni. A kezeléseket két csoportba osztottuk. Az egyik csoportba tartozó kezeléseket hagyományos módon, egyedileg tenyésztettük (Egyedi csoport), míg a többi kezelés embrióit csoportosan, mikrovájatokat tartalmazó Petri-csészében (Csoportos csoport). A randomizációt a petesejtnyerést követően számítógépes program végezte. A tenyésztés módját sem az embrióbeültetést végző orvos, sem a páciens nem ismerték. A kutatást regisztráltuk a ClinicalTrials.gov adatbázisban (NCT01774006).

Elsődlegesen a klinikai terhességi arányok, illetve a beágyazódott embriók arányának alakulását vizsgáltuk, de összehasonlítottuk a megtermékenyülési arányokat hagyományos IVF kezelést követően, illetve ICSI után, valamint az embriók minőségét a megtermékenyítést követő második és harmadik napon. Összevetettük továbbá a felhasznált, illetve a krioprezervált embriók arányát is. Az intracitoplazmatikus spermiuminjekcióval történő megtermékenyítést követően a megtermékenyülési arányokat a megtermékenyítés módjának vizsgálatokor alkalmazottól eltérően, a normálisan megtermékenyült petesejtek és az injektált petesejtek hányadosaként számítottuk.

3.12.4. Az embriódenzitás vizsgálata

Az embriódenzitás embriók életképességére gyakorolt hatásának vizsgálatához a 2.12.3. részben leírt tanulmány egyik alcsoportjának retrospektív értékelését végeztük el. Ehhez a vizsgálat időszaka alatt elvégzett 228 IVF ciklus adatait vontuk be az értékelésbe, amelyekben az embriók tenyésztése mikrovájatokat tartalmazó Petri-csészében, csoportosan történt, illetve a második napig legalább két embrió osztódott. Az embriódenzitást a teljes tápoldattérfogat (25 μ l) és az osztódott embriók hányadosaként számítottuk, függetlenül attól, hogy a megtermékenyülés normális (2PN) vagy abnormális (1PN, \geq 3PN) volt, hiszen anyagcseréjük révén utóbbiak is hatással vannak a többi embrióra. Három különböző csoportot különítettünk el attól függően, hogy egy edényben hány embriót tenyésztettünk együtt: ED1: 2-4 embrió (denzitás: 6,3-12,5 μ l), ED2: 5-6 embrió (denzitás: 4,2-5,0 μ l), ED3: 7-9 embrió (denzitás: 2,8-3,6 μ l). Összehasonlítottuk a különböző csoportokban a fejlődő, normálisan megtermékenyült embriók minőségi paramétereit a megtermékenyítést követő második és harmadik napon, melyek a következők voltak: blasztomérák száma, fragmentáció mértéke, illetve az embriók morfológiai pontértéke. Megvizsgáltuk továbbá a jó minőségű embriók előfordulásának gyakoriságát is. Mivel egy beteg esetén a beültetett embriók több tenyésztőedényből is származhattak, a kezelések kimenetelének vizsgálatára így nem volt lehetőségünk.

3.12.5. Embriók hagyományos mélyfagyasztásának, valamint vitrifikációjának összehasonlítása

A zárt rendszerű vitrifikációval történő embriófagyasztás hatékonyságának vizsgálatához 2013. január 1. és 2014. december 31. között, fagyasztott-felolvasztott embriók beültetésével végzett 96 IVF kezelés (Krio-ET) adatait értékeltük. A tanulmányba minden olyan Krio-ET ciklus bevonásra került, amelyben a beteg embrióinak legalább egy hordozója felolvasztásra került. Nem vizsgáltuk azon kezelések adatait, amelyek során mind hagyományos, mind vitrifikációval krioprezervált embriók egyazon Krio-ET ciklusban kerültek felolvasztásra.

A vizsgált Krio-ET kezeléseket a fagyasztás módja szerint két csoportra osztottuk. Az első csoportba (Hagyományos csoport) kerültek azok a ciklusok, amelyekben programozott lassú fagyasztást alkalmaztunk. A második csoportba (Vitrifikáció csoport) pedig azok a ciklusok kerültek, ahol az embriókat vitrifikáció módszerével

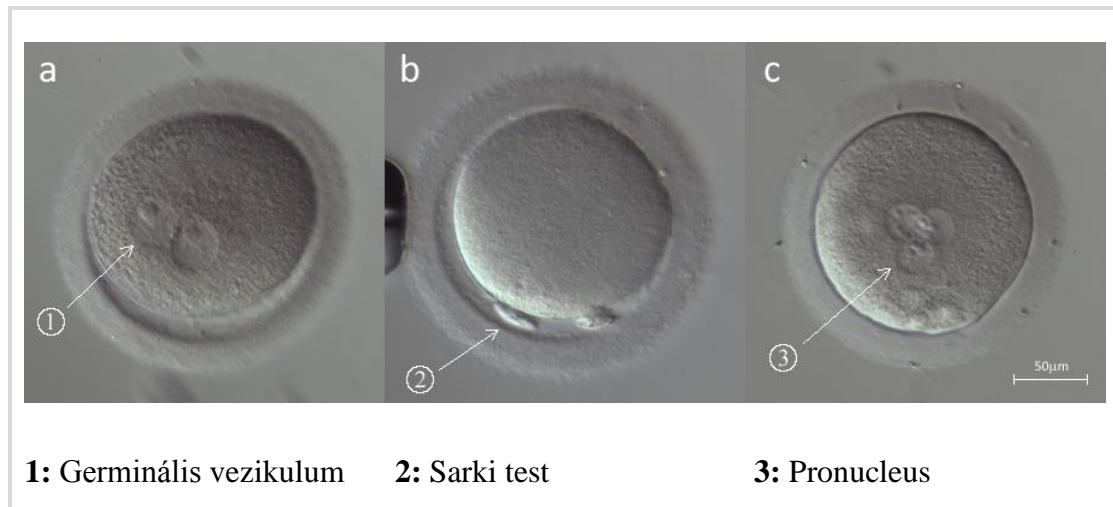
kriporezerváltak. Összehasonlítottuk az olyan IVF kezelések klinikai adatait (nőbetegek életkora, stimulációs protokoll, stimuláció hossza, nyert petesejtek száma, megtermékenyítés módja), amelyekben embriófagyasztást végeztünk. Megvizsgáltuk a különböző módszerekkel fagyasztott embriók felolvasztás utáni túlélését. Az általánosan elfogadott gyakorlat szerint akkor tekintünk túléltnek egy embriót, ha sejtjeinek legalább 50 %-a sértetlen maradt a felolvasztás után (Edgar és Gook 2012). A két technika hatékonyságának jobb összevetése érdekében a 80%-os és 100 %-os túlélést is megvizsgáltuk a felolvasztást követően. Az értéket úgy kaptuk, hogy azon embriók arányát vizsgáltuk, amelyek sejtjeinek legalább 80%-a, illetve az összes blasztomérája ép maradt a felolvasztást követően. Megvizsgáltuk a felolvasztott és beültetett embriók arányát, valamint a felolvasztott, illetve a beültetett embriók minőségét. Összehasonlítottuk a beágyazódási, illetve a klinikai terhességi arányokat, valamint az élveszülések arányát is a két csoportban.

3.12.6. Óriás petesejtek vizsgálata

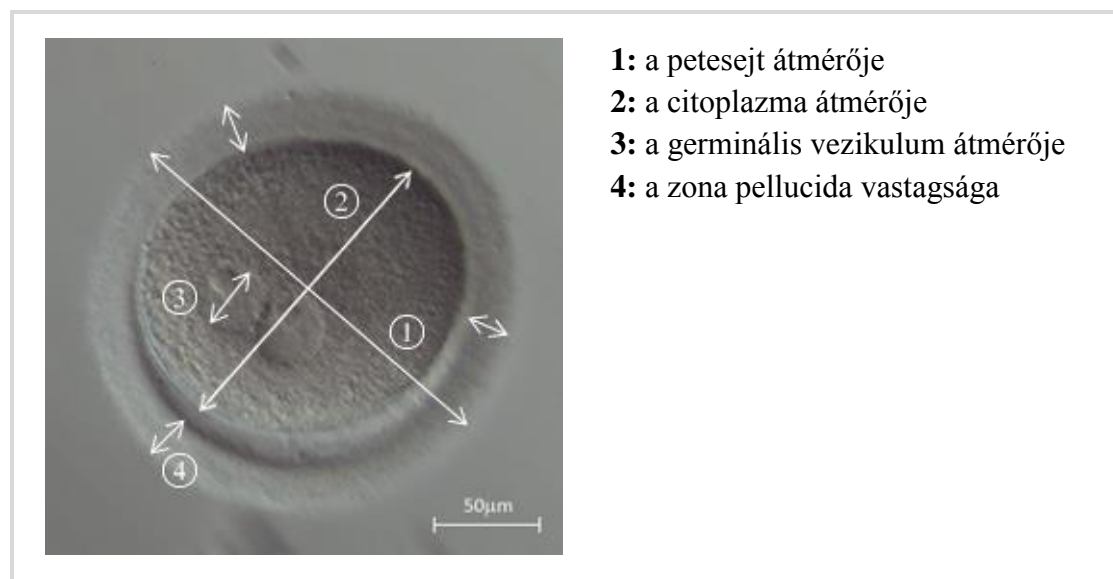
Az óriás petesejtek indikátorszerepének vizsgálatához 2008. január és 2013. november között elvégzett 1521 in vitro fertilizációs kezelés adatait elemeztük retrospektív módon. A kezelések két csoportját különítettük el. Az óriás petesejt csoportba (ÓriásPS csoport) tartoztak azok a ciklusok, ahol a nyert petesejtek közül legalább egy óriás volt, míg a másik csoportba azok a ciklusok tartoztak, amelyekben csak normálméretű petesejteket nyertünk (Normál csoport). Egy petesejtet akkor tekintettünk óriásnak, ha az átmérője 25-30%-kal nagyobb volt, mint normális társaié.

Az óriás petesejtek tulajdonságainak jobb megismerése érdekében méréseket végeztünk ImageJ v1.48 szoftver segítségével 11 óriás petesejtről, 40 normális méretű, MII állapotban lévő, 20 normális méretű GV állapotban lévő petesejtről, valamint 20 normális méretű petesejtből fejlődött zigótáról (2PN) készült fényképeken. A képek Octax Eye USB2.0 (MTG, Bruckberg, Németország) kamera, valamint a hozzá tartozó Octax EyeWare (MTG) képalkotó programmal készültek a tanulmány ideje alatt. Minden petesejt és zigóta esetében két-két, egymásra merőleges átmérőt mértünk zona pellucidával együtt, illetve nélküle is, továbbá azonos módon meghatároztuk az éretlen normális méretű, valamint óriás petesejtek germinális vezikulumainak (IX a. Ábra), továbbá a normális és óriás zigótákban látható pronucleusok átmérőit is (IX c. Ábra).

Megmértük a zona pellucida vastagságát is, minden esetben három különböző ponton (X. Ábra).



IX. Ábra Óriás petesejtek különböző állapotai (a: óriás petesejt két germinális vezikulummal, b: érett (Metafázis II) óriás petesejt két sarkitessel, c: abnormálisan megtermékenyült óriás petesejt 3 pronucleusszal)



X. Ábra Óriás petesejtek mérésének helyei

Összehasonlítottuk a két csoportban a betegek életkorát, a stimulációs protokollok, valamint az alkalmazott gonadotropinok típusát, a tüszőpunkciót megelőző ösztrogén-szinteket, a nyert petesejtek számát. Megvizsgáltuk továbbá a megtermékenyülési arányt, az érett petesejtek arányát (ICSI esetén), az embriók sejttségét és minőségét a

megtermékenyítést követő második és harmadik napon, valamint a klinikai terhességi arányt.

A fenti vizsgálatok eredményeinek ismeretében párosított tesztet végeztünk, azért, hogy az óriás petesejt csoport alacsony esetszámának hatását kiküszöböljük. Az ÓriásPS és a Normál csoportokat a betegek életkora, a nyert petesejtek száma, valamint a stimulációs protokoll szerint rendeztük össze, és így 30 párt alkottunk. Összehasonlítottuk az embriók minőségét a második, illetve harmadik napon, valamint a beültetésre kerülő embriók esetében is.

3.13. Statisztikai vizsgálatok

Az adatok gondos ellenőrzését és szűrését követően, statisztikai értékelésüket Statistica (StatSoft, USA) szoftver a Semmelweis Egyetemen aktuálisan elérhető legfrissebb verziója (7-13.2) segítségével végeztük. A szignifikancia szintet az általánosan elfogadott $P < 0,05$ értéként határoztuk meg. Két független, nem normális eloszlású változó – mint az embriók sejt száma, morfológiai pontértéke, fragmentációs aránya – összehasonlítására Mann-Whitney U-próbát alkalmaztunk. A különböző denzitáscsoportok tulajdonságainak vizsgálatánál, ahol kettőnél több független változó tesztelése történt, varianciaanalízist (ANOVA) végeztünk. Az egyes csoportok közötti különbségek feltárására post hoc vizsgálatként a Tukey-féle HSD (honestly significant difference) tesztet alkalmaztuk. Az óriás petesejtek vizsgálatakor, a nem független párosított ciklusok összehasonlítását Wilcoxon-féle párosított teszttel végeztük. A csoportos változók összehasonlítására, mint a megtermékenyülési, terhességi és beágyazódási arányok, a jó minőségű embriók aránya, illetve felhasznált vagy fagyasztott embriók aránya, Pearson-féle Chi-négyzet próbát, illetve alacsony mintaszámok esetén, amennyiben a kontingencia táblázat egyik cellájában az esetszám < 5 volt, Fisher-féle egzakt próbát végeztünk.

4. Eredmények

4.1. A hagyományos IVF és ICSI kezelések összehasonlításának eredményei

IV. Táblázat A különböző módszerekkel megtermékenyített petesejtek száma az egyes csoportokban

| Az egyes csoportokban előforduló petesejtszámok | | | Ondóminta minősége szerint | | | Összesen |
|---|--------------------------|-----------------------|----------------------------|-------------------|------------------|----------|
| | | | SPI (0-15 M) | SPII (15-30 M) | SPIII (≥30 M) | |
| IVF | Petesejtek száma szerint | PS1 (1-3) | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | PS2 (4-6) | 0 | 29 | 313 | 342 |
| | | PS3 (7-9) | 9 | 59 | 678 | 746 |
| | | PS4 (≥10) | 30 | 151 | 2044 | 2225 |
| | Életkor szerint | ÉK1 (≤31 év) | 0 | 41 | 719 | 760 |
| | | ÉK2 (32-36 év) | 39 | 113 | 1248 | 1400 |
| | | ÉK3 (37-40 év) | 0 | 74 | 888 | 962 |
| | | ÉK4 (≥41 év) | 0 | 11 | 180 | 191 |
| ICSI | Petesejtek száma szerint | PS1 (1-3) | 137 | 46 | 266 | 449 |
| | | PS2 (4-6) | 355 | 130 | 444 | 929 |
| | | PS3 (7-9) | 729 | 133 | 315 | 1177 |
| | | PS4 (≥10) | 2707 | 578 | 482 | 3767 |
| | Életkor szerint | ÉK1 (≤31 év) | 1474 | 238 | 197 | 1909 |
| | | ÉK2 (32-36 év) | 1650 | 372 | 575 | 2597 |
| | | ÉK3 (37-40 év) | 520 | 217 | 329 | 1066 |
| | | ÉK4 (≥41 év) | 284 | 60 | 406 | 750 |

SP: A natív mintában progresszívan mozgó spermiumok száma (millió db) alapján meghatározott kezeléscsoportok

PS: A nyert petesejtek száma (db) szerint meghatározott kezeléscsoportok

ÉK: A nőbeteg életkora alapján elkülönített kezeléscsoportok

A vizsgált időszak alatt 1132 olyan IVF kezelést (hagyományos IVF: 318, ICSI: 814) végeztünk, amely megfelelt a kiválasztási kritériumoknak, így ezen kezelések adatainak részletes értékelését végeztük el. A IV. Táblázat mutatja az egyes kategóriákhoz tartozó

esetszámokat a kezelések csoportosítása után. A leggyengébb minőségű ondóminták (SPI) felhasználásával csak néhány esetben végeztünk hagyományos IVF kezelést, amennyiben a feldolgozást követően az ondóminta minősége ezt lehetővé tette, ugyanakkor 4-nél alacsonyabb petesejtszám (PS1) esetén egyáltalán nem.

4.1.1. Megtermékenyülési arányok

Az összehasonlíthatóság érdekében a megtermékenyülési arányokat az összes petesejtre vonatkoztatva számítottuk. Minden esetben szignifikánsan magasabb megtermékenyülési arányt értünk el hagyományos IVF kezelést követően az összes spermakategóriát figyelembe véve (V. Táblázat). Az SPII csoportban nem volt különbség a megtermékenyülési arányokban a két módszer között egyik korszakban sem, ugyanakkor hagyományos IVF kezelést követően magasabb volt a megtermékenyülési arány a PS2, alacsonyabb a PS3 petesejtcsoportban. Az SPIII csoportban szignifikánsan magasabbak voltak a megtermékenyülési arányok hagyományos IVF-et követően az ÉK3 csoport kivételével valamennyi petesejtszám- és életkorcsoportban.

V. Táblázat Megtermékenyülési arányok hagyományos in vitro fertilizációt (IVF) és intracitoplazmatikus spermiuminjekciót (ICSI) követően a különböző minőségű ondóminták esetében a petesejtszám és az életkor függvényében

| Kategóriák | | Megtermékenyülési arány | | p-érték |
|--|----------------|-------------------------|-------|---------|
| | | IVF | ICSI | |
| Összes kategória (SP I-III) | | | | |
| Petesejtek száma szerint | PS1 (1-3) | – | 57,1% | – |
| | PS2 (4-6) | 70,8% | 58,9% | <0,01 |
| | PS3 (7-9) | 66,2% | 59,0% | <0,01 |
| | PS4 (≥10) | 65,6% | 56,1% | <0,01 |
| Életkor szerint | ÉK1 (≤31 év) | 67,5% | 57,5% | <0,01 |
| | ÉK2 (32-36 év) | 66,1% | 56,4% | <0,01 |
| | ÉK3 (37-40 év) | 65,4% | 58,3% | <0,01 |
| | ÉK4 (≥41 év) | 67,0% | 57,3% | 0,015 |
| SPII kategória (15-30 millió progresszív spermium az ondómintában) | | | | |
| Petesejtek száma szerint | PS1 (1-3) | – | 58,7% | – |
| | PS2 (4-6) | 79,3% | 58,5% | 0,036 |
| | PS3 (7-9) | 49,2% | 65,4% | 0,034 |
| | PS4 (≥10) | 65,6% | 62,5% | 0,480 |
| Életkor szerint | ÉK1 (≤31 év) | 65,9% | 66,0% | 1,000 |
| | ÉK2 (32-36 év) | 61,9% | 62,1% | 1,000 |
| | ÉK3 (37-40 év) | 63,5% | 57,1% | 0,337 |
| | ÉK4 (≥41 év) | 63,6% | 65,0% | 1,000 |
| SPIII kategória (≥30 millió progresszív spermium az ondómintában) | | | | |
| Petesejtek száma szerint | PS1 (1-3) | – | 56,8% | – |
| | PS2 (4-6) | 70,0% | 59,7% | <0,01 |
| | PS3 (7-9) | 67,6% | 56,8% | <0,01 |
| | PS4 (≥10) | 65,6% | 58,9% | <0,01 |
| Életkor szerint | ÉK1 (≤31 év) | 67,6% | 55,3% | <0,01 |
| | ÉK2 (32-36 év) | 66,3% | 59,8% | <0,01 |
| | ÉK3 (37-40 év) | 65,5% | 61,7% | 0,215 |
| | ÉK4 (≥41 év) | 67,2% | 54,9% | <0,01 |

SP: A natív mintában progresszívan mozgó spermiumok száma (millió db) alapján meghatározott kezeléscsoportok
 PS: A nyert petesejtek száma (db) szerint meghatározott kezeléscsoportok
 ÉK: A nőbetegek életkora alapján elkülönített kezeléscsoportok

4.1.2. A fejlődő embriók minősége

| Összes kategória (2. nap) | Petesejtek száma szerint | | | Életkor szerint | | | | |
|---------------------------|--------------------------|------------|------------|-----------------|-------------------|------------|------------|---------|
| | | IVF | ICSI | P-érték | | IVF | ICSI | P-érték |
| Sejtszám | PS1 (1-3) | – | 3,7±1,3 | – | ÉK1 (<31év) | 4,2±1,5 | 4,1±1,3 | 0,050 |
| Morfológiai pontérték | | – | 2,2±0,7 | – | | 2,2±0,8 | 2,3±0,7 | 0,010 |
| Fragmentáció | | – | 13,6±10,6% | – | | 15,2±10,8% | 13,9±9,7% | 0,015 |
| Sejtszám | PS2 (4-6) | 3,9±1,4 | 3,8±1,4 | 0,466 | ÉK2 (32-36 év) | 4,0±1,3 | 4,1±1,3 | 0,115 |
| Morfológiai pontérték | | 2,2±0,8 | 2,2±0,7 | 0,333 | | 2,2±0,8 | 2,2±0,7 | 0,478 |
| Fragmentáció | | 15,5±10,3% | 13,5±10,0% | <0,01 | | 14,5±10,5% | 13,9±9,6% | 0,522 |
| Sejtszám | PS3 (7-9) | 4,0±1,2 | 4,0±1,3 | 0,194 | ÉK3 (37-40 év) | 3,9±1,2 | 4,0±1,3 | 0,313 |
| Morfológiai pontérték | | 2,3±0,7 | 2,2±0,7 | 0,092 | | 2,3±0,8 | 2,2±0,7 | 0,267 |
| Fragmentáció | | 14,4±11,1% | 14,3±9,7% | 0,435 | | 12,6±9,4% | 13,9±9,1% | <0,01 |
| Sejtszám | PS4 (≥10) | 4,1±1,3 | 4,1±1,3 | 0,220 | ÉK4 (≥41év) | 4,1±1,4 | 3,8±1,3 | 0,030 |
| Morfológiai pontérték | | 2,2±0,8 | 2,2±0,7 | 0,042 | | 2,2±0,9 | 2,2±0,8 | 0,961 |
| Fragmentáció | | 13,9±10,2% | 14,1±9,6% | 0,122 | | 15,3±12,1% | 14,7±11,4% | 0,494 |

Az adatok formátuma átlag±szórás

SP: A natív mintában progresszívan mozgó spermiumok száma (millió db) alapján meghatározott kezeléscsoportok

PS: A nyert petesejtek száma (db) szerint meghatározott kezeléscsoportok

ÉK: A nőbetegek életkora alapján elkülönített kezeléscsoportok

VI. Táblázat Embriók minősége hagyományos in vitro fertilizációs kezelést (IVF), valamint intracitoplazmatikus spermiuminjekciót (ICSI) követő 2. napon

Az összesen 5741 megtermékenyített petesejt fejlődésének vizsgálata alapján nem volt különbség a két megtermékenyítési módszer között az inszeminációt követő második (n=5741), illetve harmadik napon (n=5266). Megegyezett az embriók átlagos sejtszáma (2. nap: 4,0±1,3 vs. 4,0±1,3; p=0,923; 3. nap: 6,7±2,2 vs. 6,8±2,1; p=0,196), fragmentáltsága (2. nap: 14,2±10,5% vs. 14,0±9,8%; p=0,829; 3. nap: 14,8±11,4% vs. 14,6±10,8%; p=0,763), valamint morfológiai pontértéke is (2. nap: 2,2±0,8 vs. 2,2±0,7 p=0,207; 3. nap: 2,2±0,7 vs. 2,2±0,7; p=0,112). A jó minőségű embriók aránya sem tért

el hagyományos IVF-et, illetve ICSI-t követően sem a második (26,8% vs. 27,4%; $p=0,603$), sem pedig a harmadik napon (21,4% vs. 23,0%; $p=0,167$).

A különböző megtermékenyítési módszerekkel létrehozott embriók minőségét az egyes életkor (ÉK) és petesejtszám (PS) csoportokban a megtermékenyítést követő második napon a VI. Táblázatban, a harmadik napon a VII. Táblázatban tüntettük fel.

VII. Táblázat Embriók minősége hagyományos in vitro fertilizációs kezelést (IVF), valamint intracitoplazmatikus spermiuminjekciót (ICSI) követő 3. napon

| Összes kategória (3. nap) | Petesejtek száma szerint | | | | Életkor szerint | | | |
|------------------------------|--------------------------|------------|------------|-------------|-------------------|------------|------------|-------------|
| | | IVF | ICSI | P- érték | | IVF | ICSI | P- érték |
| Sejtszám | PS1 (1-3) | – | 6,9±2,0 | – | ÉK1 (<31év) | 6,8±2,1 | 6,9±2,0 | 0,717 |
| Morfológiai pontérték | | – | 2,4±0,7 | – | | 2,1±0,7 | 2,2±0,6 | 0,095 |
| Fragmentáció | | – | 10,6±7,8% | – | | 16,2±11,9% | 14,4±10,6% | <0,01 |
| Sejtszám | PS2 (4-6) | 6,3±2,1 | 7,0±2,3 | <0,01 | ÉK2 (32-36 év) | 6,7±2,3 | 6,8±2,2 | 0,280 |
| Morfológiai pontérték | | 2,1±0,8 | 2,3±0,6 | 0,021 | | 2,1±0,7 | 2,2±0,7 | 0,108 |
| Fragmentáció | | 16,8±12,7% | 13,9±10,0% | <0,01 | | 15,1±11,8% | 14,9±10,8% | 0,659 |
| Sejtszám | PS3 (7-9) | 6,7±2,1 | 6,8±2,1 | 0,496 | ÉK3 (37-40 év) | 6,7±2,1 | 6,7±2,0 | 0,898 |
| Morfológiai pontérték | | 2,2±0,7 | 2,2±0,7 | 0,973 | | 2,2±0,7 | 2,2±0,7 | 0,635 |
| Fragmentáció | | 14,5±11,9% | 14,5±10,4% | 0,441 | | 13,3±10,2% | 14,5±10,4% | 0,013 |
| Sejtszám | PS4 (≥10) | 6,8±2,2 | 6,8±2,1 | 0,720 | ÉK4 (≥41év) | 7,0±2,2 | 7,0±2,4 | 0,776 |
| Morfológiai pontérték | | 2,2±0,7 | 2,2±0,7 | 0,525 | | 2,2±0,7 | 2,2±0,8 | 0,824 |
| Fragmentáció | | 14,6±11,0% | 14,8±11,0% | 0,472 | | 15,3±11,7% | 14,1±12,0% | 0,035 |

Az adatok formátuma átlag±szórás

SP: A natív mintában progresszívan mozgó spermiumok száma (millió db) alapján meghatározott kezeléscsoportok

PS: A nyert petesejtek száma (db) szerint meghatározott kezeléscsoportok

ÉK: A nőbetegek életkora alapján elkülönített kezeléscsoportok

A legfiatalabb nőbetegek csoportjában (ÉK1) az embriók fragmentáltsága alacsonyabb volt ICSI-t követően a második (15,2±10,8% vs. 13,9±9,7%; $p=0,015$), valamint a harmadik napon is (16,2±11,9% vs. 14,4±10,6%; $p<0,01$), míg ugyanez a paraméter az

ÉK3 csoportban hagyományos IVF után volt szignifikánsan alacsonyabb mindkét időpontban (2. nap: $12,6 \pm 9,4\%$ vs. $13,9 \pm 9,1\%$; $p < 0,01$; 3. nap: $13,3 \pm 10,2\%$ vs. $14,5 \pm 10,4\%$; $p = 0,013$). A legidősebb betegek esetén (ÉK4) ugyancsak ICSI-vel történő megtermékenyítést követően kaptunk alacsonyabb fragmentációs értékeket a harmadik napon ($15,3 \pm 11,7\%$ vs. $14,1 \pm 12,0\%$; $p = 0,035$). Az embriók sejtszámában kizárólag az ÉK4 csoportban, a második napon ($4,1 \pm 1,4$ vs. $3,8 \pm 1,3$; $p = 0,030$), a morfológiai pontértékekben az ÉK1 csoportban, szintén a második napon ($2,2 \pm 0,8$ vs. $2,3 \pm 0,7$; $p = 0,010$) találtunk eltérést.

Az embriók minőségét a petesejtek száma szerint vizsgálva a PS2, PS3 és PS4 csoportokban minden eltérő érték az intracitoplazmatikus spermiuminjekció esetében volt kedvezőbb. A legalacsonyabb petesejtszámmal rendelkező beteg esetében egyetlen esetben sem végeztünk hagyományos IVF kezelést. Különbséget találtunk a PS2 csoportban a fragmentáció mennyiségében a második napon ($15,5 \pm 10,3\%$ vs. $13,5 \pm 10,0\%$; $p < 0,01$), illetve mind az embriók sejtszámában ($6,3 \pm 2,1$ vs. $7,0 \pm 2,3$; $p < 0,01$), fragmentáltságában ($16,8 \pm 12,7\%$ vs. $13,9 \pm 10,0\%$; $p < 0,01$), valamint morfológiai pontértékében is ($2,1 \pm 0,8$ vs. $2,3 \pm 0,6$; $p = 0,021$) a megtermékenyítést követő harmadik napon. A jó minőségű embriók aránya ugyanakkor nem különbözött. Kedvezőbb volt továbbá az embriók második napi morfológiai pontértéke a legnagyobb petesejtszámmal rendelkező ciklusok csoportjában ICSI-t követően ($2,2 \pm 0,8$ vs. $2,2 \pm 0,7$; $p = 0,042$). A kezelések petesejtszám szerinti csoportosítását vizsgálva különbséget csak a blasztomérák számában a második napon a PS4 csoportban ($3,8 \pm 1,2$ vs. $4,2 \pm 1,3$; $p < 0,01$), valamint a PS2 csoportban a harmadik napon ($5,8 \pm 2,7$ vs. $7,0 \pm 2,9$; $p = 0,026$) találtunk. Magasabb volt továbbá a jó minőségű embriók aránya ICSI-t követően a PS4 csoportban a második napon ($15,8\%$ vs. $26,3\%$; $p = 0,034$).

Hasonlóan vegyes képet mutat az osztódó embriók minősége, amennyiben a közepes minőségű spermamintával (SPII) történő megtermékenyítést követően vizsgáltuk őket (VIII. és IX. Táblázatok).

VIII. Táblázat Embriók minősége közepes minőségű ondómintával (SPII) végzett hagyományos in vitro fertilizációs kezelést (IVF), valamint intracitoplazmatikus spermiuminjekciót (ICSI) követő 2. napon

| SP II kategória (15-30 M) 2. nap | Petesejtek száma szerint | | | | Életkor szerint | | | |
|--|--------------------------|------------|------------|-----------------|--------------------------|--------------------------|------------|--------------|
| | | IVF | ICSI | P- érték | | IVF | ICSI | P- érték |
| Sejtszám | | – | 3,6±1,0 | – | | 3,6±1,1 | 4,4±1,3 | 0,013 |
| Morfológiai pontérték | PS1 (1-3) | – | 2,3±0,8 | – | ÉK1 (<31év) | 1,9±0,8 | 2,3±0,7 | 0,031 |
| Fragmentáció | | – | 13,5±9,0% | – | | 12,2±8,9% | 15,6±12,0% | 0,182 |
| Sejtszám | | 3,9±1,3 | 3,7±1,1 | 0,431 | | ÉK2 (32-36 év) | 4,0±1,2 | 4,2±1,3 |
| Morfológiai pontérték | 2,2±0,7 | 2,3±0,6 | 0,529 | 2,2±0,7 | 2,2±0,7 | | 0,858 | |
| Fragmentáció | 12,4±5,4% | 13,8±10,9% | 0,567 | 14,0±10,0% | 14,2±9,4% | | 0,940 | |
| Sejtszám | PS3 (7-9) | 4,1±1,3 | 4,0±1,1 | 0,748 | ÉK3 (37-40 év) | 3,8±1,4 | 3,7±1,2 | 0,573 |
| Morfológiai pontérték | | 2,3±0,9 | 2,4±0,6 | 0,656 | | 2,1±1,0 | 2,2±0,7 | 0,308 |
| Fragmentáció | | 16,9±15,0% | 12,5±5,5% | 0,602 | | 14,9±13,9% | 13,0±8,0% | 0,797 |
| Sejtszám | PS4 (≥10) | 3,8±1,2 | 4,2±1,3 | <0,01 | ÉK4 (≥41év) | 4,4±0,8 | 3,7±1,0 | 0,154 |
| Morfológiai pontérték | | 2,1±0,9 | 2,2±0,7 | 0,147 | | 2,3±1,0 | 2,3±0,5 | 0,881 |
| Fragmentáció | | 13,2±10,5% | 14,8±10,7% | 0,123 | | 9,3±3,5% | 13,2±10,7% | 0,653 |

Az adatok formátuma átlag±szórás

SP: A natív mintában progresszívan mozgó spermiumok száma (millió db) alapján meghatározott kezeléscsoportok

PS: A nyert petesejtek száma (db) szerint meghatározott kezeléscsoportok

ÉK: A nőbetegek életkora alapján elkülönített kezeléscsoportok

IX. Táblázat Embriók minősége közepes minőségű ondómintával (SPII) végzett hagyományos in vitro fertilizációs kezelést (IVF), valamint intracitoplazmatikus spermiuminjekciót (ICSI) követő 3. napon

| SP II kategória (15-30 M) 3. nap | Petesejtek száma szerint | | | | Életkor szerint | | | |
|--|--------------------------|------------|------------|-------------|--------------------------|------------|------------|-------------|
| | | IVF | ICSI | P- érték | | IVF | ICSI | P- érték |
| Sejtszám | PS1 (1-3) | – | 5,1±2,9 | – | ÉK1 (<31év) | 6,2±2,9 | 6,8±1,9 | 0,093 |
| Morfológiai pontérték | | – | 2,1±1,2 | – | | 2,0±0,8 | 2,1±0,6 | 0,816 |
| Fragmentáció | | –s | 15,0±7,7% | – | | 12,0±9,5% | 17,5±13,3% | 0,042 |
| Sejtszám | PS2 (4-6) | 5,8±2,7 | 7,0±2,9 | 0,026 | ÉK2 (32-36 év) | 6,9±2,3 | 6,9±2,0 | 0,578 |
| Morfológiai pontérték | | 2,0±0,8 | 2,1±0,8 | 0,633 | | 2,1±0,6 | 2,2±0,6 | 0,410 |
| Fragmentáció | | 13,7±5,5% | 18,9±13,8% | 0,417 | | 14,8±10,5% | 15,1±11,1% | 0,887 |
| Sejtszám | PS3 (7-9) | 6,7±1,8 | 7,0±1,8 | 0,655 | ÉK3 (37-40 év) | 6,3±2,4 | 6,5±2,4 | 0,851 |
| Morfológiai pontérték | | 2,1±0,8 | 2,2±0,5 | 0,323 | | 1,9±0,9 | 2,2±0,6 | 0,027 |
| Fragmentáció | | 15,2±13,0% | 13,4±7,9% | 0,943 | | 16,3±14,4% | 15,6±10,8% | 0,603 |
| Sejtszám | PS4 (≥10) | 6,9±2,5 | 6,7±1,9 | 0,447 | ÉK4 (≥41év) | 8,7±1,7 | 6,5±2,3 | 0,025 |
| Morfológiai pontérték | | 2,0±0,7 | 2,2±0,6 | 0,100 | | 2,1±0,4 | 2,3±0,7 | 0,497 |
| Fragmentáció | | 14,7±12,3% | 16,3±12,3% | 0,103 | | 10,7±4,5% | 18,2±12,9% | 0,254 |

Az adatok formátuma átlag±szórás

SP: A natív mintában progresszívan mozgó spermiumok száma (millió db) alapján meghatározott kezeléscsoportok

PS: A nyert petesejtek száma (db) szerint meghatározott kezeléscsoportok

ÉK: A nőbetegek életkora alapján elkülönített kezeléscsoportok

Az összes kezelést tekintve magasabb volt az embriók morfológiai pontértéke a harmadik napon ICSI után (2,0±0,7 vs. 2,2±0,6; p=0,037). Különbség mutatkozik továbbá a jó minőségű embriók arányában is, amely magasabb volt spermiuminjekciót követően (17,8% vs. 26,9%; p=0,024). A legfiatalabb nőbetegek esetében (ÉK1) magasabb sejtszámot (3,6±1,1 vs. 4,4±1,3; p=0,013), illetve morfológiai pontértéket (1,9±0,8 vs. 2,3±0,7; p=0,031) tapasztaltunk a második napon ICSI-t követően, ugyanakkor a harmadik napon alacsonyabb fragmentációs arányt hagyományos IVF kezelés során (12,0±9,5% vs. 17,5±13,3%; p=0,042). A jó minőségű embriók aránya ugyancsak

szignifikáns eltérést mutatott (3,8% vs. 31,8%; $p<0,01$), noha ennek értékelésénél nem hagyhatjuk figyelmen kívül, hogy a csoportokban alacsony volt az esetszám. A harmadik napon az ÉK3 csoportban az embriók morfológiai pontértéke magasabb ($1,9\pm 0,9$ vs. $2,2\pm 0,6$; $p=0,027$), az ÉK4 csoportban sejtszámuk alacsonyabb ($8,7\pm 1,7$ vs. $6,5\pm 2,3$; $p=0,025$) ICSI-vel történő megtermékenyítést követően.

X. Táblázat Embriók minősége jó minőségű ondómintával (SPIII) végzett hagyományos in vitro fertilizációs kezelést (IVF), valamint intracitoplazmatikus spermiuminjekciót (ICSI) követő 2. napon

| SP III kategória (≥ 30 M) 2. nap | Petesejtek száma szerint | | | | Életkor szerint | | | |
|--|--------------------------|------------------|------------------|-------------|------------------------|------------------|------------------|-------------|
| | | IVF | ICSI | P- érték | | IVF | ICSI | P- érték |
| Sejtszám | PS1 (1-3) | – | $3,7\pm 1,3$ | – | ÉK1 (<31 év) | $4,3\pm 1,5$ | $4,0\pm 1,4$ | 0,064 |
| Morfológiai pontérték | | – | $2,3\pm 0,7$ | – | | $2,2\pm 0,7$ | $2,4\pm 0,6$ | $<0,01$ |
| Fragmentáció | | – | $13,5\pm 10,6\%$ | – | | $15,4\pm 10,9\%$ | $12,1\pm 7,7\%$ | $<0,01$ |
| Sejtszám | PS2 (4-6) | $3,9\pm 1,4$ | $3,8\pm 1,5$ | 0,710 | ÉK2 (32-36 év) | $4,0\pm 1,3$ | $4,0\pm 1,4$ | 0,940 |
| Morfológiai pontérték | | $2,2\pm 0,8$ | $2,2\pm 0,8$ | 0,671 | | $2,2\pm 0,8$ | $2,2\pm 0,7$ | 0,399 |
| Fragmentáció | | $15,8\pm 10,7\%$ | $13,2\pm 10,3\%$ | $<0,01$ | | $14,6\pm 10,7\%$ | $12,4\pm 8,5\%$ | $<0,01$ |
| Sejtszám | PS3 (7-9) | $3,9\pm 1,2$ | $4,0\pm 1,4$ | 0,348 | ÉK3 (37-40 év) | $3,9\pm 1,2$ | $4,0\pm 1,5$ | 0,947 |
| Morfológiai pontérték | | $2,3\pm 0,7$ | $2,1\pm 0,7$ | 0,022 | | $2,3\pm 0,7$ | $2,2\pm 0,7$ | 0,278 |
| Fragmentáció | | $14,1\pm 10,8\%$ | $15,0\pm 9,6\%$ | 0,055 | | $12,4\pm 9,0\%$ | $13,5\pm 9,9\%$ | 0,140 |
| Sejtszám | PS4 (≥ 10) | $4,1\pm 1,3$ | $4,1\pm 1,2$ | 0,814 | ÉK4 (≥ 41 év) | $4,1\pm 1,4$ | $3,8\pm 1,3$ | 0,072 |
| Morfológiai pontérték | | $2,2\pm 0,8$ | $2,3\pm 0,7$ | 0,280 | | $2,2\pm 0,9$ | $2,1\pm 0,8$ | 0,360 |
| Fragmentáció | | $14,0\pm 10,3\%$ | $13,1\pm 9,5\%$ | 0,169 | | $15,7\pm 12,3\%$ | $16,1\pm 12,5\%$ | 0,855 |

Az adatok formátuma átlag \pm szórás

SP: A natív mintában progresszívan mozgó spermiumok száma (millió db) alapján meghatározott kezeléscsoportok

PS: A nyert petesejtek száma (db) szerint meghatározott kezeléscsoportok

ÉK: A nőbetegek életkora alapján elkülönített kezeléscsoportok

XI. Táblázat Embriók minősége jó minőségű ondómintával (SPIII) végzett hagyományos in vitro fertilizációs kezelést (IVF), valamint intracitoplazmatikus spermiuminjekciót (ICSI) követő 3. napon

| SP III kategória (≥30 M) 3. nap | Petesejtek száma szerint | | | | Életkor szerint | | | |
|---------------------------------------|--------------------------|------------|------------|-------------|--------------------------|------------|------------|-------------|
| | | IVF | ICSI | P- érték | | IVF | ICSI | P- érték |
| Sejtszám | PS1 (1-3) | – | 7,1±1,7 | – | ÉK1 (<31 év) | 6,8±2,1 | 7,2±1,8 | 0,412 |
| Morfológiai pontérték | | – | 2,5±0,7 | – | | 2,1±0,7 | 2,2±0,7 | 0,269 |
| Fragmentáció | | – | 9,3±8,0% | – | | 16,4±11,9% | 12,0±7,4% | <0,01 |
| Sejtszám | PS2 (4-6) | 6,4±2,0 | 7,1±2,2 | <0,01 | ÉK2 (32-36 év) | 6,7±2,2 | 7,2±2,3 | <0,01 |
| Morfológiai pontérték | | 2,1±0,8 | 2,3±0,6 | 0,062 | | 2,1±0,7 | 2,3±0,6 | <0,01 |
| Fragmentáció | | 17,2±13,3% | 11,5±7,7% | <0,01 | | 15,2±12,0% | 12,9±9,4% | 0,017 |
| Sejtszám | PS3 (7-9) | 6,7±2,1 | 6,6±2,4 | 0,644 | ÉK3 (37-40 év) | 6,7±2,1 | 6,5±1,9 | 0,407 |
| Morfológiai pontérték | | 2,2±0,7 | 2,2±0,6 | 0,680 | | 2,3±0,7 | 2,2±0,7 | 0,754 |
| Fragmentáció | | 14,5±11,9% | 15,7±11,3% | 0,074 | | 13,0±9,8% | 13,2±9,5% | 0,829 |
| Sejtszám | PS4 (≥10) | 6,8±2,2 | 7,1±2,0 | 0,082 | ÉK4 (≥41 év) | 6,9±2,2 | 6,7±2,1 | 0,369 |
| Morfológiai pontérték | | 2,2±0,7 | 2,2±0,7 | 0,314 | | 2,2±0,8 | 2,2±0,8 | 0,508 |
| Fragmentáció | | 14,7±11,0% | 13,7±10,3% | 0,164 | | 15,6±11,9% | 15,7±12,7% | 0,469 |

Az adatok formátuma átlag±szórás

SP: A natív mintában progresszívan mozgó spermiumok száma (millió db) alapján meghatározott kezeléscsoportok

PS: A nyert petesejtek száma (db) szerint meghatározott kezeléscsoportok

ÉK: A nőbetegek életkora alapján elkülönített kezeléscsoportok

A X. és XI. Táblázatok mutatják a legjobb minőségű ondómintával (SPIII) végzett kezelések során fejlődő embriók minőségének összevetésével nyert eredményeket. Az embriók második napi morfológiai pontértékét a PS3 csoportban leszámítva (2,3±0,7 vs. 2,1±0,7; p=0,022) minden esetben, ahol különbség mutatkozott a megtermékenyítés módszere között, az intracitoplazmatikus spermiuminjekció bizonyult eredményesebbnek. Az embriók morfológiai pontértéke a harmadik napon magasabb (2,2±0,7 vs. 2,2±0,7; p=0,036), fragmentációs rátája alacsonyabb (14,9±11,4% vs. 13,4±10,0%; p<0,01) volt az összes kezelést figyelembe véve. A legalacsonyabb életkorú nőbetegek esetén a

fragmentáció mértéke a második ($15,4\pm 10,9\%$ vs. $12,1\pm 7,7\%$; $p<0,01$) és harmadik napon ($16,4\pm 11,9\%$ vs. $12,0\pm 7,4\%$; $p<0,01$) is alacsonyabb, a morfológiai pontértéke a második napon ($2,2\pm 0,7$ vs. $2,4\pm 0,6$; $p<0,01$) magasabbnak bizonyult. Ugyancsak alacsonyabb volt a fragmentáció mértéke az ÉK2 csoportban a második napon ($14,6\pm 10,7\%$ vs. $12,4\pm 8,5\%$; $p<0,01$). Ugyanebben a csoportban a megtermékenyítést követő harmadik napon mind a blasztomérák száma ($6,7\pm 2,2$ vs. $7,2\pm 2,3$; $p<0,01$), mind a fragmentációs arány ($15,2\pm 12,0\%$ vs. $12,9\pm 9,4\%$; $p=0,017$), illetve az embriók morfológiai pontértéke ($2,1\pm 0,7$ vs. $2,3\pm 0,6$; $p<0,01$) is kedvezőbb volt spermiuminjektálást követően. A PS2 csoportban az embriók fragmentáltsága a második ($15,8\pm 10,7\%$ vs. $13,2\pm 10,3\%$; $p<0,01$) és harmadik napokon ($17,2\pm 13,3\%$ vs. $11,5\pm 7,7\%$; $p<0,01$) is alacsonyabb, míg sejtszámuk a harmadik napon ($6,4\pm 2,0$ vs. $7,1\pm 2,2$; $p<0,01$) magasabb volt.

4.1.3. A beültetett embriók minősége

A XII. Táblázat mutatja a beültetett embriók minőségét IVF valamint ICSI megtermékenyítés esetén az ondóminták minőségétől függetlenül (összes SP kat.).

XII. Táblázat A beültetésre került embriók minősége hagyományos in vitro fertilizációs kezelést (IVF), valamint intracitoplazmatikus spermiuminjekciót (ICSI) követően

| Összes SP kategória | Petesejtek száma szerint | | | | Életkor szerint | | | |
|------------------------------|--------------------------|-----------|------------|-----------------|--------------------------|-----------|-----------|-----------------|
| | | IVF | ICSI | P-érték | | IVF | ICSI | P-érték |
| Sejtszám | PS1 (1-3) | – | 4,1±1,9 | – | ÉK1 (<31év) | 7,5±1,8 | 7,2±2,1 | 0,121 |
| Morfológiai pontérték | | – | 2,3±0,6 | – | | 2,6±0,7 | 2,5±0,7 | 0,402 |
| Fragmentáció | | – | 14,0±11,0% | – | | 12,2±8,5% | 11,4±7,7% | 0,332 |
| Sejtszám | PS2 (4-6) | 6,3±2,3 | 5,7±2,7 | 0,016 | ÉK2 (32-36 év) | 7,7±1,8 | 6,9±2,4 | <0,01 |
| Morfológiai pontérték | | 2,4±0,7 | 2,4±0,7 | 0,679 | | 2,6±0,7 | 2,5±0,7 | 0,644 |
| Fragmentáció | | 13,8±9,7% | 13,5±9,7% | 0,567 | | 11,4±7,4% | 11,7±8,2% | 0,962 |
| Sejtszám | PS3 (7-9) | 7,2±2,0 | 7,0±2,1 | 0,286 | ÉK3 (37-40 év) | 7,2±2,1 | 6,1±2,4 | <0,01 |
| Morfológiai pontérték | | 2,5±0,7 | 2,4±0,7 | 0,086 | | 2,6±0,7 | 2,4±0,6 | <0,01 |
| Fragmentáció | | 10,4±6,9% | 12,8±9,1% | <0,01 | | 9,9±6,4% | 12,8±8,4% | <0,01 |
| Sejtszám | PS4 (≥10) | 8,0±1,6 | 7,7±1,7 | 0,024 | ÉK4 (≥41év) | 7,3±2,6 | 5,3±2,6 | <0,01 |
| Morfológiai pontérték | | 2,7±0,7 | 2,6±0,7 | 0,08 | | 2,6±0,7 | 2,3±0,7 | <0,01 |
| Fragmentáció | | 10,7±6,4% | 10,8±7,2% | 0,617 | | 12,3±6,6% | 14,5±11,7 | 0,812 |

Az adatok formátuma átlag±szórás

SP: A natív mintában progresszívan mozgó spermiumok száma (millió db) alapján meghatározott kezeléscsoportok

PS: A nyert petesejtek száma (db) szerint meghatározott kezeléscsoportok

ÉK: A nőbetegek életkora alapján elkülönített kezeléscsoportok

XIII. Táblázat A beültetésre került embriók minősége közepes minőségű ondómintával végzett hagyományos in vitro fertilizációs kezelést (IVF), valamint intracitoplazmatikus spermiuminjekciót (ICSI) követően

| SP II kategória (15-30 M) | Petesejtek száma szerint | | | | Életkor szerint | | | |
|------------------------------|--------------------------|-----------|-----------|-------------|--------------------------|------------|------------|-----------------|
| | | IVF | ICSI | P- érték | | IVF | ICSI | P- érték |
| Sejtszám | PS1 (1-3) | – | 4,0±1,5 | – | ÉK1 (<31 év) | 6,1±2,5 | 6,9±1,8 | 0,450 |
| Morfológiai pontérték | | – | 2,5±0,6 | – | | 2,1±0,4 | 2,3±0,7 | 0,634 |
| Fragmentáció | | – | 12,3±8,1% | – | | 12,9±10,4% | 13,7±10,8% | 0,827 |
| Sejtszám | PS2 (4-6) | 6,6±3,7 | 5,4±2,7 | 0,269 | ÉK2 (32-36 év) | 7,9±2,3 | 7,1±2,2 | 0,351 |
| Morfológiai pontérték | | 2,4±0,7 | 2,3±0,7 | 0,993 | | 2,5±0,5 | 2,6±0,6 | 0,713 |
| Fragmentáció | | 12,5±6,3% | 13,5±9,5% | 0,885 | | 10,9±5,0% | 10,7±7,2% | 0,458 |
| Sejtszám | PS3 (7-9) | 6,6±2,1 | 7,3±1,7 | 0,242 | ÉK3 (37-40 év) | 6,9±1,6 | 6,3±2,6 | 0,221 |
| Morfológiai pontérték | | 2,6±0,8 | 2,4±0,5 | 0,831 | | 2,7±0,9 | 2,5±0,7 | 0,671 |
| Fragmentáció | | 9,2±4,7% | 12,8±6,5% | 0,115 | | 8±4,9% | 13,1±7,4% | 0,015 |
| Sejtszám | PS4 (≥10) | 8,2±1,2 | 7,6±1,4 | 0,055 | ÉK4 (≥41 év) | 9,5±1,9 | 5,0±2,3 | <0,01 |
| Morfológiai pontérték | | 2,5±0,6 | 2,5±0,7 | 0,870 | | 2,3±0,5 | 2,4±0,6 | 0,639 |
| Fragmentáció | | 10,0±6,5% | 11,6±9,2% | 0,685 | | 11,3±4,8% | 13,1±9,9% | 0,876 |

Az adatok formátuma átlag±szórás

SP: A natív mintában progresszívan mozgó spermiumok száma (millió db) alapján meghatározott kezeléscsoportok

PS: A nyert petesejtek száma (db) szerint meghatározott kezeléscsoportok

ÉK: A nőbetegek életkora alapján elkülönített kezeléscsoportok

Az embriók sejtszáma magasabb volt a PS2 és PS4 csoportokban petesejtszám szerinti, illetve az ÉK2, ÉK3 és ÉK4 csoportokban életkor szerinti felosztás esetén. A beültetett embriók fragmentáltsága alacsonyabb volt a PS3 és ÉK3 csoportokban, morfológiai pontértéke magasabb volt az ÉK3 és ÉK4 csoportokban hagyományos IVF-et követően. A többi tulajdonságban nem volt különbség a két megtermékenyítési mód között az ondóminták minőségét figyelmen kívül hagyva. Közepes minőségű ondómintákkal (SPII csoport) végzett kezeléseknél a beültetett embriók minősége minden életkor-, illetve petesejtszám-csoportban hasonlított, függetlenül a megtermékenyítés módjától, kivéve az

embriók sejtszámát az ÉK4, valamint a fragmentáció mértékét az ÉK3 csoportokban. (XIII. Táblázat).

XIV. Táblázat A beültetésre került embriók minősége jó minőségű ondómintával végzett hagyományos in vitro fertilizációs kezelést (IVF), valamint intracitoplazmatikus spermiuminjekciót (ICSI) követően

| SP III kategória (≥30 M) | Petesejtek száma szerint | | | | Életkor szerint | | | |
|------------------------------|--------------------------|------------|------------|-------------|--------------------------|-----------|------------|-------------|
| | | IVF | ICSI | P- érték | | IVF | ICSI | P- érték |
| Sejtszám | PS1 (1-3) | – | 4,2±2 | – | ÉK1 (<31 év) | 7,6±1,7 | 6,3±2,5 | <0,01 |
| Morfológiai pontérték | | – | 2,3±0,6 | – | | 2,6±0,7 | 2,4±0,6 | 0,069 |
| Fragmentáció | | – | 14,2±11,1% | – | | 12,1±8,4% | 11,2±7,8% | 0,394 |
| Sejtszám | PS2 (4-6) | 6,3±2,2 | 5,7±2,8 | 0,038 | ÉK2 (32-36 év) | 7,6±1,8 | 6,5±2,9 | <0,01 |
| Morfológiai pontérték | | 2,4±0,7 | 2,3±0,7 | 0,420 | | 2,6±0,7 | 2,5±0,6 | 0,211 |
| Fragmentáció | | 13,9±10,0% | 13,6±10,3% | 0,447 | | 11,4±7,7% | 11,9±7,8% | 0,491 |
| Sejtszám | PS3 (7-9) | 7,3±2,0 | 6,9±2,5 | 0,081 | ÉK3 (37-40 év) | 7,2±2,1 | 5,6±2,4 | <0,01 |
| Morfológiai pontérték | | 2,5±0,6 | 2,3±0,6 | 0,012 | | 2,6±0,7 | 2,3±0,6 | <0,01 |
| Fragmentáció | | 10,5±7,0% | 15,3±11,2% | <0,01 | | 10,1±6,5% | 13,3±9,8% | <0,01 |
| Sejtszám | PS4 (≥10) | 8,0±1,7 | 7,3±2,1 | <0,01 | ÉK4 (≥41 év) | 7,1±2,6 | 5,1±2,5 | <0,01 |
| Morfológiai pontérték | | 2,7±0,7 | 2,6±0,7 | 0,063 | | 2,6±0,7 | 2,3±0,7 | <0,01 |
| Fragmentáció | | 10,7±6,4% | 10,7±7,6% | 0,511 | | 12,4±6,8% | 15,9±12,8% | 0,316 |

Az adatok formátuma átlag±szórás

SP: A natív mintában progresszívan mozgó spermiumok száma (millió db) alapján meghatározott kezeléscsoportok

PS: A nyert petesejtek száma (db) szerint meghatározott kezeléscsoportok

ÉK: A nőbetegek életkora alapján elkülönített kezeléscsoportok

Jó minőségű ondómintával (SPIII) végzett hagyományos IVF kezelést követően szignifikánsan nagyobb sejtszámú embriók kerültek beültetésre a PS2 és PS4 csoportokban, illetve az összes életkorcsoportban (XIV. Táblázat). A PS3 és ÉK3 csoportokban a transzferált embriók magasabb morfológiai pontértékkel és alacsonyabb fragmentáltsággal rendelkeztek hagyományos IVF megtermékenyítést követően. A 40

év feletti nőbetegek esetében (ÉK4) az embriók morfológiai pontértéke ICSI kezelést követően alacsonyabb, mint hagyományos IVF kezelés után.

4.1.4. Embrióbeültetés és a kezelések kimenetele

Embrió beültetésére összesen 1072 (IVF: 315 vs. ICSI: 757) esetben került sor, míg 60 (IVF: 3 vs. ICSI:57) esetben nem végeztünk transzfert. Az összes kezelést tekintve szignifikánsan magasabb embriótranszferre vonatkoztatott klinikai terhességi arányt sikerült elérnünk hagyományos IVF kezelést követően (49,4% vs. 37,2%; $p<0,01$). Nem volt különbség ugyanakkor a klinikai terhességi arányban a két megtermékenyítési módszer között az SPII csoportban (45,8% vs. 36,1%; $p=0,374$), azonban a SPIII csoportban magasabb volt ez az arány hagyományos IVF-et követően (49,8% vs. 25,9%; $p<0,01$). Ugyancsak nem találtunk szignifikáns eltérést a két módszer között az embrióbeültetésre vonatkoztatott beágyazódási arányban az összes spermakategóriát tekintve (30,5% vs. 25,4%; $p=0,060$), illetve a közepes minőségű ondóminták (SPII) esetében (36,7% vs. 24,1%; $p=0,729$), ugyanakkor szignifikánsan magasabb volt ez az arány a legjobb minőségű ondómintákkal végzett hagyományos IVF kezeléseket követően (29,9% vs. 16,8%; $p<0,01$).

Akárcsak a klinikai terhességi arányok esetében, az embrióbeültetésre vonatkoztatott élve szülési arány is magasabb volt hagyományos IVF kezelést követően az összes kezelés esetén (40,1% vs. 31,4%; $p<0,01$). A közepes minőségű ondómintával (SPII) végzett kezeléseket esetében az eltérés, jóllehet jelentősnek tűnik, statisztikailag nem volt igazolható (41,7% vs. 27,6%; $p=0,177$). Jó minőségű ondómintával (SPIII) végzett hagyományos IVF kezeléseket ugyancsak magasabb élve szülési arányt eredményeztek, mint az ICSI-vel történő megtermékenyítés (39,8% vs. 21,7%; $p<0,01$).

4.2. **A csoportos tenyésztés vizsgálatának eredményei**

A tenyésztés módjának vizsgálatát 532 IVF ciklus (Csoportos: 264 vs. Egyedi: 268) bevonásával végeztük. A két csoport között nem volt különbség a nőbetegek életkorát (35,7 \pm 4,8 vs. 35,9 \pm 4,7; $p=0,689$), a stimuláció hosszát (11,1 \pm 1,1 nap vs. 11,1 \pm 1,1 nap; $p=0,709$), illetve a nyert petesejtek számát (8,7 \pm 5,3 vs. 8,7 \pm 5,6; $p=0,966$) tekintve. A két megtermékenyítési módszer alkalmazása is hasonló arányban történt mindkét csoportban (ICSI aránya: 78,4% vs. 76,1%; $p=0,529$). A normális megtermékenyülési arány hagyományos IVF-et követően nem különbözött (69,0% vs. 66,6%; $p=0,361$),

ICSI-t követően azonban szignifikánsan magasabb volt csoportos tenyésztés esetén (70,6% vs. 64,9%; $p < 0,01$).

A XV. Táblázat mutatja az embriók minőségi paramétereit a megtermékenyítést követő második és harmadik napokon. Az embriók morfológiai pontértéke, valamint fragmentáltsága sem különbözött a két tenyésztési mód esetén sem a második, sem a harmadik napon, azonban az embriók átlagos sejtszáma mindkét napon magasabbnak bizonyult csoportos tenyésztés esetén. Nem volt különbség a jó minőségű embriók arányában sem a két módszer között sem a második, sem a harmadik napon.

XV. Táblázat Embriók minősége a megtermékenyítést követő 2. és 3. napokon mikrovájatokat tartalmazó tenyésztőedényben történő csoportos, illetve hagyományos egyedi tenyésztés esetén

| | Csoportos tenyésztés | Egyedi tenyésztés | p-érték |
|------------------------------------|-----------------------------|--------------------------|----------------|
| 2. Nap | | | |
| N | 1411 | 1338 | |
| Sejtszám ¹ | 4,1±1,4 | 4±1,3 | 0,038 |
| Morfológiai pontérték ¹ | 2,2±0,8 | 2,2±0,8 | 0,401 |
| Fragmentáció ¹ | 15,2±9,9 | 14,8±10,4 | 0,313 |
| Jó minőségű embriók aránya | 25,0% | 26,7% | 0,299 |
| 3. Nap | | | |
| N | 1281 | 1197 | |
| Sejtszám ¹ | 7,0±2,2 | 6,7±2,3 | 0,013 |
| Morfológiai pontérték ¹ | 2,2±0,7 | 2,2±0,8 | 0,528 |
| Fragmentáció ¹ | 15,3±10,9 | 15,2±11,5 | 0,831 |
| Jó minőségű embriók aránya | 22,9% | 23,4% | 0,748 |

¹átlag±szórás

Jóllehet a beültetett embriók átlagos mennyisége megegyezett a két csoportban (2,1±0,9 vs. 2,1±0,9; $p = 0,665$), a klinikai terhességi arány szignifikánsan magasabb volt a mikrovájatokat tartalmazó tenyésztőedényben történő embriótenyésztést követően

(50,8% vs. 40,6%; $p=0,022$). Nem volt ugyanakkor különbség a beágyazódott embriók arányában (30,1% vs. 27,0%; $p=0,265$). A krioprezervált embriók aránya (39,7% vs. 32,1%; $p<0,01$), akárcsak az összes felhasznált embrió aránya (81,3% vs. 74,7%; $p<0,01$) magasabb volt csoportos embriótenyésztést követően.

4.3. Az embriódenzitás vizsgálatának eredményei

A különböző embriódenzitások embriók életképességére gyakorolt hatásának vizsgálatához 1337 osztódási fázisú embrió minőségi paramétereit értékeltük a megtermékenyítést követő második napon (ED1 csoport: $n=370$, ED2 csoport: $n=486$, ED3 csoport: $n=481$), míg 1229 embrióét a harmadik napon (ED1 csoport: $n=269$, ED2 csoport: $n=479$, ED3 csoport: $n=481$). Nem volt különbség a három csoport között a nőbetegek életkorában ($35,0\pm 5,2$ vs. $34,6\pm 4,5$ vs. $34,5\pm 4,1$; $p=0,197$), illetve a korábban végzett in vitro fertilizációs kezelések számában ($2,0\pm 1,4$ vs. $1,8\pm 1,4$ vs. $1,9\pm 1,4$; $p=0,255$). Különbség mutatkozott ugyanakkor az alkalmazott stimulációs protokollban, illetve a megtermékenyítés módjában. A magasabb embriódenzitású csoportokban a GnRH-agonista hosszú protokoll alkalmazásának aránya magasabb volt (80,3% vs. 82,1% vs. 87,9%; $p<0,01$), míg a petesejtek intractoplazmatikus spermiuminjekcióval történő megtermékenyítésének aránya alacsonyabb (91,4% vs. 72,6% vs. 53,4% vs. $p<0,01$). Különbség volt továbbá a stimuláció hosszában is ($11,1\pm 1,0$ vs. $10,9\pm 1,0$ vs. $10,8\pm 1,0$; $p<0,01$).

A XVI. Táblázaton tüntettük fel az embriók minőségi paramétereit az egyes denzitáscsoportokban, valamint a jó minőségű embriók arányát a második napon. Nem volt különbség az embriók blasztoméráinak számában, ugyanakkor az ED1 csoportban a morfológiai pontérték alacsonyabb ($2,2\pm 0,7$ vs. $2,3\pm 0,7$; $p=<0,01$), míg az embriók fragmentáltsága magasabb volt ($16,1\pm 10,9\%$ vs. $14,2\pm 8,9\%$; $p<0,01$), mint az ED2 csoportban. Ugyancsak magasabb volt a jó minőségű embriók aránya az ED2 csoportban, mint a másik két csoportban (ED és ED2: 18,9% vs. 31,5%; $p<0,001$, illetve ED2 és ED3: 31,5% vs. 24,7% $p=0,02$). Az ED1 és ED3 csoportok között ugyancsak mutatkozott eltérés (18,9% vs. 24,7%; $p=0,043$).

XVI. Táblázat Embrióminőség a különböző denzitáscsoportokban a megtermékenyítést követő 2. napon

| 2. nap | ED1 Csoport (6,3-12,5 µl) | ED2 Csoport (4,2-5,0 µl) | ED3 Csoport (2,8-3,6 µl) | p-érték |
|------------------------------------|---|--|--|----------------|
| Esetszám | 370 | 486 | 481 | |
| Sejtszám ¹ | 4,1±1,4 | 4,3±1,2 | 4,2±1,3 | 0,055 |
| Morfológiai pontérték ¹ | 2,2±0,7 ^a | 2,3±0,7 ^a | 2,2±0,7 | 0,004 |
| Fragmentáció ¹ | 16,1±10,9 ^b | 14,2±8,9 ^b | 14,6±8,1 | 0,009 |
| Jó minőségű embriók aránya | 18,9% ^{c,d} | 31,5% ^{c,e} | 24,7% ^{d,e} | <0,001 |

¹átlag±szórás

^ap=0,003 ^bp=0,009 ^cp<0,001 ^dp=0,043 ^ep=0,020

XVII. Táblázat Embrióminőség a különböző denzitáscsoportokban a megtermékenyítést követő 3. napon

| 3. nap | ED1 Csoport (6,3-12,5 µl) | ED2 Csoport (4,2-5,0 µl) | ED3 Csoport (2,8-3,6 µl) | p-érték |
|------------------------------------|---|--|--|----------------|
| Esetszám | 269 | 479 | 481 | |
| Sejtszám ¹ | 6,8±2,2 ^a | 7,3±2,1 ^{a,b} | 7,0±2 ^b | 0,002 |
| Morfológiai pontérték ¹ | 2,1±0,7 ^c | 2,3±0,7 ^c | 2,2±0,6 | 0,028 |
| Fragmentáció ¹ | 16,7±11,5% ^{d,e} | 14,7±10,4% ^d | 14,2±9,4% ^e | 0,006 |
| Jó minőségű embriók aránya | 19,7% ^f | 27,1% ^{f,g} | 21,2% ^g | 0,029 |

¹átlag±szórás

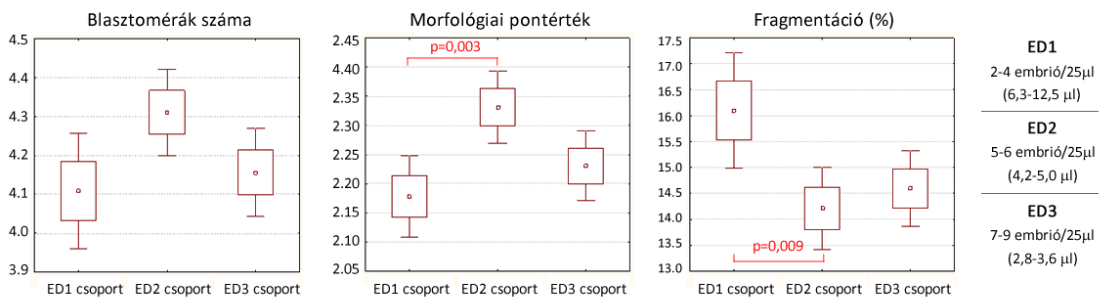
^ap=0,004 ^bp=0,014 ^cp=0,021 ^dp=0,029 ^ep=0,005 ^fp=0,023 ^gp=0,032

A harmadik napi embrióminőséget a XVII. Táblázat mutatja. Az embriók átlagos sejtszáma magasabb volt az ED2 csoportban (7,3±2,1; p=0,004) összehasonlítva az ED1 (6,8±2,2; p<0,01) illetve az ED3 (7,0±2,0; p=0,014) csoportokkal. Az embriók átlagos morfológiai pontértéke ugyancsak magasabb volt az ED2 csoportban (2,3±0,7), mint az ED1 csoportban (2,1±0,7; p=0,021), nem különbözött azonban az ED3 csoportban tapasztalható értéktől (2,2±0,6; p=0,474). Nem mutatkozott szignifikáns eltérés az embriók fragmentáltsága között sem az ED2 és ED3 csoportokban (14,7±10,4% vs. 14,2±9,4%; p=0,768), azonban mindkét esetben jelentősen alacsonyabb volt, mint az ED1

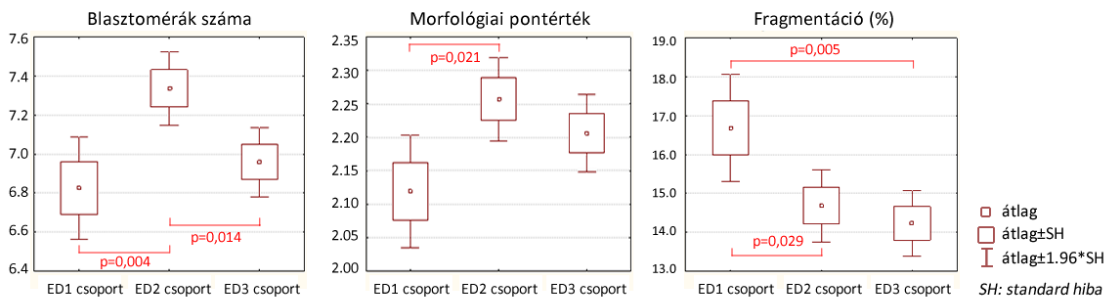
csoportban (ED1 és ED2: $16,7 \pm 11,5$ vs. $14,7 \pm 10,4$; $p=0,029$; ED1 és ED3: $16,7 \pm 11,5$ vs. $14,2 \pm 9,4$; $p<0,01$). A jó minőségű embriók aránya a sejtszáméhoz hasonló eloszlást mutatott. Az ED2 csoportban volt a legmagasabb (21,7%), majd azt követte az ED3 csoport (21,2%; $p=0,032$), míg a legalacsonyabb érték az ED1 csoportban volt (19,7%; $p=0,023$).

Az embriók mind a második, mind a harmadik napi minőségi paramétereit jól szemlélteti a XI. Ábra.

2. nap



3. nap



XI. Ábra Embriók minőségi paramétereit az egyes denzitáscsoportokban a megtermékenyítést követő 2. és 3. napokon „box and whiskers” diagrammok segítségével ábrázolva

4.4. A különféle fagyasztási módszerek összehasonlításának eredményei

A vizsgált időszakban 96 Krio-ET ciklust végeztünk, ebből 53 esetben hagyományos lassú fagyasztás, 43 esetben vitrifikációs módszerrel 343 (Hagyományos csoport: 164 vs. Vitrifikációs csoport: 149) krioprezervált embrió felolvasztására került sor, melyek összesen 90 friss IVF ciklusból (Hagyományos csoport: 52 vs. Vitrifikációs csoport: 38) származtak. Friss IVF ciklus alatt a petefészek hormonális stimulációját követően nyert petesejtek megtermékenyítésével végzett in vitro fertilizációs kezeléseket értjük. Az eltérés oka, hogy egyes esetekben egyetlen friss ciklusban lefagyasztott embriók több Krio-ET ciklusban kerültek felolvasztásra.

Nem volt különbség a friss IVF ciklusok általános jellemzőiben a két fagyasztási csoport esetén. Megegyezett a nőbetegek életkora ($32,8 \pm 4,7$ vs. $34,1 \pm 4,3$; $p=0,270$), az alkalmazott stimulációs protokoll (GnRH-agonista : $92,3\%$ vs. $92,1\%$; $p=1,000$), illetve a stimuláció hossza ($10,8 \pm 0,8$ vs. $11,0 \pm 1,0$ nap; $p=0,391$). Nem különbözött az egy ciklusban nyert petesejtek átlagos száma ($13,7 \pm 4,9$ vs. $15,0 \pm 4,6$; $P=0,263$), valamint az alkalmazott megtermékenyítés módja, azaz az ICSI gyakorisága ($65,4\%$ vs. $57,9\%$; $p=0,471$). A fagyasztásra került embriók átlagos száma sem mutatott eltérést a két csoport között ($6,2 \pm 3,2$ vs. $6,5 \pm 2,4$; $p=0,319$), ugyanakkor minőségük nem volt azonos. A Vitrifikációs csoportban jobb minőségű embriók kerültek lefagyasztásra, melyek sejtszáma ($7,7 \pm 2,0$ vs. $6,9 \pm 1,8$; $p<0,001$), morfológiai pontértéke magasabb ($2,3 \pm 0,6$ vs. $2,2 \pm 0,4$; $p<0,001$), fragmentáltsága alacsonyabb ($12,2 \pm 6,4\%$ vs. $14,1 \pm 8,4\%$; $p=0,039$) volt.

A programozott lassú fagyasztás esetében a felolvasztott 245 embrióból 15 (6,1%), míg vitrifikáció után 152-ből mindössze egyetlen embrió (0,7%) nem került elő a fagyasztócsőből, illetve a vitrifikációs pálcáról ($p=0,007$). Az embriók hagyományosan vizsgált 50%-os túlélése (tehát a sejtek legalább fele sértetlen maradt a felolvasztás után) vitrifikációt követően szignifikánsan magasabb volt, mint a hagyományos fagyasztás alkalmazásával ($55,1\%$ vs. $92,1\%$; $p<0,001$). Hasonló különbséget találtunk a 80%-os ($35,1\%$; vs. $69,1\%$; $p<0,001$), valamint a teljes, 100%-os túlélés esetében is ($21,2\%$ vs. $57,2\%$; $p<0,001$). Minthogy a lefagyasztott embriók minősége nem volt azonos a két csoportban, elvégeztük az összehasonlítást úgy is, hogy csak a 7-12 sejtes embriók adatait vettük figyelembe. Mind az 50%-os ($80,9\%$ vs. $93,0\%$; $p=0,004$), a 80%-os ($53,9\%$ vs.

69,8%; $p=0,011$), mind pedig a 100%-os túlélési arány (31,3% vs. 56,6%; $p<0,001$) magasabb volt a Vitrifikációs csoportban.

A beültetésre kerülő embriók minőségén túl azon embriók minőségét is összehasonlítottuk, melyek sejtjeinek legalább fele sértetlen maradt a felolvasztás után (XVIII. Táblázat). Mind a felolvasztást túlélő, mind pedig a beültetésre kerülő embriók minősége minden vizsgált paraméter alapján jobb volt az ultragyors hűtéssel krioprezervált embriók esetében.

XVIII. Táblázat Hagyományos fagyasztással, illetve vitrifikációval krioprezervált, majd a felolvasztást túlélő, valamint a beültetett embriók minősége

| | | Hagyományos fagyasztás (n=135) | Vitrifikáció (n=140) | p-érték |
|---|------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|---------|
| A felolvasztást túlélő embriók minősége | Sejtszám ¹ | 6,1±2,1 | 7,5±2,4 | <0,001 |
| | Morfológiai pontérték ¹ | 2,1±0,6 | 2,3±0,7 | 0,001 |
| | Fragmentáció ¹ | 21,6±14,4% | 16,7±12,1% | 0,003 |
| A beültetésre kerülő embriók minősége | Sejtszám ¹ | 7,1±2,5 | 8,3±2,5 | <0,001 |
| | Morfológiai pontérték ¹ | 2,1±0,6 | 2,4±0,7 | 0,001 |
| | Fragmentáció ¹ | 20±14,1% | 14,1±9,0% | 0,003 |

¹átlag±szórás

A beültetett embriók száma hasonló volt mindkét csoportban (2,1±0,6 vs. 2,4±0,6; $p=0,102$). Szignifikáns különbség mutatkozott azonban a beültetett és felolvasztott embriók arányában. Míg hagyományos fagyasztás-felolvasztás esetén ez az arány 29,6% volt, addig vitrifikációt követően szignifikánsan magasabb, 39,4% ($p=0,012$). Vitrifikációval történő hűtést és melegítést követően történő embrióbeültetés eredményeként a klinikai terhességi arány 15%-kal (32,7% vs. 47,6%; $p=0,145$), a beágyazódott embriók aránya 9%-kal (16,5% vs. 25,3%; $p=0,125$) haladta meg a hagyományos módszerrel történő fagyasztás-felolvasztást követő embriótranszfer eredményeit, jóllehet a különbségek nem érték el a statisztikai szignifikancia szintjét. Nem volt ugyanakkor különbség az élve szülési arányokban a két fagyasztási módszer között (30,8% vs. 31,0%; $p=1,000$).

4.5. Az óriás petesejtek vizsgálatának eredményei

A vizsgált időszak alatt elvégzett 1521 IVF ciklus során összesen 12554 petesejtet nyertünk, melyekből 37 volt óriás. Az óriás petesejtek előfordulásának aránya tehát 0,3%-nak adódott. Ezek átmérője szignifikánsan meghaladta a normál társaikét ($200,0 \pm 12,2 \mu\text{m}$ vs. $161,6 \pm 6,1 \mu\text{m}$; $p < 0,01$ zona pellucidával, illetve $140,8 \pm 10,2 \mu\text{m}$ vs. $11,8 \pm 2,9 \mu\text{m}$; $p < 0,01$ zona nélkül). Átlagos térfogatuk $4,19 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$, míg normális méretű társaiké $2,21 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$ volt. Az óriás petesejteket körülvevő zona pellucida vastagabb, mint normál petesejtek esetén ($21,8 \pm 2,8 \mu\text{m}$ vs. $17,6 \pm 2,8 \mu\text{m}$; $p < 0,01$), ugyanakkor a germinális vezikulumok ($31,2 \pm 2,9 \mu\text{m}$ vs. $32,0 \pm 1,4 \mu\text{m}$; $p = 0,06$), illetve pronucleusok átmérője ($23,6 \pm 1,4 \mu\text{m}$ vs. $25,1 \pm 1,8 \mu\text{m}$; $p = 0,43$) megegyezik a normális petesejtekben találhatóakkal.

A petefészek GnRH agonista hosszú protokoll szerinti stimulációját követően óriás petesejtek a ciklusok 2,7%-ában, míg antagonistá protokoll szerinti stimuláció után 6,6%-ában fordultak elő ($p = 0,31$). Ugyancsak nem volt különbség az óriás petesejtek előfordulásában HMG vagy FSH hormonok alkalmazása esetén (1,6% vs. 1,9%; $p = 0,22$). A nőbetegek átlagos életkora ($33,5 \pm 3,9$ vs. $35,3 \pm 4,9$; $p = 0,02$) alacsonyabb, az E2-szint ($1954 \pm 903 \text{ pg/l}$ vs. $1488 \pm 909 \text{ pg/l}$; $p < 0,01$), valamint a leszívott petesejtek száma ($12,7 \pm 8,1 \pm 5,1$; $p < 0,01$) magasabb volt azokban a ciklusokban, ahol óriás petesejt fordult elő. A klinikai terhességi arány megegyezett az Óriás petesejt és a Normál csoportban (37,8% vs. 37,4%; $p = 1,00$).

Az embriók minőségi paramétereit az inszeminációt követő második, illetve harmadik napon a XIX. Táblázat mutatja. A második napon mindössze az embriók fragmentáltságában mutatkozott némi különbség a Normál csoport javára ($16,1 \pm 11,4\%$ vs. $14,4 \pm 10,2\%$; $p = 0,04$). A harmadik napon a fragmentációs arányon túl ($17,9 \pm 13,0\%$ vs. $15,6 \pm 11,5\%$; $p < 0,01$) a blasztomérák száma is ($6,2 \pm 2,0$ vs. $6,6 \pm 2,1$; $p < 0,01$) kedvezőbb volt a Normál csoportban. A beültetésre került embriók minősége nem mutatott eltérést.

XIX. Táblázat Embriológiai adatok összehasonlítása az Óriás Petesejt, valamint a Normál Csoportban

| | ÓriásPS Csoport (n=430) | Normál Csoport (n=12055) | p-érték |
|------------------------------------|---------------------------------------|--|-----------------|
| 2. Nap | | | |
| Sejtszám ¹ | 4,1±1,2 | 4,0±1,3 | 0,34 |
| Morfológiai pontérték ¹ | 2,3±0,6 | 2,3±0,6 | 0,82 |
| Fragmentáció ¹ | 16,1±11,4% | 14,4±10,2% | 0,04 |
| Jó minőségű embriók aránya | 24,9% | 24,2% | 0,89 |
| 3. Nap | | | |
| Sejtszám ¹ | 6,2±2,0 | 6,6±2,1 | <0,01 |
| Morfológiai pontérték ¹ | 2,1±0,6 | 2,2±0,6 | 0,08 |
| Fragmentáció ¹ | 17,9±13,0% | 15,6±11,5% | <0,01 |
| Jó minőségű embriók aránya | 14,9% | 18,4% | 0,18 |
| Beültetett embriók | | | |
| Sejtszám ¹ | 6,9±1,7 | 6,4±2,3 | 0,47 |
| Morfológiai pontérték ¹ | 2,6±0,5 | 2,6±0,5 | 0,99 |
| Fragmentáció ¹ | 11,8±5,9 | 12,6±7,9 | 0,91 |

¹átlag±szórás

A párosított ciklusok összehasonlításának eredményeit a XX. Táblázat foglalja össze. A fentiekkel ellentétben nem volt különbség az embriók minőségében a két csoport között sem a megtermékenyítést követő második, sem pedig a harmadik napon. A beültetett embriók sejtszáma alacsonyabb volt ugyanakkor az Óriás petesejt csoportban (7,0±1,8 vs. 7,8±1,6; p=0,03).

XX. Táblázat A párosított IVF ciklusok embriológiai adatainak összehasonlítása

| | ÓriásPS Csoport (n=359) | Normál Csoport (n=359) | p-érték |
|------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|----------------|
| 2. Nap | | | |
| Sejtszám ¹ | 4,0±1,2 | 4,3±1,2 | 0,71 |
| Morfológiai pontérték ¹ | 2,1±0,6 | 2,2±0,6 | 0,18 |
| Fragmentáció ¹ | 16,5±11,6 | 15,3±11,4 | 0,6 |
| Jó minőségű embriók aránya | 22,3% | 24,4% | 0,62 |
| 3. Nap | | | |
| Sejtszám ¹ | 5,9±2,0 | 6,8±2,0 | 0,13 |
| Morfológiai pontérték ¹ | 2,0±0,6 | 2,1±0,6 | 0,09 |
| Fragmentáció ¹ | 17,6±12,0 | 17,3±13,8 | 0,41 |
| Jó minőségű embriók aránya | 12,5% | 18,9% | 0,08 |
| Beültetett embriók | | | |
| Sejtszám ¹ | 7,0±1,8 | 7,8±1,6 | 0,03 |
| Morfológiai pontérték ¹ | 2,6±0,5 | 2,6±0,4 | 0,72 |
| Fragmentáció ¹ | 11,4±5,5 | 10,3±5,4 | 0,57 |

¹átlag±szórás

5. Megbeszélés

A meddőség világszerte komoly egészségügyi problémát jelent. Becslések szerint a fejlett országokban a párok 9-14%-ának nehézségei vannak a teherbe eséssel (Walschaerts és mtsai 2012). Az asszisztált reprodukciós kezelések többek között az ilyen párok számára jelenthetnek megoldást. Sok országban, ahol a népesség csökkenést mutat, különös jelentőséggel bírnak a szervezeten kívüli megtermékenyítéssel végzett meddőségi kezelések. Nem meglepő, hogy számuk folyamatosan nő. Csak Európában 800.000 in vitro fertilizációs kezelést végeztek a 2015-ös évben (<https://www.eshre.eu/Home/ESHRE-Annual-Report-2015.aspx>). Minden egymillió lakosra nagyjából 1252 IVF ciklus jutott (Calhaz-Jorge és mtsai 2016). Természetesen a kezelések számának emelkedésével párhuzamosan az embriológiai laboratóriumban alkalmazott módszerek és eszközök is jelentős fejlődésen mentek keresztül. E fejlesztések igen szerteágazóak, az asszisztált reprodukciós kezelések szinte minden területére kiterjednek. Fontos megemlíteni ugyanakkor, hogy az egyes részterületek a kezelések eredményességét integráltan befolyásolják. Munkánk során éppen ezért igyekeztünk a legújabb kutatási eredményeket figyelembe véve több fontos területen is kutatómunkát végezni, melyek együttesen jelentős hatással lehetnek a kezelések eredményességére.

Az utóbbi évek egyik nagy változását a különböző vitrifikációs technikák megjelenése és elterjedése hozta. Mára a szervezeten kívüli megtermékenyítéssel végzett meddőségi kezelések közel harmada fagyasztott-felolvasztott embrió beültetésével történik (Dyer és mtsai 2016), amely nyilvánvalóan köszönhető a fagyasztási technikák fejlődésének. Az ilyen módon végzett kezelések számának és arányának jelentős növekedése még inkább indokoltá teszi olyan módszerek alkalmazását, amelyek nem csak az embriók krioprezervációt követő magas túlélési arányát biztosítják, de ugyanakkor biztonságosak is, nem teszik ki az embriókat a fertőzések és keresztfertőzések veszélyének.

Számos laboratórium működését, illetve a bennük folyó munka menetét megváltoztatta a time-lapse rendszerek megjelenése, melyek lehetővé tették az embriók fejlődésének folyamatos nyomon követését, elősegítve a fejlődés menetének, illetve az egyes fejlődési szakaszok és kulcsmozzanatok embriók életképességére gyakorolt hatásának jobb megismerését. Meg kell ugyanakkor jegyezni, hogy noha a time-lapse rendszerek alkalmazásának kétség kívül számos előnye lehet, nincs egyértelmű bizonyíték arra

vonatkozóan, hogy alkalmazásukkal jobb klinikai terhességi arány, élve szülési arány, vagy éppen alacsonyabb vetélési arány lenne elérhető (Armstrong és mtsai 2015).

Az új eszközökön és eljárásokon túl nagyon lényeges kiemelnünk az olyan irányzatokat, amelyek ugyan alapjaiban nem változtatják meg a kezelések menetét, ugyanakkor jelentősen befolyásolhatják azok kimenetelét. Jóllehet az intracitoplazmatikus spermiuminjekció már több mint 20 éve a klinikai rutin része, alkalmazásának indokoltsága újra napirendre került. Napjainkban világszerte nagyjából 3-ból 2 esetben a megtermékenyítés ICSI-vel történik (Calhaz-Jorge és mtsai 2016, Dyer és mtsai 2016), jóllehet a módszert eredetileg andrológiai eredetű meddőség kezelésére fejlesztették ki, amely gyakorisága ezt nem magyarázza. Annak ismerete, hogy mely esetekben lehet mégis indokolt ezt a megtermékenyítési módszert választani a hagyományos in vitro fertilizációval szemben, különösen fontos, hiszen csak így érhetünk el optimális eredményt, a lehető legbiztonságosabb módon, mindezt ráadásul költség- és időráfordítás szempontjából is hatékonyan.

5.1. Az intracitoplazmatikus spermiuminjekció alkalmazása

Az intracitoplazmatikus spermiuminjekció megfelelő alkalmazásának indokoltságával kapcsolatban a mai napig nincs teljes egyetértés. Tanulmányunkban 5 év IVF kezeléseinek adatait részletesen értékeltük, azért, hogy megvizsgáljuk, a megtermékenyítés módja milyen hatással van a megtermékenyülési arányra, az embriók minőségére, illetve a kezelések eredményességére különböző minőségű ondóminták esetén, figyelembe véve a nőbetegek életkorát és a petefészek hormonális stimulációjának eredményképpen nyert petesejtek számát. Az ondóminták minőségének megítéléséhez a natív mintában található progresszív spermiumok számát vettük alapul, amely korábbi eredményeink alapján jól jellemzi azt. Eredményeink egyértelműen arra engednek következtetni, hogy sok esetben, amikor a megtermékenyítés módjának rutinszerűen az ICSI-t választják, ez nem lenne indokolt. Ha elvonatkoztattunk a megtermékenyítéshez használt ondóminták minőségétől, azt tapasztaltuk, hogy hagyományos IVF módszerrel jobb klinikai terhességi, és ami a legfontosabb, magasabb élve szülési arányok érhetők el. Ugyanez igaz a legjobb minőségű ondómintákkal végzett kezelésekre is, míg a közepes minőségű ondóminták felhasználása esetén nem találtunk különbséget a két megtermékenyítési módszer között, azaz pusztán a natív spermaminta minősége még

ilyen esetekben sem indokolja az ICSI alkalmazását. Természetesen további szempontok is szerepet játszhatnak a megtermékenyítési módszer választásánál. Amennyiben a megfelelő és hatékony megtermékenyítési módszert választjuk, úgy a magasabb megtermékenyülési arányok következtében több embrióból lehet választani a beültetéshez, illetve több állhat rendelkezésre fagyasztáshoz, ez végső soron a kumulált terhességi arányt is pozitívan befolyásolhatja.

Jó minőségű spermamintával végzett hagyományos IVF kezelések esetén minden petesejtcsoportban jobb volt a megtermékenyülési arány, mint ICSI kezelést követően. Meg kell ugyanakkor jegyeznünk, hogy a jelenleg érvényben lévő laboratóriumi protokollunk alapján, amennyiben négynél kevesebb petesejtet sikerült csak nyernünk, a megtermékenyítés módja minden esetben ICSI volt, ezért alacsony petesejtszám esetén további vizsgálatok szükségesek.

A jó minőségű ondómintákkal végzett IVF kezelések esetén a megtermékenyülési arány minden korcsoportban magasabb volt, mint ICSI-t követően, azonban csak a 32-36 és a ≥ 41 éves betegek esetében érte el a különbség a szignifikancia szintet. Közepes minőségű ondómintával végzett hagyományos IVF kezelések során a megtermékenyülési arány nem különbözött az ICSI-vel végzett kezelések eredményétől. Ehhez hasonló eredményeket kaptak Plachot és munkatársai (2002), akik mérsékelt oligo-asthenoteratozoospermiás ondómintákkal végzett kezeléseket vizsgáltak. Amennyiben a tanulmányukba bevont kezelés a pár első IVF ciklusa volt, a petesejtek felét hagyományos IVF segítségével, felét ICSI-vel termékenyítették meg. Nem találtak különbséget sem a megtermékenyülési arányokban, sem az embriók sejtszámában a megtermékenyítést követő második napon, sem a kiváló minőségű embriók arányában. Meg kell azonban jegyezni, hogy vizsgálatukban csak fiatal ($32,2 \pm 3,3$ év) nőbetegek vettek részt.

Tournaye és munkatársai (2002) szintén egy betegről származó petesejteket termékenyítettek meg a két különböző módszerrel. Vizsgálatukba olyan pácienseket vontak be, akik már legalább három sikertelen intrauterin inszeminációs (IUI) kezeléssel voltak túl. A hagyományos IVF módszer alkalmazásának feltétele az volt, hogy a gradiens centrifugálással történő feldolgozás után a spermamintában a mozgó spermiumok koncentrációja legalább 0,5 millió/ml legyen. Ezek alapján jó és közepes minőségű ondómintákkal egyaránt végeztek kezeléseket. Hagyományos IVF esetén kétfajta protokollt követtek. Az első esetben a petesejteket egyenként 5000 mozgó spermiummal

inszeminálták. A megtermékenyülési arány ekkor alacsonyabb volt, mint ICSI esetén. A második esetben az inszeminációs koncentráció magasabb volt (20000 mozgó spermium petesejtenként), ekkor az ICSI-hez hasonló megtermékenyülést sikerült elérniük. Az embriók morfológiája és az átlagos osztódási arány nem különbözött a hagyományos IVF és ICSI módszerek között. Tanulmányunkban ehhez hasonló eredményt kaptunk. Tournaye és munkatársai (2002) metaanalízise alapján az ICSI módszerrel történő megtermékenyítés jóval eredményesebbnek bizonyult a hagyományos IVF kezelésekkel szemben (62,8% vs. 35,7%). A szerzők a határértékű spermaparaméterekkel jellemzett ondómintákkal végzett kezelések esetében is ugyanerre a következtetésre jutottak (ICSI: 62,7% vs. IVF: 32,5%). Ez ellentétben áll saját eredményeinkkel, azonban nem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy a metaanalízisbe bevont tanulmányok között akad olyan, ahol olyan kezeléseket vizsgáltak, melyekben korábban hagyományos IVF kezelés során egyetlen petesejt sem termékenyült meg (Kastrop és mtsai 1999). Az ICSI utáni magas megtermékenyülési arány azzal lehet kapcsolatban, hogy azt több tanulmányban is az injektált petesejtekre vonatkoztatva adták meg (Payne és mtsai 1995, Kastrop és mtsai 1999), azaz míg hagyományos IVF kezelés során minden cumulus-petesejt komplex inszeminálásra kerül függetlenül azok érettségi állapotától, addig ICSI esetén csak a meiotikus sejtosztódás második fázisában lévő (MII), érett petesejtek kerülnek injektálására. Hasonló következtetésre jutottak ugyanakkor Van der Westerlaken és munkatársai (2006) is. Olyan betegeknel, ahol az ondóminta valamelyik paramétere eltért a WHO által meghatározott referenciaértéktől, ICSI után magasabb megtermékenyülési arányt (50% vs. 41%) értek el, valamint több jó minőségű embrió fejlődött, amikor mindkét módszert használták egyazon betegnél. A terhességi arányokban azonban nem találtak különbséget. Ehhez hasonló eredményekről számoltak be Verheyen és munkatársai is (1999), akik azt találták, hogy asthenozoospermia esetén a megtermékenyülés teljes elmaradásának esélye alacsonyabb ICSI-t követően. Azoknál a betegeknel, ahol hagyományos IVF-et követően volt megtermékenyülés nem találtak szignifikáns különbség a megtermékenyülési arányok között (ICS: 59,4% vs. IVF: 45,7%).

A fentiekkel némileg ellentétben, a hagyományos IVF jobb eredményességét támasztja alá Wang és munkatársainak (2014) közleménye. Ők arról számolnak be, hogy hagyományos IVF módszerrel történő megtermékenyítést követően a jó minőségű

embriók aránya, a balsztocisztaképződés aránya, valamint a beültetésre vagy fagyasztásra alkalmas embriók aránya is magasabb. Nem találtak szignifikáns különbséget ugyanakkor a beágyazódási és klinikai terhességi arányokban, illetve a vetélések gyakoriságában sem. Ezzel szemben Bhattacharya és munkatársai (2001), valamint Van Rumste és munkatársai (2011) szignifikánsan magasabb beágyazódási és terhességi arányokat tapasztaltak hagyományos IVF kezelést követően, míg a megtermékenyülési és osztódási arányokban nem volt különbség a két módszer között, ahogyan az embriók morfológiai pontértékei is megegyeztek.

A különböző tanulmányok eltérő eredményeinek egyik oka lehet a különböző betegpopulációk vizsgálata, de minden bizonnyal szerepet játszik a különféle protokollok alkalmazás is a hagyományos IVF kezelés során. Utóbbit jól példázza Tournaye és munkatársainak (2002) munkája, akik nem csak a két megtermékenyítési módot hasonlították össze, de hagyományos IVF során is két különböző spermiumkoncentrációt használtak a petesejtek inszeminálásához, és így eltérő eredményeket kaptak.

Saját vizsgálatunk során a megtermékenyítés módjának embriók minőségére gyakorolt hatásának tanulmányozásakor a következő eredményeket kaptunk. Az összes spermakategóriában az embriók számos minőségi paramétere jobb volt ICSI-vel történő megtermékenyítést követően. Közepes minőségű ondómintákkal végzett kezelések során pedig szignifikánsan több jó minőségű embrió állt rendelkezésre ICSI-t követően. Igen meglepőek ezek az eredmények, ha megnézzük a beültetésre kerülő embriók minőségét, illetve a klinikai eredményeket. A jó minőségű ondómintákkal végzett IVF kezelések esetén a beültetett embriók minősége minden korcsoportban jobb volt, mint ICSI kezelést követően. Közepes minőségű ondómintával végzett kezelések során a beültetésre kerülő embriók minősége között nem találtunk különbséget, függetlenül a rendelkezésre álló petesejtek számától és a nőbetegek életkorától. Amennyiben az összes kezelést tekintjük, szinte minden életkor, valamint petesejtcsoporthoz jobb minőségű embriók kerültek beültetésre hagyományos IVF esetén.

Az egyik magyarázat a fenti eltérésre az embriók átlagos minősége, valamint a beültetésre kerülő embriók minősége között az lehet, hogy míg ICSI-t követően több jó minőségű embrió áll rendelkezésre, a legjobb minőségű embriók mégis csak hagyományos IVF kezelést követően fejlődnek. Rávilágíthat ugyanakkor ez az eltérés arra is, hogy az

alkalmazott embrióbírálati rendszer nem elég szenzitív, esetleg szükséges lehet felülbírálata.

Fontos megemlíteni még az intracitoplazmatikus kezelés esetleges kockázatait is, amely szintén szempont lehet a megtermékenyítési mód kiválasztásakor. Noha néhányan felhívják a figyelmet a rendellenességek nagyobb kockázatára (Bowen és mtsai 1998, Chan és mtsai 2000, Wennerholm és mtsai 2000, Cox és mtsai 2002, Devroey és mtsai 2004, Bonduelle és mtsai 2005), többen ezzel ellentétes megállapításra jutottak. Wen és munkatársai (2012) egy metaanalízis keretében vizsgálták az in vitro fertilizációval fogant gyermekek születési rendellenességeinek gyakoriságát. Jóllehet mind a hagyományos IVF, mind az intracitoplazmatikus spermiuminjekció magasabb kockázatot jelent a természetes úton történő fogantatáshoz képest, a két megtermékenyítési módszer között nem találtak különbséget. Ez összhangban van néhány korábban közölt eredménnyel (Bonduelle és mtsai 2002b, Lie és mtsai 2005). Nem kizárt továbbá, hogy az ICSI-vel történt megtermékenyítést követően előforduló rendellenességek valójában nem magának a módszernek a következményei, hanem összefüggésben állnak a meddőség okával (Wennerholm és mtsai 2000, Ludwig és mtsai 2002). A különböző eredmények és következtetések okai lehetnek a vizsgálati populációk, a tanulmányozott rendellenességek és vizsgálati időtartamok közötti különbségek. Jóllehet nincs teljes egyetértés a kockázatok tekintetében, az ICSI során a petesejtek hosszabb ideig vannak szuboptimális körülmények között, amely minden bizonnyal extra kockázatot jelent.

További szempontok is felmerülhetnek a megfelelő módszer kiválasztásánál. Jól körülhatárolt ismeretlen eredetű meddőség esetén ICSI alkalmazásával, nagyobb eséllyel kerülhető el a megtermékenyülés teljes elmaradása (Johnson és mtsai 2013). Zhao és munkatársai (2014) pedig arról számoltak be, hogy a spermiumok DNS-sérülése negatív hatással van a terhességi arányra hagyományos IVF kezelések esetén, ugyanakkor nem befolyásolja azt, amennyiben a megtermékenyítés ICSI-vel történik. Ezzel szemben Simon és munkatársai (2016) egy friss metaanalízisükben mindkét megtermékenyítési módszer esetén kimutatták a spermiumok DNS-sérüléseinek kedvezőtlen hatását.

Végezetül nem mehetünk el szó nélkül az egyes megtermékenyítési módszerek költségének figyelembe vétele mellett sem. A különbség a két kezelési módszerben mind anyagi, mind időbeli ráfordításként jelentkezik. Természetesen utóbbi is kifejezhető anyagiként. Jóllehet embriológusként nem feltétlenül feladatunk ezek figyelembe vétele,

a téma gyakorlati jelentősége ugyanakkor megkérdőjelezhetetlen. Az intracitoplazmatikus spermiuminjekció a hagyományos IVF kezeléshez képest többletköltséget jelent, ezért szükséges lehet annak vizsgálata, hogy ez a többletköltség milyen esetekben jár többlethasználattal. Érdekes eredményt közöltek ezzel kapcsolatban Vitek és munkatársai (2013). Olyan 35 év alatti nőbetegek esetén végzett kezelések költséghatékonyságát vizsgálták, amelyek során a petesejtek egyik részét hagyományos IVF módszerrel, másik részét ICSI-vel termékenyítik meg. Azt találták, hogy amennyiben egyetlen kezelést végeznek hagyományos IVF kezelés alkalmazása javasolt, mivel ez esetben legalacsonyabb az egy élve szülésre eső költség. Amennyiben azonban betegenként két kezelés szükséges, már egyes megtermékenyítést javasolnak, mivel így magasabb kumulált élve szülési arány érhető el, mint hagyományos IVF-fel, valamint alacsonyabb az egy élve szülésre eső költség, mint csak ICSI-vel történő megtermékenyítés esetén. Összegezve elmondható, hogy hagyományos IVF kezeléssel még alacsony petesejtszám, illetve a nőbeteg emelkedett életkora esetén is hasonló vagy jobb eredmények érhetőek el, mint intracitoplazmatikus spermiuminjekció használata esetén, miközben a hagyományos módszer kevésbé idő- és költségigényes, továbbá kisebb kockázatot jelent a születendő gyermekre nézve, ezért vizsgálataink eredménye alapján az ICSI alkalmazása csak súlyos andrológiai eredetű meddőség, korábbi sikertelen, vagy gyenge megtermékenyülés esetén indokolt.

5.2. Embriók csoportos tenyésztése

Humán embriók szervezeten kívüli tenyésztésének körülményei nagymértékben befolyásolják az embriók fejlődését. Az in vitro tenyésztés számos paramétere hatással lehet az embriók életképességére, így ezek megfelelő megválasztása, illetve beállítása elősegítheti a terhesség létrejöttét a méhüregbe történő beültetést követően. Igen lényeges a megfelelő tápoldat kiválasztása, hiszen ez biztosítja az embriók számára szükséges tápanyagokat, felel az ozmolaritás és pH biztosításáért. A Petri-csészék esetében lényeges, hogy megfelelő anyagból készüljenek, amelyek az embriókra nézve nem toxikusak. Felelnek még a hőátadásért a felületek és a tápoldat között, befolyásolhatják a tápanyagok és egyéb faktorok áramlását, koncentrálódását a tápoldatban, valamint kialakításuk miatt hatással lehetnek az embriók bírálatainak hosszára. Utóbbi azért lényeges, mert befolyásolja, hogy az embriók mennyi ideig kénytelenek szuboptimális

körülmények között lenni az inkubátoron kívül. Igen meghatározó még a megfelelő inkubátorok alkalmazása, amelyek elsősorban az állandó körülményeket hivatottak biztosítani.

Tanulmányunkban két eltérő tenyésztési rendszert, az embriók egyedileg, illetve csoportosan történő tenyésztését hasonlítottuk össze. Előbbi esetben az embriókat egy arra alkalmas hagyományos Petri-csészében, osztódó fázisú embriók tenyésztésére kifejlesztett tápoldat 25 μ l-es cseppjeiben tenyésztettük. Az embriók csoportos tenyésztéséhez a 9 mikrovájatot tartalmazó Primo Vision Dish Petri-csészét használtunk, amelyben az embriók egyetlen, szintén 25 μ l-es tápoldat-térfogatban voltak.

Humán embriók csoportos tenyésztésének pozitív hatásáról több tanulmány is született. Elsők között Moessner és Dodson (1995) számoltak be arról, hogy a csoportosan tenyésztett embriók osztódási aránya, illetve minőségi pontértéke magasabb volt az egyedileg tenyésztett embriókéénál, jóllehet a blasztomérák számából és a minőségi pontértékből képzett „morfológiai pontérték” nem különbözött a két csoport esetén. Ebner és munkatársai (2010) csoportos tenyésztés esetén magasabb blasztociszta-képződési arányról, illetve jobb minőségű blasztocisztákról adtak számot. Tanulmányukban Rebollar-Lazaro és Matson (2010) két csoportot hasonlítottak össze. Az egyikben az embriókat csoportosan tenyésztették osztódási fázisban, majd a megtermékenyítést követő harmadik naptól egyedileg, míg a másik csoportban végig egyedileg. A beágyazódási és terhességi arányokban nem találtak különbséget, azonban a 35 év alatti nőbetegek esetén a blasztociszták felhasználási aránya magasabb volt.

A csoportos tenyésztés pozitív hatását az embriók által kibocsátott különböző faktorok magyarázhatják. Az első ilyen, amelyet azonosítottak a vérlemezke aktiváló faktor (PAF – platelet activating factor) volt (Collier és mtsai 1988), de továbbiak is ismeretesek, mint például az acitivin és inhibin alegységek, növekedési hormon (GH – Growth Hormone), inzulin-szerű növekedési faktorok (Insulin-like growth factors: IGF-1 és IGF-2), leukémiagátló faktor (LIF – leukemia inhibitory factor) (O'Neill 2008). Ahhoz, hogy ezek az embriotróf ligandumok más embriókra is hatással lehessenek, lényeges a megfelelő távolság az embriók között (Stokes és mtsai 2005, Gopichandran és Leese 2006). Az embriók által termelt faktorok egy úgynevezett effektív zónát alkotnak, amely saját, illetve társaik fejlődésére is hatással lehet (Reed és mtsai 2011).

Humán embriók csoportos tenyésztésének azonban sokáig akadályát képezte a tápoldatban lévő embriók egyedi azonosíthatóságának problémája, amely egészen az úgy nevezett „well-of-the-well” edény megjelenéséig (Vajta és mtsai 2000) fennállt. Ezután vált lehetővé az egyes embriók egyedi nyomon követése. A tanulmányban általunk is alkalmazott 9 vájatú Primo Vision Dish Petri-csésze is a „well-of-the-well” rendszer ötlete alapján született.

Vizsgálatunk során a hagyományos IVF módszerrel történő megtermékenyítés esetében nem tapasztaltunk különbséget a két tenyésztési módszer között, ugyanakkor a megtermékenyülési arány magasabb volt a csoportosan tenyésztett embriók esetében ICSI-t követően. Ennek oka lehetett, hogy a petesejtek a megtermékenyítés módszerétől függően különböző ideig tartózkodtak a tenyésztőedényben. Intracitoplazmatikus spermiuminjekciót követően azonnal a Primo Vision Dish Petri-csészébe kerültek, míg hagyományos IVF kezelés esetén az ivarsejteket 16-18 órán át a megtermékenyítéshez használt Petri-csészében együtt inkubáltuk, és csak ezt követően kerültek át az egyedi vagy csoportos tenyésztő edénybe. Ennek eredményeképpen ICSI-t követően a megtermékenyüléssel járó biológiai folyamatok a pronucleusok kialakulásáig a hagyományos IVF-fel ellentétben, a két csoport esetében eltérő tenyésztési körülmények között zajlottak. Ez magyarázatot adhat arra, hogy a megtermékenyítés eredményessége miért különbözött a két módszer esetén, és arra enged következtetni, hogy az embriók csoportos tenyésztése kedvezően befolyásolja a megtermékenyülés létrejöttét. Feltételezésünk szerint, a megtermékenyülés, illetve az első sejtciklus teljes folyamata nagyon érzékeny rendszer, amely jobb eséllyel zajlik le kedvezőbb körülmények között. Nem mutatkozott ugyanakkor különbség az embriók minőségében a két tenyésztési módszer között, amely megerősíti néhány szerző azon korábbi megállapítását, hogy a csoportos tenyésztés pozitív hatása az embriók morfológiájára a tenyésztés első 2-3 napján még nem jelentkezik (Spyropoulou és mtsai 1999, Vajta és mtsai 2008, Ebner és mtsai 2010). Figyelemre méltó azonban, hogy csoportos tenyésztés esetén a különböző embriódenzitások hatása az embriók minőségére már ekkor is megmutatkozik. Erről a későbbiekben még bővebben szót ejtünk. Moessner és Dodson (1995) egy korai tanulmányukban arra jutottak, hogy az embriók csoportban történő tenyésztése gyorsabb fejlődést eredményez. Ezen megállapítással összecseng saját megfigyelésünk, miszerint

a Primo Vision Dish Petri-csészében tenyésztett embriók fejlődése némileg gyorsabb volt, mint egyedi tápoldatcseppben tenyésztett társaiké.

A legtöbb korai vizsgálat során az embriókat blasztociszta állapotig tenyésztették, és beültetésükre az 5-6. napon került sor. Vajta és mtsai (2008) magasabb blasztocisztaképződési arányról számoltak be, amelyet Ebner és mtsai (2010) eredményei is alátámasztanak. Miután vizsgálatunk során 3. napi embriótranszfert végeztünk, ezt a jelenséget nem állt módunkban megvizsgálni, azonban csoportban tenyésztett osztódási fázisú embrió beültetése jelentősen, 10%-kal magasabb klinikai terhességi arányt eredményezett, mint egyedi tenyésztésből származó embriók transzfere. Érdekes azonban, hogy a beágyazódott embriók aránya nem különbözött a két csoport esetén, egyedi tenyésztést követő embrióbeültetés több ikerterhességet eredményezett. Ennek oka egyelőre ismeretlen, ezért felderítéséhez további vizsgálatok szükségesek. Különbség mutatkozott azonban a fagyasztásra alkalmas embriók számában. Korábbi tanulmányok a beültetésre vagy fagyasztásra alkalmas blasztociszták magasabb számáról számoltak be (Vajta és mtsai 2008, Rebollar-Lazaro és Matson 2010), amely nyilvánvalóan a jobb embriófejlődés, az életképesebb embriók magasabb számának következménye. Eredményeink ezt osztódási fázisú embriók esetén is alátámasztják.

Humán embriók mikrovájatokat tartalmazó Petri-csészében történő csoportos tenyésztésének tehát számos előnye van, amelyek egy része már osztódási fázisú embriók tenyésztése és beültetése esetén is mutatkozik. Az ICSI-t követő jobb megtermékenyülés, az embriók gyorsabb fejlődése, a beültetést követő magasabb klinikai terhességi arány, valamint a fagyasztásra alkalmas embriók magasabb száma a harmadik napon mind ezek közé tartoznak. Nem szabad azonban megfeledkeznünk arról, hogy az eredményességet a tenyésztés egyéb körülményei, illetve a tenyésztőedény tulajdonságai is befolyásolják. Ismeretes, hogy a csoportthatás létrejöttében az embriók egymástól való távolsága is szerepet játszik, ami praktikusán a mikrovájatok távolságával szabályozható (Stokes és mtsai 2005, Gopichandran és Leese 2006). Vizsgálatunk során az embriók csoportos tenyésztésére a Primo Vision Dish Petri-csészét használtuk, amely a Primo Vision time-lapse rendszerhez kifejlesztett speciális edény, ugyanakkor jól használható a szokásos gyakorlatban is. Az embriók közti kis távolságból adódó további előnye, hogy a hagyományos morfológiai bírálat a piacon kapható egyedi tenyésztésre alkalmas Petri-csészékkel összevetve gyorsabban elvégezhető (Fancsovits és mtsai 2013), ezáltal

csökkentve az embriók szuboptimális körülményeknek történő kitettségét, mint amilyen például a fényexpozíció.

5.3. Az embriódenzitás szerepe csoportos embriótenyésztés során

Ismeretes, hogy az embriók denzitása is befolyásolhatja fejlődésüket, ezáltal hatással lehet a kezelések eredményességére. Vizsgálatunk során azt találtuk, hogy 5-6 embrió együtt tenyésztése egy 25 μ l-es tápoldatcseppben (4,1-5,0 μ l/embrió) magasabb átlagos sejtszámot, illetve a jó minőségű embriók nagyobb arányát eredményezte. A többi minőségre utaló paraméter, mint a fragmentáció mértéke, vagy a morfológiai pontérték szintén eltért a különböző denzitások esetén. Ezek a különbségek sok esetben statisztikailag is szignifikánsnak bizonyultak a legalacsonyabb (6,3-12,5 μ l/embrió) és közepes denzitással rendelkező csoportok között, de egyértelmű trend rajzolódott ki a közepes, illetve legnagyobb denzitású (2,8-3,6 μ l/embrió) csoportok között is.

Eredményeink alapján tehát a mérsékelt denzitás (5-6 embrió/25 μ l) úgy tűnik, hogy kedvező hatással van az embriók minőségére, ugyanakkor vizsgálatunk néhány korlátozó tényezőjére fontos rávilágítanunk. A degenrálódott petesejtek az edényből azonnal eltávolításra kerültek, amint észleltük őket – ez leggyakrabban a megtermékenyülés vizsgálatakor következett be –, mivel ezek kedvezőtlenül befolyásolhatják a többi embrió fejlődését (Reed és mtsai 2012), ugyanakkor egyes szerzők szerint az alacsony sejtszámmal rendelkező embriók is előnytelen hatást fejthetnek ki (Jones és mtsai 1998, Reed és mtsai 2011), noha mások ezt cáfolják (Larson és Kubish, 1999). Ezzel szemben viszont a jobb minőségű embriók segíthetik a közelükben lévő társaik fejlődését (Reed és mtsai 2011).

Eredményeink kiértékelése során nem tudtuk figyelembe venni az egyes embriók relatív helyzetét és távolságait, noha ezek is befolyásolhatják az embriók fejlődését (Ali 200, Ebner és mtsai 2010, Gopichandran és Leese 2006, Stokes és mtsai 2005, Reed 2012). A tanulmány felépítése miatt nem volt lehetséges a terhességi arányok és a kezelések klinikai eredményeinek összevetése.

A petesejtszám és embrióminőség közötti összefüggés már ismeretes, és szintén befolyásolhatja a kezelések kimenetelét. Ji és munkatársai (2013) azt találták, hogy fiatal betegek esetén az élve születési arány friss embrióbeültetést követően a 6-12 petesejtes csoportban volt a legnagyobb, és csökkent az 1-5 és a >15 petesejtes csoportokban. A

kumulált élve szülési arány nőtt a petesejtszámmal. Ezzel összhangban, Timeva és munkatársai (2006) magasabb terhességi arányt regisztráltak olyan esetekben, amikor 6-15 petesejtet sikerült nyerni, az 1-5 és a >15 petesejtes csoportokkal szemben. Ezzel szemben Letterie és munkatársai (2005) nem találtak különbséget a megtermékenyülési arányban és a klinikai terhességi arányban sem különböző petesejtszámok esetén, de 3-nál több nyert petesejt vizsgálatokor. A petesejtszám hatását a korábban már említett okok miatt szintén nem állt módunkban kiküszöbölni, jóllehet irodalmi adatok (Ji és mtsai 2013, McAvey és mtsai 2011, Timeva és mtsai 2006) arra engednek következtetni, hogy az alacsony denzitás esetén tapasztalt gyengébb embrióminőség inkább összefügg az alacsony petesejtszámmal, mintsem az embriódenzitással.

A legnagyobb denzitás esetén tapasztalt gyengébb embrióminőség ugyanakkor sokkal inkább az embriódenzitás következményének tűnik, mintsem a petesejtszám velejárájának. Egyrészt irodalmi adatok alapján nem egyértelmű, hogy a magasabb petesejtszám kedvezőtlenül befolyásolná az embriók minőségét. Saját vizsgálatunk során arra jutottunk, hogy egyedi tenyésztés során az embriók magasabb száma, a legfeljebb 9 embrióval rendelkező betegek esetén, az embriók minőségének javulásával jár. Másrészt, vizsgálatunk során, amennyiben egy beteg embrióinak száma a 9-et meghaladta, két, vagy szükség esetén három Petri-csészében tenyésztettük őket, így az egy edényben együtt lévő embriók az osztályozás során bármelyik denzitáscsoportba kerülhettek. Szintén fontos hangsúlyoznunk, hogy tanulmányunk során az osztódó embriók denzitását vizsgáltuk szemben a petesejtekével, és ez majdnem minden esetben alacsonyabb, hiszen a kezelések többségében nem mindegyik petesejt termékenyül meg.

Az általunk kedvezőnek ítélt 4,1-5,0 μ l-es denzitás (5-6 embrió/ 25 μ l) elősegítheti az embriók fejlődését az alkalmazott Primo Vision Dish Petri-csészében, ugyanakkor más edények esetében korántsem biztos, hogy optimális választás lesz. Eredményeink nem támasztják alá Gardner és Lane ajánlásait. Ők nem javasolták négynél több embrió közösen tenyésztését a tápoldat 25 μ l-es térfogatában (6,25 μ l-es denzitás) (Gardner és Lane 2001). Később ajánlásukat módosították, és ekkor már maximum 4 embrió együtt tenyésztését javasolták a tápoldat 50 μ l-es térfogatában (12,5 μ l-es denzitás) (Gardner és Lane 2004). Ez az ellentmondás is rávilágít arra, hogy a jelenség jobb megértése szükséges, azért, hogy azt a jövőben hatékonyabban alkalmazhassuk. A jelenséget, hogy létezik egy optimális denzitás, az embriók körül kialakuló, már korábban említett

effektív zóna magyarázza. Ahogyan arról már fentebb szó esett, az embriók tenyésztésére használt Petri-csésze kialakítása is befolyásolhatja az embriók fejlődését, éppen ezért nem létezik egyfajta univerzálisan elfogadott optimális denzitás, hiszen az különböző tenyésztőedényekben eltérő lehet. Ugyanígy lényeges, hogy egy adott embriódenzitást hogyan érünk el, hiszen eltérő eredményeket kaphatunk, ha egy adott térfogatmennyiségben változtatjuk az embriók számát, illetve ha adott számú embriót tenyésztünk különböző tápoldatmennyiségekben. Éppen ezért, noha az embriódenzitás helyes megválasztása hozzájárulhat az embriók fejlődéséhez, minden laboratóriumnak magának kell az optimális értéket megtalálni, amely illeszkedik az általa használt eszközökhöz és körülményekhez.

5.4. Embriók biztonságos krioprezervációja zárt rendszerű vitrifikációval

Vizsgálatunk során két év, fagyasztott-felolvasztott embriók felhasználásával végzett embrióbeültetések adatait értékeltük. A vizsgálat ideje alatt mind programozott lassú fagyasztással, mind vitrifikációval krioprezervált embriók felolvasztásával végeztünk embrió beültetéseket. Megvizsgáltuk, hogy a Rapid-I módszerrel történő zárt rendszerű vitrifikáció milyen hatással van a lefagyasztott embriók túlélésére és minőségére a felolvasztás után, valamint az ilyen embriók beágyazódási arányára, illetve a terhességek létrejöttére. A hagyományos megítélés szerint egy embrió akkor tekinthető a fagyasztást túléltnak, ha a felolvasztás után sejtjeinek legalább 50%-a ép maradt (Edgar és Gook 2012). ennek oka, hogy olyan embrió is képes lehet beágyazódni, amelyiknek néhány sejtje megsérült, mivel az embrió sejtjei ebben az állapotban még totipotensek, néhány, vagy akár egyetlen sejt is alkalmas lehet arra, hogy életképes embrióvá fejlődjön. E szerint a hagyományos módszerrel fagyasztott embrióknak mindössze 55,1%-a élte túl a fagyasztást, ami jelentősen elmarad a vitrifikációval krioprezervált embriók túlélésétől (92,1%), mely eredményünk összhangban áll az irodalmi adatokkal (Kuwayama és mtsai 2005, Rama Raju és mtsai 2005, Desai 2007, Balaban és mtsai 2008, Rama Raju és mtsai 2009). Saját adatainkban a hagyományos fagyasztás utáni túlélés alacsonyabb, mint a publikált esetek nagy részében (Mandelbaum és mtsai 1998, Kuwayama és mtsai 2005, Balaban és mtsai 2008). Ennek egyik oka az lehet, hogy korábbi gyakorlatunkban a fagyasztásra kerülő embriók kiválasztásánál kevésbé szigorú kritériumokat alkalmaztunk, aminek következtében olyan embriók is krioprezervációra kerültek,

amelyek kisebb eséllyel éltek túl a fagyasztást. Hagyományos fagyasztással történő krioprezervációt követően az embriók nagyjából egy ötödének (21,2%) maradt sértetlen minden sejtje a felolvasztás után, míg vitrifikáció esetében az embriók több mint felének minden blasztomérája ép maradt (57,2%). Ez utóbbi arány kissé elmarad az irodalomban közölt adatoktól (Edgar és Gook 2012), miszerint akár az embriók 70%-a is teljesen ép maradhat vitrifikációval történő fagyasztás után. Meg kell azonban jegyezni, hogy a hordozók, oldatok és protokollok sokfélesége miatt az adatok nehezen hasonlíthatók össze egymással. Saját gyakorlatunkban például zárt rendszerű vitrifikációt alkalmaztunk, ami – a kisebb hűtési sebesség miatt – kedvezőtlenebb lehet az embriók túlélése szempontjából, mint a nyílt rendszerek, ugyanakkor a tárolás során esetleg fellépő keresztfertőzések kizárásával biztonságosabbak azoknál. Az azonos sejtszámú, 7-12 sejtés embriók esetében is jobb volt az embriók túlélési aránya (a sejtek legalább 50%-a ép maradt) a vitrifikációt követően, mint programozott lassú fagyasztás után, ahogyan a 80%-os és teljes 100%-os túlélési arány is nagyobb gyakorisággal fordult elő. Utóbbi különösen lényeges paraméter, mivel korábbi vizsgálatok azt mutatták, hogy azon embriók beágyazódási aránya magasabb, melyeknek minden blasztomérája ép maradt a felolvasztást követően, és ezen embriók beültetése magasabb terhességi arányt is eredményez (Van den Abbeel és mtsai 1997, El-Toukhy és mtsai 2003). Meg kell azonban jegyeznünk, hogy Gabrielsen és munkatársai (2006) nem tapasztalták a blasztomérák elvesztésének negatív hatását. Az ellentmondás oka az lehet, hogy – mint ahogyan a szerzők is megjegyzik – tanulmányukban viszonylag kevés sérült blasztomérával rendelkező embrió került beültetésre.

Saját tanulmányunkban a túlélési arányokhoz hasonlóan a fagyasztást túlélte embriók minősége, illetve a beültetésre kerülő embriók minősége is jobb volt a vitrifikáció után. A beültetett embriók beágyazódási aránya 9%-kal, a klinikai terhességi arány 15%-kal magasabb volt vitrifikációval történt krioprezerváció után, ezek a különbségek azonban statisztikailag nem bizonyultak szignifikánsnak. Desai és munkatársai (2013) osztódási fázisú embriók Rapid-I módszerrel történő vitrifikációja után eredményeinkkel megegyező klinikai terhességi arányt (47%) kaptak, míg a beágyazódási arány valamivel magasabb volt (37%). A túlélési arányokban lévő különbség, illetve a vitrifikáció esetében tapasztalt magas klinikai terhességi arány ismeretében kissé meglepő ugyanakkor, hogy az embrióbeültetésre vonatkoztatott élve szülési arány mindkét

módszer esetében azonos volt, a vitrifikációval történt kezeléseket követően a vetélések magasabb aránya miatt. A jelenség okainak feltárásához azonban további vizsgálatok szükségesek.

A megegyező élve szülési arányok ellenére a zárt rendszerű vitrifikáció a hagyományos programozott fagyasztás megfelelő alternatíváját nyújthatja, hiszen számos tekintetben – különösen az embriók túlélését figyelembe véve – jobb eredmények érhetők el vele. Az embriók magasabb túlélési aránya, valamint a felolvasztást túlélte embriók jobb minősége pedig azt is jelenti, hogy sok esetben kevesebb embrió felolvasztása is elegendő, így bizonyos esetekben azonos számú lefagyasztott embrióval akár több felolvasztást követő embrióbeültetés is végezhető. Ezt igazolja, hogy a vizsgálati időszak alatt a felolvasztott embriók szignifikánsan nagyobb része került beültetésre vitrifikációt követően.

Nem mehetünk el ugyanakkor amellett, hogy osztályunkon, számos más asszisztált reprodukciós intézethez hasonlóan, a programozott lassú fagyasztásnak egy régóta alkalmazott módszerét használtuk az embriók fagyasztásához. A hagyományos fagyasztás egy módosított változatával azonban a korábbinál jobb eredmények érhetők el, amelyek már összehasonlíthatók a vitrifikáció eredményeivel (Jericho és mtsai 2003, Edgar és Gook 2012). Ugyanakkor a vitrifikációs módszereknek továbbra is előnyük marad a jóval olcsóbb eszköz- és jelentősen kisebb időigényük, a zárt rendszerek pedig – mint amilyen a Rapid-I is – biztonságosan alkalmazhatók humán embriók krioprezervációjára is.

5.5. Óriás petesejtek indikátorszerepe

Az óriás petesejtek indikátorszerepének vizsgálata során leírtuk azok morfológiai paramétereit, valamint kiértékeljük azon IVF kezelések jellemzőit, amelyekben óriás petesejtek fordulnak elő olyan kezelések adataival összevetve, ahol ilyen petesejtek nem találhatóak. Saját gyakorlatunkban a vizsgált időszakban az óriás petesejtek előfordulásának gyakorisága 0,3% volt, amely egybevág korábbi irodalmi adatokkal (Balakier és mtsai 2002, Rosenbusch és mtsai 2002), noha egy frissebb tanulmányban Machtinger és munkatársai (2011) ennél lényegesen alacsonyabb, 0,12%-os gyakoriságról számoltak be. A normális méretű petesejtek átlagos átmérője 112,8 µm volt a zona pellucidát nem számítva, amely egybevág az irodalmi adatokkal. Romao és munkatársai (2010) 112,2 µm-es átlagos petesejtméretéről számoltak be. Az óriás

petesejtek átmérője hozzávetőleg 26%-kal bizonyult nagyobbak a normális petesejtekétől. Balakier és munkatársai (2002) ugyanakkor ennél valamivel nagyobb, 30%-os méretkülönbséget állapítottak meg.

Megállapítottuk, hogy az óriás petesejtek jelenléte nem utal a stimulációs protokollra, illetve az alkalmazott gonadotropin típusára. Vizsgálataink szerint egyik sincs hatással az óriás petesejtek előfordulására. Feltételezzük éppen ezért, hogy az ilyen petesejtek létrejöttéért felelős eltérés – például valamilyen osztódási rendellenesség – az oogenézis egy korábbi szakaszában jelentkezik.

Tanulmányunk első részében a vizsgált időszak során intézetünkben előforduló olyan IVF ciklusokat, hasonlítottunk össze a többi kezeléssel, amelyekben óriás petesejtek előfordultak. A nőbeteg életkora, az ösztradiol-szint, valamint a nyert petesejtek száma is különbözött a két csoportban. Óriás petesejtek olyan ciklusokban fordulnak elő gyakrabban, ahol a nőbeteg fiatalabb, a kezelés során a szérum ösztradiol-szint emelkedettebb, és a nyert petesejtek száma magasabb. Nyilvánvaló, hogy a fenti jellemzők között összefüggés van. Általánosságban igaz, hogy a fiatalabb betegek jobban reagálnak a stimulációra, egyszerre több tüsző érik meg, így a szérum ösztradiol-szintjük magasabb lesz, illetve több petesejtet sikerül nyernünk. Azon ciklusok esetén, ahol óriás petesejtek is előfordulnak az érett, MII petesejtek alacsonyabb aránya, melyet ICSI-vel történő megtermékenyítés esetén tapasztalhatunk, ugyancsak ezzel magyarázható. A magasabb petesejtszámmal rendelkező betegek esetében az éretlen petesejtek aránya gyakran magasabb, mint a kevés vagy mérsékelt számú petesejttel rendelkezőknél (Briggs és mtsai 2015).

A fentiekkel összefüggésben a normális megtermékenyülést mutató petesejtek száma az óriás petesejt csoportban alacsonyabb volt. Nincs prediktív hatással az óriás petesejtek jelenléte ugyanakkor a terhességi arányokra, a klinikai terhességi arányok mindkét csoportban megegyeztek. Ez összhangban van Machtinger és munkatársai (2011) korábbi eredményeivel. Eltérés mutatkozott ugyanakkor az embriók minőségében. Azokban a ciklusokban, ahol óriás petesejt előfordult az embriók sejtszáma az inszeminációt követő harmadik napon alacsonyabb volt, valamint ezen embriók fragmentáltsága is magasabb volt mind a második mind pedig a harmadik napon. A morfológiai pontértékekben azonban nem mutatkozott különbség, ahogyan a jó minőségű embriók számában sem volt

eltérés. Ugyancsak nem különbözött a beültetésre kerülő embriók minősége a két csoportban.

Tanulmányunk második részében olyan ciklusokat párosítottunk, amelyekben óriás petesejt előfordult olyanokkal, amelyekben nem. A párosítás alapját a nőbetegek életkora, a nyert petesejtek száma és a stimulációs protokoll képezték. Ismereteink szerint eleddig mindössze Machtinger és munkatársai (2011) vizsgálták a jelenséget hasonlóképpen. A két csoportban tapasztalható hasonló szérum ösztadiol-szintek megerősítik eredményeiket, ahogyan a vizsgálatunk első részében tapasztalt eltérés a szérum ösztadiol-szintekben Balakier és munkatársai (2002) tapasztalatait támasztják alá. Saját eredményeinkkel ellentétben Machtinger és munkatársai (2011) magasabb megtermékenyülési arányt tapasztaltak azokban a ciklusokban, amelyekben óriás petesejtek is jelen voltak, ezzel szemben mi mind az összes ciklust figyelembe véve, mind a párosított ciklusok vizsgálatakor alacsonyabb megtermékenyülési arányt találtunk ezen ciklusok esetében.

Ami az embriók minőségét illeti, azt mondhatjuk, hogy az egyetlen lényeges eltérés a két csoport között a beültetett embriók alacsonyabb sejtszámában mutatkozott az óriás petesejttel rendelkező ciklusok esetén.

Kijelenthetjük tehát, hogy az óriás petesejtek jelenléte nem hordoz információt a petefészek stimulációra vonatkozóan, ahogyan nem jelzi előre a kezelés várható eredményességét sem, így a minőségbiztosítási rendszerben indikátorként nem használható.

6. Következtetések

1. Nem andrológiai javallat esetén a hagyományos IVF kezelés az ICSI-vel azonos eredményességgel, vagy annál hatékonyabban alkalmazható módszer. Jó minőségű ondóminta esetén a megtermékenyülési arány, a beültetett embriók minősége és a klinikai terhességi arány is jobb, míg közepes minőségű ondóminták esetén sem rosszabb hagyományos IVF kezelést követően, mint ICSI esetén. A nőbetegek magas életkora önmagában nem indokolja ICSI kezelés végzését, azt kizárólag súlyos fokú andrológiai eltérés, illetve korábbi sikertelen hagyományos IVF kezelés esetén javasoljuk alkalmazni.
2. A mikrovájatokat tartalmazó edényben történő csoportos tenyésztés kedvező hatással van a petesejtek megtermékenyülésére ICSI-t követően. Az embriók csoportos tenyésztése kedvezően befolyásolja azok fejlődését. A klinikai terhességi arány, illetve a krioprezervált embriók aránya is magasabb csoportos tenyésztést követően.
3. Mikrovájatokat tartalmazó edényben történő csoportos tenyésztés esetén az embriók denzitása hatással van azok fejlődésére. Öt-hat embrió együtt tenyésztése 25 µl-es oldatcseppben (4,2-5,0 µl/embrió) kedvezően befolyásolja az embriók minőségét.
4. Az osztódási stádiumú embriók nagyobb eséllyel élik túl a fagyasztva tárolást Rapid-I hordozóval végzett zárt rendszerű vitrifikáció után, mint lassú fagyasztást követően, valamint átlagos sejtszámuk és minőségük is jobb. Ugyanakkor a Rapid-I módszerrel történő vitrifikáció utáni embrióbeültetést követő beágyazódási és terhességi arány kedvezőbb tendenciát mutat, azonban még sincs különbség az élve szülések arányában sem. Ugyanannyi embrió beültetéséhez azonban kevesebb embrió felolvasztására van szükség. Ezáltal a kumulált terhességi arány, illetve élve szülési arány is magasabb lehet.
5. Óriás petesejtek leggyakrabban olyan nőbetegek kezelésekor fordulnak elő, akiknél a nyert petesejtek száma magas. Jelenlétük nem utal a kezelés többi

petesejtjének minőségére, illetve az azokból fejlődő embriók minőségére, ahogyan a kezelés kimenetelére sem.

7. Összefoglalás

A meddőségi kezelések során az embriológiai laboratóriumban alkalmazott módszerek az elmúlt évtizedekben jelentős fejlődésen mentek keresztül. A kutatások, fejlesztések igen szerteágazók, az in vitro fertilizációs (IVF) kezelések minden részfolyamatára kiterjednek. Jelen tanulmányunkban az embriológiai laboratóriumi munka négy fontos területén végeztünk vizsgálatokat. Tanulmányunkhoz a Semmelweis Egyetem I. sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika Asszisztált Reprodukciós Osztályán 2008. és 2015. között elvégzett IVF kezelések adatait dolgoztuk fel. Összehasonlítottuk az intracitoplazmatikus spermiuminjekció (ICSI) és a hagyományos IVF kezelés eredményességét, és megállapítottuk, hogy a nőbetegek magas életkora önmagában nem indokolja ICSI végzését, azt kizárólag súlyos fokú andrológiai eltérés, illetve korábbi sikertelen hagyományos IVF kezelés esetén javasoljuk alkalmazni. Az embriók tenyésztése a megtermékenyítés módszere mellett egy másik kritikusan fontos terület. Megállapítottuk, hogy a mikrovájatokat tartalmazó edényben történő csoportos tenyésztés az egyedi tenyésztéssel szemben magasabb megtermékenyülési arányt eredményezett ICSI-t követően és kedvezően befolyásolta az embriók fejlődését, illetve a klinikai terhességi arányt. Megállapítottuk továbbá, hogy az embriók denzitása hatással van azok fejlődésre. Öt-hat embrió együtt tenyésztése 25 µl-es oldatcseppben (4,2-5,0 µl/embrió) kedvezően befolyásolja az embriók minőségét. A csoportos tenyésztés alkalmazásának eredményeképpen több embrió állt rendelkezésre a fagyasztáshoz. Az ilyen embriók a fagyasztásával és későbbi időpontban történő beültetésével lehetőség van a kumulált terhességi arány növelésére anélkül, hogy a petefészek újabb hormonális stimulációjára lenne szükség. A fagyasztási módszerek vizsgálatainak eredményei alapján megállapítottuk, hogy az osztódási stádiumú embriók nagyobb eséllyel élik túl a fagyasztva tárolást Rapid-I hordozóval végzett zárt rendszerű vitrifikáció után, szemben a lassú programozott fagyasztással, és átlagos sejtszámuk, valamint minőségük is jobb. Végezetül megvizsgáltuk, hogy az IVF kezelésekben szórványosan előforduló úgynevezett óriás petesejtek felhasználhatók-e a minőségbiztosítás részeként és megállapítottuk, hogy az ilyen petesejtek jelenléte nem utal a kezelés többi petesejtjének, illetve az azokból fejlődő embriók minőségére, ahogyan a kezelés kimenetelére sem, így nem alkalmazhatók minőségi indikátorként.

8. Summary

Current trends in the laboratory practice of in vitro fertilization treatments

Embryology laboratory methods have gone through serious evolution in the past decades. Researches and developments involve all aspects of in vitro fertilization (IVF) treatments. In our study, four important subfields were examined. Data of IVF cycles performed between 2008. and 2015. at the Division of Assisted Reproduction, First Department of Obstetrics and Gynecology, Semmelweis University were analyzed. Efficiency of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and of conventional IVF was compared. We found that advanced female age alone does not indicate the use of ICSI, which should only be used in case of severe male factor infertility or previous fertilization failure with conventional IVF. Embryo culture is also crucial in terms of treatment outcome. We can conclude, that culture of human embryos in a microwell group culture dish results higher fertilization rate after ICSI, and also has a positive effect on embryo development, as well as on clinical pregnancy rate compared to individual culture. Embryo density (also referred as embryo-to-volume ratio) was also studied, as it plays an important role when culturing embryos in groups. We found, that culturing 5-6 embryos together in a volume of 25 μl (4.2-5.0 $\mu\text{l}/\text{embryo}$) favorably affects embryo quality. Moreover, group culture results more embryos suitable for cryopreservation. Freezing and transfer of these embryos after thawing at a later date can increase cumulative pregnancy rate without the need of expensive and risky hormonal stimulation of the ovary. We compared two different freezing technics, and found that cleavage stage embryos have higher chance to survive vitrification with the Rapid-I closed system, than conventional freezing. Mean blastomere number and quality of these vitrified-warmed embryos are also higher. Finally, as quality management is crucial in every laboratory, we examined the opportunity to use giant oocytes as quality indicators. These oocytes have a significantly increased cytoplasm volume, and present sporadically in IVF cycles. We conclude, that the presence of giant eggs refers to neither the quality of sibling oocytes and developing embryos, nor treatment outcome, thus cannot be included as an indicator in the quality management system.

9. Irodalomjegyzék

- AbdelHafez F, Xu J, Goldberg J, Desai N. (2011) Vitrification in open and closed carriers at different cell stages: assessment of embryo survival, development, DNA integrity and stability during vapor phase storage for transport. *BMC Biotechnol*, 11(1): 29.
- Ali J. (2004) Continuous ultra micro-drop culture yields higher pregnancy and implantation rates than either large-drop culture or fresh-medium replacement. *Clin Embryol (online)*, 7(2): 1-23.
- Andersen AN, Carlsen E, Loft A. (2008) Trends in the use of intracytoplasmic sperm injection marked variability between countries. *Hum Reprod Update*, 14(6): 593-604.
- Armstrong S, Arroll N, Cree LM, Jordan V, Farquhar C. (2015) Time-lapse systems for embryo incubation and assessment in assisted reproduction. *The Cochrane database of systematic reviews*, 2, CD011320.
- Asch R, Ellsworth L, Balmaceda J, Wong P. (1984) Pregnancy after translaparoscopic gamete intrafallopian transfer. *Lancet*, 324(8410) :1034-1035.
- Austin CR. (1960) Anomalies of fertilization leading to triploidy. *J Cell Compar Physl*, 56: S1.
- Balaban B, Brison D, Calderón G, Catt J, Conaghan J, Cowan L, Ebner T, Gardner D, Hardarson T, Lundin K, Magli MC. (2011) The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod*, 26(6): 1270-1283.
- Balaban B, Urman B, Ata B, Isiklar A, Larman MG, Hamilton R, Gardner DK. (2008) A randomized controlled study of human Day 3 embryo cryopreservation by slow freezing or vitrification: vitrification is associated with higher survival, metabolism and blastocyst formation. *Hum Reprod*, 23(9): 1976-1982.
- Balakier H, Bouman D, Sojecki A, Librach C, Squire JA. (2002) Morphological and cytogenetic analysis of human giant oocytes and giant embryos. *Hum Reprod*, 17(9): 2394-2401.

- Baltz JM és Tartia AP. (2010) Cell volume regulation in oocytes and early embryos: connecting physiology to successful culture media. *Hum Reprod Update*, 16(2): 166-176.
- Bhattacharya S, Hamilton MPR, Shaaban M, Khalaf Y, Seddler M, Ghobara T, Templeton A. (2001) Conventional in-vitro fertilisation versus intracytoplasmic sperm injection for the treatment of non-male-factor infertility: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2001; 357(9274): 2075-2079.
- Bjercke, S, Tanbo, T, Dale, P. O, Mørkrid, L, Åbyholm, T. (1999) Human chorionic gonadotrophin concentrations in early pregnancy after in-vitro fertilization. *Hum Reprod*, 14(6): 1642-1646.
- Bonduelle M, Van Assche E, Joris H, Keymolen K, Devroey P, Van Steirteghem A, Liebaers I. (2002a) Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters. *Hum Reprod*, 17(10): 2600-2614.
- Bonduelle M, Liebaers I, Deketelaere V, Derde MP, Camus M, Devroey P, Van Steirteghem A. (2002b) Neonatal data on a cohort of 2889 infants born after ICSI (1991–1999) and of 2995 infants born after IVF (1983–1999). *Hum Reprod*, 17(3): 671-676.
- Bonduelle M, Wennerholm UB, Loft A, Tarlatzis BC, Peters C, Henriët S, Mau C, Victorin-Cederquist A, Van Steirteghem A, Balaska A, Emberson JR, Sutcliffe, AG. (2005) A multi-centre cohort study of the physical health of 5-year-old children conceived after intracytoplasmic sperm injection, in vitro fertilization and natural conception. *Hum Reprod*, 20(2): 413-419.
- Boulet SL, Mehta A, Kissin DM, Warner L, Kawwass JF, Jamieson DJ. (2015) Trends in Use of and Reproductive Outcomes Associated With Intracytoplasmic Sperm Injection. *J Amer Med Assoc*, 313(3): 255-263.
- Bowen JR, Gibson FL, Leslie GI, Saunders DM. (1998) Medical and developmental outcome at 1 year for children conceived by intracytoplasmic sperm injection. *Lancet*, 351(9115): 1529-1534.

- Briggs R, Kovacs G, MacLachlan V, Motteram C, Baker HG. (2015). Can you ever collect too many oocytes? *Hum Reprod*, 30(1): 81-87.
- Bunge RG és Sherman JK. (1953) Fertilizing Capacity of Frozen Human Spermatozoa. *Nature*, 172: 767-768.
- Calhaz-Jorge C, de Geyter C, Kupka MS, de Mouzon J, Erb K, Mocanu E, Motrenko, T, Scaravelli G, Wyns, C, Goossens V. (2016). Assisted reproductive technology in Europe, 2012: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod*, 31(8): 1638-1652.
- Catt JW és Henman M. (2000) Toxic effects of oxygen on human embryo development. *Hum Reprod*, 15(suppl 2):199-206.
- Chan AW, Luetjens CM, Dominko T, Ramalho-Santos J, Simerly CR, Hewitson L, Schatten G. (2000) TransgenICSI reviewed: foreign DNA transmission by intracytoplasmic sperm injection in rhesus monkey. *Mol Reprod Dev*, 56(S2): 325-328.
- Chen C. (1986) Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet*, 327(8486): 884-886.
- Chronopoulou E és Harper JC. (2014) IVF culture media: past, present and future. *Hum Reprod Update*, 21(1): 39-55.
- Ciapa B és Arnoult C. (2011) Could modifications of signalling pathways activated after ICSI induce a potential risk of epigenetic defects? *Int J Dev Biol*, 55(2): 143-152.
- Collier M, O'Neill C, Ammit AJ, Saunders DM. (1988) Biochemical and pharmacological characterization of human embryo-derived platelet activating factor. *Hum Reprod*, 3(8): 993-998.
- Cox GF, Bürger J, Lip V, Mau UA, Sperling K, Wu BL, Horsthemke B. (2002) Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am J Hum Genet*, 71(1): 162-164.
- Craft I, Bennett V, Nicholson N. (1993) Fertilising ability of testicular spermatozoa. *Lancet*, 342(8875): 864.

- Cruz M, Garrido N, Herrero J, Pérez-Cano I, Muñoz M, Meseguer M. (2012) Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality. *Reprod Biomed Online*, 25(4): 371-381.
- Currie J és Craig J (2013) Quality management in assisted reproduction. in: Coward K és Wells D (szerk.), *Textbook of clinical embryology*. Cambridge University Press, p 200-209.
- Davies MJ, Moore VM, Willson KJ, Van Essen P, Priest K, Scott H, Chan A. (2012) Reproductive technologies and the risk of birth defects. *New Eng J Med*, 366(19): 1803-1813.
- De Kretzer D, Dennis P, Hudson B, Leeton J, Lopata A, Outch K, Talbot J, Wood, C. (1973) Transfer of a human zygote. *Lancet*, 302(7831): 728-729.
- De Munck N, Santos-Ribeiro S, Mateizel I, Verheyen G. (2015) Reduced blastocyst formation in reduced culture volume. *J Assist Reprod Gen*, 32: 1365-1370.
- Desai N, Blackmon H, Szeptycki J, Goldfarb J. (2007) Cryoloop vitrification of human day 3 cleavage-stage embryos: post-vitrification development, pregnancy outcomes and live births. *Reprod Biomed Online*, 14(2): 208-213.
- Desai NN, Goldberg JM, Austin C, Falcone T. (2013) The new Rapid-i carrier is an effective system for human embryo vitrification at both the blastocyst and cleavage stage. *Reprod Biol Endocrin*, 11(1): 41.
- Devroey P és Van Steirteghem A. (2004) A review of ten years experience of ICSI. *Hum Reprod Update*, 10(1): 19-28.
- Devroey P, Braeckmans P, Smits J, Waesberghe L, Wisanto A, Steirteghem A, Heytens L, Camu F. (1986) Pregnancy after translaparoscopic zygote intrafallopian transfer in a patient with sperm antibodies. *Lancet*, 327(8493): 1329.
- Diedrich K, Diedrich C, Santos E, Zoll C, Al-Hasani S, Reissmann T, Krebs D, Klingmüller D. (1994) Suppression of the endogenous luteinizing hormone surge by the gonadotrophin-releasing hormone antagonist Cetrorelix during ovarian stimulation. *Hum Reprod*, 9(5): 788-791.

- Dyer S, Chambers GM, De Mouzon J, Nygren KG, Zegers-Hochschild F, Mansour R, Ishihara O, Banker M, Adamson GD. (2016) International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies world report: Assisted Reproductive Technology 2008, 2009 and 2010. *Hum Reprod*, 31(7): 1588-1609.
- Ebner T, Shebl O, Moser M, Mayer RB, Arzt W, Tews G. (2010) Group culture of human zygotes is superior to individual culture in terms of blastulation, implantation and life birth. *Reprod Biomed Online*, 21(6): 762-768.
- Edgar DH és Gook DA. (2012) A critical appraisal of cryopreservation (slow cooling versus vitrification) of human oocytes and embryos. *Hum Reprod Update*, 18(5): 536-554.
- Edwards RG, Donahue RP, Baramki, TA, Jones HW. (1966) Preliminary attempts to fertilize human oocytes matured in vitro. *Am J Obstet Gynecol*, 96(2): 192-200.
- Edwards RG, Fishel SB, Cohen J, Fehilly CB, Purdy JM, Slater JM, Steptoe PC, Webster JM. (1984) Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. *J Assist Reprod Gen*, 1(1): 3-23.
- Edwards RG, Steptoe PC, Purdy JM. (1970) Fertilization and Cleavage in vitro of Preovulator Human Oocytes. *Nature*, 227:1307–1309.
- El-Toukhy T, Khalaf Y, Al-Darazi K, Andritsos V, Taylor A, Braude P. (2003) Effect of blastomere loss on the outcome of frozen embryo replacement cycles. *Fertil Steril*, 79(5): 1106-1111.
- ESHRE Capri Workshop Group. (2005) Fertility and ageing. *Hum Reprod Update*, 11(3): 261-276.
- Evers JH. (2016) Santa Claus in the fertility clinic. *Hum Reprod*, 31(7): 1381-1382.
- Fancsovits P. (2006) Petesejtek, zygoták és praeembryók morfológiai vizsgálata in vitro fertilisációs kezelések során. Doktori értekezés. Semmelweis Egyetem, Budapest, p 90.

- Fancsovits P, Lehner Á, Murber Á, ifj Rigó J, Urbancsek J. (2013) Az ondóminták minőségének megítélése a WHO-referenciaértékek változásának tükrében. *Magy Andrológia*, 18(2): 29-34.
- Fancsovits P, Pribenszky C, Lehner A, Murber A, Rigo J, Urbancsek J. (2013) Prospective randomized study comparing human embryo culture in group in the Well-of-the-Well dish or individually in droplets. Results from an intermediate analysis. *Hum Reprod*, 28(s1): 186.
- Fancsovits P, Toth L, Takacs ZF, Murber A, Papp Z, Urbancsek, J. (2005) Early pronuclear breakdown is a good indicator of embryo quality and viability. *Fertil Steril*, 84(4): 881-887.
- Fauser BCJM, Devroey P, Diedrich K, Balaban B, Bonduelle M, Delemarre-van de Waal HA, Group EAREW. (2014) Health outcomes of children born after IVF/ICSI: a review of current expert opinion and literature. *Reprod Biomed Online* 28(2): 162-182.
- Fishel S, Aslam I, Lisi F, Rinaldi L, Timson J, Jacobson M, Gobetz L, Green S, Campbell A, Lisi R. (2000) Should ICSI be the treatment of choice for all cases of in-vitro conception? *Hum Reprod*, 15(6): 1278-1283.
- FitzHarris G és Baltz JM (2006) Granulosa cells regulate intracellular pH of the murine growing oocyte via gap junctions: development of independent homeostasis during oocyte growth. *Development*, 133(4): 591-599.
- French NA. (1997) Modeling incubation temperature: The effects of incubator design, embryonic development, and egg size. *Poultry Sci*, 76(1): 124-133.
- Fujita T, Umeki H, Shimura H, Kugumiya K, Shiga K. (2006) Effect of group culture and embryo-culture conditioned medium on development of bovine embryos. *J Reprod Develop*, 52: 137-142.
- Gabrielsen A, Fedder J, Agerholm I. (2006) Parameters predicting the implantation rate of thawed IVF/ICSI embryos: a retrospective study. *Reprod Biomed Online*, 12(1): 70-76.

- Gardner DK. (2016) The impact of physiological oxygen during culture, and vitrification for cryopreservation, on the outcome of extended culture in human IVF. *Reprod Biomed Online*, 32(2): 137-141.
- Gardner DK és Lane M. (2001) Embryo culture, in: Gardner, D. K. (Szerk.), *Textbook of Assisted Reproductive Technologies. Laboratory and Clinical Perspectives*. Martin Dunitz, London, p 203-222.
- Gardner DK és Lane M. (2004) Culture of the mammalian preimplantation embryo. in Gardner, D. K, Lane, M, Watson, J. A. (Szerk.) *A laboratory guide to the mammalian embryo*. p 41-61.
- Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. (2000) Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril*, 73(6): 1155-1158.
- Gardner DK, Vella P, Lane M, Wagley L, Schlenker T, Schoolcraft WB. (1998) Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil Steril*, 69(1): 84-88.
- Gleicher N, Vidali A, Braverman J, Kushnir VA, Barad DH, Hudson C, Wu YG, Wang Q, Zhang L, Albertini DF. (2016) Accuracy of preimplantation genetic screening (PGS) is compromised by degree of mosaicism of human embryos. *Reprod Biol Endocrin*, 14(1): 54.
- Gopichandran N és Leese HJ. (2006) The effect of paracrine/autocrine interactions on the in vitro culture of bovine preimplantation embryos. *Reproduction*, 131(2): 269-277.
- Gordon JW, Grunfeld L, Garrisi GJ, Talansky BE, Richards C, Laufer N. (1988) Fertilization of human oocytes by sperm from infertile males after zona pellucida drilling. *Fertil Steril*, 50(1): 68-73.
- Hamilton JAM, Cissen M, Brandes M, Smeenk JMJ, de Bruin JP, Kremer JAM, Nelen WLD, Hamilton CJCM. (2015) Total motile sperm count: a better indicator for the severity of male factor infertility than the WHO sperm classification system. *Hum Reprod*, 30(5): 1110-1121.

- Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RML. (1990) Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature*, 344(6268): 768-70.
- Hardarson T, Löfman C, Coull G, Sjögren A, Hamberger L, Edwards RG. (2002) Internalization of cellular fragments in a human embryo: time-lapse recordings. *Reprod Biomed Online*, 5(1): 36-38.
- Hardarson T, Lundin K, Hanson C. (2002) A human oocyte with two sets of MII/PB-structures: Case report. *Hum Reprod*, 17(7): 1892-1894.
- Hoelker M, Rings F, Lund Q, Ghanem N, Phatsara C, Griese J, Schellander K, Tesfaye D. (2009). Effect of the microenvironment and embryo density on developmental characteristics and gene expression profile of bovine preimplantative embryos cultured in vitro. *Reproduction* 137(3): 415-425.
- Hollingsworth B, Harris A, Mortimer D. (2007) The cost effectiveness of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) *J Assist Reprod Gen*, 24(12): 571-577.
- Hughes PM, Hudson SB, Walker DL, Fredrickson JR, Coddington CC, Morbeck DE. (2009) Mouse embryo assay (MEA): group versus individual culture effects on the sensitivity for peroxides in mineral oil. *Fertil Steril*, 92(3): S231.
- Jansen RP, Anderson JC, Sutherland PD. (1988) Nonoperative embryo transfer to the fallopian tube. *New Engl J Med*, 319(5): 288-291.
- Jericho H, Wilton L, Gook DA, Edgar DH. (2003) A modified cryopreservation method increases the survival of human biopsied cleavage stage embryos. *Hum Reprod*, 18(3): 568-571.
- Ji J, Liu Y, Tong XH, Luo L, Ma J, Chen Z. (2013) The optimum number of oocytes in IVF treatment: an analysis of 2455 cycles in China. *Hum Reprod*, 28(10): 2728-2734.
- Johansson M, Hardarson T, Lundin K. (2003) There is a cutoff limit in diameter between a blastomere and a small anucleate fragment. *J Assist Reprod Gen*, 20(8): 309-313.

- Johnson LN, Sasson IE, Sammel MD, Dokras A. (2013) Does intracytoplasmic sperm injection improve the fertilization rate and decrease the total fertilization failure rate in couples with well-defined unexplained infertility? A systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*, 100(3): 704-711.
- Jone GM, Trounson AO, Gardner DK, Kausche A, Lolatgis N, Wood C. (1998) Evolution of a culture protocol for successful blastocyst development and pregnancy. *Hum Reprod*, 13(1): 169-177.
- Kastrop PMM, Weima SM, Van Kooij RJ, Te Velde ER. (1999) Comparison between intracytoplasmic sperm injection and in-vitro fertilization (IVF) with high insemination concentration after total fertilization failure in a previous IVF attempt. *Hum Reprod*, 14(1): 65-69.
- Khamsi F, Yavas Y, Roberge S, Wong JC, Lacanna IC, Endman M. (2001) Intracytoplasmic sperm injection increased fertilization and good-quality embryo formation in patients with non-male factor indications for in vitro fertilization: a prospective randomized study. *Fertil Steril*, 75(2): 342-347.
- Kirkegaard, K, Agerholm, I. E, & Ingerslev, H. J. (2012) Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment. *Hum Reprod*, 27(5): 1277-1285.
- Kligman I, Benadiva C, Alikani M, Munné S. (1996) The presence of multinucleated blastomeres in human embryos is correlated with chromosomal abnormalities. *Hum Reprod*, 11(7): 1492-1498.
- Kovačić B és Vlaisavljević, V. (2008) Influence of atmospheric versus reduced oxygen concentration on development of human blastocysts in vitro: a prospective study on sibling oocytes. *Reprod Biomed Online*, 17(2): 229-236.
- Kovacs P. (2014) Embryo selection: the role of time-lapse monitoring. *Reprod Biol Endocrin*, 12(1): 124.
- Kuleshova LL, Lopata A. (2002) Vitrification can be more favorable than slow cooling. *Fertil Steril*, 78(3): 449-454.
- Kushnir VA, Darmon SK, Albertini DF, Barad, DH, Gleicher N. (2016) Effectiveness of in vitro fertilization with preimplantation genetic screening: a

reanalysis of United States assisted reproductive technology data 2011–2012. *Fertil Steril*, 106(1): 75-79.

- Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O. (2005) Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reprod Biomed Online*, 11(5): 608-614.
- Lane M és Gardner DK. (1992) Effect of incubation volume and embryo density on the development and viability of mouse embryos in vitro. *Hum Reprod*, 7(4): 558-562.
- Lanzendorf SE, Maloney MK, Veeck LL, Slusser J, Hodgen GD, Rosenwaks Z. (1988) A preclinical evaluation of pronuclear formation by microinjection of human spermatozoa into human oocytes. *Fertil Steril*, 49(5): 835-842.
- Larson MA és Kubisch HM. (1999) The effects of group size on development and interferon- τ secretion by in-vitro fertilized and cultured bovine blastocysts. *Hum Reprod*, 14(8): 2075-2079.
- Lassalle B, Testart J, Renard JP. (1985) Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1, 2 propanediol. *Fertil Steril*, 44(5): 645-651.
- Laws-King A, Trounson A, Sathananthan H, Kola I. (1987) Fertilization of human oocytes by microinjection of a single spermatozoon under the zona pellucida. *Fertil Steril*, 48(4): 637-642.
- Lehner A, Pribenszky C, Murber A, Rigo Jr J, Urbancsek J, Fancsovits P. (2013) Embryo density in group culture of human embryos may influence embryo quality. *Hum Reprod* 28(Suppl. 1): 180-181.
- Lemmen JG, Agerholm I, Ziebe S. (2008) Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reprod Biomed Online*, 17(3): 385-391.
- Letterie G, Marshall L, Angle M. (2005) The relationship of clinical response, oocyte number, and success in oocyte donor cycles. *J Assist Reprod Gen*, 22(3):115-117.

- Lewis WH és Gregory PW. (1929) Cinematographs of living developing rabbit-eggs. *Science*, 69: 226-229.
- Lie RT, Lyngstadass A, Ørstavik KH, Bakketeig LS, Jacobsen G, Tanbo T. (2005) Birth defects in children conceived by ICSI compared with children conceived by other IVF-methods; a meta-analysis. *Int J Epidemiol*, 34(3): 696-701.
- Loutradi KE, Kolibianakis EM, Venetis CA, Papanikolaou EG, Pados G, Bontis I, Tarlatzis BC. (2008) Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*, 90(1): 186-193.
- Ludwig M, Katalinic A, German ICSI Follow-up Study Group. (2002) Malformation rate in fetuses and children conceived after ICSI: results of a prospective cohort study. *Reprod Biomed Online*, 5(2): 171-178.
- Luna M, Bigelow C, Duke M, Ruman J, Sandler B, Grunfeld L, Copperman AB. (2011) Should ICSI be recommended routinely in patients with four or fewer oocytes retrieved? *J Assist Reprod Gen*, 28(10):911-915.
- Lundin K, Bergh C, Hardarson T. (2001) Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Hum Reprod*, 16(12):2652-57.
- Machtinger R, Politch JA, Hornstein MD, Ginsburg ES, Racowsky C. (2011) A giant oocyte in a cohort of retrieved oocytes: does it have any effect on the in vitro fertilization cycle outcome? *Fertil Steril*, 95(2): 573-576.
- Magli MC, Jones GM, Lundin K, Van den Abbeel E. (2012) Atlas of human embryology: from oocytes to preimplantation embryos. *Hum Reprod*, 27(Suppl 1): 1-91.
- Malter HE és Cohen J. (1989) Partial zona dissection of the human oocyte: a nontraumatic method using micromanipulation to assist zona pellucida penetration. *Fertil Steril*, 51(1):139-148.
- Mandelbaum J, Belaïsch-Allart J, Junca AM, Antoine JM, Plachot M, Alvarez S, Alnot MO, Salat-Baroux J. (1998) Cryopreservation in human assisted reproduction is now routine for embryos but remains a research procedure for oocytes. *Hum Reprod*, 13(suppl 3): 161-174.

- Mantikou E, Youssef MA, van Wely M, van der Veen F, Al-Inany HG, Repping S, Mastenbroek S. (2013) Embryo culture media and IVF/ICSI success rates: a systematic review. *Hum Reprod Update*, 19(3): 210-220.
- Mazur P. (1970) Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science*, 168(3934): 939-949.
- McAvey B, Zapantis A, Jindal SK, Lieman HJ, Polotsky AJ. (2011) How many eggs are needed to produce an assisted reproductive technology baby: is more always better? *Fertil Steril*, 96(2): 332-335.
- Meintjes M, Chantilis SJ, Douglas JD, Rodriguez AJ, Guerami AR, Bookout DM, Madden JD. (2009) A controlled randomized trial evaluating the effect of lowered incubator oxygen tension on live births in a predominantly blastocyst transfer program. *Hum Reprod*, 24(2): 300-307.
- Mersereau JE, Plunkett BA, Cedars MI. (2008) Preimplantation genetic screening in older women: a cost-effectiveness analysis. *Fertil Steril*, 90(3): 592-598.
- Meseguer M, Rubio I, Cruz M, Basile N, Marcos J, Requena A. (2012) Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: a retrospective cohort study. *Fertil Steril*, 98(6): 1481-1489.
- Milki AA, Hinckley MD, Fisch JD, Dasig D, Behr B. (2000) Comparison of blastocyst transfer with day 3 embryo transfer in similar patient populations. *Fertil Steril*, 73(1): 126-129.
- Minasi MG, Fabozzi G, Casciani V, Lobascio AM, Colasante A, Scarselli F, Greco E. (2015) Improved blastocyst formation with reduced culture volume: comparison of three different culture conditions on 1128 sibling human zygotes. *J Assist Reprod Gen*, 32(2): 215-220.
- Moessner J és Dodson WC. (1995) The quality of human embryo growth is improved when embryos are cultured in groups rather than separately. *Fertil Steril*. 64(5): 1034-1035.
- Mortimer ST és Mortimer D. (2015) Quality and risk management in the IVF laboratory. Cambridge University Press. p 146.

- Mukaida T, Wada S, Takahashi K, Pedro PB, An TZ, Kasai M. (1998) Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos. *Hum Reprod*, 13(10): 2874-2879.
- Nezhat C. (2016) Nezhat's History of Endoscopy: A Historical Analysis of Endoscopy's Ascension Since Antiquity. *CNezhatMD*, p 132.
- O'Neill C. (2008) The potential roles for embryotrophic ligands in preimplantation embryo development. *Hum Reprod Update*, 14(3): 275-288.
- Ohta N, Nohara M, Kojimahara T, Ito M, Saito T, Nakahara K, Hiroi M. (1996) Ultrarapid freezing of human embryos by vitrification method-a case of delivery. *Jpn J Fertil*. 41: 48-51.
- Ola B, Afnan M, Sharif K, Papaioannou, S, Hammadieh N, Barratt CL. (2001) Should ICSI be the treatment of choice for all cases of in-vitro conception? Considerations of fertilization and embryo development, cost effectiveness and safety. *Hum Reprod*, 16(12): 2485-2490.
- Orvieto R, Shuly Y, Brengauz M, Feldman B. (2016) Should pre-implantation genetic screening be implemented to routine clinical practice? *Gynecol Endocrinol*, 32(6): 506-508.
- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. (1992) Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 340(8810): 17-18.
- Palermo GD, Neri QV, Takeuchi T, Squires J, Moy F, Rosenwaks Z. (2008) Genetic and epigenetic characteristics of ICSI children. *Reprod Biomed Online*, 17(6): 820-833.
- Parmegiani L, Accorsi A, Cognigni GE, Bernardi S, Troilo E, Filicori M. (2010) Sterilization of liquid nitrogen with ultraviolet irradiation for safe vitrification of human oocytes or embryos. *Fertil Steril*, 94(4): 1525-1528.
- Payne D, Flaherty SP, Barry MF, Matthews CD. (1997) Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum Reprod*, 12(3): 532-541.

- Payne, D és Matthews CD. (1995) Intracytoplasmic sperm injection--clinical results from the reproductive medicine unit, Adelaide. *Reprod Fert Develop*, 7(2): 219-227.
- Pegg DE. (2002) The history and principles of cryopreservation. *Semin Reprod Med*, 20(1): 5-14.
- Perone N. (1991) Gamete intrafallopian transfer (GIFT): Historic perspective. *J Assist Reprod Gen*, 8(1): 1-4.
- Plachot M, Belaisch-Allart J, Mayenga JM, Chouraqui A, Tesquier L, Serkine AM. (2002) Outcome of conventional IVF and ICSI on sibling oocytes in mild male factor infertility. *Hum Reprod*. 17(2): 362-369.
- Poikkeus P, Hiilesmaa V, Tiitinen A. (2002) Serum HCG 12 days after embryo transfer in predicting pregnancy outcome. *Hum Reprod*, 17(7): 1901-1905.
- Polanski LT, Neto C, Nastri CO, Navarro PA, Ferriani RA, Raine-Fenning N, Martins WP. (2014) Time-lapse embryo imaging for improving reproductive outcomes: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obst Gyn*, 44(4): 394-401.
- Polge C, Smith AU, Parkes AS (1949) Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164(4172): 666.
- Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology, & Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. (2012) Elective single-embryo transfer. *Fertil Steril*, 97(4): 835-842.
- Pribenszky C, Losonczi E, Molnár M, Lang Z, Mátyás S, Rajczy K, Molnár K, Kovács P, Nagy P, Conceicao J, Vajta G. (2010) Prediction of in-vitro developmental competence of early cleavage-stage mouse embryos with compact time-lapse equipment. *Reprod Biomed Online* 20(3): 371-379.
- Quinn P és Kerin JFP. (1986) Experience with the cryopreservation of human embryos using the mouse as a model to establish successful techniques. *J In Vitro Fertil Em*, 3(1): 40-45.

- Rall WF és Fahy GM. (1985) Ice-free cryopreservation of mouse embryos at–196°C by vitrification. *Nature*, 313: 573-575.
- Rama Raju GA, Prakash GJ, Krishna KM, Madan K. (2009) Neonatal outcome after vitrified day 3 embryo transfers: a preliminary study. *Fertil Steril*, 92(1): 143-148.
- Rama Raju, GA, Haranath GB, Krishna KM, Prakash GJ, Madan K. (2005) Vitrification of human 8-cell embryos, a modified protocol for better pregnancy rates. *Reprod Biomed Online*, 11(4): 434-437.
- Rebollar-Lazaro I és Matson P. (2010) The culture of human cleavage stage embryos alone or in groups: effect upon blastocyst utilization rates and implantation. *Reprod Biol*, 10(3): 227-234.
- Reed M. (2006) Communication skills of embryos maintained in group culture—the autocrine paracrine debate. *Clin Embryol (online)*, 9: 5-19.
- Reed ML, Woodward BJ, Swain JE. (2011). Single or group culture of mammalian embryos: the verdict of the literature. *J Reprod Biotech Fert*, 2(2): 77-87.
- Reed ML. (2012) Culture systems: embryo density. In: Smith GD, Swain JE, Pool TB (Szerk.), *Embryo Culture*. Humana Press, New York pp. 273-312.
- Rijnders PM és Jansen CAM. (1999) Influence of group culture and culture volume on the formation of human blastocysts: a prospective randomized study. *Hum Reprod*, 14(9): 2333-2337.
- Rock J és Miriam FM. (1944) In Vitro Fertilization and Cleavage of Human Ovarian Eggs. *Science* 100(2588): 105–107
- Romao, GS, Araújo MCPM, de Melo AS, Navarro PADAS, Ferriani RA, dos Reis RM. (2010) Oocyte diameter as a predictor of fertilization and embryo quality in assisted reproduction cycles. *Fertil Steril*, 93(2): 621-625.
- Rosenbusch B, Schneider M, Gläser B, Brucker C. (2002) Cytogenetic analysis of giant oocytes and zygotes to assess their relevance for the development of digynic triploidy. *Hum Reprod*, 17(9): 2388-2393.

- Sakkas D, Percival G, D'Arcy Y, Sharif K, Afnan M. (2001) Assessment of early cleaving in vitro fertilized human embryos at the 2-cell stage before transfer improves embryo selection. *Fertil Steril*, 76(6): 1150-1156.
- Sakkas D, Shoukir Y, Chardonnens D, Bianchi PG, Campana A. (1998) Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability. *Hum Reprod*, 13(1): 182-187.
- Salahuddin S, Ookutsu S, Goto K, Nakanishi Y, Nagata Y. (1995) Fertilization and early embryology: Effects of embryo density and co-culture of unfertilized oocytes on embryonic development of in-vitro fertilized mouse embryos. *Hum Reprod*, 10(9): 2382-2385.
- Sananmuang T, Tharasanit T, Nguyen C, Phutikanit N, Techakumphu M. (2011). Culture medium and embryo density influence on developmental competence and gene expression of cat embryos. *Theriogenology*, 75(9): 1708-1719.
- Schenk SL. (1878) Das Säugetierei künstlich befruchtet außerhalb des Muttertieres. *Mitt. Embr. Inst. K. K. Univ. Wien* 1, 107.
- Seki S és Mazur P. (2009) The dominance of warming rate over cooling rate in the survival of mouse oocytes subjected to a vitrification procedure. *Cryobiology*, 59(1): 75-82.
- Shettles LB. (1979) Ova harvest with in vivo fertilization. *Am J Obstet Gynecol* 133(7): 845
- Shoukir Y, Campana A, Farley T, Sakkas D. (1997) Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Hum Reprod*, 12(7): 1531-1536.
- Simon L, Zini A, Dyachenko A, Ciampi A, Carrell DT. (2016) A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome. *Asian J Androl*, 18: 1-11.
- Sobrinho DBG, Oliveira JBA, Petersen CG, Mauri AL, Silva LF, Massaro FC, Franco JG. (2011) IVF/ICSI outcomes after culture of human embryos at low oxygen tension: a meta-analysis. *Reprod Biol Endocrin*, 9(1): 143.

- Son WY és Tan SL. (2009) Comparison between slow freezing and vitrification for human embryos. *Expert Rev Med Devic*, 6(1): 1-7.
- Spyropoulou I, Karamalegos C, Bolton VN. (1999) A prospective randomized study comparing the outcome of in-vitro fertilization and embryo transfer following culture of human embryos individually or in groups before embryo transfer on day 2. *Hum Reprod*, 14(1): 76-79.
- Steptoe PC és Edwards RG. (1978) Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*, 312(8085): 366.
- Steptoe PC és Edwards RG. (1976) Reimplantation of a Human Embryo with Subsequent Tubal Pregnancy. *Lancet*, 307(7965): 880–882.
- Stokes PJ, Abeydeera LR, Leese, HJ. (2005) Development of porcine embryos in vivo and in vitro; evidence for embryo ‘cross talk’ in vitro. *Dev Biol*, 284(1): 62-71.
- te Velde ER és Pearson PL. (2002) The variability of female reproductive ageing. *Hum Reprod Update*, 8(2): 141-154.
- Templeton A, Morris JK, Parslow W. (1996) Factors that affect outcome of in-vitro fertilisation treatment. *Lancet*, 348(9039): 1402-1406.
- Tesarik J, Pilka L, Dvorak M, Trávník P. (1983) Oocyte recovery in vitro insemination and transfer into the oviduct after its microsurgical repair at a single laparotomy. *Fertil Steril*, 39(4): 472-475.
- Timeva T, Milachich T, Antonova I, Arabaji T, Shterev A, Omar HA. (2006) Correlation between number of retrieved oocytes and pregnancy rate after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm infection. *The Scientific World Journal*, 6: 686-690.
- Tournaye H, Verheyen G, Albano C, Camus M, Van Landuyt L, Devroey P, Van Steirteghem A. (2002) Intracytoplasmic sperm injection versus in vitro fertilization: a randomized controlled trial and a meta-analysis of the literature. *Fertil Steril*, 78(5): 1030-1037.

- Trounson A és Mohr L. (1983) Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature*, 305(5936): 707-709.
- Turner K. (2013) Embryo culture. Coward, K, & Wells, D. (szerk) *Textbook of clinical embryology*. Cambridge University Press, Cambridge pp 275-285.
- Vajta G és Nagy ZP. (2006) Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod Biomed Online*, 12(6): 779-796.
- Vajta G, Kőrösi T, Du Y, Nakata K, Ieda S, Kuwayama M, Nagy ZP. (2008) The Well-of-the-Well system: an efficient approach to improve embryo development. *Reprod Biomed Online*, 17(1): 73-81.
- Vajta G, Peura TT, Holm P, Paldi A, Greve T, Trounson AO, Callesen H. (2000) New method for culture of zona-included or zona-free embryos: The Well of the Well (WOW) system. *Mol Reprod Dev*, 55(3): 256-264.
- Vajta G, Rienzi L, Ubaldi FM. (2015) Open versus closed systems for vitrification of human oocytes and embryos. *Reprod Biomed Online*, 30(4): 325-333.
- Van den Abbeel E, Camus M, Van Waesberghe L, Devroey P, Van Steirteghem AC. (1997) Viability of partially damaged human embryos after cryopreservation. *Hum Reprod*, 12(9): 2006-2010.
- Van der Westerlaken L, Naaktgeboren N, Verburg H, Dieben S, Helmerhorst FM. (2006) Conventional in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in patients with borderline semen: a randomized study using sibling oocytes. *Fertil Steril*, 85(2): 395-400.
- Van Montfoort AP, Dumoulin JC, Kester AD, Evers JL. (2004) Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfers. *Hum Reprod*, 19(9): 2103-2108.
- Van Rumste MM, Evers JL, Farquhar C. (2002) Intra-cytoplasmic sperm injection versus conventional techniques for oocyte insemination during in vitro fertilisation in couples with non-male subfertility. *The Cochrane database of systematic reviews*, (2): CD001301.

- Veeck LL. (1991) Atlas of the human oocyte and early conceptus (2. kiadás), Williams & Wilkins, London
- Verheyen G, Tournaye H, Staessen C, De Vos A, Vandervorst M, Van Steirteghem A. (1999) Controlled comparison of conventional in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in patients with asthenozoospermia. *Hum Reprod*, 14(9): 2313-2319.
- Vutyavanich T, Saeng-anan U, Sirisukkasem S, Piromlertamorn W. (2011) Effect of embryo density and microdrop volume on the blastocyst development of mouse two-cell embryos. *Fertil Steril*, 95(4): 1435-1439.
- Walschaerts M, Bujan L, Isus F, Parinaud J, Mieusset R, Thonneau P. (2012). Cumulative parenthood rates in 1735 couples: impact of male factor infertility. *Hum Reprod*, 27(4): 1184-1190.
- Wang CZ, Feng GX, Zhang B, Zhou H, Shu JH, Gan XY, Chen HH. (2014) Effects of IVF versus ICSI on the outcomes of elective blastocyst culture. *National J Androl*, 20(8): 697-701.
- Wang J és Sauer MV. (2006) In vitro fertilization (IVF): a review of 3 decades of clinical innovation and technological advancement. *Ther Clin Risk Manag*, 2(4): 355-364.
- Weissman A, Farhi J, Levran D. (2004) Zygote intrafallopian transfer (ZIFT) in: Gardner KD, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. (Szerk.) Textbook of assisted reproductive techniques: laboratory and clinical perspectives. Taylor & Francis, London, 735-747.
- Wen J, Jiang J, Ding C, Dai J, Liu Y, Xia Y, Liu J, Hu Z. (2012) Birth defects in children conceived by in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection: a meta-analysis. *Fertil Steril*, 97(6): 1331-1337.
- Wennerholm, UB, Bergh C, Hamberger L, Lundin K, Nilsson L, Wikland M, Källén B. (2000) Incidence of congenital malformations in children born after ICSI. *Hum Reprod*, 15(4): 944-948.
- Wikland M, Enk L, Hammarberg K, Nilsson L. (1987) Use of a vaginal transducer for oocyte retrieval in an IVF/ET program. *J Clin Ultrasound*, 15(4): 245–251.

- Wong CC, Loewke KE, Bossert NL, Behr B, De Jonge CJ, Baer TM, Pera RAR. (2010) Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotechnol*, 28(10): 1115-1121.
- Wong MY, Ledger WL. (2013) Is ICSI Risky? *Obstet Gynecol International*. Article ID 473289.
- World Health Organization (1999) WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- World Health Organization (2010) WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. 5th ed. WHO Press, Geneva.
- Xi QS, Zhu LX, Hu J, Wu L, Zhang HW. (2012) Should few retrieved oocytes be as an indication for intracytoplasmic sperm injection? *J Zhejiang Univ Sci B*, 13(9): 717-722.
- Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara, O. (2009) The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, 2009. *Hum Reprod*, 24(11): 2683-2687.
- Zeilmaker GH, Alberda AT, van Gent I, Rijkmans CM, Drogendijk AC. (1984) Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. *Fertil Steril*, 42(2): 293–296.
- Zhao J, Zhang Q, Wang Y, Li Y. (2014) Whether sperm deoxyribonucleic acid fragmentation has an effect on pregnancy and miscarriage after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*, 102(4): 998-1005.

9.1. Internetes hivatkozások:

- "The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2010". Nobelprize.org. Nobel Media AB 2014. Web. 15 Aug 2016.)

- <https://focusonreproduction.eu/2016/07/05/6-5-million-ivf-babies-since-louise-brown/>
- <https://www.eshre.eu/Home/ESHRE-Annual-Report-2015.aspx>

10.A doktori értekezés alapjául szolgáló saját közlemények jegyzéke

10.1. Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények

- Lehner A, Kaszas Z, Murber A, Rigo J Jr, Urbancsek J, Fancsovits P. (2017) Embryo density may affect embryo quality during in vitro culture in a microwell group culture dish. Arch Gynecol Obstet, DOI: 10.1007/s00404-017-4403-z
IF: 2,090
- Lehner A, Kaszas Z, Murber A, Rigo J Jr, Urbancsek J, Fancsovits P. (2015) Giant oocytes in human in vitro fertilization treatments. Arch Gynecol Obstet, 292(3): 697-703.
IF: 1,680
- Lehner Á, Kaszás Z, Murber Á, Rigó J Jr, Urbancsek J, Fancsovits P. (2015) Az embriók vitrifikációja és hagyományos mélyfagyasztásuk eredményességének összehasonlítása in vitro fertilizációs kezelések során. Magy Nőorv L, 78(4): 210-217
- Lehner Á, Kaszás Z, Murber Á, Rigó J Jr, Urbancsek J, Fancsovits P. (2015) Az intracitoplazmatikus spermiuminjekció (ICSI) és hagyományos in vitro fertilizációs (IVF) kezelések eredményeinek összehasonlítása az ondóminta minőségének függvényében. Magy Nőorv L, 78(6): 310-318.

10.2. A tudományos munkásságot megalapozó egyéb közlemények

- Fancsovits P, Urbancsek J, Fónyad L, Sebestyén A, Csorba G, Lehner Á, Kaszás Z, Rigó J Jr, Bokor A. (2016) Kezdeti tapasztalataink a petefészeszövet-fagyasztás bevezetésével. Orvosi Hetilap 157(49): 1947-1956.
IF: 0,349
- Fancsovits P, Lehner A, Murber A, Kaszas Z, Rigo J Jr, Urbancsek J. (2014) Effect of hyaluronan-enriched embryo transfer medium on IVF outcome: a prospective randomized clinical trial. Arch Gynecol Obstet, 291(5): 1173-1179.
IF: 1,364

- Fancsovits P, Lehner Á, Murber Á, Rigó J Jr, Urbancsek J. (2013) Az ondóminták minőségének megítélése a WHO-referenciaértékek változásának tükrében. Magy Androl, 18(2): 29-34.

10.3. Tudományos közlemények:

Közlemények: 7 (IF: 5,383)

Nemzetközi folyóiratban: 3

Magyar nyelvű folyóiratban: 4

Idézhető absztraktok: 15

11. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik szerepet játszottak abban, hogy ez a doktori értekezés elkészülhetett.

Hálásan köszönöm *dr. Rigó János* Professzor Úrnak a bizalmát, támogatását, és mindenekelőtt a lehetőséget, hogy az I. számú Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikán dolgozhassak, illetve kutathassak.

Hálásan köszönöm *dr. Fancsovits Péternek*, témavezetőmnek, az Embriológia Laboratórium vezetőjének mindazt a bizalmat, emberi és szakmai támogatást, amelyet az elmúlt években nyújtott, valamint a bátorítást, amellyel átsegített a nehézségeken, a türelmet, amellyel átolvasta és kijavította kézirataimat. Köszönök minden segítséget, amelyet a több éves kutatómunkához, és ezen doktori értekezés elkészítéséhez megkaptam.

Hálásan köszönöm *dr. Urbancsek János* Professzor Úrnak, az Asszisztált Reprodukciós Osztály vezetőjének a bizalmát, hogy – mint pályakezdő embriológust – alkalmasnak talált arra, hogy az osztályon dolgozhassak. Hálával tartozom továbbá mindazért a támogatásért, amelyet az évek során nyújtott.

Köszönettel tartozom *Tóthné Gilán Zsuzsának*, vezető embriológiai szakasszisztensnek mindazért a szakmai és emberi támogatásért, amelyet közös munkánk során, illetve azt követően is nyújtott.

Köszönöm továbbá az Asszisztált Reprodukciós Osztály valamennyi munkatársának, *dr. Murber Ákos* egyetemi adjunktusnak, *dr. Árokszállási Anikó* szakorvosjelöltnek, *Pál Istvánnénak*, *Ács Andreának*, *Lengyel Annának*, *Kaszás Zitának*, *Pappné Rideg Juditnak*, valamint *Magyaros Albertnének* a közös munkát, hálás vagyok, hogy segítségükre bármikor számíthattam.

Nem lehet teljes a felsorolás azok nélkül, akik korábbi tanulmányaim során mellettem álltak, hiszen az ő segítségük, támogatásuk nélkül e dolgozat bizonyosan nem jöhetett volna létre.

Hálával tartozom *Baranyai József* biológusnak, a szombathelyi Bolyai János Gyakorló Általános Iskola és Gimnázium biológiatanárának, akinek segítése, szakmai ismerete, és nem utolsósorban pedagógiai kvalitásai nagyban hozzájárultak ahhoz, hogy tanulmányaimat természettudományi irányban folytattam.

Köszönettel tartozom *Kériné dr. Borsodi Andrea* Docens Asszonynak, egyetemi témavezetőmnek, aki nagyban hozzájárult tudományos érdeklődésem kialakulásához.

Végezetül – de egyáltalán nem utolsó sorban – hálásan köszönöm szüleimnek mindazt a támogatást és segítséget, amelyet azt elmúlt harminc évben nyújtottak.

Hálával tartozom feleségemnek a támogatásáért és bátorításáért, illetve kitartásáért, amellyel nagymértékben hozzájárult ahhoz, hogy dolgozatom elkészülhessen.