

# Új irányzatok az in vitro fertilizációs kezelések laboratóriumi gyakorlatában

Doktori tézisek

**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**

Bevezetés .....	2
Célkitűzések.....	5
Módszerek.....	6
Eredmények .....	8
A csoportos tenyésztés vizsgálatának eredményei .....	10
A különféle fagyasztási módszerek összehasonlításának eredményei .....	12
Következtetések .....	14
Saját publikációk jegyzéke .....	16

## Bevezetés

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.

Robert G. Edwards és Patrick Steptoe közös munkássága eredményeként 1978. július 25-én az Oldhami Általános Kórházban megszületett az első szervezeten kívül fogant gyermek, Louise Brown. 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, a fejlett országokban az in vitro fertilizációval fogant gyermekek aránya pedig az 5%-ot is elérheti. Edwards professzor neve 2010-ben vált hazánkban is szélesebb körben ismertté, miután „a szervezeten kívüli megtermékenyítés módszerének kifejlesztéséért” elnyerte az orvostudományi Nobel-díjat.

Az első sikeres IVF kezelések óta a kutatások, fejlesztések igen szerteágazók, az in vitro fertilizációs kezelések minden részfolyamatára kiterjednek. Jelen tanulmányunkban az embriológiai laboratóriumi munka négy fontos területén végeztünk vizsgálatokat.

A petesejték 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. A másik, intracitoplazmatikus spermiuminjekciónak (ICSI) nevezett technikát eredetileg súlyos fokú andrológiai meddőség kezelésére fejlesztették ki. Lényege, hogy a 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. Jóllehet e módszer végzésének egészségügyi kockázatai a hagyományos IVF kezeléssel összevetve magasabbak, világszerte nagy

arányban alkalmazzák, a kezelések kétharmadában a petesejtek megtermékenyítését ICSI technikával végzik.

Humán embriók szervezeten kívüli tenyésztése – már csak a folyamat hossza miatt is – kulcsfontosságú tényező a szervezeten kívüli megtermékenyítéssel végzett meddőségi kezelések folyamatában. Igen lényeges, hogy megfelelő tenyésztési körülményeket biztosítsunk, mivel azok hatással vannak az embriók életképességére. Az *in vitro* tenyésztés körülményeit többféleképpen befolyásolhatjuk, például különböző összetételű és fajtájú tápoldatok, eltérő típusú inkubátorok alkalmazásával, vagy a tenyésztés módszerének megválasztásával, mint az embriók egyedileg vagy csoportosan történő tenyésztése. Egyedi tenyésztés során az embriók külön-külön tápoldatcseppbe kerülnek. Ilyenkor megváltoztathatják mikrokozmoszukat saját egyedi igényeiknek megfelelően autokrin jelátvitellel. A módszer fontos előnye, hogy lehetővé teszi a petesejtek és embriók egyedi azonosítását, ezáltal fejlődésük nyomon követhető. A mikrovájatokat tartalmazó tenyésztőedények megjelenésével azonban az egyedi nyomon követés csoportos embriótenyésztés esetén is lehetővé vált. Ez utóbbi technika előnye lehet az embriók közötti parakrin kommunikáció, amely pozitív faktorok felhalmozódásával segítheti fejlődésüket. Ugyanakkor, az embriotoxikus anyagok vagy más kedvezőtlen faktorok embriók körüli akkumulációja hátrálthatja is azok fejlődését.

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.

A beültetésre kerülő embriókon túl gyakran rendelkezésre állnak olyan embriók is, amelyek életképessége megfelelő lehet ahhoz, hogy beágyazódjanak és terhességet hozzanak létre. Az embriók mélyfagyasztásának, fagyasztva tárolásának, majd felolvasztásának (krioprezerváció) és későbbi beültetésének számos előnye van. Ilyen kezelés végzése esetén nincs szükség újabb petefészekstimulációra, és a kumulatív, azaz a páciens összes kezelésére vonatkoztatott terhességi arány is magasabb lehet, miközben bonyolult és költséges laboratóriumi módszerekre sincs szükség. 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 hűtik a megfelelő hőmérsékletre. A programozott lassú fagyasztást mára egyre több helyen váltja fel az ultragyors fagyasztás, a vitrifikáció, amelynek eredményeképpen az embrió sejteinek víztartalma üvegszerű állapotba kerül. Ehhez az embriókat rövid ideig magas koncentrációjú fagyvédő oldatba teszik, majd közvetlenül folyékony nitrogénbe merítik. A vitrifikáció nem igényel költséges felszerelést és sokkal rövidebb időt vesz igénybe, mint a hagyományos fagyasztás. Kezdetben az embriókat valamilyen kisméretű, gyorsan 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, biztonságosabb és egyszerűbb megoldást jelent a zárt rendszerű vitrifikáció, amelynek során a hordozó és az azon lévő embriók nem érintkeznek közvetlenül a folyékony nitrogénnel. Hátránya ugyanakkor, hogy alkalmazásával a hűtési sebesség jelentősen csökken, amely hatással lehet az embriók túlélésére is.

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. Elterjedtek olyan értékek, illetve jelenségek nyomon követése, amelyek utalhatnak a kezelések eredményességére, illetve jelezhetnek bizonyos problémákat. Klasszikusan ilyen indikátorok például az érett petesejtek aránya, megtermékenyülési arányok, jó minőségű embriók aránya. További indikátor lehet az IVF kezeléseknél szórványosan előforduló úgynevezett óriás petesejtek, melyek citoplazmájának térfogata nagyjából a normális petesejtek duplája. Ilyen petesejtek jelenléte jelezheti a petefészkek hormonális stimulációjának hatékonyságát és utalhat a beteg többi petesejtjének minőségére.

## **Célkitűzések**

A meddőség kezelésben szerteágazó fejlesztések, újítások zajlanak, melyek a klinikai embriológia valamennyi területére kiterjednek. Egyetemi klinikaként feladatunk a lehető legtöbb, legfontosabb irányokban történő kutatások eredményeinek nyomon követése, jóllehet minden új irányzat és módszer kipróbálása, valamint vizsgálata nem áll módunkban. Dolgozatomban 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 kezeléseket 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.

## Módszerek

A hagyományos IVF kezelés és az intracitoplazmatikus spermiuminjekció eredményességének összehasonlításához 1132 IVF kezelés adatait értékeltük retrospektív módon, melyeket 2009. és 2014. között végeztünk. 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. Az SPI csoportba kerültek a <15 millió, az SPII csoportba a 15-30 millió, az SPIII csoportba a  $\geq 30$  millió progresszív spermiumot tartalmazó minták felhasználásával végzett kezelések. Az IVF ciklusokat a nőbetegek életkora szerint (ÉK1:  $\leq 31$ , ÉK2: 32-36, ÉK3: 37-40, ÉK4:  $\geq 41$ ), valamint a nyert petesejtek száma szerint is osztályoztuk (PS1: 1-3, PS2: 4-6, PS3: 7-9, PS4:  $\geq 10$ ).

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 másik csoport embrióit csoportosan, mikrovájatokat tartalmazó Petri-csészében (Csoportos csoport). A randomizációt a petesejtnyerést követően számítógépes program végezte.

Az embriódenzitás embriók életképességére gyakorolt hatásának vizsgálatát a csoportosan tenyésztett embriók adatainak retrospektív értékelésével végeztük. 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 $\mu$ l) és az osztódott embriók hányadosaként számítottuk. Három különböző csoportot különítettünk el attól függően, hogy egy edényben hány embrió tenyésztettünk együtt: ED1: 2-4 embrió (denzitás: 6,3-12,5  $\mu$ l), ED2: 5-6 embrió (denzitás: 4,2-5,0  $\mu$ l), ED3: 7-9 embrió (denzitás: 2,8-3,6  $\mu$ l).

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.

A vizsgált Krio-ET kezeléseket a fagyasztás módja szerint vizsgáltuk. Vizsgálatunk során Hagyományos csoportként utalunk azokra a ciklusokra, amelyekben programozott lassú fagyasztást alkalmaztunk, Vitrifikáció csoportként) pedig azokra a ciklusokra, ahol az embriókat vitrifikáció módszerével krioprezerváltuk. Megvizsgáltuk a különböző módszerekkel fagyasztott embriók felolvasztás utáni túlélését. Az általánosan elfogadott gyakorlat szerint akkor tekintünk túléltnek egy embrió, ha sejtjeinek legalább 50 %-a sértetlen maradt a felolvasztás után. A két technika hatékonyságának jobb összevetése érdekében a 80%-os és 100 %-os túlélést is megvizsgáltuk a felolvasztást követően.

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 petesejt 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. A vizsgálatok eredményeinek ismeretében párosított tesztet is 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.

## **Eredmények**

### **A hagyományos IVF és ICSI kezelések összehasonlításának eredményei**

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 (I. Táblázat). Az SPII csoportban nem volt különbség a megtermékenyülési arányokban a két módszer között egyik korcsoportban 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.

**I. Táblázat** Megtermékenyülési arányok

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

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 kezelések 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 kezelések ugyancsak magasabb élveszülési arányt eredményeztek, mint az ICSI-vel történő megtermékenyítés (39,8% vs. 21,7%;  $p < 0,01$ ).

### **A csoportos tenyésztés vizsgálatának eredményei**

A tenyésztés módjának vizsgálatát 532 IVF ciklus (Csoportos: 264 vs. Egyedi: 268) bevonásával végeztük. 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%;  $p < 0,01$ ). Az embriók morfológiai pontértéke, valamint fragmentáltsága sem különbözött a két tenyésztési mód esetén sem a megtermékenyítést követő második, sem a harmadik napon. Az embriók átlagos sejtszáma magasabbnak bizonyult csoportos tenyésztés esetén a második ( $4,1 \pm 1,4$  vs.  $4,0 \pm 1,3$ ;  $p = 0,038$ ) és harmadik napon is ( $7,0 \pm 2,2$  vs.  $6,7 \pm 2,3$ ;

$p=0,013$ ). Nem volt különbség a jó minőségű embriók arányában sem a két módszer között sem a második, sem a harmadik napon.

Jóllehet a beültetett embriók átlagos mennyisége megegyezett a két csoportban ( $2,1\pm 0,9$  vs.  $2,1\pm 0,9$ ;  $p=0,665$ ), 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.

### **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:  $n=481$ ).

A megtermékenyítést követő 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.  $24,7\%$ ;  $p=0,043$ ).

A harmadik napon az embriók átlagos sejtszáma magasabb volt az ED2 csoportban ( $7,3\pm 2,1$ ;  $p=0,004$ ) összehasonlítva az ED1 ( $6,8\pm 2,2$ ;  $p<0,01$ ) illetve az ED3 ( $7,0\pm 2,0$ ;  $p=0,014$ ) csoportokkal. Az embriók átlagos morfológiai pontértéke ugyancsak magasabb volt az ED2 csoportban ( $2,3\pm 0,7$ ), mint az ED1 csoportban ( $2,1\pm 0,7$ ;  $p=0,021$ ), nem különbözött azonban az ED3 csoportban tapasztalható értéktől ( $2,2\pm 0,6$ ;  $p=0,474$ ). Nem mutatkozott szignifikáns eltérés az embriók fragmentáltsága között sem az ED2 és ED3 csoportokban ( $14,7\pm 10,4\%$  vs.  $14,2\pm 9,4\%$ ;  $p=0,768$ ), 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%;  $p=0,023$ ).

### **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.

Az embriók hagyományosan vizsgált 50%-os túlélése 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.  $57,2\%$ ;  $p<0,001$ ).

A lefagyasztott embriók minősége nem volt azonos a két csoportban. 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.

Fentiek miatt elvégeztük a felolvasztott embriók minőségének összehasonlítását úgy is, hogy csak a 7-12 sejtes embriók adatait vettük figyelembe, ezzel kiküszöbölve az eltérő kiindulási paramétereket. 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.

Szignifikáns különbség mutatkozott a beültetett embriók számának felolvasztott embriók számához viszonyított arányában. Míg hagyományos fagyasztás-felolvasztás esetén ez az arány 29,6% volt, addig vitrifikációt

követően szignifikánsan magasabb, 39,4% ( $p=0,012$ ). Vitifikációval 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%;  $p=1,000$ ).

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 antagonisták 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 ( $12,7\pm$  vs.  $8,1\pm 5,1$ ;  $p<0,01$ ) 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%;  $p=1,00$ ).

A megtermékenyítést követő 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.

A párosított ciklusok esetében 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 ( $7,0\pm 1,8$  vs.  $7,8\pm 1,6$ ;  $p=0,03$ ).

## **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 élnek 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

vitifikáció utáni embrióbeültetést követő beágyazódási és terhességi arány kedvezőbb tendenciát mutat, azonban mégis 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.



## Saját publikációk jegyzéke

### A doktori 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 kezeléseik 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) kezeléseik eredményeinek összehasonlítása az ondóminta minőségének függvényében. Magy Nőorv L, 78(6): 310-318.

### 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.

**Tudományos közlemények:**

Közlemények: 7 (IF: 5,483)

Nemzetközi folyóiratban: 3

Magyar nyelvű folyóiratban: 4

Idézhető absztraktok: 15