

Dr. Urbancsek János és Dr. Fancsovits Péter

Állatokon végzett első sikeres in vitro fertilizációról több mint száz évvel ezelőtt Bécsben számoltak be: 1880-ban Schenknek sikerült nyúl és tengerimalac petesejtjeit in vitro megtermékenyítenie, sőt a megtermékenyített petesejtek további osztódását is megfigyelnie. Több mint fél évszázad telt el addig, míg az első kísérleteket emberi petesejteken a negyvenes évek elején elvégezheték.

Az első sikeres, terhességet eredményező szervezeten kívüli megtermékenyítést emberen Ausztráliában végezték: a terhesség azonban korai vetéléssel végződött. 1978 nyarán Patrick Christopher Steptoe (1913–1988) angol nőgyógyász és Robert Geoffrey Edwards (1925–2013) embriológus rövid beszámoló formájában adták hírül a *Nature* című folyóiratban, hogy 1978. jú-



28-1. ábra. Patrick C. Steptoe angol szülész-nőgyógyász



28-2. ábra. Robert G. Edwards előadást tart a Baross utcai Női Klinikán tantermében (Budapest, 1996. október 18.)

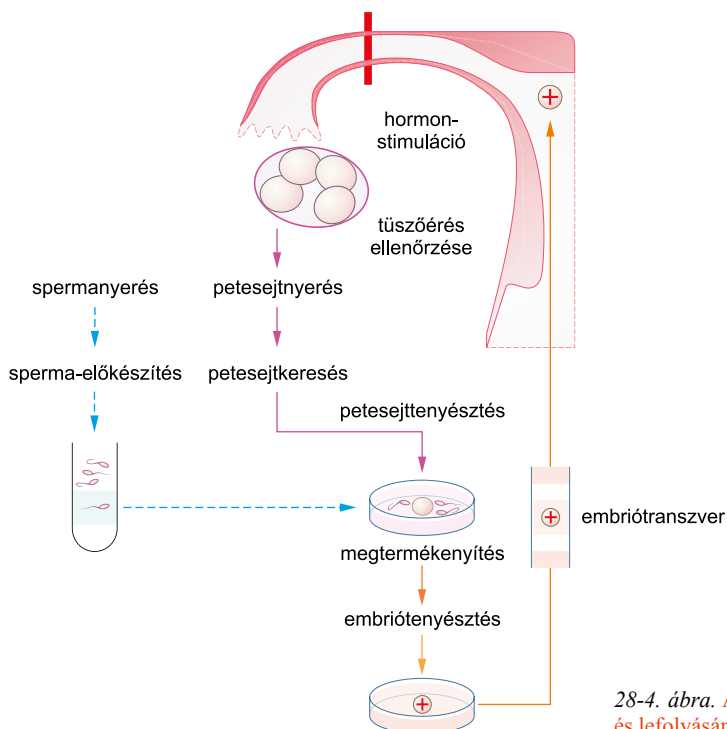


lius 25-én Angliában megszületett az első, szervezeten kívüli megtermékenyítés útján fogant gyermek, az első „lombikbébi”. Egyébként kezdeti kísérleteik egyike még 1976-ban méhen kívüli terhességhez vezetett. Kiemelést érdemel Howard Wilbur Jones (1910–2015) úttörő munkássága, akinek a laboratóriumában az 1960-as években Edwards dr. is dolgozott. Nagy megtiszteltetés volt számunkra, hogy mind Edwards, mind Jones professzor meglátogatta a Klinikánkat (28-1. ábra, 28-2. ábra és 28-3. ábra).

Az elmúlt csaknem négy évtizedben világszerte több mint 5 millió gyermek született, akik létüket ennek a módszernek köszönhetik. A petesejt hím ivarsejttel történő, szervezeten kívüli megtermékenyítését in vitro fertilizációnak (IVF), a megtermékenyített petesejtből fejlődő embrió méhürbe történő beültetését embrió-



28-3. ábra. Howard W. Jones látogatása a Baross utcai Női Klinikán 1992. október 26-án. Balról jobbra Thomas Rabe, Georgeanna Jones, Brigitte Hauff, Lucinda Veeck, Howard W. Jones és Urbancsek János



28-4. ábra. Az in vitro fertilizáció és embriótranszfer elvének és lefolyásának összefoglalása

transzfernek (ET) nevezzük (28-4. ábra). Ezen kezelési eljárás bevezetésével az elmúlt évtizedekben nemcsak számos olyan meddő házaspár gyermek utáni vágya teljesült, akik e módszer nélkül gyermekalkásban sosem részesültek volna, hanem a reprodukív orvostudomány és biológia is számtalan új ismerettel gyarapodott.

A szervezeten kívüli megtermékenyítés javallatai

Az in vitro fertilizáció és embriótranszfer kezelést a női meddőség azon formája hívta életre, melyben az ivarsejtek szervezeten belüli találkozását vagy a méhkürtök operatív úton nem megoldható lezártsága vagy azoknak a hiánya akadályozza. Ez a „klasszikus” indikáció képezte a kezelés alapját a világon az első szervezeten kívül fogant gyermek születésekor is 1978-ban. Az ún. kürt eredetű meddőség magában foglalja a kürtök hiányát vagy elzáródását méhen kívüli terhesség miatt végzett salpingectomia, postoperatív vagy gyulladás utáni összenövés következményeként. Felismerésében a hysterosalpingographia vagy a laparoscopia során végzett chromopertubatio jelentik a legmegbízhatóbb segítséget.

A súlyos andrológiai eredetű meddőség képezi az in vitro fertilizációs kezelések második javallati csoportját. Annak ellenére, hogy a petesejt in vitro megtermékenyítéséhez csak 10 000–100 000 mozgó spermiumra van szükség, az andrológiai meddőség „hagyományos” in vitro fertilizáció útján történő kezelésétől akkor remélhetünk eredményt, ha a sperma előkészítése után legalább 500

000 jó mozgékonyaságú és normál morfológiájú hímivarsejt áll rendelkezésre a megtermékenyítéshez. Az esetek egyre növekvő részében azonban a sperma feldolgozása után sem biztosítható ilyen mennyiségű hímivarsejt. Ilyenkor egyetlen spermiumnak a petesejt plazmájába való fecskendezésével (Intracytoplasmatic Spermium Injection, ICSI) érhető el megtermékenyülés, illetve terhesség. A módszer 1992 óta áll rendelkezésünkre.

Az in vitro fertilizáció az úgynevezett idiopathiás, azaz ismeretlen eredetű meddőség bizonyos eseteiben is sikerrel alkalmazható. Ilyenről akkor beszélhetünk, ha a reprodukív működés kimutatható zavara nélkül 2 év próbálkozás után sem jön létre terhesség. Ez a javallat csak mint relatív javallat szerepel és csak akkor fogadható el, ha már minden egyéb kezelési próbálkozást kimerítettünk (például ovulációindukciós kezelés után, előkészített spermával megfelelő időben végrehajtott intrauterin inszemináció hatszori próbálkozás ellenére sem vezetett eredményre). Ha az ilyenkor elvégzett in vitro fertilizáció során (diagnosztikus IVF) megtermékenyülés létrejön, akkor további intrauterin inszeminációkat végezhetünk, esetleg az IVF próbálkozásokat tovább folytathatjuk. Itt kell megemlíteni az immunológiai eredetű meddőséget mint az in vitro fertilizáció újabb relatív indikációját is.

A szervezeten kívüli megtermékenyítés negyedik fő javallati területét az endometriosis szövődményű meddőség alkotja. Ennek I–II. stádiumát is csak relatív indikációnak tekinthetjük, és csak akkor végezhetünk miatta IVF-ET kezelést, ha már a gyógyszeres, esetleg műtéti

kezelés lehetőségeit kimerítettük. A III. illetve IV. stádiumú endometriosisal, valamint az ún. „mélyen infiltráló endometriosisal” szövődött meddőségi esetekben a körkép az IVF kezelés abszolút javallatát képezi. A képet az is bonyolítja, hogy a petevezetékek elzáródását okozó kürt- vagy súlyos összenövésekhez vezető kismencedei endometriosis eseteitől eltekintve nem tudjuk, hogy a betegség milyen úton vezet a reprodukív funkció zavarához.

A szervezeten kívüli megtermékenyítés orvosi feltételei

Az in vitro fertilizációs kezelés végzésének alapvető feltétele a fent felsorolt javallatok valamelyikének a megléte. Fontos feltétel még, hogy a nő reprodukív korban legyen. Az életkor megadása nem minden esetben fedí a nő „reprodukív korát”. Ez utóbbinak meghatározására megbízhatóbb a spontán menstruációs ciklus harmadik napján mért (basalis) szérum FSH-koncentráció meghatározása: 25 NE/l feletti szérum FSH-szint esetén a sikertelen stimulációk száma ugrásszerűen emelkedik, a terhességi arány a nullát közelíti. Úgy tűnik azonban, hogy az AMH (Anti Müllerian Hormone) meghatározása fogja a jövőben átvenni az FSH-meghatározás fenti szerepét, amennyiben megbízható, egymással összehasonlítható eredményt adó és olcsó hormonmeghatározó kitek állnak majd rendelkezésünkre.

A férfpartner részéről a „minimum” spermogrammon túlmenően lényeges feltétel a sperma bakteriológiai vizsgálata, pozitív esetben az antibiotikum-kezelés. Alapvető szabály, hogy in vitro fertilizációs kezelés megkezdése előtt a spermaminőség javításának minden lehetőségét (a férj antibiotikus kezelése, legmegfelelőbb spermaelőkészítési mód kiválasztása) meg kell próbálni.

A házaspár in vitro fertilizációs programba való felvételét minden esetben egy részletes konzultációnak kell megelőznie, melyen a kezelőorvos az anamnézis és a már elvégzett vizsgálatok eredményeinek birtokában a házaspárt részletesen tájékoztatja az in vitro fertilizációs kezelés sikerének az adott estre vonatkozó esélyéről, az esetleges alternatív kezelési lehetőségekről, valamint a lehetséges szövődményekről. A házaspár mindkét tagjának HIV- és hepatitisz-vizsgálaton kell részt vennie: fertőzőképességet igazoló pozitív eredmény esetén nem nyerhetnek felvételt a programba, mivel a fertőzésnek az újszülötthez való átvitele, valamint a kezelőszemélyzet és a betegtársak megfertőzésének veszélye a testfolyadékokkal való manipuláció során nem zárható ki teljes biztonsággal.

A szervezeten kívüli megtermékenyítés laboratóriumi feltételei

A szervezeten kívüli megtermékenyítés laboratóriumi lépései az asszisztált reprodukív vagy embriológiai laboratóriumban zajlanak. Itt történik többek között a pe-

tesejtek azonosítása és összegyűjtése a tüszőpunctio során nyert tüszőfolyadékából, az ondóminta vizsgálata és előkészítése, a petesejtek megtermékenyítése, a létrejött embriók tenyésztése, az embriók kiválasztása és előkészítése a beültetéshez, valamint a beültetésre nem kerülő embriók mélyfagyasztása. Ezen folyamatok összességét *klinikai embriológiának* nevezzük, amely magas szintű és naprakész szakmai felkészültséget, korszerű laboratóriumi háttérrel és szigorú minőségbiztosítást igényel.

Az embriológiai laboratóriumban rendelkezésre kell állnia minden olyan eszköznek, amely biztosítja az IVF kezelés biztonságos lefolytatását. A petesejtek és embriók tenyésztése során az optimális környezet előállításához szabályozott gázösszetételt is biztosító inkubátorok szükségesek. Az ivarsejtek azonosításához, az embriók fejlődésének nyomon követéséhez, valamint a mikromanipulációs eljárásokhoz megfelelő mikroszkópokra, illetve mikromanipulátorra van szükség. A petesejtek és embriók inkubátoron kívüli vizsgálatait, valamint manipulálása során fűtött munkafelületeket kell biztosítani. A tenyésztőedények és szövetenyésztő oldatok kezeléséhez megfelelő sterilitást biztosító fülkére van szükség. Az embriológiai laboratóriumnak rendelkeznie kell ivarsejtek és embriók mélyfagyasztásához és fagyasztva tárolásához szükséges készülékekkel. Biztosítani kell továbbá a kezelések szempontjából alapvető készülékek folyamatos és precíz működését, a váratlan meghibásodások esetére pedig megfelelő riasztórendszernek és lehetőség szerint tartalék készülékeknek kell rendelkezésre állnia.

Minden olyan oldatnak és eszköznek, amely közvetlen kapcsolatba kerül az ivarsejtekkel vagy embriókkal, sterilnek és az embriófejlődést károsító (embriotoxikus) anyagoktól mentesnek kell lennie. Az embriológiai laboratóriumban kiemelt figyelmet kell fordítani a levegő minőségére, ami nem csak a levegő kórokozók elleni szűrését, hanem az illékony szerves vegyületek és egyéb, embriófejlődést károsító ágensek eliminálását is jelenti. A laboratóriumi munka során a kezelés kezdetétől a végéig biztosítani kell az ivarsejtek és embriók egyértelmű azonosítását és biztonságos kezelését.

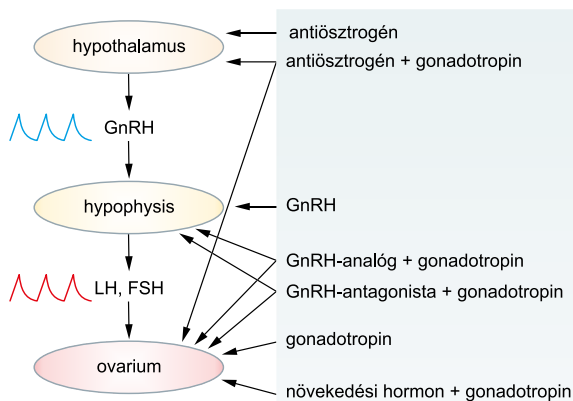
Célszerű az embriológiai laboratórium működését jelző sarkszámokat (pl. a megtermékenyülési arány, a terhességi arány) folyamatosan ellenőrizni és összevetni azokat az intézet saját korábbi eredményeivel, valamint a nemzetközi adatbázisokban közzétett standard értékekkel.

Hormonstimuláció

Az első „lombikbábik” előzetes hormonkezelés nélkül, spontán ciklusok során nyert petesejt in vitro megtermékenyítése után létrejött terhességekből születtek. A későbbiekben azonban az in vitro fertilizáció úttörői

az eljárás sikerességének növelésére a petefészkek hormonstimulálásával egyidejűleg több petesejt fejlődését, illetve megtermékenyítését, majd pedig több embrió méhürbe történő beültetését tűzték célul. A cél tehát az volt és maradt az IVF kezeléseknél ma is, hogy szemben a spontán menstruációs ciklus során megfigyelhető egyetlen domináns tüsző kiválasztódásával, majd növekedésével egy adott ciklus alatt több domináns tüsző kiválasztódását, illetve fejlődését biztosítsuk.

A hormonstimuláció mechanizmusa. A spontán ciklus domináns tüszőjének kiválasztódása Baird (1987) elmélete szerint a következőképpen magyarázható: a növekedésnek indult antrális tüszők közül csak az képes dominánssá válni, mely a korai tüszőfázisban fellépő szérumszerű FSH-szint emelkedés idejéig egy bizonyos nagyságot és érettséget már elért. Ezt az emelkedett szérumszerű FSH-szinttel járó időszakot nevezi Baird „FSH-kapu”-nak. Csak ez az antrális tüsző lesz képes ugyanis az FSH-kapun „átlépni” és domináns tüszővé válva tovább fejlődni. A domináns tüsző kiválasztódásának Baird szerinti elmélete alapján két lehetőség adódik annak biztosítására, hogy egyszerre több tüsző váljon dominánssá és fejlődjen tovább. Az egyik, hogy a kis, 24 mm átmérőjű egymással szinkron növekvő antrális tüszők számát emeljük. Mivel az antrális stádiumot elérő tüszők mennyisége az emberben genetikailag determinált, ez a lehetőség nem megvalósítható. A másik megoldást az jelenti, hogy azt az időszakot, melyben a szérumszerű FSH-szint emelkedett, megnyújtjuk, azaz Baird szemléletes megfogalmazása szerint az FSH-kaput kiszélesítjük. Ekkor ugyanis több antrális tüsző érheti el a dominánssá váláshoz szükséges nagyságot és érettséget és juthat át a kiszélesített FSH-kapun.



28-5. ábra. A különböző hormonstimulációs kezelések támaszpontja a hypothalamus-hypophysis-ovarium tengelyen

Mindezek alapján multiplex tüszőnövekedést emberen úgy érhetünk el, ha a korai tüszőfázis alatt az emelkedett szérumszerű FSH-szintet hosszabb ideig fenntartjuk. Ez pedig az endogén FSH-felzabulás fokozásával, illetve exogén FSH adásával lehetséges. Az alábbiakban azokat a lehetőségeket foglaljuk össze, melyek a hypothalamus-hypophysis-ovarium tengely különböző pontján hatva a korai tüszőfázis szérumszerű FSH-szintjét tartósan emeli és így multiplex tüszőnövekedést eredményez (28-5. ábra).

Stimuláció antiösztrógenel. Az ovulációindukció céljára legrégebben és legelterjedtebben alkalmazott készítmény a clomiphene citrate (klomifencitrát), mely a ciklus 37. vagy 59. napja között napi 50150 mg-os adagban kerül alkalmazásra. Hatásmechanizmusa főként abban áll, hogy a hypothalamikus ösztrogén receptorokra kötődve gátolja, hogy az ösztrogének negatív feedback hatásukat kifejtsék. A gátlás gátlása fokozott GnRH felzabadáshoz vezet, ez pedig az FSH-felzabulás növekedését eredményezi. A klomifencitrát dózisfüggő antiösztrógen hatása az endometrium fejlődését és a sárgatestműködést egyaránt kedvezőtlenül befolyásolja. A nyert petesejtek alacsonyabb száma mellett valószínű ez is szerepet játszik a klomifencitrát kezelés során megfigyelhető viszonylag alacsony implantációs és terhességi arányban in vitro fertilizáció esetén. Mindezek miatt a tiszta klomifencitrát kezelést napjainkban kevesen alkalmazzák in vitro fertilizációs kezelés során, de a felsorolt hátrányok kiküszöbölhetőek a klomifencitrát kezelésnek gonadotropinokkal való kombinálásával.

Stimuláció gonadotropinokkal. A gonadotropinokat több mint ötven éve alkalmazzák meddő nőbetegek hormonstimulálására. A kezelés célja itt is a petefészkek kontrollált túlstimulálása. Az exogén FSH adása (akár hMG, akár tiszta FSH formájában) a szérumszerű FSH-szint emelkedését és ezáltal multiplex tüszőnövekedést eredményez. A gonadotropinok tüszőfázis alatti adása a sárgatestműködést is javítja.

Mivel a domináns folliculus kiválasztódása a ciklus 5. és 7. napja között zajlik le, a kezelést megelőzően, a 3. ciklusnapon kezdődik, amikor még elég korán van ahhoz, hogy ne csak egy, hanem több tüsző folytathassa fejlődését, dominánssá válva az ovuláció eléréseig. Az exogén hMG FSH komponense felelős azért, hogy nem csak egy, hanem több tüsző lép az ovulációig tartó fejlődés útjára. A folliculusnövekedés kezdeti szakában az exogén FSH fokozza a granulosa-sejtek ösztrogéntermelését, s ez megakadályozza egy androgénben viszonylag gazdag hormonális környezet kialakulását, s ezzel a ciklus elején növekedésnek indult tüszők sorvadását. Az FSH emellett bizonyos mértékben fokozza a növekvő folliculusok inhibítermelését is, mely célja a rendszer

védelve a túl erős hyperstimulációtól. Általánosan elfogadott, hogy a gonadotropin stimulációra a betegek egyénenként eltérően reagálnak. Ezért a kezeléseket egyénre szabott protokollokkal, rugalmasan kell végrehajtani. Mégis a stimulációk két fő csoportját különíthetjük el: az úgynevezett norfolki séma egy „alacsony dóziszú, csökkenő” stimulációt jelent (36. ciklusnap napi két ampulla [75 NE/ampulla] gonadotropin, ezt követően, két nappal a tervezett ovulációindukció előtti napig napi egy, esetleg két ampulla). A másik, az úgynevezett bonni séma egy „nagy dóziszú, emelkedő” stimulációt jelent (36. ciklusnap reggel és este egy-egy ampulla, a 7. ciklusnaptól az ovulációindukciót megelőző napig három ampulla gonadotropin naponta).

Jóllehet korábban a tiszta FSH-készítményt elsősorban a PCO-szindrómás vagy a kórosan magas szérumszintű meddő nők multiplex folliculusnövekedésének indukálására alkalmazták, napjainkban döntően ezeket a gonadotropin készítményeket használjuk rutinszerűen. A tiszta FSH-kezelésnél az LH/FSH arány optimalizálása révén a tüszőfolyadékban létrejövő kedvező ösztrogén/androgén egyensúly a tüszőnövekedés, illetve petesejtfejlődés számára kedvezőbb környezetet biztosít, melyben normális, megtermékenyítésre alkalmas petesejtek fejlődhetnek. A betegek a 3. ciklusnaptól naponta 2-3 ampulla FSH-t (75 NE ampullánként) kapnak, a 79. ciklusnaptól kezdve az ovarialis választól függően ez az adag tovább emelhető. PCO-szindrómás betegek esetén a kezelést célszerű napi 1 ampullával kezdeni és ezt az adagot akár 23 héten át fenntartani mindaddig, amíg jelentős ösztadiolszint-emelkedés nem igazolható.

Az eddig felsorolt hagyományos, vizeletből kivont FSH (és HMG) készítmények ritkán ugyan, de kellemetlen reakciókat (pl. urticaria) válthatnak ki, melyek a készítmények viszonylag magas kísérő fehérjetartalmával kapcsolatosak. A 150 NE/mg fehérje specifikus aktivitású „hagyományos” vizelet gonadotropin FSH mellett napjainkban egyre terjed a >9000 NE/mg fehérjespecifikus aktivitású ún. HP (highly purified)-FSH vagy hMG-készítmény is, mely szemben a hagyományos FSH-készítmény 3%-os tisztaságával, 95%-os tisztasággal rendelkezik és ennek köszönhetően a betegek számára kedvezőbb subcutan úton is adható.

A gyakorlatilag 100%-os tisztaságúnak tekinthető, rekombináns DNS-technológiával baktériumokban, egér fibroblaszt-, hőrscsőg vesesejtvonalban stb. előállított új FSH-, illetve LH-készítmény, az rFSH, illetve rLH is bővíti a gonadotropin készítmények sorát. Az első, rFSH-val végzett stimulációt követően szervezeten kívül fogant magzat születéséről 1992-ben számoltak be.

Stimuláció antiösztrogén és gonadotropin kombinációjával. A kombinált klomiféncitrát és gonadotropinkezelés során a szérumszintű FSH-koncentráció részben

az antiösztrogén által indukált hypophysealis FSH-felszabadulás fokozódása, részben pedig az exogén FSH adása révén emelkedik. A kezelés során a betegek 5 napon keresztül 100 mg klomiféncitrátot kapnak a 25. ciklusnaptól kezdve. Az ún. „szimultán” kombinált kezelés során ezzel egyidejűleg, majd később önmagában napi 1-2 ampulla gonadotropint is adunk. A „szekvenciális” kombinált kezelés esetében az 5 napos klomiféncitrát kezelést követően adjuk a gonadotropint, napi 1-2 ampulla mennyiségben.

A klasszikus stimulációs sémák értékelése. A felsemelt klasszikus stimulációs sémák közös hátránya, hogy az ovarialis válasz időben előre nem jósolható meg, valamint az, hogy a reakció erőssége rendkívül különböző lehet (gyenge, normális vagy fokozott válaszkapacitás). További hátrány, hogy változó számú és érettségi fokú tüsző fejlődik, és mindenekelőtt, hogy egy idő előtti (a tervezett ovulációindukció idejéhez viszonyítva) LH-emelkedés vagy -csúcs léphet fel.

Az idő előtti LH-felszabadulás és az azt követő luteinizáció jelentik az ép hypothalamus-hypophysis-ovarium működésű betegek fent részletezett klasszikus stimulációs kezelése során gyakran fellépő nemkívánt endocrin reakciókat. Megfigyelték, hogy a hypothalamus-hypophysis-ovarium rendszer sérült működése miatti petefészek-elégtelenségben szenvedő betegek (a WHO I-es csoport) gonadotropin kezelése során jobb terhességi arány érhető el, mint a normogonadotrop petefészek-elégtelenségben szenvedő társaiknál (a WHO II-es csoport). Ez a felismerés vezette *Fleming* és munkatársait (1982) arra, hogy GnRH-analóg készítménnyel végrehajtott szelektív gonadotropingátlással a meddő nőt hypogonadotrop állapotba hozzák, és csak ezután kezdjék el a hagyományos gonadotropin stimulációt.

Stimuláció GnRH-agonista analóg és gonadotropin kombinációjával. Míg a GnRH pulzatorikus adagolásban a hypophysealis gonadotropin-szintézist és -felszabadulást serkenti, a hormonnak vagy agonista analógnak folyamatos adagolása (tartós infúzió) kezdeti gonadotropin felszabadulás után a hypophysealis gonadotropinok (főleg LH) reverzibilis gátlásához és ezáltal a petefészek-működés nyugalomba helyezéséhez vezet emlőszöveteken és emberen egyaránt. A gonadotropinok fokozott kezdeti felszabadulását a hypophysealis GnRH receptorok deszenzibilizálódása (down regulation) követi, mely a hypophysealis LH- és FSH-szekréció gátlásához vezet.

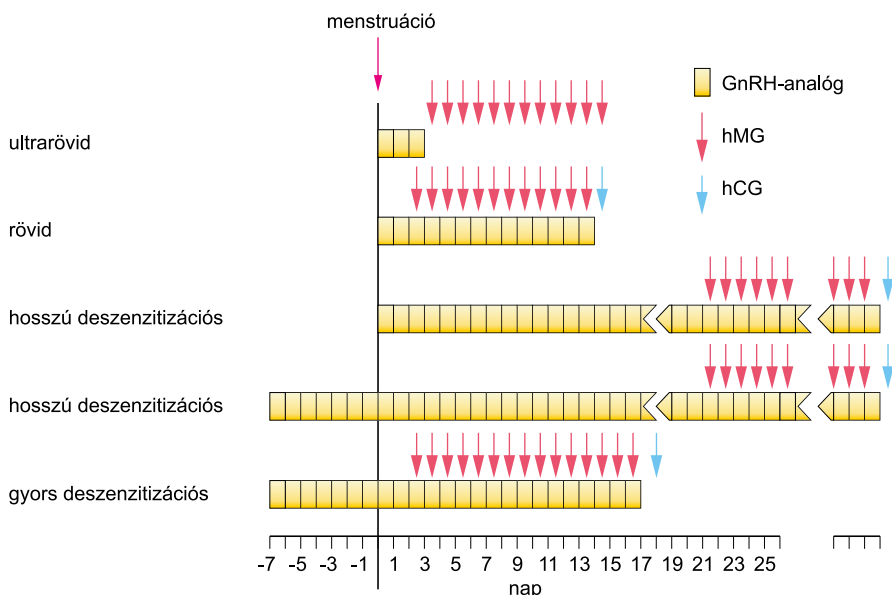
A GnRH-agonista analógok a GnRH decapeptid molekula kémiai modifikációjával előállított vegyületek. A molekulán végzett manipuláció egyrészt erősíti a vegyületnek a hypophysealis receptorokhoz való affinitását, másrészt gátolja azokat a proteolitikus enzimeket,

melyek a természetes GnRH gyors lebontásáért felelősek. A GnRH-agonista analóg vegyületek e két fontos sajátjának köszönhető, hogy hatásuk a természetes decapeptid hatását többszörösen felülmúlja és hogy a készítmény a napi 4-6-szori (nem folyamatos) alkalmazása ellenére mégis folyamatos hatást fejthet ki receptoraira.

A kombinált GnRH-analóg és gonadotropin kezelésnek négy formája ismert: „ultrarövid”, „rövid”, „hosszú deszenzitizációs” és „gyors deszenzitizációs” protokoll (28-6. ábra). Az „ultrarövid” és a „rövid” protokoll alkalmazása a GnRH-agonista analóg adásának kezdetén fellépő gonadotropinstimuláló hatáson („flare-up” effektus) alapul, mely egy-két napig tart és egyszerre több tüsző fejlődésének elindításához nyújt segítséget. A GnRH-agonista analógot ilyenkor a ciklus első napjától annak harmadik napjáig („ultrarövid” protokoll) vagy az ovulációindukció napjáig („rövid” protokoll) kapják a betegek. A gonadotropinstimuláció a ciklus harmadik napján kezdődik. A „hosszú deszenzitizációs” protokoll alkalmazása esetén a GnRH-agonista analógot a beteg valamelyik ciklusának első napjától vagy a sárgatestfázis közepétől 1014 napig, a gonadotropinfelzabulás kelendő mértékű gátlásának kialakulásáig adjuk. Csak ezután kezdődik a gonadotropinstimuláció a GnRH készítmény további adagolásának fenntartása mellett. Saját vizsgálataink eredménye szerint a sárgatestfázis közepén elkezdett GnRH-agonista analóg kezeléssel a hypophysis kellő mértékű gátlása gyorsabban érhető el, a megtermékenyülési, terhességi és születési arány magasabb, mint akkor, ha a GnRH-analóg adását az első ciklusnapon kezdjük. A rövid és a hosszú deszenzitizációs protokollokat összehasonlító prospektív, randomizált tanul-

mányok tanúsága szerint a „hosszú deszenzitizációs” protokoll jobbnak mondható, ha a tüszők fejlődését, a megtermékenyülési arányt, illetve az embriótranszferre alkalmas embriók számát vesszük figyelembe. A „gyors deszenzitizációs” protokoll azt jelenti, hogy a beteg a megelőző ciklusa sárgatestfázisának közepétől kapja a GnRH-agonista analógot és az azt követő ciklus 3. napjától kezdődően egészítjük ki a kezelést gonadotropin adásával. Ez utóbbi kezelési séma egyesíti magában a „rövid” és a „hosszú deszenzitizációs” protokoll előnyeit, mivel a megelőző sárgatestfázis közepén megkezdett GnRH-agonista analóg kezeléssel a hypophysis gonadotropin szekréciója gyorsan csökkenthető és egyúttal a tüszőfázis kezdetén fellépő fokozott gonadotropinfelzabulás elkerülhető a GnRH-analógnak csak viszonylag rövid ideig tartó alkalmazása ellenére.

Stimuláció GnRH-antagonista analóg és gonadotropin kombinációjával. A szintetikusan előállított GnRH-antagonista analógok segítségével az endogén LH- és FSH-felzabulás gátlása nagyon gyorsan (néhány órán belül) elérhető a GnRH-agonista analógok alkalmazásakor megfigyelhető kezdeti „flare-up” hatás fellépte nélkül. Így a kombinált GnRH-antagonista analóg és gonadotropin kezelés IVF programban való alkalmazásával a kezelés ideje szignifikánsan csökkenthető a kombinált GnRH-agonista analóg és gonadotropin kezelés időtartamához képest. A GnRH-antagonista analógok első két generációja azonban olyan erős, hisztamin-felzabulásban megnyilvánuló mellékhatással rendelkezik, hogy azok klinikai alkalmazása nem volt lehetséges. A harmadik generációs GnRH-antagonista



28-6. ábra. A kombinált GnRH-agonista analóg és gonadotropin kezelés alkalmazásának lehetséges módjai: az ultrarövid, rövid, hosszú és gyors deszenzitizációs protokollok

analóg készítmények mellékhatása azonban már olyan csekély, hogy azok emberi alkalmazása is lehetővé vált.

A kombinált GnRH-antagonista analógok alkalmazásával hasonló megtermékenyülési, illetve terhességi arány érhető el, mint a hagyományosnak mondható, hosszú protokoll szerinti kombinált GnRH-agonista analóg + gonadotropin stimulációval úgy, hogy közben a szükséges gonadotropin mennyisége és az OHSS-szindróma kialakulásának az esélye is kevesebb. Mindezeknek köszönhetően napjainkban egyre szélesebb körben kerül alkalmazásra ez a kombinált stimulációs forma, melynek során a korábban részletezett gonadotropinstimuláció megkezdése után – amikor az idő előtti LH-csúcs fellépének kockázata a mért szérum ösztradiolszint (400 pg/ml felett), illetve a növekedésnek indult tüszők átmérője (14 mm felett) alapján fennáll kezdjük csak eladni a GnRH-antagonista analóg készítményt. Ez utóbbit adhatjuk naponta egyetlen ampulla (0,25 mg) formájában az ovulációindukció napjáig („Lübeck” protokoll), vagy egyetlen ampulla depot készítményt (3 mg) a fenti feltételek teljesülése esetén („francia” protokoll).

Multiplex tüszőnövekedés biztosítását szolgáló egyéb stimulációk. A betegek egy szűk csoportjában nagy dóziszú (6-8 ampulla/nap) gonadotropin kezelés ellenére sem sikerül multiplex tüszőérést elérni. Ezen nőbetegeknél a petefészkek egy relatív rezisztenciája áll fenn gonadotropinokkal szemben, melyen a gonadotropinstimuláció növekedési hormonnal történő kiegészítése javíthat. A növekedési hormon hatásmechanizmusa ennél a kombinált kezelésnél még nem teljesen tisztázott, de feltételezhető, hogy a granulosa-sejtek és/vagy a májsejtek IGF (insulin-like growth factor) termelésének fokozásán keresztül fejti ki kedvező hatását a multiplex tüszőnövekedésre. Az IGF-I fokozza a granulosa-sejtek differenciálódását és azok FSH-függő aromataz-aktivitását.

A kombinált kezelés során a gonadotropinhormont kiegészítjük minden második nap alkalmazott 2024 NE szintetikus növekedési hormonnal egykét héten keresztül. Az ilyen kezelés előnye a sikeres stimuláción túlmenően, hogy a kezelés ideje megrövidülhet, és a szükséges gonadotropinmennyiség csökkenhet. Hátránya azonban, hogy a rekombináns DNS-technológiával előállított növekedési hormonkészítmények rendkívül drága gyógyszerek.

Rögzített stimulációs protokoll. Az úgynevezett „rögzített” stimulációs kezelések eredetileg azzal a céllal kerültek alkalmazásra, hogy segítségükkel előre megadott időben petesejteket nyerjenek kutatási célra önkéntesen jelentkezőktől. Később ezek a kezelési protokollak a klinikai in vitro fertilizációban is helyet kaptak. A rögzített protokoll alkalmazásakor a beteg

valamelyik ciklusa első napjától kezdve fogamzásgátló készítményt szed legalább 18 napon keresztül, majd azt egy keddi napon abbahagyja. Vérése ezt követően 27 nap múlva várható, de ettől függetlenül a beteg a következő vasárnaptól csütörtökig (5 napon keresztül) 100 mg klomifencitrátot szed naponta, kiegészítve 2 ampulla gonadotropin adásával kétnaponta. Az első kontrollvizsgálaton a következő vasárnap, tehát a stimulációs kezelés 8. napján jelentkezik az IVF-központban. Ettől kezdve a beteg további kezelése annak egyéni reakciójától függően történik. A rögzített protokoll előnye, hogy a kezelés a beteg és az IVF kezelést végző munkacsoport időbeosztásához igazítható, és hogy a protokoll rögzített volta miatt azt a kezelés elején az IVF-központtól független orvos is adhatja.

Az in vitro fertilizáció céljából végzett stimulációk javallatai. A multiplex tüszőnövekedés biztosítására alkalmazott kontrollált petefészkek-túlstimulálás az in vitro fertilizációs kezelések sikerességének egyik döntő meghatározója, jóllehet a terhességi arány számos egyéb faktor is befolyásolja. Nem tisztázott, hogy a hormonális stimulációhoz használt készítményeknek a petesejt érési folyamatát közvetlenül befolyásoló kedvezőtlen hatása vagy a petesejteket körülvevő hormonális milió megváltoztatása felelős a viszonylag alacsony (30%-os) terhességi arányért. Mai felfogásunk szerint az alkalmazott stimuláció szempontjából az in vitro fertilizációs kezelések sikerességén úgy javíthatunk, a terhességi arányt úgy emelhetjük, ha egyéni indikációk alapján megválasztott, az adott nőbetegnek leginkább megfelelő stimulációs kezelést alkalmazunk a beteg egyéni reakciójához igazított adagolásban.

A fentieket összefoglalva elmondhatjuk, hogy napjainkban a kombinált GnRH-agonista analóg és gonadotropin stimuláció rutinszerű alkalmazása látszik a leginkább eredményesnek az IVF kezelések körében akkor, ha a kombinált kezelés gonadotropin részét tiszta FSH-stimuláció képezi. Ez utóbbiak körében a vizeletből kivont hagyományos FSH-készítmények helyét egyre inkább a nagy tisztaságú vizelet FSH-készítmények, illetve a géntechnológiai módszerrel előállított rFSH-készítmények veszik át. Viszonylagos egyszerűsége, a beteget kevésbé megterhelő volta, valamint a korábban felsorolt egyéb előnyei miatt a kombinált GnRH-antagonista analóg + gonadotropinstimuláció alkalmazása is széles körben terjed világszerte különösen a hagyományos GnRH-agonista analóg + gonadotropinkombinációra gyengén vagy túl erősen reagáló betegek esetében.

Az ovuláció időzítése. A multiplex tüszőnövekedés céljából végzett kontrollált túlstimulálás során két lehetőség van a petesejtnyerés időpontjának meghatáro-

zására: ma már csaknem általános gyakorlat a petesejtnyerés idejének hCG adásával végzett ovulációindukció útján való terminálása. A terhességi hormon (hCG) adásával, mely szerkezetében és hatásában az LH-hoz nagyon hasonló, az ovuláció ideje előre meghatározható. Mivel az ovuláció a hCG készítmény *i.m.* adását követően 37 órával következik be, a tüszőpunctiót ezt megelőzően, 36 órával a hCG adását követően végezzük. Ovulációindukció céljából általában 10 000 NE hCG-t adunk. Ovulációindukcióra csak akkor kerülhet sor, ha ultrahangvizsgálattal legalább egy, az alkalmazott stimuláció módjától függően 1618 mm átmérőjű tüsző, valamint további két-három, 1516 mm átmérőjű tüsző látható, és ha a szérum ösztradiolszint a 200300 pg/ml-t (0,731,1 nmol/l-t) elérte a ≥ 1516 mm nagyságú tüszőnként. Az előbbieken felsoroltakon túlmenően további előnye a petesejtnyerés terminálás ezen útjának az, hogy a nagy mennyiségű hCG adásával a progeszteronszintézis indukcióján keresztül egyúttal a sárgatestfázist is támogatjuk. Hátránya azonban, hogy a túlstimulációs szindróma kialakulását is elősegítjük. Ez utóbbi kockázat a kombinált GnRH-antagonista analóg + gonadotropinstimuláció alkalmazásakor csökkenthető, ha ovulációindukció céljából a hCG helyett egyetlen adag (0,10,5 mg *s.c.*) GnRH-agonista analógot adunk a betegnek.

A sárgatestfázis kezelése hormonstimuláció esetén. Annak ellenére, hogy *in vitro* fertilizáció esetén magas megtermékenyítési arányt (7090%) érünk el, az embriótranszfer után a terhességi arány csak 2530% marad. Ennek oka részben a sárgatestfázisban keresendő. A GnRH-analógok károsítják a sárgatestműködést és ezért a kombinált GnRH-analóg és gonadotropin kezelés esetén a sárgatestfázis hormonális támogatása nélkülözhetetlen. A GnRH-agonista analóg vegyületek feltételezhetően nem közvetlenül károsítják a sárgatestet, mivel a kezelés megszüntetése után a keringésből gyorsan kiürülnek. Kimutatták, hogy a GnRH-agonista analógok heteken át történő adása után a gonadotropinszintézis és -felszabadulás még hosszú ideig gátolt marad. Feltételezik, hogy hosszú távú GnRH-analóg kezelést követően egy hypophysealis refrakter állapot lép fel. Úgy tűnik, hogy a GnRH-analógok a sárgatestműködést közvetetten, az LH-felszabadulás gátlásán keresztül károsítják.

A sárgatest-elégtelenség kezelése történhet direkt úton, progeszteron adásával, illetve indirekt úton, hCG adásával, esetleg a kettő kombinációjával. A progeszteron alkalmazása azon alapszik, hogy a sárgatest-elégtelenségben jellemző csökkent progeszterontermelést exogén progeszteron bevitelével pótoljuk. A természetes progeszteron alkalmazható a mikronizált progeszteron kapszula formájában. Ez utóbbi per os (2x100300 mg/nap) és hüvelyi (2 x 100300 mg/nap) kezelésre is egy-

aránt alkalmas, azonban bizonyított, hogy a mikronizált progeszteron intravaginalis alkalmazása lényegesen hatásosabb az implantáció elősegítése és a spontán vetélések számának csökkentése szempontjából, mint a szájon át történő alkalmazás vagy akár az *i.m.* injekció. Ennek magyarázata a máj „first pass” effektusának megkerülése a hüvelyi alkalmazás esetén. A progeszteron adásának előnye, hogy egy esetlegesen kialakuló túlstimulációs szindrómára is kedvező hatással van, illetve annak kialakulásának esélyét az LH-felszabadulás gátlása révén csökkenti.

A stimulációs kezelések szövődménye: a túlstimulációs szindróma (Ovarian HyperStimulation Syndrome, OHSS)

A petefészek bizonyos fokú (kontrollált) túlstimulálása minden ovulációindukciós kezelésben részesülő betegben megfigyelhető, de ezt el kell különíteni a túlstimulációs szindrómától. A túlstimulációs szindróma kialakulása a petefészektüszők kifejezett luteinizációjának következménye, s mint ilyen a hCG adása vagy a spontán LH-csúcs jelentkezése után alakulhat ki. Az első esetben a klinikai tünetek 510 nappal az ovulációindukció céljából alkalmazott hCG adását követően jelentkeznek. Az utóbbinál azonban az intraovariális regulációs mechanizmusok (pl. inhibin), valamint a petefészek és a hypophysis között fennálló negatív visszacsatolás miatt a túlstimulációs szindróma ritkábban alakul ki. Annak alapján, hogy az ovuláció, illetve a luteinizáció a túlstimulációs szindróma kialakulásának alapvető feltétele, feltételezhető, hogy a petefészekből, illetve a sárgatestekből származó anyagoknak döntő szerepük van a szindróma létrejöttében. Ezek a vegyületek, mint pl. a prosztoglandinok felelősek az érpermeabilitás fokozódásáért, mely az intravasalis folyadék intraperitoneumba való jutását teszik lehetővé. A kapilláris permeabilitás fokozódása így jelentős ascitesképződéshez, ez utóbbi pedig hypovolaemiához vezet, melyet haemokoncentráció, a centrális vénás nyomás, valamint a vérnyomás csökkenése és tachycardia kísér. A súlyos hypovolaemia csökkent veseátáramláshoz, ez pedig fokozott nátrium és víz reabszorpcióhoz vezet a proximalis tubulusokban. Az így kialakuló oliguria megfelelő kezelés nélkül azotaemiába torkollik. A túlstimulált petefészekből származó fokozott renin aktivitás a renin-angiotenzin rendszer aktiválásán keresztül járul hozzá a kapilláris permeabilitás fokozódásához és így a hypovolaemia kialakulásához. Súlyos esetben a hypovolaemia májoedemához és így a májfunkció zavarához vezet. A súlyos túlstimulációs szindrómát kísérő májfunkciózavar kialakulásában az extrém mértékben megemelkedett szérumszintű ösztradiol fokozott metabolizmusa is szerepet játszik. A haemokoncentráció az erősen megemelkedett szé-

rum ösztradiolkoncentrációval együtt tehető felelőssé a thromboemboliás szövődmények kialakulásáért.

A klinikai tünetek és a laboratóriumi leletek alapján a túlstimulálási szindrómának három fokozata különböztethető meg: az enyhe, a közepes és a súlyos forma. Míg az enyhe fokú túlstimulálási szindrómának klinikai jelentősége minimális, addig a súlyos fokú túlstimulálási szindróma az ovulációindukciós kezelések életveszélyes szövődménye lehet. A szindróma fő tünetei a petefészkek jelentős megnagyobbodása (>10 cm), ascites, hydrothorax, haemokoncentráció, a folyadék- és elektrolitháztartás zavara, oliguria, rendkívül súlyos esetben thromboemboliás történések, illetve véralvadási zavar. Ez utóbbi súlyos forma előfordulási gyakorisága in vitro fertilizációs kezelések esetén 1% körül mozog, míg a közepes formában 15%, enyhe formában 515%-os gyakoriságról számol be az irodalom.

A túlstimulálási szindróma kialakulását a fent részletezett pathomechanizmus mellett több tényező befolyásolja: (a) a beteganyag: a WHO-klasszifikáció szerinti II csoportba sorolható anovulációs betegek esetében gyakrabban lép fel; (b) az alkalmazott gonadotropin típusa és mennyisége: tiszta vizelet FSH-készítmény adásakor a kórkép ritkábban fordul elő, azonban a rFSH-készítmények erősebb hatékonysága miatt rFSH-stimuláció alkalmazásakor fokozott óvatosság indokolt annak ellenére, hogy eddig még nem sikerült igazolni a kórkép gyakoribb előfordulását rFSH-val történt stimulációt követően; (c) a GnRH-analóg készítmények alkalmazása: kombinált GnRH-agonista analóg + gonadotropin kezeléseknél gyakrabban fordul elő, mint kombinált GnRH-antagonista + gonadotropinstimuláció után; (d) a kezelés kimenetele: terhességhez, főként ikerterhességhez vezető kezelések esetén gyakrabban alakul ki.

A multiplex tüszőérés ellenőrzése. Élettani körülmények között az ovuláció idején az érett petesejt az ún. „metafázis II” stádiumban található, vagyis az első érési osztódása (meiózis I) az egyik sarki test kilökődésével befejeződött, a petesejt megtermékenyíthető állapotba jutott. (A második érési osztódás befejeződését jelző második sarki test kilökődése csak az után jön létre, amikor a hímivarsejt behatolt a petesejtbe.) Az in vitro fertilizációs kezelés keretében nyert petesejtek azonban nem mindig találhatók ebben az optimális, azonnali megtermékenyítésre alkalmas stádiumban. Ennek két oka van: egyik az, hogy a petesejtnyerés céljából végzett tüszőpunctiót egykét órával a várható ovuláció ideje előtt végezzük, amikor még nem minden petesejt fejezte be első meiotikus osztódását. Másrészt, a petefészkek kontrollált túlstimulálása során a fejlődő tüszők, illetve petesejtek nincsenek teljesen azonos fejlődési stádiumban. A tüsző-, illetve petesejtérés ellenőrzésének a célja lehetőség szerint érett, megtermékenyítésre

alkalmas petesejtek nyerésének biztosítása. A tüsző-, illetve petesejtérést indirekt módszerekkel: a petefészkek ultrahangvizsgálatával és hormonmeghatározásokkal ellenőrizzük.

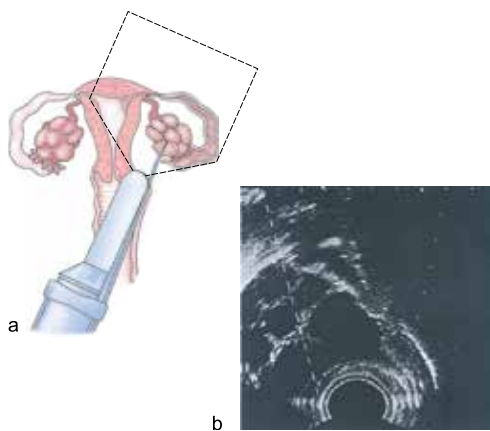
Ultrahangvizsgálat. A folliculusok növekedését a stimulált ciklus 57. napjától kezdődően kétnaponta (extrem gyenge vagy erős reakció esetén esetleg naponta) hüvelyi ultrahangvizsgálattal ellenőrizzük. Az ultrahangvizsgálat segítségével a növekvő tüszők számát, nagyságát, a petefészkeken való elhelyezkedését, illetve a petefészkeknek a kismedencében elfoglalt helyzetét, hozzáférhetőségét vizsgáljuk. Tapasztalat szerint hormonstimuláció alatt a tüszők átmérője naponta átlag 12 mm-t nő.

Szérum-ösztradiolszint meghatározása. A dominánsá vált és ily módon további növekedésnek indult tüszők granulosa-sejtjei ösztrogént, főként 17- β ösztradiolt termelnek. E hormon szérumkoncentrációjának az ellenőrzésével válik lehetővé a hormonstimuláció során a tüszők növekedésének, illetve a petesejtek érésének indirekt ellenőrzése. A szérum-ösztadiol meghatározásokat az 57. ciklusnaptól kezdve kétnaponta (esetleg naponta) végezzük. Normális tüsző-, illetve petesejtérésnek a jele, ha a szérum ösztadiolkoncentráció kezdeti lassú emelkedés (látens fázis) után meredeken halad felfelé (aktív fázis: a szérum ösztadiolszint a megelőző érték kétszeresét meghaladja) és az ovulációindukció idejére a domináns tüszőnkénti 200300 pg/ml (0,731,1 nmol/l) koncentrációt eléri.

A petesejt nyerése. A petesejtnyerésnek két útja lehetséges: a laparoscopon keresztül, illetve a hüvelyen keresztül, ultrahang-ellenőrzés mellett végzett tüszőpunctio. Jóllehet kezdetben a petesejtnyerés laparoscopon keresztül történt, napjainkban csaknem kizárólag a transvaginalis punctiót alkalmazzuk petesejtnyerésre.

A transvaginalis tüszőpunctio kétféleképpen végezhető el: (1) szabadkézi punctio hüvelyen keresztüli ultrahangellenőrzéssel; (2) transvaginalis punctio a hüvelyi ultrahangfejre erősített punctió automatá segítségével (28-7. ábra).

A transvaginalis folliculuspunctiót ambuláner végezzük szedatívum, esetleg fájdalomcsillapító intravénás adása vagy akár intravénás narkózis mellett. A beteg műtő- (esetleg vizsgáló-) asztalra helyezése után fertőtleníttük a külső genitálékát, majd a hüvelyt fiziológiás sóoldattal erős vízsugarával alaposan kiöblítjük. A hüvelyi ultrahangfejet a punctio előtt megadott ideig fertőtlenítő oldatban áztatjuk, majd azt is steril fiziológiás sóoldattal erős vízsugarával öblítjük. A steril punctiót egységeseget az ultrahangfejre rögzítjük, majd óvatosan a hüvelybe vezetjük. Először tájékozódunk a petefészkek, a méh, az iliacalis erek elhelyezkedéséről, a Douglas-üregben folyadékgyülem jelenlétéről vagy hiányáról. A méh és a petefészkek felkeresése, az a.



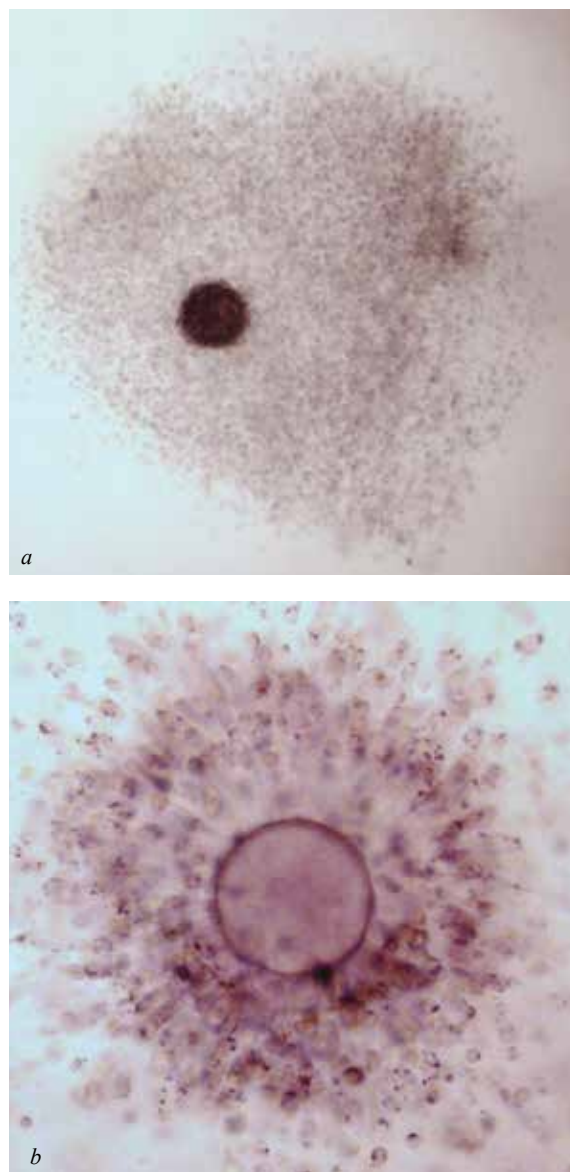
28-7. ábra. A transvaginális ultrahang-ellenőrzés mellett végzett tüszőpunctio sematikus ábrázolása (a) és a tüszőpunctio során készült ultrahangkép (b). A szaggatott vonal a punctio során a tű behatolási irányát mutatja

és v. iliacák, valamint a bélkacsok lokalizálását követően a punctió s feljhez legközelebb eső folliculust állítjuk be a képernyőn. Ezután, lehetőség szerint a hátsó hüvelyboltozaton keresztül a folliculust megpungáljuk, majd annak folyadéktartalmát leszívjuk. A punctió s tű hegyének az átszűrt tüszőn belüli pontos helyzete annak ultrahangárnyéka révén a képernyőn egyértelműen felismerhető és a tüsző megkisebbedése a tüszőfolyadék leszívása során jól nyomon követhető. A tüszőfolyadék leszívását követően a tüszőket átöblíthetjük a mosó tápoldat és heparin keverékével azért, hogy az esetleg a tüsző falához tapadt petesejtekhez is hozzáférjünk. A folliculusfolyadékot maximálisan 250 Hgmm vákuummal szívjuk le. A petesejtek megtalálási aránya a leszívott tüszőfolyadékban 80% feletti. A Douglas-úr ellenőrzését a folliculusok punctiója után ismét elvégezzük esetleges intraabdominalis vérzés kizárása céljából. A punctio befejezésekor ellenőrizzük a hüvelyboltozatban ejtett szűrési sérüléseket, illetve azt, hogy azokból milyen erős vérzés mutatkozik. A transvaginális ultrahang-ellenőrzés mellett végzett tüszőpunctio előnye, hogy nem igényel intubációs narkózist, így ambulánsan könnyen, gyorsan elvégezhető és hogy kifejezett kismenedencei összenövés esetén is sikeres, feltéve, ha a petefészkek a hüvelyboltozathoz közel helyezkednek el. A beavatkozás szövödményei (ér-, illetve bélsérülés, postoperatív gyulladás) 12%-ban fordulnak elő.

A petesejtek gyűjtése. Az ultrahangvezérelt tüszőpunctio során nyert tüszőfolyadékot az embriológiai laboratóriumban vizsgáljuk. A petesejtek a tüszőpunctio idején cumulus sejtekkel körülvéve ún. cumulus oophorust alkotnak. Ez a világosan fénylő, jellegzetesen nyúlós állapotú sejthalmaz, melynek mérete akár 810 μm is lehet, a gomolyfelhőhöz való hasonlósága miatt kapta a cumulus elnevezést. Ebben a sejthalmazban a kb. 160 μm átmérőjű petesejt már csak mikroszkópos ellenőrzés mellett látható.

A tüszőpunctio, valamint a petesejtkeresés során a megfelelő hőmérséklet és aseptikus környezet biztosítására törekszünk. A nyert petesejteket a tüszőfolyadékból kiemelve szövettenyésztő tápoldatba helyezjük át és a petesejtek, illetve embriók fejlődéséhez szükséges optimális körülményeket biztosító inkubátorba tesszük.

A petesejtek minőségének értékelése. A petesejtnyerést 36 órával megelőző, az LH-csúcsot utánzó hCG-adás hatására az addig nyugalmi állapotban lévő petesejtben folytatódik az érési osztódás és az I. meiotikus fázis profázisából a II. fázis metafázisába jut el a petesejtek többsége. Petesejtnyeréskor a petesejtek érési állapota az azt szorosán körülvevő cumulus sejtek



28-8. ábra. (a) A petesejt és az azt körülvevő granulosa sejtek halmaza (cumulus oophorus); (b) a petesejt körül sugarirányban elrendeződő corona radiata sejtréteg

miatt mikroszkóppal sem látható. A cumulus sejthalmaz morfológiája azonban utalhat a petesejt nukleáris érési állapotára is. Ideálisnak tekintjük a homogén, fellazult, a petesejtet minden irányból körülvevő cumulust, amelyben mikroszkópos vizsgálattal a petesejt körül többretegű, sugárirányban elrendeződött corona radiata sejtréteg figyelhető meg (28-8. ábra).

In vitro előérlelés. A petesejtnyerést követően a petesejteket szövettenyésztő tápoldatban 46 órán keresztül inkubáljuk. Az előinkubálás célja, hogy a petesejt a megtermékenyítés előtt elérje a megfelelő nukleáris és citoplazmatikus érettségét. A túl korai vagy túl későn végzett megtermékenyítés a petesejt megtermékenyülésének elmaradását vagy kóros megtermékenyülést eredményezhet. A megtermékenyítés időpontjában éretlen (I. meiotikus fázisban vagy metafázisban lévő) petesejtek megtermékenyítését hosszabb előinkubálást követően, a megfelelő érett állapot elérése után érdemes elvégezni.

Petesejtek in vitro érlelése. Az IVF kezeléseket ma már szinte minden esetben a petefészek hormonális stimulációjával kiegészítve végzik. Ennek eredményeként a tüszőpunctio során egyszerre több érett petesejt nyerhető. Ugyanakkor arra is van lehetőség, hogy a beavatkozást hormonális stimuláció nélkül végezzük el. Ilyenkor a tüszőpunctio során a kisebb méretű, antralis tüszőkben lévő éretlen petesejteket távolítjuk el. Ezeket a petesejteket laboratóriumi körülmények között kell érlelni ahhoz, hogy elérjék a megtermékenyítésre alkalmas állapotot. A folyamatot in vitro érlelésnek (in vitro maturation, IVM) nevezik. Alkalmazása során mind a petesejtnyerés, mind a petesejtek inkubációja, mind pedig a megtermékenyítés módja eltér a hagyományos IVF kezeléseknél leírtaktól. A módszer elsősorban azon betegeknek jelenthet megoldást, ahol a petefészek hormonális stimulációja ellenjavallt, vagy ahol a petefészek nem reagál a hormonkezelésre.

Az IVM alkalmazásával elkerülhető a petefészek-stimulációval együtt járó számos kockázat és kényelmetlenség. Ugyanakkor a hagyományos IVF kezelésekhöz képest nyerhető alacsony petesejtszám, az in vitro érlelés csekély hatékonysága, valamint a petesejtek in vitro érlelése körüli molekuláris folyamatok ismereteinek hiánya miatt a módszer széles körű klinikai alkalmazása még várat magára.

A spermaminták vizsgálata és előkészítése az IVF-hez

Az IVF kezelés céljára történő spermaminta adást megelőzően 27 napos szexuális aktivitástól mentes időszak megtartása szükséges. Ennél hosszabb absztinencia esetén csökkenhet a spermiumok motilitása, míg 2 napnál rövidebb idő esetén kisebb mennyiségű ondómintára és alacsonyabb spermiumkoncentrációra számíthatunk.

Mintaadás maszturbáció útján, lehetőség szerint az asszisztált reprodukciós intézetben történik. Amennyiben intézeten kívül (otthon) kerül sor a mintaadásra, úgy a beteget tájékoztatni kell a spermaminta megfelelő szállításának módjáról.

A mintaadást követően az ondóminta kb. 30 perccel belül elfolyósodik, ezt követően kerül sor a spermavizsgálatra a 26. és 27. fejezetben leírt módon. Elfolyósodási zavarról beszélünk, ha a mintaadás után 30 perccel még mindig sűrű viszkózus állapotban van az ondóminta. Ez ugyan nem befolyásolja a hímivarsejtek életképességét, de megnehezíti a minta vizsgálatát és feldolgozását. Ezért súlyos elfolyósodási zavar esetén amiláz vagy kimotripszin enzimes kezelés alkalmazható.

A spermavizsgálat eredménye alapján dönt az embriológus a minta feldolgozásának módjáról. A leggyakrabban alkalmazott módszerek a felúztatás és a sűrűséggrádiens centrifugálás.

A felúztatásos módszer. A felúztatásos módszert („swim up”) elsősorban a jó minőségű, referenciaérték feletti paraméterekkel rendelkező spermaminták feldolgozására alkalmazzuk. Az eljárás során a spermamintát centrifugáljuk, melynek eredményeként a hímivarsejtek a kémcső alján gyűlnek össze. Az így kialakult pellet feletti ondóplazmát eltávolítjuk, majd a pelletre óvatosan kis mennyiségű tápoldatot rétegzünk. Az ezt követő inkubálás során a mozgó hímivarsejtek felúznak a felső tápoldat rétegbe, míg a nem mozgó hímivarsejtek a kémcső alján maradnak. Az eljárás tehát motilitásuk alapján választja külön a spermiumokat. A felső tápoldatréteget leszívva olyan spermaszuspenziót kapunk, amely alkalmas intrauterin inszeminációra vagy a petesejtek in vitro megtermékenyítésére is.

A sűrűséggrádiens centrifugálás. A gyengébb minőségű, referenciaérték alatti paraméterekkel rendelkező spermaminták esetében a sűrűséggrádiens centrifugálást alkalmazzuk. Az eljárás lényege, hogy két vagy több különböző sűrűségű kolloid állapotú szilikát oldatot rétegzünk egymás fölé egy centrifugacsőbe. Az erre rétegzett spermamintát centrifugáljuk. Az életképes hímivarsejtek fajlagos sűrűsége nagyobb, mint az elhalt spermiumoké, így azok gyorsabban vándorolnak a centrifugálás során. Az elválasztást az is segíti, hogy a szilikát részecskéi, negatív felületi töltésük miatt taszítják az intakt spermiumokat, ugyanakkor magukhoz vonzzák a sérült membránjuk miatt negatív felületi töltésüket vesztett sejteket. A sűrűséggrádiens centrifugálást követően a kémcső alján összegyűlt, nagyrészt célirányosan mozgó hímivarsejt frakciót tápoldattal felhígítva mossuk, majd újabb centrifugálást követően, a pelletet kis mennyiségű oldatba felvéve kapjuk meg a megtermékenyítéshez alkalmas spermaszuspenziót.

Spermaminta feldolgozása súlyosan csökkent paraméterek esetén. Súlyos oligozoospermia, valamint criptozoospermia esetén, amikor az ondóminta nagyon kevés mozgó hímivarsejtet tartalmaz, a fenti módszerek nem alkalmazhatók. Ilyenkor az ondómintát tápoldattal hígítva centrifugáljuk (mossuk), majd a kémcső alján összegyűlt pelletből mikromanipulátor segítségével tudunk mozgó hímivarsejteket kiválasztani a megtermékenyítéshez.

Elektroejaculatio. Bizonyos idegrendszeri rendellenességek és sérülések következtében jelentkező súlyos ejaculatio zavarok esetén lehetőség van az ejaculatio elektromos stimulusokkal történő kiváltására. A módszer alkalmazása során általános érzéstelenítést követően a rectumba helyezett elektródákkal kiváltott ejaculatio során megtermékenyítésre alkalmas ondóminta nyerhető.

Spermiumnyerés sebészeti úton. Amennyiben az ondómintában nem találunk életképes, megtermékenyítésre alkalmas hímivarsejteket, úgy lehetőség van sebészeti úton történő spermiumnyerésre. A heréből (testicular sperm extraction, TESE), mellékheréből (microsurgical epididymal sperm aspiration, MESA), ritkábban a ductus deferensből történő mintavételre nyitott sebészeti biopsia vagy percutan tübiopsia formájában kerülhet sor. Az eljárás hatékonysága fokozható, ha a biopsia operációs mikroszkóp ellenőrzése mellett történik (micro-TESE), így az operátor fel tudja keresni a here jobb vérellátottságú, így hímivarsejtet nagyobb eséllyel tartalmazó tubulusait. A módszer az andrológus és embriológus szoros együttműködését igényli, hiszen a műtét közben érdemes az egyes mintákban ellenőrizni, hogy azok tartalmaznak-e hímivarsejteket.

A sebészeti úton nyert szövetmintákból az asszisztált reprodukciós laboratóriumban enzimes emésztés és mechanikai fellazítást követően mikromanipulátor segítségével tudunk megtermékenyítésre alkalmas hímivarsejteket gyűjteni.

Ahhoz, hogy az IVF kezeléshez nagy biztonsággal rendelkezésre álljon elegendő hímivarsejt, valamint, hogy a sebészeti spermiumnyerést ne kelljen minden IVF kezelés alkalmával megismételni, a hímivarsejteket tartalmazó biopátumot le lehet fagyasztani. Így a későbbiekben a felolvasztott mintákból nyert spermiumokkal végezzük a megtermékenyítést.

A petesejtek szervezetén kívüli megtermékenyítése

A petesejtek megtermékenyítésére az előinkubációt követően, általában 46 órával a petesejtnyerés után kerül sor. A jelenleg legelterjedtebb két módszer a hagyományos in vitro fertilizáció (IVF) és az intracitoplazmatikus spermium injektálás (ICSI).

Hagyományos in vitro fertilizációs kezelés (IVF). Normál vagy mérsékeltén csökkent spermamparaméterek esetén a petesejteket csoportosan 0,51 ml fertilizációs tápoldatban vagy egyenként 3050 µl-es mikrocsseppekben inszemináljuk, azaz a megfelelően előkészített és feldolgozott spermamintából annyit adunk a petesejtekhez, hogy 100 000 500 000 db/ml-es spermiumkoncentrációt kapjunk. Az ivarsejteket 1618 órán át együtt inkubáljuk. Ez idő alatt lezajlik a megtermékenyülés, és a petesejtet körülvevő cumulus sejthalmaz fellazul. Az inkubációs idő végén a petesejtekhez tapadó cumulus sejteket mechanikai úton, egy megfelelő átmérőjű mikropipettába többször felszívva távolítjuk el. Az így „lecsupaszított” petesejt mikroszkópos vizsgálatával ellenőrizzük, hogy létrejött-e a megtermékenyülés.

Intracitoplazmikus spermiuminjekció (intracytoplasmic sperm injection, ICSI). Súlyosan csökkent spermamparaméterek esetén a hagyományos IVF kezelés eredményessége jelentősen lecsökken. Ebben az esetben a petesejtek megtermékenyítését ICSI módszerrel, mikromanipulátor segítségével végezzük.

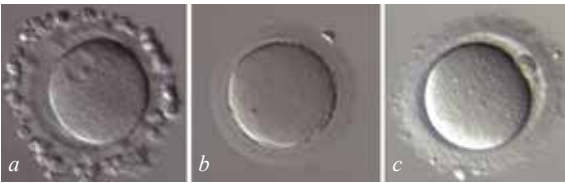
A mikromanipulátor egy mikroszkópra szerelt, mechanikus, elektromos vagy hidraulikus vezérlésű eszköz, amely mikrométeres nagyságrendű mozdulatokká alakítja át az emberi kéz milliméteres mozdulatait (28-9. ábra). A manipulátor tartószáraiba egy-egy vékony üvegkapillárist, ún. mikropipettát illesztünk. A készülék segítségével nagyon precízen, a tér minden irányába tudjuk mozgatni az injektáló, illetve tartó mikropipettákat. Az injektáló kapilláris vége hegyesre van csiszolva és belső átmérője 56 µm, míg a petesejtet rögzítő tartópipetta átmérője 1520 µm. A mikropipetták egy-egy finoman szabályozható fecskendőhöz csatlakoznak, melyekkel akár pikoliteres nagyságrendű folyadékmennyiséget is fel lehet szívni az injektáló kapillárisba.

Az előinkubálást követően a petesejteket körülvevő cumulus sejteket hialuronidáz enzimmal, valamint mechanikus úton, egy vékony pipettába felszívva távolítjuk el. A mikromanipulációs Petri-csészében egymástól elkülönített tápoldat cseppekbe helyezzük el a petesejteket, ami lehetőséget biztosít azok későbbi egyedi nyomon követésére. Csak az érett petesejtek (28-10.c ábra) megtermékenyítését végezzük el. Az éretlen, sarkí testtel nem rendelkező (28-10.b ábra) vagy jól látható csírahólyagot (germinalis vesiculum) tartalmazó (28-10.a ábra) petesejtek megtermékenyítésére csak a megfelelő állapot eléréséig tartó in vitro érlelést követően kerülhet sor.

Az ICSI kezeléshez első lépésként mikroszkópos ellenőrzés mellett kiválasztunk egy célirányosan mozgó, normál morfológiájú hímivarsejtet. A spermium farki részét a mikropipettával megsértjük, ami azt eredményezi, hogy a hímivarsejt nem fog a továbbiakban mozogni,



28-9. ábra. A mikromanipulátor



28-10. ábra. A petesejt különböző érési állapotai: (a) I. meiotikus főszakasz profázisában lévő éretlen petesejt (GV: germinális vesiculum); (b) I. meiotikus főszakasz metafázisában lévő éretlen petesejt (az I. sarki test még nem látható); (c) II. meiotikus főszakasz metafázisában lévő, érett, megtermékenyítésre alkalmas petesejt (PB: első sarki test)

valamint olyan citoplazmatikus faktorok szabadulnak ki a membránsérülés helyén, amelyek segíthetik a petesejt aktiválódási folyamatát, ezzel is javítva a megtermékenyülés esélyét. Az így előkészített hímivarsejtet felszívjuk az injektáló pipettába, majd a petesejtet rögzítjük a másik oldali tartópipettán. Ezt követően az injektáló mikropipettát a petesejtet körülvevő zona pellucidán és a sejtmembránon át a citoplazmába szúrjuk és a hímivarsejtet a petesejtbe injektáljuk (28-11. ábra). A folyamatot valamennyi érett petesejt esetében megismételjük, majd a petesejtet embriótenyésztő tápoldatot tartalmazó tenyésztőedénybe tesszük és visszahelyezzük az inkubátorba.

ICSI-hez kapcsolódó különleges eljárások. Az ICSI kezes hatékonyságának javítása különösen olyan esetekben indokolt, amikor a korábbi kezelésben az elvárhatónál gyengébb volt a megtermékenyülési arány. Számos módszer áll rendelkezésre a hatékonyság javítása érdekében, de ezek többségében költséges és időigényes



28-11. ábra. Az intracitoplazmatikus spermiuminjektálás (ICSI)

eljárások, és viszonylag ritkán fordulnak elő olyan esetek, amikor ezen eljárások alkalmazása valóban indokolt.

Bizonyos petesejt-rendellenességek esetén, különösen a szokásosnál vastagabb és merevebb zona pellucida, valamint sérülékeny sejtmembrán esetén a petesejt az ICSI során könnyen degenerálódik. Az injektálás során a petesejtet érő mechanikai hatás enyhíthető úgy, hogy az mikropipetta behatolásának helyén a zona pellucidát mikrosebészeti lézerrimpulzus alkalmazásával elvékonyítjuk (lézer-asszisztált ICSI), vagy a kapillaris zona pellucidán történő áthaladást a mikromanipulátorba épített piezo-elektromos eszköz által keltett vibráció is segítheti (piezo-asszisztált ICSI).

A petesejt életképességének vizsgálata fontos lenne a megtermékenyítést megelőzően, azonban a rendelkezésre álló módszerek többsége élő sejteken nem véggezhető el. Lehetőség van azonban a petesejt részletes vizsgálatára a mikroszkópba épített fény polarizációs elven működő „Polcscope” készülék alkalmazásával, amelynek segítségével az élő petesejtben láthatóvá válik a meiotikus orsó („spindle view” technika), valamint a zona pellucida szerkezete is vizsgálható. A meiotikus orsó hiánya vagy rendellenes morfológiája a petesejt gyengébb életképességére utal. Az eljárás magas költsége, valamint időigényessége miatt nem terjedt el széles körben a rutin klinikai alkalmazásban.

Korábbi sikertelen megtermékenyülés esetén lehetőség van a petesejt mesterséges aktiválására is. Ilyenkor kémiai hatás (pl. kalcium ionofor kezelés) vagy elektromos impulzus alkalmazásával próbáljuk kiváltani a petesejt aktiválódás folyamatát és javítani a megtermékenyülés esélyét.

A normál megtermékenyüléshez azonban életképes petesejt mellett megfelelő minőségű, termékenyítőképes hímivarsejtre is szükség van. Az ondóminta feldolgozása elsősorban arra irányul, hogy kiválasszuk a mintából

a jól mozgó, életképesnek tűnő hímivarsejteket. Az ICSI kezelés során a spermiumok kiválasztása 200-400-szoros nagyítás mellett történik. Így látható a hímivarsejtek normál vagy rendellenes mozgása és a durva morfológiai eltérések is kiszűrhetők, de a spermiumok részletes morfológiai vizsgálatára ebben a nagyítási tartományban nincs lehetőség. Speciális optikai rendszer alkalmazásával, valamint a hagyományos fénymikroszkópos kép további digitális nagyításával lehetőség nyílik arra, hogy a mozgó hímivarsejtek morfológiáját akár több mint 6000-szeres nagyítás mellett vizsgáljuk. Az eljárást IMSI (Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection) módszernek nevezzük. Alkalmazása rendkívül időigényes, azonban lehetőséget adhat arra, hogy magasabb terhességi és alacsonyabb vetelési arányt érjünk el. Az eddigi eredmények azonban még nem igazolták egyértelműen a módszer hatékonyságát.

Az életképes hímivarsejtek kiválasztásának másik módszere azon az elven alapul, hogy csak az érett, megtermékenyítésre alkalmas hímivarsejtek tudnak hialuronsavhoz kötődni. Így egy Petri-csésze aljára felvitt hialuronsav-réteghez kötődő spermiumok ritkábban hordoznak kromoszómarendellenességet vagy egyéb elváltozásokat. A hialuronsav-kötődés alapján kiválasztott spermiumokkal végzett ICSI kezelés eddigi eredményei azonban ellentmondásosak, nem igazolódott egyértelműen a módszer jobb hatékonysága.

A megtermékenyülés ellenőrzése

A spermium behatolását követően a petesejt befejezi érési osztódását, amelynek során kiválik a második sarki test. Ezt követően láthatóvá válik az apai és anyai előmag (pronucleus). A pronucleusok meglétét a meg-



28-12. ábra. Két előmagot (pronucleus) tartalmazó megtermékenyült petesejt

termékenyítés vagy spermium mikroinjekció után kb. 1618 órával ellenőrizzük. Normál megtermékenyülés esetén a petesejt közepén két azonos méretű, egymás mellé rendeződött előmagot látunk, amelyekben az ivarsejtek genetikai állományát tartalmazó magvacskák kb. azonos számban, szimmetrikusan, az ekvatoriális síkban rendeződnek el (28-12. ábra). Mind a hagyományos IVF kezelés, mind pedig ICSI alkalmazása esetén a petesejtek kb. 60–80%-a megtermékenyül meg. A többi petesejt vagy nem mutatja a megtermékenyülés jeleit, vagy kóros megtermékenyülést mutat. Kóros megtermékenyülés esetén a petesejtben 1 vagy 3 (esetleg több) előmagot látunk. Ezek a zigóták, bár gyakran normál sejtosztódást mutatnak, többnyire kóros kromoszómakészlettel rendelkeznek, így a későbbiekben nem kerülnek beültetésre.

Embriótenyésztés

Tenyésztési körülmények. A petesejtek és zigóták inkubációjához hasonlóan az embriótenyésztésnek is nagy jelentősége van az IVF kezelés eredményessége szempontjából. Jóllehet, az osztódó embriók bizonyos környezeti tényezők ingadozását vagy az optimálistól való eltérését bizonyos mértékig elviselik, a szuboptimális tenyésztési körülmények az életképesség csökkenéséhez vezethetnek.

Az embriótenyésztés során az embriók fejlődését számos tényező is befolyásolja, melyek többségét a szövettenyésztő tápoldat közvetíti. A tápfolyadék hőmérséklete, ozmolaritása, pH-ja meghatározó a fejlődő embrió számára. Ezek állandóságát megfelelő szövettenyésztő inkubátor segítségével biztosítjuk. Egyre inkább elterjednek azok az inkubátorok, amelyekben minden egyes Petri-csésze külön inkubációs kamrában van, így egy-egy minta inkubátorból történő kiemelése (pl. megtermékenyítéshez vagy embrióbeültetéshez) nem befolyásolja az inkubátorban lévő többi tenyésztőedény környezetét.

A leggyakrabban használt oldatok általában széles körben alkalmazott szövettenyésztő tápoldatok humán embriótenyésztés céljára módosított, fehérje forrással kiegészített változatai. Feladatuk, hogy biztosítsák a beágyazódás előtti osztódó embriók anyagcsere-folyamataihoz szükséges tápanyagokat, valamint felvegyék és semlegesítsék az embriók által leadott anyagcsere-termékeket.

Az embriótenyésztés történhet monokultúra formájában, amikor a megtermékenyítéstől a blastocysta állapotban történő embrióbeültetésig ugyanabban az oldatban vannak az embriók. Széles körben alkalmaznak ugyanakkor a szekvenciális táptalajokat, amelyek figyelembe veszik az embriók anyagcsere-folyamataiban a 4-8 sejt állapotban bekövetkező változásokat, így a

megtermékenyítést követő 3. nap előtt és után más-más összetételű tápoldatot alkalmaznak.

Az egyedi embriótenyésztés során minden egyes embriót külön-külön tápoldatcseppben tartunk, ami lehetőséget biztosít az embriófejlődés egyedi nyomon követésére. Amennyiben több embriót közös tápoldatcseppben, csoportosan tenyésztünk, úgy az embriók a környezetükbe kiválasztott faktorok felhalmozódásával autokrin és parakrin úton elősegíthetik egymás fejlődését.

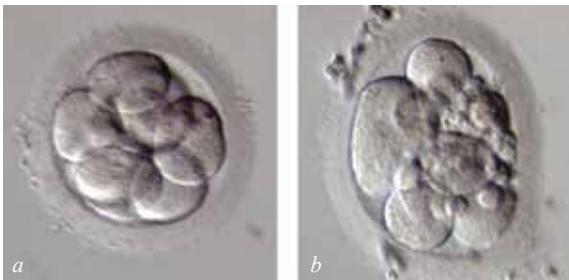
A tenyésztéshez különböző kialakítású steril, egyszerűszerhasználatos edényeket használhatunk. Ezek lehetnek nagyobb mennyiségű (12 ml) oldatot befogadó szövettenyésztő Petri-csészék vagy kisebb, 2050 µl-es mikrocseppeket tartalmazó edények is. Az utóbbi időben megjelentek a mikrovájatokat tartalmazó speciális Petri-csészék is, amelyekben minden egyes embrió egy kb. 300 µm átmérőjű vályúba kerül. A vályúkat közös tápoldatcsepp fedi, biztosítva ezzel a csoportos tenyésztés előnyeit úgy, hogy közben az embriók egyedileg beazonosíthatók, fejlődésük nyomon követhető.

Az embriófejlődés vizsgálata. Az osztódó embriók fejlődését a megtermékenyüléstől az embrióbeültetésig rendszeresen ellenőrizzük. A morfológiai vizsgálatok célja, hogy minél több olyan információt gyűjtsünk, amelyből következtetni tudunk az embriók életképességére.

A „hagyományos” (szekvenciális) bírálat során a tenyésztőedényt az inkubátorból kivéve, általában 200x-os nagyítás mellett végezzük a mikroszkópos morfológiai vizsgálatot.

ICSI kezelés esetén már a petesejtek vizsgálatára is lehetőség nyílik, amely a petesejt érettsége mellett a zona pellucida, a sarki test, valamint a citoplazma rendelkezései megfigyelésére irányul.

A megtermékenyült petesejt esetében elsősorban a két előmag meglétét vizsgáljuk, de a megfigyelések kiterjedhetnek a pronucleusok szabályos méretére és elhelyezkedésére, valamint a magvacskák számára és a pronucleusokon belüli szabályos elrendeződésére is.



28-13. ábra. Az embriók minőségének értékelése morfológiai bélyegek alapján: (a) fejlődési állapotának megfelelő, szabályos szerzetű, jó minőségű 8-sejtes embrió; (b) különböző méretű sejteket, valamint jelentős fragmentációt tartalmazó, gyenge minőségű embrió

Az első sejtciklus befejeződése előtt a sejtmaghártya lebomlik, így a pronucleusok már nem láthatók, a syngamiát követően pedig lezajlik az első sejtosztódás. Az előmagok eltűnése, valamint az első sejtosztódás időpontja fontos információ lehet az életképes embriók kiválasztásánál.

A megtermékenyítés utáni napokban elvégzett mikroszkópos vizsgálat képet adhat az osztódó embriók állapotáról. A vizsgálat kiterjed a blastomerák számára, méretére, szabályos vagy szabálytalan alakjára, a sejtmagmentes fragmentumok mennyiségére, valamint a citoplazma állapotára, vacuolumok, szemcsézettség előfordulására (28-13. ábra). Az ideális 2-sejtes embrió (28-14.a ábra) a megtermékenyítés utáni második napon 4- (28-14.b ábra), a harmadik napon pedig 8-sejtes állapotban (28-14.c ábra) van. A blastomerák száma és mérete a fejlődési állapotnak megfelel, alakjuk szabályos, citoplazmájuk homogén.

A megtermékenyítés utáni 4. napon megkezdődik a kompaktálódás folyamata, melynek során a blastomerák szorosan egymáshoz tapadnak. A mikroszkópos vizsgálatok alkalmával korábban jól látható sejthatárok elmosódnak, és létrejön a szedericsíra (morula) állapot (28-14.d ábra). Ezt követően az embrió belsejében megkezdődik a blastocoel kialakulása. A blastocysta



28-14. ábra. A beágyazódás előtti embriófejlődés: (a) 2-sejtes; (b) 4-sejtes; (c) 8-sejtes; (d) szedericsíra (morula); (e) hólyagcsíra (blastocysta); (f) a zona pellucidából kibújó blastocysta

(hólyagszira) állapotban (28-14.e ábra) a vizsgálatok a blastocoel méretére, a trophoctoderma sejtréteg, illetve az embriócsomó sejtjeinek számára, szabályos alakjára terjednek ki.

A hagyományos mikroszkópos morfológiai vizsgálatok során az embriók fejlődését egy-egy előre meghatározott időpontban végezzük, általában naponta egy alkalommal. Így pontos képet kaphatunk egy-egy fejlődési állapotról (pl. a 4- vagy 8-sejtes állapot), de nem lesz információnk arról, hogy hogyan fejlődött az embrió a két vizsgálat között. Az utóbbi időben megjelent „time-laps” készülékekkel lehetőség nyílik arra, hogy egy inkubátorba szerelhető vagy azzal egybeépített kamera segítségével folyamatosan megfigyelhessük és rögzíthessük az embrió fejlődését. Ezek a készülékek képesek arra, hogy egy néhány perces gyorsított videofelvételt készítsenek az egyes embriók fejlődéséről a megtermékenyítéstől az embrió beültetéséig.

Embriótranszfer

Az IVF kezelés klinikai és embriológiai eredményeit figyelembe véve döntünk az embriótranszfer stratégiájáról, amely magában foglalja az embrióbeültetés idejének, a beültetésre kerülő embriók számának meghatározását, valamint a leginkább életképesnek tűnő embriók kiválasztását.

Az embrióbeültetés időpontja. A kezelések jelentős részében embriók a megtermékenyítést követő 2. vagy 3. napon, 4-8 sejtes állapotban kerülnek beültetésre. Lehetőség van a blastocysta stádiumban történő transzferre is az 5. vagy 6. napon. Humán embriók esetében 8-sejtes állapotban kezdődik meg az embrió saját genomjának aktiválódása, ami az embrió életében egy rendkívül érzékeny időszak. Kóros genetikai állományt vagy egyéb sejtbiológiai hibát hordozó embriók gyakran nem jutnak túl ezen az állapon, így a blastocysta transzfer során már nagyobb eséllyel tudunk életképes, beágyazódásra alkalmas embriót választani. A módszer hátránya ugyanakkor, hogy alkalmazásával az embriók hosszabb időt töltenek a szervezetben kívül, és a szuboptimális környezet hátrányosan befolyásolhatja fejlődésüket, csökkentheti életképességüket.

Az embrióbeültetés időpontjának meghatározásánál figyelembe kell venni, hogy hány megtermékenyült petesejt áll rendelkezésünkre. Kevés embrió esetén, amikor nincs lehetőség arra, hogy kiválasszuk a legéletképesebbeket, hiszen várhatóan mindegyiket beültetjük, célszerű már a 2. napon elvégezni az embrióbeültetést. Amennyiben több embrió áll rendelkezésünkre, mint amennyinek a beültetését tervezzük, úgy a transzfert a 3. vagy az 56. napon végezzük.

A beültetésre kerülő embriók száma. A beültetésre kerülő embriók számának meghatározásánál figyelembe vesszük a beteg életkorát, a korábbi kezelések eredményét és az embriók minőségét. A hazai jogszabályok legfeljebb 3, bizonyos esetekben (magasabb anyai életkor, több korábbi sikertelen IVF kezelés) 4 embrió beültetését teszik lehetővé. Ha a méhbe ültetett embriók számát egyről háromra növeljük, a terhességi arány szignifikánsan nő. Háromnál több embrió beültetése már nem növeli jelentősen a terhességi arányt. A több embrió beültetése azonban növeli az esélyt a magas anyai és magzati kockázattal járó többes terhességek kialakulásának. A beültetendő embriók számának megállapításakor az embrió kriokonzerválás lehetőségét és határfokát is mérlegelni kell. Az asszisztált reprodukciós központok világszerte törekednek a „iatrogen” többes terhességek kockázatának csökkentésére a beültetett embriók számának egyre, illetve kettőre történő csökkentésével. A nemzetközi ajánlások kettőnél több embrió beültetését nem javasolják.

A beültetésre kerülő embriók kiválasztása. A legnagyobb beágyazódási eséllyel bíró embriók kiválasztása hagyományosan a különböző fejlődési állapotokban elvégzett morfológiai vizsgálatok alapján történik. A beültetés előtt elvégzett vizsgálat eredményén kívül figyelembe vehetjük a petesejt és a zigóta életképességével összefüggő morfológiai jellemzőit is. A 23. napon történő embriótranszfer esetén az embrió fejlődési állapotának megfelelő sejtszám, a sejtek azonos vagy eltérő mérete, szabályos vagy szabálytalan alakja, valamint a sejteken kívül megfigyelhető fragmentáció mennyisége alapján választjuk ki a legéletképesebbnek látszó embriókat.

Blastocysta stádiumú transzfer esetén, a megtermékenyítés utáni 56. napon, az embrió fejlődési állapota (korai vagy expandált blastocysta), valamint a mikroszkóppal megfigyelhető embriócsomó és a trophoctoderma sejtréteg jellemzői alapján választjuk ki a beültetésre kerülő embriókat.

A legújabb laboratóriumi technikai fejlesztések lehetőséget adnak arra, hogy az embriók állapotát ne csak egy-egy előre meghatározott pillanatban vizsgáljuk, hanem ún. time-laps felvétel készítésével folyamatosan dokumentálni tudjuk. Így megfigyelhető az embriófejlődés teljes folyamata a megtermékenyüléstől egészen a beültetésig. A sejtosztódás szabályos vagy szabálytalan lefolyása, valamint a folyamat egyes lépéseinek időtartama szoros összefüggésben áll az embriók életképességével. Így, bár a módszer jelenleg még kísérleti stádiumban van, a time-laps felvételek számítógépes értékelése hozzásegíthet a nagyobb beágyazódási eséllyel rendelkező embriók kiválasztásához.

Az embriók életképessége meghatározásának másik lehetősége az embriótenyésztő tápoldat vizsgálata. Az

in vitro tenyésztés során az embriók az anyagcsere-folyamataikhoz szükséges anyagokat a tápoldatból veszik fel, és a számukra már nem szükséges anyagokat is oda választják ki. Így a tápoldatok összetételének vizsgálata is információt adhat az abban fejlődő embrió anyagcsere-folyamatairól. Lehetőség van különböző anyagcsere-termékek (pl. glükóz) felvételének mérésére, valamint a tápoldatba kiválasztott fehérjék, nukleinsavak vizsgálatára is. Ezen módszerek magas költség- és eszköz-igényük miatt ma még nem terjedtek el széles körben a klinikai alkalmazás területén.

Asszisztált hatching. Blastocysta állapotban az embriót körülvevő burok, a zona pellucida, fokozatosan elvékonyodik, majd várhatóan a megtermékenyítést követő 67. napon megnyílik, és az embrió kibújik belőle (28-14.f ábra). Feltételezések szerint az esetek egy részében azért nem jön létre a beágyazódás, mert a fenti folyamat valamilyen zavart szenved, és az embrió nem képes kibújni a zona pellucidából. Lehetőség van arra, hogy az embriótranszfer előtt akár mechanikai úton, mikromanipulátorra szerelt vékony üvegapillárisal, akár mikrosebészeti lézerimpulzus alkalmazásával a zona pellucidán nyílást ejtsünk, elősegítve ezzel az embrió későbbi kibújását. A beavatkozást magasabb anyai életkor, több korábbi sikertelen IVF kezelés, valamint a szokásosnál vastagabb, sötétebb zona pellucida esetén javasolt elvégezni. A módszer több mint két évtizedes alkalmazásának tapasztalatai ellenére sem sikerült egyértelműen igazolni annak hatékonyságát.

Az embriótranszfer gyakorlati kivitelezése. Az embriótranszfer előtt ultrahangvizsgálattal, esetleg próba-katéterezéssel meggyőződünk a méh és a nyakcsatorna helyzetéről és az endometrium állapotáról. Az embriók méhbe fecskendezését kb. 200–300 µm belső átmérőjű, polietilénből vagy teflonból készült, steril, egyszerűhasználatos embriótranszfer-katéterrel végezzük, melynek Luer kónuszához 0,5 vagy 1ml-es műanyagfecskendőt csatlakoztatunk. Használat előtt a katétert tápfolyadékkal átöblítjük. Ezután 10–30 µl médiummal felszívjuk az embriókat a katéterbe, majd a katétert a nyakcsatornán keresztül a méhbe vezetjük. Amikor a katéter hegye a fundustól kb. 0,5 cm távolságra van, az embriókat tartalmazó médiumcseppet óvatosan befecskendezzük az uterusba, majd óvatosan kihúzzuk a katétert, és sztereomikroszkóp alatt azonnal ellenőrizzük, elhagyták-e az embriók a csövet. A katéterezést aszeptikusan, traumatamentesen és lehetőség szerint gyorsan kell végezni. Az embrióbeültetés kivitelezése viszonylag egyszerű, mégis ez a lépés az IVF kezelés egyik leggyakoribb hibaforrása. Ha a katéter méhbe vezetése nehézkes, a méhszájat golyófogóval megragadva kiegyenesíthetjük a cervix és az uterus tengelyét, vagy

alkalmazhatunk ultrahanggal katéterirányítást. Elkerülhetjük az embriók elvesztését és lehülését a nehézkes katéterezéskor, ha külső katétervezetőt használunk, és az embriókat tartalmazó transzferkatétert a katétervezető méhbe vezetése után, azon keresztül juttatjuk az uterus üregébe.

Az embriótranszfer után az embriók néhány napig szabadon fejlődnek a méh üregében, mielőtt beágyazódnának. Közben blastocystává fejlődnek, expandálódnak és kibújnak a zona pellucidából (hatching). A beágyazódást számos embrionális és embriótól független tényező befolyásolja. Az in vitro előállított embriók implantációs aránya alacsony (mindössze 1040%). A kedvezőtlen megtapadási arány javítására, illetve okainak felderítésére irányuló kutatási irányok közé tartozik az asszisztált hatching és az embrióbeágyazódás előtti molekuláris genetikai vizsgálómódszer (praesztantációs genetikai szűrés, PGS) alkalmazása is.

A fagyasztott-felolvasztott embriók méhbe ültetése. A felolvasztott embriót vagy a spontán menstruációs ciklus alatt, vagy a klomifencitráttal (esetleg gonadotropinnal kombinálva) stimulált ciklus során vagy a GnRH-agonista analóg kezeléssel létrehozott hypogonadotrop állapotra felépített hormonpótló kezelés során ültethetjük a méh üregébe. A felolvasztott embriók beültetésének időzítésénél is figyelembe kell vennünk az ún. „implantációs ablakot”, azt a néhány napos időszakot, amikor a méh állapota alkalmas az embrió beágyazódására. Jóllehet a spontán ciklus biztosítaná a leginkább életleni feltételeket a beültetett embrió számára, gyakorlati megvalósítása számos nehézségbe ütközik (intenzív monitorizálás szükségessége, az embriótranszfer időpontja nem tervezhető meg előre). Rendszeretlen ciklusú nők esetén a klomifencitrát kezeléssel felépített ciklus során végzett embrióbeültetés bizonyulna hasznosnak, de a klomifencitrátnak a méhnyálkahártya felépítésére és a sárgatest működésére kifejített kedvezőtlen hatása miatt ez a lehetőség sem ajánlható. Legmegbízhatóbbnak az a megoldás bizonyul, melynek során GnRH-agonista analóg alkalmazásával a beteget átmenetileg hypogonadotrop állapotba hozzuk, majd hormonpótló kezelést kezdünk. Ekkor a hormonpótló kezelés 15. napja között 2 mg, 6. és 9. napja között 4 mg, 1013. napja között 6 mg, majd a 14. naptól ismét 4 mg ösztradiolt adunk naponta. A kezelés 1516. napján ezt kiegészítjük napi 3x200 mg progeszteron adásával, ezzel biztosítva a méhnyálkahártya megfelelő felépülését. Terhesség létrejötte esetén a gestatio 12. hetéig napi 8 mg ösztradiolt és 3x200 mg progeszteront adunk. Pronucleus stádiumban fagyasztott zigótákat a kezelés 16. napján (spontán ciklus esetén az ovuláció után egy nappal) olvasztjuk fel és másnap, a 17. napon ültetjük be. Az embriókat a kezelés 17. napján (spontán ciklus esetén az ovuláció utáni

második napon) olvasztjuk fel és még aznap beültetjük. Blastocysta stádiumban mélyhűtött embriókat a 19. napon (spontán ciklus esetén az ovulációt követő 4. napon) olvasztjuk fel és implantáljuk. A mélyfagyasztott, majd felolvasztott embriókkal végzett kezelések eredményessége hasonló a friss embriókkal végzett kezelésekével.

Az ivarsejtek és embriók kriokonzerválása

Az asszisztált reprodukciós kezelések során gyakran felmerül az igény arra, hogy a különböző kezelések egyes lépései térben és időben egymástól elkülönülten történjenek. Végezhető például IVF kezelés más intézetben gyűjtött donor ivarsejtek felhasználásával, de gyakran végzünk embrióbeültetést olyan embriókkal, amelyek egy korábbi IVF kezelés során jöttek létre. Ezekben az esetekben szükség van az ivarsejtek, embriók kriokonzerválására, amely a sejtek életképességének hosszú távú megőrzését jelenti. Az eljárás során a mintákat alacsony hőmérsékletre (+37 °C-ról –196 °C-ra) hűtjük, folyékony nitrogénben, –196 °C-on hosszú időn keresztül tároljuk, majd a felhasználás előtt visszamelegítjük (felolvasztjuk). Az alacsony hőmérsékleten történő tárolás során a sejtek életképessége elvileg korlátlan ideig megőrizhető. A fagyasztás, illetve felolvasztás során azonban a sejtek károsodhatnak, amelyet fagyvédő oldatok hozzáadásával próbálunk megelőzni. Ezek az anyagok részben bejutnak a sejtbe, és segítenek stabilizálni a sejtalkotók, valamint a sejtmembrán szerkezetét, részben pedig a sejten kívül maradvíz vonnak ki a sejtekből, csökkentve ezzel az intracelluláris jégkristályképződés esélyét.

A mélyfagyasztás módszerei. Jelenleg két eljárást alkalmaznak széles körben az asszisztált reprodukciós kezelések során. Az egyik a programozott „lassú” fagyasztás, a másik pedig a vitrifikáció.

A lassú fagyasztás során a kis koncentrációjú fagyvédő oldatba helyezett sejteket fagyasztókészülék segítségével, előre meghatározott sebességgel hűtjük le. A hűtés során folyamatosan víz lép ki a sejtekből, ami megakadályozza a sejten belüli jégképződést. A hűtést és a minták alacsony hőmérsékleten történő tárolását folyékony nitrogén segítségével végezzük, melynek hőmérséklete –196 °C. A felolvasztás a fagyasztásnál lényegesen gyorsabban történik, és a fagyvédő oldatokat hígítással nyújtjuk ki a sejtekből.

A másik módszer, amely az utóbbi időben egyre nagyobb teret nyert az asszisztált reprodukciós laboratóriumokban, a *vitrifikáció*. Ez egy rendkívül gyors hűtést jelent, ahol a minták hűtési sebessége elérheti akár a 20 000 °C/perces sebességet is. Az ilyen gyors hűtés során a sejtek víztartalma nem tud jégkristállyá alakulni, hanem egy üvegszerű, amorf, viszkózus állapotba kerül.

A nagy hűtési sebesség eléréséhez az kell, hogy a sejteket tartalmazó hordozó kisméretű, így gyorsan hűthető legyen. A mintákat a hordozóval együtt közvetlenül folyékony nitrogénbe merítjük. A minták visszamelegítése szintén nagy sebességgel, 37 °C-os felolvasztó oldatba történő bemerítéssel történik. A vitrifikáció során a hagyományos lassú fagyasztásnál alkalmazottnál magasabb koncentrációjú fagyvédő oldatokat használunk. A módszer a jelenlegi adatok alapján mind a petesejt-, mind pedig az embriófagyasztás esetében hatékonyabban működik, mint a hagyományos lassú fagyasztás.

Hímivarsejtek fagyasztása. A hímivarsejtek mélyfagyasztására évtizedek óta hatékony módszerek állnak rendelkezésre. Így ma lehetőség nyílik mind a meddő pár férfi tagja saját spermamintájának a krioprezervációjára, mind pedig donor sperma mélyfagyasztására és felhasználására asszisztált reprodukciós kezelések során. A spermamintákat többnyire kontrollált lassú módszerrel fagyasztjuk, a vitrifikáció ebben az esetben még nem tűnik kellően hatékony eljárásnak.

Fagyasztott hímivarsejt felhasználására az asszisztált reprodukciós kezelések során akkor lehet szükség, ha

- a férj daganatos betegsége miatt gonadotoxikus kezelésben részesül, és ezt megelőzően történt spermiumfagyasztás;
- a kivizsgálás során mintaadási probléma merül fel. Amennyiben az IVF kezelés során a beteg nem tud mintát adni, lehetőség van az előzetesen lefagyasztott spermaminta használatára;
- azoospermia esetén fagyasztott-felolvasztott donor spermaminta felhasználására van lehetőség.

Nagyszámú, jól mozgó hímivarsejtet tartalmazó ejakulátum a fagyasztás-felolvasztás után alkalmas lehet intrauterin inszeminációra, míg a gyengébb minőségű spermaminta, valamint a sebészeti úton nyert hímivarsejtek IVF/ICSI kezelés során lehetnek alkalmasak a megtermékenyítésre. A hímivarsejt-fagyasztás speciális formája, amikor azoospermia vagy súlyos kriptozoospermia esetén nem az ejakulátumból, hanem sebészeti úton a hereszövetből, esetleg a mellékheréből nyerünk hímivarsejtet. Ilyenkor a megfelelően előkészített szövetminta vagy a mellékheréből származó minta kerül fagyasztásra.

Petesejtek fagyasztása. A petesejtek mélyfagyasztása szintén évtizedek óta áll az érdeklődés középpontjában. Jóllehet, az első fagyasztott-felolvasztott petesejt megtermékenyítésével fogant magzat már 1986-ban megszületett, a módszer mégis csak az elmúlt években, a vitrifikáció szélesebb körű elterjedésével és fejlesztésével vált rutin eljárássá. A jelenleg alkalmazott technikákkal az érett petesejtek felolvasztás utáni túlélési aránya

elérheti a 80–90%-ot, míg a megtermékenyülési aránya a 70% körüli értéket.

A petesejt fagyasztása azon betegek számára jelenthet megoldást, akiknél a petesejtnyerés napján nem áll rendelkezésre hímivarsejt a megtermékenyítéshez, valamint akik etikai okból nem kívánnak több embriót létrehozni, mint amennyi az adott kezelésben beültethető. Bizonyos onkológiai betegségek esetén is felmerülhet a petesejtfagyasztás mint a termékenység megőrzésének egyik lehetősége. Ebben az esetben a petefészket károsító onkológiai kezelés megkezdése előtt elvégzett petefészkek-stimulációt követően nyert petesejtek mélyfagyasztására kerül sor.

Ugyanakkor az utóbbi időben komoly társadalmi vitát váltott ki a petesejtek nem orvosi, hanem ún. „szociális” javallat alapján történő fagyasztása („social freezing”). Az eljárás alkalmazása olyan nők esetében merül fel, akik tanulmányaik, karrierjük építése vagy állandó partner hiánya miatt később tervezik a gyermekvállalást. Mint ismeretes, az életkor előrehaladtával növekszik az esélye a petefészkek kimerülésének, a genetikai rendellenességek kockázatának vagy a meddőség egyéb okai jelentkezésének. Ezek elkerülésére merül fel a még fiatal korban nyert és nagyobb eséllyel életképes petesejtek lefagyasztása. A módszer azonban számos etikai kérdést vet fel, alkalmazásának jogi háttere jelenleg nem teljesen tisztázott.

Embriófagyasztás. Jelenleg az asszisztált reprodukciós kezelések során leggyakrabban alkalmazott eljárás az embrió fagyasztása. Mind a hagyományos lassú fagyasztás, mind pedig a vitrifikáció elterjedt ebben a fejlődési állapotban. Többnyire a 23. napi embrióbeültetést követően, 4-8 sejt állapotban, vagy az 56. napi embriótranszfer után, blastocysta állapotban kerül sor az embriók fagyasztására. A módszert elsősorban a szabályos fejlődést mutató, életképesnek tűnő, de az embriótranszfer után megmaradt, ún. „szám feletti” embriók esetében alkalmazzuk azzal a céllal, hogy amennyiben a friss embriók beültetéséből létrejön terhesség, de a pár újabb gyermeket szeretne, vagy ha az IVF kezelés nem jár eredménnyel, úgy a későbbiekben fagyasztott-felolvasztott embriók kerüljenek majd beültetésre.

Hatékonyan működő embriófagyasztási rendszer mellett lehetőség nyílik arra is, hogy az ikerterhességek kockázatának csökkentése céljából a friss embriótranszfer során kevesebb embrió kerüljön beültetésre, és az így megmaradó embriók is lefagyaszthatók.

A mélyfagyasztott és felolvasztott embriók beültetésével az IVF kezelés orvosi kockázata, valamint költsége is csökkenthető, hiszen alkalmazásával nincs szükség petefészkek-stimulációra, petesejtnyerésre vagy bonyolult és költséges laboratóriumi eljárásokra, hanem a felolvasztott embriók egy rövid inkubációt követően beültethetők.

Az IVF kezelés során létrejött embriók mélyfagyasztása abban az esetben is alkalmazható, ha az embrióbeültetés valamilyen okból nem valósítható meg az adott IVF ciklusban pl. a feleség hirtelen megbetegedése, balesete vagy hyperstimulációs szindróma kialakulásának fokozott kockázata miatt. Emellett daganatos betegségek kezelése vagy oophorectomia előtt álló nőbetegek embrióinak kriokonzerválásával biztosíthatjuk számukra egy későbbi terhesség esélyét.

Az embrió mélyhűtésének klinikai jelentőségét jól szemlélteti a következő példa: az IVF ciklusok közel 50%-ában áll rendelkezésünkre úgynevezett „szám feletti” embrió az embriótranszfert követően. Száz IVF-ET kezelésben részesülő házaspár közül kb. 30 esetében várható sikeres terhesség a friss embriók beültetését követően. A sikertelen 70 házaspárból 35 esetben (50%-ban) áll majd rendelkezésünkre számfeletti embrió, melyet mélyfagyaszthatunk. A felolvasztás utáni 70%-os embrió túlélési arányt és a 30%-os terhességi arányt figyelembe véve további 7-9 házaspár esetében számíthatunk terhességre a fagyasztott embriók későbbi ciklusban történő beültetését követően. Ezzel a halmozott terhességi arányt a kezdeti 30%-ról 40%-ra sikerül növelni, ami 30%-os javulásnak felel meg. A halmozott terhességi arány tovább emelkedhet, ha további ciklusok során újabb felolvasztott embriók beültetését végezzük el.

Amennyiben a lefagyasztott embriók tárolási ideje alatt a házaspár úgy dönt, hogy már nem akar újabb terhességet, a fagyasztva tárolt embriókat más meddő házaspároknak adományozhatják vagy tudományos célra ajánlhatják fel.

A női termékenység megőrzése

Az onkológiai betegségek során alkalmazott sugárkezelés vagy kemoterápia, de bizonyos egyéb betegségek esetében felmerülő műtéti beavatkozások is súlyosan és visszafordíthatatlanul károsíthatják a petefészkek működését, ami meddőséghez vezethet. Az ilyen beavatkozások tervezése során leánygyermek, valamint fertilis korban lévő és a későbbiekben még gyermekvállalást tervező nők esetében asszisztált reprodukciós szakember bevonásával célszerű lépéseket tenni a termékenység megőrzése érdekében.

Reproduktív korban lévő nők esetében, amennyiben a petefészkek-stimuláció az onkológiai kezelés előtt nem ellenjavallt, lehetőség van petesejtnyerésre és a petesejtek vagy IVF kezelést követően embriók fagyasztására. Így amennyiben a beteg a későbbiekben gyermeket szeretne, a fagyasztott-felolvasztott petesejtek vagy embriók felhasználásával lehet terhességet létrehozni.

Leánygyermek, illetve azon reproduktív korú nők esetében, akiknél az időigényes petefészkek-stimulációra, illetve a petesejtnyerésre a daganatos megbetege-

dés kemo-, illetve radioterápiájának sürgető volta miatt nincs lehetőség, a petefészekszövet-fagyasztás jelentheti a termékenység megőrzésének módját. A petefészek működését károsító beavatkozás előtt az egyik petefészeket vagy annak egy részét eltávolítjuk, és az így nyert petefészekszövet kéregállományát több kisebb részre osztva lefagyasztjuk. A fagyasztva tárolt szövetminták a későbbiekben felolvaszthatók és a női szervezetbe visszaültetve (autológ transzplantáció) visszaállítható a petefészek hormontermelése és a petesejttermelés is. A módszer még kísérleti stádiumban van, alkalmazásával azonban világszerte eddig már több mint 60 gyermek született.

Praeimplantációs genetikai diagnosztika/szűrés (PGD/PGS)

Abban az esetben, ha a szülők valamilyen súlyos örökletes betegséget hordoznak, praenatalis diagnosztika során van lehetőség annak megállapítására, hogy születendő gyermekük hordozza-e az örökletes betegség génjét. Várhatóan beteg magzat esetében, ha a szülők nem kívánják beteg gyermeket szülni, a terhesség megszakítása jelentheti a megoldást. Azon párok számára, akik a terhességmegszakítás gondolatát nem tudják elfogadni, de nem kívánják beteg gyermeket világra hozni, lehetőség van a beágyazódás előtti embriókon történő genetikai vizsgálatra. Az eljáráshoz IVF-ET kezelést végzünk, kiegészítve a kezelés során nyert petesejteken vagy az osztódó embriókon végzett genetikai vizsgálatlal. A genetikai vizsgálat eredménye alapján azokat az embriókat ültetjük be, amelyek nem hordozzák a vizsgált betegség génjeit.

Petesejt, illetve zigóta esetén a sarki test, osztódó embrió esetén 1-2 blastomera, míg blastocysta állapotú embrió esetén néhány trophoctoderma sejt vizsgálatára van lehetőség. A genetikai célú mintavételhez a petesejtet/embriót körülvevő zona pellucidán mikrosebészeti lézer impulzussal, esetleg egy vékony üvegpipettával vagy savas oldat segítségével nyílást ejtünk, és ezen keresztül mikromanipulátor segítségével emeljük ki a sarki testet vagy embrionális sejtet. A megfelelően elvégzett biopsia nem csökkenti lényegesen az embriók életképességét.

A mintavétel során nyert sejtek vizsgálatára számos módszer áll rendelkezésre, amelyek megválasztásánál figyelembe kell venni a vizsgálni kívánt betegség genetikai hátterét. Egygénes rendellenességek esetén a polimeráz láncreakción (PCR) alapuló vizsgálatok, kromoszóma-rendellenességek vizsgálatára pedig inkább a fluoreszcens in situ hibridizáció (FISH) módszerei jöhetnek szóba. Az utóbbi időben a FISH eljárásokat a teljes genom amplifikáción alapuló array-CGH (Comparative Genomic Hybridization) váltotta fel, amely a hagyományos

citogenetikai vizsgálatoknál részletesebb eredményt ad, és mikrodéléción, mikroduplicációk kimutása mellett alkalmas a teljes genom vizsgálatára is.

Optimális esetben a genetikai vizsgálat néhány óra alatt, esetleg 12 napon belül elvégezhető, így lehetőség van arra, hogy a vizsgálat eredménye alapján felhasználható embriókat még az adott IVF ciklusban beültessük. Amennyiben a genetikai vizsgálat hosszabb ideig tart, úgy az embriók fagyasztásra kerülnek, és a beteg későbbi ciklusában történik a felolvasztás és az embrióbeültetés.

Az egyetlen vagy néhány sejtől végzett genetikai vizsgálat magas technikai felkészültséget és szaktudást igényel, és a vizsgálatok eredménye soha nem tekinthető 100%-osnak. Így a PGD kezelések során fogant magzatok esetében praenatalis diagnosztikával ajánlott a korábbi praeimplantációs genetikai vizsgálat eredményét megerősíteni.

Egyre gyakrabban alkalmazzák a praeimplantációs genetikai szűrést (PGS) amely nem a szülők által hordozott genetikai rendellenességek elkerülésére, hanem az IVF kezelés hatékonyságának fokozására és az aneuploid fogamzások kiszűrésére irányul. A beültetésre kerülő embriókat azok morfológiája és fejlődésük dinamikája alapján választjuk ki. Ezek a paraméterek azonban önmagukban nem mindig elegendők arra, hogy nagy biztonsággal válasszuk ki az életképes embriókat, hiszen a szabályosan osztódó, normál morfológiájú embriók esetében is előfordul aneuploidia, akár 3065%-ban. A szerkezeti vagy számbeli kromoszóma-rendellenességeket hordozó embriók beültetése rendellenes embriófejlődést és vetélést eredményezhet, kiviselt terhesség esetén többnyire mentális retardációt okoz. Ezért a beültetés előtt elvégzett kromoszómavizsgálat, melyet ma egyre gyakrabban CGH módszerrel végeznek, lehetőséget adhat arra, hogy euploid embriókat ültessünk be, javítva ezzel az IVF kezelések eredményességét is. A módszert jelenleg világszerte alkalmazzák, hazánkban pillanatnyilag nem engedélyezett. A kérdés jogi és etikai vonatkozásait lásd a 29. fejezetben.

Mitokondrium transzfer (mitochondrial replacement therapy)

A petesejtek citoplazmájában lévő mitokondriális DNS rendellenességei számos súlyos betegséghez, valamint meddőséghez is vezethetnek. Ilyenkor a betegséget hordozó nő petesejtjének sejtmagja egészséges, a citoplazmában lévő mitokondriumok azonban vagy azok egy része DNS-mutációt hordoz. Az ilyen, örökletes rendellenességet hordozó nők számára a PGD kezelés sem jelent hatékony megoldást ahhoz, hogy nagy valószínűséggel egészséges gyermeket hozzanak világra, ezért gyakran csak adományozott petesejttel végzett IVF kezelés jöhet szóba.

Citoplazmacsere alkalmazásával lehetőség nyílik arra, hogy ezeknek a betegeknek genetikailag saját, egészséges gyermekük szülessen. A módszer alkalmazásakor egy egészséges, ám sejtmagjától megfosztott donor petesejtbe ültetik a beteg petesejtjének sejtmagját. A mikromanipulációs technikával létrehozott petesejt citoplazmája és az abban lévő mitokondriális DNS egy egészséges donortól, míg a petesejt magja a mitokondriális betegségben érintett nőtől származik. A továbbiakban a létrehozott petesejtet a beteg férjének hímivarsejtjével termékenyítik meg, majd a létrejött, a pár nőtagjának mitokondriális DNS-hibáit már nem hordozó embriókat ültetik be.

Az ivarsejtek/embriók adományozása

Az adományozott ivarsejtekkel végzett (heterológ) IVF, az embriódonatio és a dajkaanyaság technikai szempontból nem tér el a homológ IVF és a kriokonzerválás szokásos módszereitől, javallati körük azonban eltérő, és orvosi, etikai és jogi megítélésük sokkal kritikusabb. Az ivarsejt-, illetve embrióadományozás és a dajkaanyaság etikai szempontból kizárólag orvosi javallat esetén fogadható el. *(A kérdés etikai és jogi részleteit lásd a 29. fejezetben.)*

Spermadonatio. Donorsperma alkalmazására akkor van szükség, ha a feleség meddősége IVF kezelést tesz szükségessé, és ehhez a férj ondósejtjei nem használhatók fel. Az ICSI technika széles körű elterjedésével a donorsperma IVF-alkalmazásának javallati köre 1992 óta drasztikusan beszűkült. Spermadonorok olyan normozoospermias, lehetőleg igazoltan fertilis, fiatal, egészséges, örökletes betegségben nem szenvedő férfiak lehetnek, akiknek spermája jól mélyhűthető. A donorok kiválasztásánál és rendszeres ellenőrzésénél számos szempontot kell figyelembe venni. Az AIDS-fertőzés kizárása érdekében a hatályos jogszabály előírásai szerint csak mélyhűtött donorsperma használható. A felolvasztott ondóminta a szokásos (swim up, Percoll vagy más módszerrel történő) előkészítés után használható in vitro inszeminációra. A kezelés további lépései nem különböznek a homológ IVF-től.

Petesejt-adományozás. Petesejt-adományozásra azok az asszonyok szorulnak, akiknek szervezetében nem fejlődnek életképes, egészséges petesejtek. A petesejtdonor lehetnek olyan, IVF kezelésben részvételű meddő asszonyok, akiknél a folliculuspunctio során várhatóan nagyszámú petesejt nyerhető, és előzetesen – házastársukkal egyetértve – petesejtjeik előre meghatározott hányadát felajánlják egy másik, számukra általában ismeretlen meddő házaspár javára (önkéntes, anonim donorok). A petesejtdonor lehet az adományozásra szo-

roló házaspár közeli hozzátartozója vagy barátja, aki hajlandó magát ovarialis stimulációnak és tűszópunciónak alávetni (önkéntes, ismert donor). Egyes országokban az asszisztált reprodukciós központok professzionális donorokat is alkalmaznak, akik a beavatkozással járó költségeik megtérítése ellenében vetik alá magukat a beavatkozásoknak. Hazánkban jelenleg csak önkéntes, ismert donorral végezhető ilyen kezelés akkor, ha a donor a recipiens rokona vagy közeli hozzátartozója. Az adományozott petesejtet a recipiens férjének előkészített ondósejtjeivel termékenyítjük, az embriókat a szokott módon tenyésztjük.

Embrióadományozás. Embrióadományozásról akkor beszélünk, amikor egy házaspár – általában mélyhűtve tárolt – saját céljára felajánlani nem kívánt és adományozási célra felajánlott embrióit egy másik meddő asszony méhében ültetjük. A donorok kiválasztása ebben az esetben legtöbbször utólagos, mert donorok általában akkor adományozzák másnak mélyhűtve tárolt embriókat, amikor ők maguk már nem kívánnak újabb gyermeket. Emiatt a donorok szelekciója és szűrővizsgálatai tekintetében jelentős kompromisszumokat kell kötni. Az ebből eredő kockázatokról a recipienst és házastársát tájékoztatni kell.

Dajkaanyaság (dajkaterhesség). Ha a meddőség oka az uterus hiánya, illetve terhesség kiviselésére alkalmatlan állapota megtartott ovariumműködés mellett, vagy a terhesség kiviselése orvosi szempontból ellenjavallt, a beteg petesejtjeinek szervezeten kívüli megtermékenyítésével létrehozott embriókat arra vállalkozó, ún. dajkaanya méhében ültethetjük, aki kihordja és megszüli a meddő nőbeteg számára annak magzatát. Dajkaanyaságra általában a legközelebbi rokonok (leánytestvér, anya) vállalkoznak, de egyes országokban olyan dajkaanyák is szóba jönnek, akik a beavatkozással és a terhességgel járó költségeik megtérítése ellenében hordják ki a meddő házaspár genetikai gyermekét. A dajkaanya kiválasztása, valamint az ivarsejtet adó genetikai szülőknél és a dajkaanyánál elvégzendő szűrővizsgálatok szempontjai hasonlóak az ivarsejt-, illetve embrióadományozásnál figyelembe vett szempontokkal, eltekintve a genetikai vizsgálatoktól. Hazánkban jelenleg dajkaterhességgel kiegészített szervezeten kívüli megtermékenyítés nem végezhető.

Az in vitro fertilizáció eredményessége

Egészséges, fogamzásgátlást nem alkalmazó, rendszeres házasetet élő, reprodukzív korban levő házaspár esetében a teherbeesés esélye egy menstruációs ciklusra számítva 30% (spontán teherbeesési esély). Ennek az adatnak az ismeretében kell értékelnünk az in vitro

fertilizációs kezelések sikerességét is. Az első szervezetten kívül fogant magzat születése óta eltelt csaknem 40 év alatt a kezelések eredményessége jelentősen javult, de nagy nemzetközi statisztikák alapján az embrióbeültetésre számított terhességi arány továbbra is 3035% körül mozog.

Az in vitro fertilizáció szövődményei

Az IVF-ET kezelést végző orvos alapvető kötelessége a házaspárt még az IVF programba való felvétele előtt részletesen tájékoztatni a szervezetten kívüli megtermékenyítés lényegéről, eredményességének adott esetre vonatkozó esélyeiről, a kezelés esetleges szövődményeiről, valamint a kezelés alatti orvos-beteg együttműködés fontosságáról. A szervezetten kívüli megtermékenyítés szövődményeire a kezelés egyes lépéseinek tárgyalásakor utaltunk.

Ajánlott irodalom

Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group Embryology. Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Reprod Biomed Online* 2011; 22: 632–646.

Baird DT. A model for follicle selection and ovulation: Lessons from superovulation. *J Steroid Biochem.* 1987; 27: 15–23.

Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F. Selection of spermatozoa with normal nuclei to improve the pregnancy rate with intracytoplasmic sperm injection. *N Engl J Med.* 2001; 345: 1067–1068.

Carney S-K, Das S, Blake D, et al. Assisted hatching of fertilised eggs to improve the chances of pregnancy in assisted conception (IVF and ICSI). *Cochrane Database Syst Rev.* 2012; Issue 12.

Chian R, Quinn P. *Fertility Cryopreservation.* Cambridge University Press, Cambridge, 2010.

Chua W, Boothroyd C, Walls M, et al. Slow freeze versus vitrification for embryo cryopreservation. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012; Issue 1.

Coward K, Wells D. *Textbook of Clinical Embryology.* Cambridge University Press, Cambridge, 2013.

De Kretzer D, Dennis P, Hudson B. Transfer of a human zygote. *Lancet* 1973; 2: 729.

Dellenbach P, Nisand I, Moreau L, et al. Transvaginal sonographically controlled ovarian follicle puncture for egg retrieval. *Lancet* 1984; 1: 1467.

Devroey P, Liu J, Nagy Z, et al. Normal fertilization of human oocytes after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 1994; 62: 639–641.

Devroey P, Van Steirteghem A, Mannaerts B, et al. First singleton term birth after ovarian superovulation with rh-FSH. *Lancet* 1992; 1: 1108.

Donnez J, Dolmans MM. Ovarian cortex transplantation: 60 reported live births brings the success and worldwide expansion of the technique towards routine clinical practice. *J Assist Reprod Genet.* 2015; 32: 1167–1170.

Ebner T, Montag M. Artificial oocyte activation: Evidence for clinical readiness. *Reprod Biomed Online* 2016; 32: 271–273.

Engelstad K, Sklerov M, Kriger J, et al. Attitudes toward prevention of mtDNA-related diseases through oocyte mitochondrial replacement therapy. *Hum Reprod.* 2016; doi:10.1093/humrep/dew033.

Fancsovits P. Kommentár „A meddő betegek esélyeinek javítása” cikkhez. *Nőgyógy Szül Továbbk Szle.* 2012; 14: 184–186.

Fancsovits P, Tóth L, Takács, FZ, et al. Early pronuclear breakdown is a good indicator of embryo quality and viability. *Fertil Steril.* 2005; 84: 881–887.

Fancsovits P, Urbancsek J, Papp Z. In vitro fertilisatióval létrehozott praeembryók beágyazódási esélye a petesejt, a zigóta és a praeembryo morfológiai jellemzői alapján. *Magy Nőorv L.* 2002; 65: 231–242.

Fleming J, Coutts JRT. Induction of multiple follicular growth in normally menstruating women with endogenous gonadotropin suppression. *Fertil Steril.* 1986; 45: 226–230.

Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. *Textbook of Assisted Reproductive Technologies. Laboratory and Clinical Perspectives.* Informa Healthcare, London, 2009.

Gatimel N, Parinaud J, Leandri RD. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) does not improve outcome in patients with two successive IVF-ICSI failures. *J Assist Reprod Genet.* 2016; 33: 349–355.

Gordon K, Williams RF, Danforth DR, et al. A novel regimen of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonist plus pulsatile GnRH: Controlled restoration of gonadotropin secretion and ovulation induction. *Fertil Steril.* 1991; 54: 1140–1145.

Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, et al. Pregnancies from biopsied human praeimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990; 344: 768–770.

Hodgen GD. The dominant ovarian follicle. *Fertil Steril.* 1982; 38: 281–300.

Howles C, Barri P, Cittadini E, et al. Metrodin HP: Clinical experience with a new highly purified follicle stimulating hormone preparation suitable for subcutaneous administration. In: *FSH Alone in Ovulation Induction.* Ed. Lunenfeld B. New York: The Parthenon Publishing Group, 1993; pp. 45–61.

Huszár G, Ozenci CC, Cayli S, et al. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril.* 2003; 79 (S3): 1616–1624.

- Jones HW, Jones GS, Andrews MC, et al. The program for in vitro fertilization at Norfolk. *Fertil Steril.* 1982; 38: 14–21.
- Kistner RW. Induction of ovulation with clomiphene citrat (Clomid). *Obstet Gynecol Surv.* 1965; 20: 873–899.
- Konc J, Cseh S, Kanyó K, et al. Cryopreservation of oocytes and embryos in human assisted reproduction. *J Reprod Med Endocr.* 2005; 2: 251–258.
- Konc J, Kanyó K, Varga E, et al. Oocyte cryopreservation: The birth of the first Hungarian babies from frozen oocytes. *J Assist Reprod Genet.* 2008; 25: 349–352.
- Kruger TF, Franken DR. *Atlas of Human Sperm Morphology Evaluation.* Taylor & Francis, London, 2004.
- Lee E, Illingworth P, Wilton L, et al. The clinical effectiveness of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy in all 24 chromosomes (PGD-A): Systematic review. *Hum Reprod.* 2015; 30: 473–483.
- Lehner Á, Kaszás Z, Murber Á, et al. Az embriók vitrificációja és hagyományos mélyfagyasztásuk eredményességének összehasonlítása in vitro fertilizációs kezeléseik során. *Magy Nőorv L.* 2015; 78: 210–217.
- Lenz S, Leeton J, Renou P. Transvaginal recovery of oocytes for IVF using vaginal ultrasound. *J In Vitro Fert Embryo Transfer* 1987; 4: 51–55.
- Lopata A, Johnston IWH, Houlst IJ, et al. Pregnancy following intrauterine implantation of an embryo obtained by in vitro fertilization of a preovulatory egg. *Fertil Steril.* 1980; 33: 117–120.
- Lundin K, Ahlström A. Quality control and standardization of embryo morphology scoring and viability markers. *Reprod BioMed Online* 2015; 31,459–471.
- Magli MC, Jones GM, Lundin K, et al. and ESHRE Special Interest Group on Embryology. *Atlas of Human Embryology: From Oocytes to Preimplantation Embryos.* *Hum Reprod.* 2012; 27(S1): 1–94.
- Navot D, Margalioth EJ, Laufer NJ, et al. Direct correlation between plasma renin activity and severity of the ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril.* 1987; 48: 57–61.
- Palermo G, Joris H, Devroey P, et al. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340: 17–18.
- Porter RN, Smith W, Craft IL, et al. Induction of ovulation for in-vitro fertilisation using buserelin and gonadotrophins. *Lancet* 1984; 2: 1284–1285.
- Pribenszky C, Mátyás S, Kovács P, et al. Pregnancy achieved by transfer of a single blastocyst selected by time-lapse monitoring. *Reprod Biomed Online* 2010; 21: 533–536.
- Rabe T, Gör Ü, Urbancsek J, et al. Assistierte Fertilitätstherapie in der Gynäkologie: Neue Techniken. *TW Gynäkologie* 1993; 6: 317–333.
- Rabe T, Gör Ü, Urbancsek J, et al. Assisted reproduction. In: *Gynecological Endocrinology and Reproductive Medicine, Volume 2: Reproductive Medicine.* Ed. Runnebaum B, Rabe T. 1996; pp. 297–342.
- Rabe T, Urbancsek J, Gör Ü, et al. Assistierte Fertilitätstherapie in der Gynäkologie: Geschichtliche Entwicklung. *TW Gynäkologie* 1993; 6: 312–316.
- Rienzi L, Vajta G, Ubaldi F. Predictive value of oocyte morphology in human IVF: A systematic review of the literature. *Hum Reprod Update* 2011; 17: 34–45.
- Rizk B, Aboulghar M. Modern management of ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod.* 1991; 6: 1082–1087.
- Rizk B, Meagher S, Fisher AM. Severe ovarian hyperstimulation syndrome and cerebrovascular accidents. *Hum Reprod.* 1990; 5: 697–698.
- Romero J, Remohí J, Mínguez Y, et al. Fertilization after intracytoplasmic sperm injection with cryopreserved testicular spermatozoa. *Fertil Steril.* 1996; 65: 877–879.
- Schott L, Alvero R, Leondires M, et al. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod.* 2000; 15: 2394–2403.
- Seyhan A, Ata B, Tan SL. A meddő betegek esélyeinek javítása. *Contemp Obstet Gynecol.* 2012; 57/5. *Nőgyógy Szül Továbbk Szle.* 2012; 14: 178–183.
- Simpson JL. Preimplantation genetic diagnosis at 20 years. *Prenat Diagn.* 2010; 30: 682–695.
- Smith GD, Swain JE, Pool TB (eds.) *Embryo Culture. Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology.* Vol. 912, 2012.
- Smitz J, Devroey P, Camus M, et al. The luteal phase and early pregnancy after combined GnRH-agonist/HMG treatment for superovulation in IVF or GIFT. *Hum Reprod.* 1988; 3: 585–590.
- Stephoe PC, Edwards RG. Reimplantation of a human embryo with subsequent tubal pregnancy. *Lancet* 1976; 1: 880–882.
- Stephoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Nature* 1978; 2: 366.
- Urbancsek J. A szérum LH szint prognosztikai jelentősége gonadotropin kezelés során az in vitro fertilizáció-embriótranszfer és gamétatranszfer programban. *Kandidátusi értekezés, Budapest, 1991.*
- Urbancsek J. A menstruációs ciklus élettana. In: *Nőgyógyászati endokrinológia.* Szerk. Urbancsek J, Papp Z., Budapest: Springer Hungarica, 1997; pp. 72–103.
- Urbancsek J. Sterilitás és asszisztált reprodukció. In: *Nőgyógyászati endokrinológia.* Szerk. Urbancsek J, Papp Z., Budapest: Springer Hungarica, 1997; pp. 245–286.
- Urbancsek J. Női infertilitás és asszisztált reprodukció. In: *Szülészeti-nőgyógyászati ultrahang-diagnosztika.* Szerk. Tóth Z, Papp Z., Budapest: White Golden Book Kiadó, 2001; pp. 380–399.
- Urbancsek J. Az in vitro fertilizációs kezelések eredményességének előrejelzése endokrin markerek segítségével. *MTA doktori értekezés, Budapest, 2005.*

- Urbancsek J, Bárándi Zs, Sztanyik L. A szervezeten kívüli megtermékenyítés. In: Nőgyógyászati endokrinológia. Szerk. Urbancsek J, Papp Z., Budapest: Springer Hungarica, 1997; pp. 288–380.
- Urbancsek J, Papp Z. (ed.) Nőgyógyászati endokrinológia. Budapest: Springer Hungarica, 1994.
- Urbancsek J, Rabe T. Asszisztált reprodukció. Az in vitro fertilizáció elmélete és gyakorlata. Budapest: Springer Hungarica, 1994.
- Urbancsek J, Rabe T, Grunwald K, et al. High preovulatory serum LH level is unfavourable to conception. *Gynecol Endocrinol.* 1991; 5: 223–233.
- Urbancsek J, Rabe T, Strowitzki T. Ovarian stimulation for in vitro fertilization: Past and present. In: *Manual on Assisted Reproduction*. Ed. Rabe T, Diedrich K, Strowitzki T., Berlin: Springer Verlag, 2000; pp. 165–195.
- Urbancsek J, Witthaus E. The midluteal busserelin administration is superior to early follicular phase administration in combined GnRH-analogue and gonadotropin stimulation for controlled ovarian hyperstimulation. *Fertil Steril.* 1996; 65: 966–971.
- Veeck LL. *An Atlas of Human Gametes and Conceptuses*. New York: The Parthenon Publishing Group, 1999.
- Veeck LL, Zaninković E. *An Atlas of Human Blastocyst*. New York: The Parthenon Publishing Group, 2003.
- Vereczkey A, Nánássy L. Kommentár „Az oocyták krioprezervációja: Újabb előrelépések, jövőbeni elvárások” cikkhez. *Nőgyógy Szül Továbbk Szle.* 2012; 14: 220–221.
- Verlinsky Y, Kuliev A. *An Atlas of Preimplantation Genetic Diagnosis*. New York: The Parthenon Publishing Group, 2000.
- Wang WH, Meng L, Hackett RJ, et al. Developmental ability of human oocytes with or without birefringent spindles imaged by Polscope before insemination. *Hum Reprod.* 2001; 16: 1464–1468.
- World Health Organization. *Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*. 5th ed. WHO Press, Geneva, 2010.