

Petesejtek, zygoták és praeembryók morphologiai vizsgálata *in vitro* fertilisatiós kezelések során

Doktori értekezés

Fancsovits Péter

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Urbancsek János egyetemi docens

Programvezető: Dr. Papp Zoltán egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Gócza Elen tudományos munkatárs

Dr. Gimes Gábor egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Szende Béla egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Tóth Zoltán egyetemi tanár

Dr. Csapó Zsolt egyetemi docens

Budapest

2006.

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés.....	6
1.1. Morphologiai vizsgálatok szerepe az IVF/ET kezelések során	7
1.2. Petesejtek morphologiai vizsgálata	8
1.2.1. A cumulus oophorus vizsgálata a petesejtnyerést követően	8
1.2.2. A petesejt morphológiája és érettsége	9
1.2.3. A cytoplasma morphologiai elváltozásai	12
1.2.4. Extracytoplasmatikus morphologiai elváltozások a petesejtben.....	14
1.3. Megtermékenyült petesejtek morphologiai vizsgálata.....	16
1.3.1. A petesejt megtermékenyülése	16
1.3.2. A megtermékenyült petesejt első sejtciklusa	17
1.3.3. A megtermékenyülés elbírálása.....	19
1.3.4. A pronucleusok morphologiai vizsgálata	22
1.4. Az első sejtciklus időzítésének megfigyelése az IVF/ET kezelések során	24
1.5. Az osztódó praeembryo morphologiai vizsgálata.....	25
1.5.1. A praeembryók fejlődése az első osztódástól a blastocysta állapotig.....	25
1.5.2. Praeembryók morphologiai vizsgálata és a beültetésre kerülő praeembryók kiválasztása .	26
2. Célkitűzések	30
3. Anyag és módszer	32
3.1. Adatgyűjtés	32
3.2. Petefészek stimuláció.....	32
3.2.1. GnRH analóg kezelés	32
3.2.2. Gonadotrophin stimuláció	33
3.2.3. Ovuláció indukció.....	33
3.3. Petesejtnyerés.....	33
3.4. Spermareparálás	34
3.4.1. Felúsztatásos (swim-up) módszer.....	34
3.4.2. Sűrűséggrádiens centrifugálás	35
3.4.3. Hímivarsejtek gyűjtése hereszövetből	35

3.5.	Megtermékenyítés	35
3.5.1.	Hagyományos <i>in vitro</i> fertilisatio	35
3.5.2.	ICSI kezelés.....	36
3.6.	A petesejt morfológiai vizsgálata	37
3.6.1.	A nucleáris érettség megítélése	37
3.6.2.	Az 1. sarkitest morfológiájának vizsgálata	37
3.6.3.	A perivitellinális tér méretének vizsgálata	38
3.6.4.	A cytoplasma szemcsézettségének vizsgálata	39
3.6.5.	A cytoplasmában megfigyelhető vacuolumok.....	40
3.7.	A zygota vizsgálata	41
3.7.1.	A megtermékenyülés ellenőrzése	41
3.7.2.	A zygota morfológiai vizsgálata	42
3.8.	Praeembriók tenyésztése.....	42
3.9.	A korai praeembryo fejlődés vizsgálata	43
3.10.	Az osztódó praeembryo morfológiai vizsgálata.....	43
3.11.	Embryotransfer	45
3.11.1.	Az embryotransfer időpontja	45
3.11.2.	A beültetett praeembriók száma	45
3.11.3.	A beültetésre kerülő praeembriók kiválasztása.....	45
3.11.4.	Az embryotransfer folyamata	46
3.12.	A beültetésre nem kerülő praeembriók sorsa	46
3.13.	Az <i>in vitro</i> fertilisációs kezelések kimenetele	46
3.14.	Az adatok statisztikai értékelése	47
4.	Eredmények	48
4.1.	Adatértékelés az egyes vizsgálati paraméterek esetében	49
4.2.	A petesejt morfológiai vizsgálatának eredményei	50
4.2.1.	Az 1. sarkitest morfológiai vizsgálatának eredményei.....	50
4.2.2.	A perivitellinális tér vizsgálatának eredményei.....	55
4.2.3.	A cytoplasma szemcsézettség vizsgálatának eredményei.....	60
4.2.4.	A cytoplasmában megfigyelhető vacuolumok vizsgálatának eredményei.....	65
4.3.	A korai praeembryo fejlődés vizsgálatának eredményei	71
4.3.1.	A korai praeembryo fejlődés optimális vizsgálati időpontjának meghatározása	72
4.3.2.	A megtermékenyítés módja és a korai praeembryo fejlődés kapcsolata.....	73

4.3.3.	Az előmagok korai eltűnése és a praeembryók fejlődésének kapcsolata.....	74
4.3.4.	Előmagok korai eltűnését mutató praeembryók beültetésének hatása az IVF kezelések kimenetelére	76
5.	Megbeszélés	79
5.1.	A petesejtek morfológiai vizsgálatainak értékelése	81
5.1.1.	Az első sarkitest morfológiai vizsgálatának értékelése	81
5.1.2.	A perivitellinális tér morfológiai vizsgálatának értékelése	83
5.1.3.	A cytoplasma szemcsézettség morfológiai vizsgálatának értékelése	87
5.1.4.	A cytoplasmában megfigyelhető vacuolumok vizsgálatának értékelése	90
5.2.	A korai praeembryo fejlődés vizsgálatának értékelése	93
6.	Következtetések	99
7.	Összefoglalás	102
8.	Abstract	103
9.	Irodalomjegyzék	104
10.	A doktori értekezés alapjául szolgáló saját közlemények jegyzéke	116
10.1.	A doktori értekezés témájával kapcsolatos saját közlemények.....	116
10.2.	A doktori értekezés témájával kapcsolatos, nemzetközi folyóiratokban megjelent idézhető absztraktok.....	117
10.3.	A doktori értekezés témájával kapcsolatos egyéb idézhető absztraktok.....	118
10.4.	A tudományos munkásságot megalapozó egyéb közlemények.....	119
10.5.	A tudományos munkásságot megalapozó egyéb absztraktok.....	119
11.	Köszönetnyilvánítás.....	122

Rövidítések jegyzéke

E2:	Estradiol
ESHRE:	European Society of Human Reproduction and Embryology
ET:	Embryotransfer
FSH:	Folliculus stimuláló hormon
GnRH:	Gonadotrophin releasing hormon
GV:	Germinális vesiculum
hCG:	Human chorion gonadotrophin
hMG:	Human menopausal gonadotrophin
HS:	Human serum
ICSI:	Intracytoplasmaticus spermium injektálás
IVF:	<i>In vitro</i> fertilisatio
MI:	Metafázis I (a meiotikus osztódás első fázisának metafázisa)
MII:	Metafázis II (a meiotikus osztódás második fázisának metafázisa)
NE:	Nemzetközi egység
PB:	Polar body (sarkitest)
PI:	Profázis I (a meiotikus osztódás első fázisának profázisa)
PN:	Pronucleus (előmag)
PNBD:	Pronuclear breakdown (a pronucleusok eltűnése)
PVS:	Perivitellin space (perivitellinális tér)
sER:	Sima felszínű endoplasmaticus reticulum
T ₆ :	Embryotenyésztő tápoldat
T ₆ H:	Embryotenyésztő tápoldat HEPES-sel kiegészítve
TESE:	Testicular sperm extraction (spermium nyelés hereszövetből)

1. Bevezetés

Emberi petesejtek szervezeten kívüli megtermékenyítése (*in vitro* fertilisatio, IVF) és a zygotából fejlődő praeembryók beültetése az anyaméhbe (embryotransfer, ET) már több mint két évtizede lehetőséget ad a meddőség bizonyos formáinak kezelésére [1]. Az asszisztált reprodukciós módszerek elmúlt években tapasztalt robbanásszerű fejlődése egyre több meddő pár számára ad lehetőséget arra, hogy saját gyermeke legyen. Az első sikeres kezelések óta jelentős előrelépés történt az *in vitro* fertilisációs technikákban. A petefészek stimulációs kezelések, valamint a petesejtnyerés módszerének fejlődése következtében egyre több petesejt nyerhető egy-egy kezelés során. Az *in vitro* fertilisációs technikák fejlődésével a rendelkezésre álló petesejtek egyre nagyobb részét sikerült megtermékenyíteniⁱ, egyre több beültetésre alkalmas praeembryótⁱⁱ hozva ezzel létre. A petesejtek megtermékenyítése terén elsősorban az intracytoplasmaticus spermium injectio (ICSI) valamint a hereszövetből történő spermiumnyerés bevezetésével mind súlyosabb andrológiai eredetű meddőségi esetekben is lehetőség nyílik az IVF-ET kezelésre. A praeembryók tenyésztési körülményeinek javításával a megtermékenyült petesejtekből egyre több jó minőségű, így nagyobb eséllyel terhességet eredményező praeembryo jöhet létre. Korszerű szemléletű embryotransfer stratégiák kialakítása, valamint eredményesebb ET technikák bevezetése tovább fokozza az IVF-ET kezelések hatékonyságát.

Mindez az IVF-ET kezelések számának világszerte tapasztalható emelkedése mellett az eredményesség fokozatos javulásához vezetett az elmúlt két évtizedben. Az Európai Humán Reprodukciós és Embriológiai Társaság (European Society of Human Reproduction and Embryology, ESHRE) által vezetett IVF adatbázis alapján az 1997-ben elvégzett, és az adatbázisba lejelentett 142 462 embryotransfer 26.3%-a vezetett klinikai terhességhez [2]. Az ezt követő években mind a kezelések száma, mind pedig azok eredményessége fokozatosan emelkedett, így 2001-ben ugyanez az adatbázis már 189 401 embryotransferról számol be, amelyek 28.7%-a eredményezett terhességet [3].

ⁱ Megtermékenyült petesejt = zygota (a hímivarsejt petesejtbe történő behatolásától az első sejtosztódásig nevezzük így a conceptust)

ⁱⁱ Előébrény = praeembryo (az első sejtosztódástól a 14. napig tartó időszakban nevezzük így a conceptust)

Ugyanebben az évben a magyarországi IVF központokban végzett 5140 embryotransfer átlagosan 28,8%-a eredményezett terhességet.

1.1. Morphologiai vizsgálatok szerepe az IVF/ET kezelések során

Az IVF/ET kezelések során az utóbbi időben megfigyelhető fejlődés elsősorban azt eredményezte, hogy egyre több beültethető praeembryo áll rendelkezésünkre az embryotransfer előtt. A jelenlegi hazai szabályozás alapján 3, bizonyos esetekben 4 praeembryót ültethetünk be egy-egy kezelés során. Számos európai országban azonban a többes terhességek arányának csökkentése céljából ma már gyakran csak 2, esetleg 1 praeembryo ültethető be. Így komoly kihívást jelent az embriológusok számára, hogy a rendelkezésre álló praeembryók közül milyen módon válasszák ki a legéletképesebbeket az ET-hez.

A praeembryók életképességének és beágyazódási esélyének megítélésére ma már számos módszer áll rendelkezésünkre, amely alapulhat a praeembryo morfológiai, molekuláris vagy cytogenetikai vizsgálatán, esetleg a tüszőfolyadék, vagy a praeembryók környezetének számító embryotenyésztő tápoldat biokémiai vizsgálatán is. Mindezen lehetőségek közül azonban a klinikai gyakorlatban csak olyan módszer alkalmazható, amely nem invazív, viszonylag gyorsan (néhány perc alatt) elvégezhető, nem csökkenti a praeembryók életképességét, objektív és olcsó. Úgy tűnik, hogy a jelenleg rendelkezésünkre álló módszerek közül leginkább a morfológiai vizsgálatok felelnek meg a fenti követelményeknek, bár ezek a vizsgálatok nem minden esetben tekinthetők objektívnek.

A rendelkezésre álló praeembryók közül a legtöbb munkacsoport jelenleg kizárólag a beültetés előtt megfigyelt morfológiai sajátosságok alapján választja ki azokat, amelyek embryotransferre kerülnek. Számos új ismeret azonban arra utal, hogy a praeembryók hagyományos bírálata mellett újabb tényezőket, a petesejt és a megtermékenyült petesejt jellemzőit is célszerű figyelembe venni a beültetendő praeembryók kiválasztásánál.

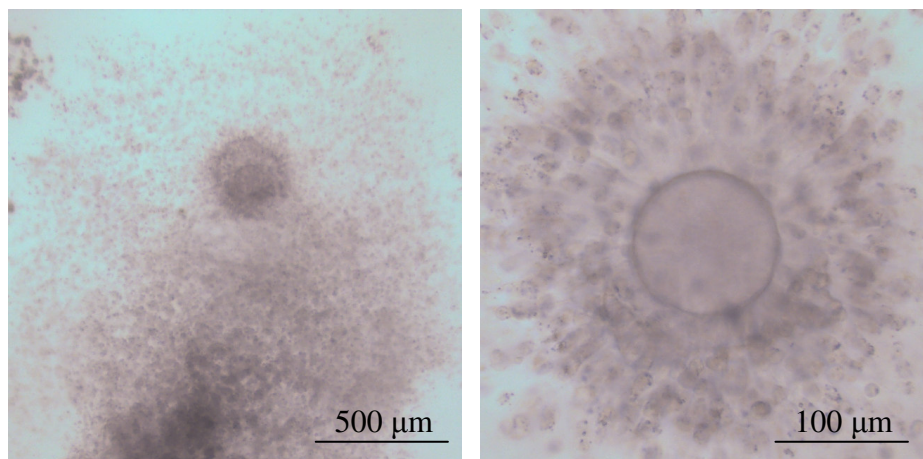
Ezen tulajdonságoknak ugyanis a legújabb kutatási eredmények alapján egyre nagyobb szerepük lehet abban, hogy segítségével a korábbi bírálati módszereknél hatékonyabban meg lehessen ítélni a megtermékenyült petesejtből fejlődő praeembryo életképességét, beágyazódási esélyét. Amennyiben a petesejt, a zygota és az osztódó

praeembryo komplex morfológiai bírálata alapján sikerül a leginkább életképes praeembryókat kiválasztani az embryotransferhez, úgy lehetőség nyílik arra, hogy tovább növeljük az *in vitro* fertilisatiós kezelések eredményességét, valamint kevesebb, de jobb minőségű praeembryót beültetve csökkenthetjük a jelentős anyai és magzati kockázattal járó többes terhességek arányát is.

1.2. Petesejtek morfológiai vizsgálata

1.2.1. A cumulus oophorus vizsgálata a petesejtnyerést követően

Az IVF kezelések során a tüszőpunkció útján nyert petesejtek cumulus sejtekkel körülvéve (cumulus oophorus) találhatóak a tüszőfolyadékban (1. ábra). A *cumulus sejtek érettsége* hagyományosan támpontként szolgál az embriológusnak a petesejtek érettségének megítélésében [4]. Megfelelő méretű, érett, ovuláció előtt álló tüszőből nyert petesejtek cumulus sejtjei általában fellazultak, a petesejtet körülvevő zona pellucida körül sugárirányban rendeződtek.



1. ábra: Cumulus oophorus: a petesejt és az azt körülvevő granulosa sejtek halmaza

Kevésbé expandált, vagy a petesejtet szorosan körülvevő, tömött cumulus sejtréteg a petesejt különböző fokú éretlenségére utal. Bár több közlemény is beszámol arról, hogy a cumulus sejtek érettsége és a petesejt nuclearis érettsége nem minden esetben egyezik meg [5,6], az IVF kezeléseket végző legtöbb munkacsoport mégis ellenőrzi a cumulus sejtek érettségét. Ez azért alakult így, mert sokáig ez volt az egyetlen olyan információ, amely alapján a petesejtek érettségére következtetni lehetett. A hagyományos IVF kezelések során ugyanis a petesejt az azt körülvevő cumulus sejtektől nem, vagy csak

alig látható fénymikroszkóp segítségével. Így a tényleges nuclearis érettségre utaló első sarkitest jelenléte nem figyelhető meg.

A mikromanipulációs technikák fejlődésével bevezetésre került az intracytoplasmaticus spermium injectio (ICSI) módszere [7], elsősorban a súlyos andrológiai eredetű meddőség kezelésére. Az eljárás során mikromanipulátor segítségével egyetlen spermiumot fecskendezünk a zona pellucidán keresztül a petesejt cytoplasmájába (2. ábra). Ehhez még a beavatkozás előtt el kell távolítani a zona pellucidát körülvevő cumulus sejteket (denudatio). Így láthatóvá válik a petesejt, ami lehetővé teszi a részletes morfológiai vizsgálatot még a megtermékenyítés előtt.



2. ábra: Az intracytoplasmaticus spermium injectio (ICSI)

1.2.2. A petesejt morfológiája és érettsége

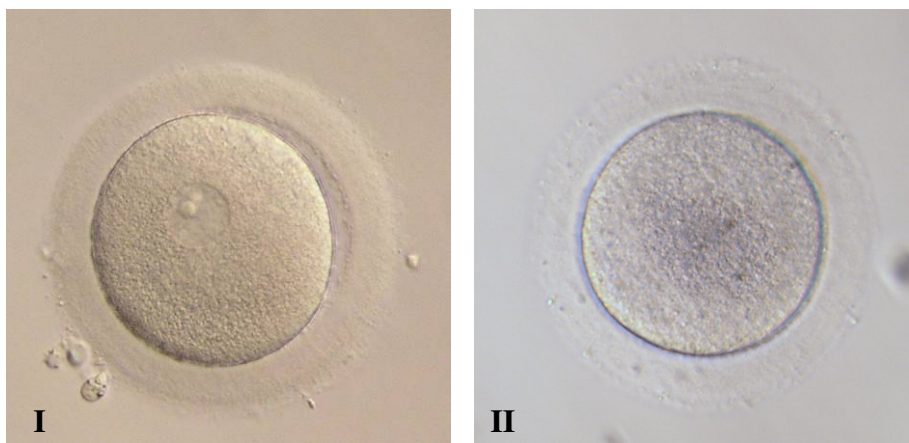
A megtermékenyítésre alkalmas, érett emberi petesejt (3. ábra) cytoplasmája átlagosan 110-115 μm átmérőjű. Kívülről plasmamembrán (oolemma) borítja, amit egy 15-20 μm vastagságú glykoprotein burok, a zona pellucida vesz körül. Az oolemma és a zona pellucida között a folyadékkal telt perivitellinális tér (perivitelline space, PVS) található. Az oolemmán belül a petesejt cytoplasmája (ooplasma), és corticalis granulomok formájában mutakozó sejtalkotók (mitochondriumok, endoplasmaticus reticulum, Golgi-apparatus) található [8]. Az oolemma mellett, a perivitellinális térben helyezkedik el az első sarkitest, amelynek jelenléte a praeovulatoricus petesejt nuclearis érettségére utal.



3. ábra: Normál morfológiájú, érett (MII) petesejt

Több kutatócsoport is foglalkozott olyan – mikroszkópos vizsgálattal egyszerűen megítélhető – petesejt tulajdonságok megfigyelésével, amelyek összefüggésbe hozhatók a petesejtből fejlődő praeembryo minőségével.

Az elsődleges szempont a petesejt morfológiai vizsgálata során a nuclearis érettség megítélése. Az érett petesejt az ovuláció (petesejtnyerés) idején meiotikus osztódása második fázisának metafázisában (MII) van. Az IVF kezelések során nyert petesejtek jelentős része MII állapotban van, kisebb részük (kb. 5-15%) azonban éretlen petesejt. Azok a petesejtek, ahol sarkitest nem látszik, az I. meiotikus osztódás metafázisában (MI, 4. ábra/I), vagy az I. meiotikus osztódás profázisában (PI 4. ábra/II) vannak. Ez utóbbi esetben, az ooplasmában egy membránnal jól körülhatárolt, világos hólyagszerű sejtmag (germinalis vesiculum) látható. Akár hagyományos *in vitro* fertilisatiót, akár ICSI kezelést végzünk, normál megtermékenyülésre elsősorban érett, MII petesejtek esetén számíthatunk. MI petesejtek *in vitro* érlelést követően megtermékenyíthetők, de a termékenyülési és terhességi arány ebben az esetben elmarad az MII petesejtekétől, így az éretlen petesejteket és az azokból létrejött praeembriókat az IVF kezelések során elsősorban akkor érdemes felhasználni, ha nem áll rendelkezésre elegendő MII petesejt, illetve abból létrejött praeembryo [9,10].



4. ábra: Éretlen petesejtek: I) az I. meiotikus főszakasz profázisában lévő (PI) petesejt, II) az I. meiotikus főszakasz metafázisában (MI) lévő petesejt

A nucleáris érési folyamattal párhuzamosan történik a cytoplasma érése is. Ez a folyamat magába foglalja a zona pellucida kialakulását, a corticalis granulomok felhalmozódását, számos biokémiai és sejtstruktúrát érintő változást, amely alkalmassá teszi a petesejtet a megtermékenyülésre. Csak e két folyamat teljessé válását követően kerülhet sor a petesejt szabályos megtermékenyülésére és a későbbi normális embryofejlődésre. Bármilyen zavar vagy aszinkronia a fenti folyamatokban különböző morphologiai anomáliákat eredményezhet attól függően, hogy a nucleáris, vagy a cytoplasmikus maturáció zavara lépett fel [11].

Számos – a petesejtek morphológiájának megfigyelésére irányuló – tanulmány eredményeit összegezve egyértelművé vált, hogy az „ideális” MII petesejt homogén, enyhén szemcsézett cytoplasmával, kis méretű perivitellinális térrel, szabályos alakú, intakt sarkitesttel, és halvány zona pellucidával rendelkezik [12,13,14], jóllehet, a petesejtek több mint felében legalább egy morphologiai eltérés figyelhető meg a fenti, ideálisnak tekintett petesejthez képest.

A petesejtek morphologiai anomáliáit cytoplasmikus és extracytoplasmikus eltérésekre lehet osztani [11].

1.2.3. A cytoplasma morphologiai elváltozásai

Cytoplasmatikus anomáliák közé soroljuk a cytoplasma különböző mértékű szemcsézettségét, vacuolumok, vesiculák, necrotikus területek jelenlétét, és minden egyéb, a cytoplasmában megfigyelhető rendellenességet.

Még az ICSI kezelések széleskörű elterjedése előtt leírták az IVF kezelések során nyert petesejtek leggyakoribb morphologiai eltéréseit [4]. Ezek között szerepel a cytoplasma különböző mértékű szemcsézettsége.

Veeck (1991) írta le először a cytoplasmában megfigyelhető legalább 10 μm átmérőjű, erősen fénytörő tulajdonságot mutató, nagyrészt zsírszerű anyagot tartalmazó, sötét színű szemcsét, amelyet fénytörő szemcsének (refractile body) nevezett [4].

Másik, jellegzetes morphologiai elváltozás, a többnyire a cytoplasma középső részén megjelenő, sötét színű, krátterszerű szemcsézettség [15], amely különböző mértékben ugyan, de a petesejtek több mint 60%-ában megfigyelhető.

A cytoplasma szintén jellegzetes morphologiai elváltozása a vacuolumok megjelenése. Számuk és méretük változó lehet, kialakulásukra nemcsak a petesejt képződése során lehet számítani, hanem a megtermékenyülés vagy a praeembryo későbbi osztódása során is létrejöhetnek. Ezek a membránnal határolt cytoplasma képletek folyadékot tartalmaznak, amely – összetételét tekintve – azonosnak bizonyult a perivitellinális teret kitöltő folyadékkal [16]. Keletkezésüket illetően több elmélet is létezik. Feltehetően spontán jönnek létre a cytoplasmában [16], de az is elképzelhető, hogy a sima felszínű endoplasmaticus reticulumból, vagy a Golgi apparátusból előzetesen kialakult vesiculák fúziója során alakulnak ki [17].

Otsuki és munkatársai [18] az ICSI kezelést megelőzően vizsgált érett petesejtek közel 10%-ában figyeltek meg egy pronucleus méretű, opálosan áttetsző, de a folyadéktartalmú vacuolumoktól jól megkülönböztethető, zsákocskaszerű képletet (sacculus), amely sima felszínű endoplasmaticus reticulum (sER) felhalmozódásának eredményeként jött létre [16,19].

A fenti petesejt elváltozásoknak a megtermékenyülésre és a praeembryo későbbi fejlődésére gyakorolt hatásáról több tanulmány is született. Számos faktort vizsgálva az eredmények máig sem egyértelműek. Nagyobb esetszámmal végzett vizsgálatok, [12, 20] melyek több kisebb anomáliát (cytoplasma sötét színe; a zona pellucida sötét színe; normálnál nagyobb perivitellinális tér; szemcsék, granulumok, vacuolumok a

cytoplasmában) vetettek össze az ideálisnak tartott petesejttel, sem találtak semmilyen különbséget a normál és rendellenes petesejtek között a megtermékenyülési arányban vagy a praeembryók minőségében, valamint a terhességi és beágyazódási arányban. Mindez arra utal, hogy egy-egy cytoplasma elváltozás önmagában nem befolyásolja jelentősen a petesejtek megtermékenyülését és a praeembryók későbbi fejlődését [12,15]. A tanulmányok ugyanakkor arra is felhívják a figyelmet, hogy a petesejtek 25-30%-ában két, vagy több rendellenesség egyszerre fordul elő. [12,20,21]. Más szerzők ezzel szemben azt állapították meg, hogy bizonyos cytoplasma rendellenességek jelenléte kedvezőtlenül befolyásolhatja a petesejtek megtermékenyülési arányát vagy a praeembryók minőségét [4,13,22].

Petesejtek cytoplasmaticus anomáliáit vizsgálva Sheral és munkatársai [23] hasonló megtermékenyülési- és osztódási arányt, valamint praeembryo minőséget találtak a normál és rendellenes petesejtek csoportjában. Azoknál a betegeknél azonban, akiknél kizárólag rendellenes petesejtekből fejlődő praeembryók álltak rendelkezésre a beültetéshez, lényegesen alacsonyabb terhességi arányt figyeltek meg, mint azoknál, akik esetében normál morphológiájú petesejtekből fejlődő praeembryókat ültettek be (3% vs. 24%, ET-re vonatkoztatva). A drasztikusan csökkent terhességi arányt ebben a tanulmányban a cytoplasma jelentős granuláltságának, valamint különböző cytoplasmaticus képleteknek (vacuolumok, fénytörő szemcsék, a sima felszínű endoplasmaticus reticulumból képződött nagyobb tömlő) tulajdonították. Más szerzők a granulált cytoplasma jelenlétét vizsgálva megállapították, hogy az nem befolyásolja hátrányosan sem a megtermékenyülési arányt, sem a praeembryók minőségét vagy a terhességi arányt [15]. A beágyazódási arány és a “kihordott terhességek” aránya azonban alacsonyabb volt azokban az esetekben, ahol ezekből a granulált cytoplasmájú petesejtekből fejlődő praeembryókat ültették be.

A cytoplasma szemcsézettség egymásnak ellentmondó eredményeivel szemben a különböző típusú vacuolumok vizsgálatával viszonylag kevés tanulmány foglalkozik. Ez utóbbiak eredményei azonban egységesek abban, hogy ezek a cytoplasma elváltozások jelentősen befolyásolhatják a petesejtek megtermékenyülésének esélyét. Már a hagyományos IVF kezelések során végzett morphologiai vizsgálatok alapján is kimutatták, hogy a kisebb méretű (<5 μm) vacuolumoknak feltehetően nincs jelentős hatásuk a megtermékenyülésre, míg a nagyobb vacuolumok jelenléte csökkentette a

megtermékenyülés esélyét [4, 24]. Ezt a megfigyelést az ICSI kezelések során végzett vizsgálatok a különböző méretű vacuolumok esetében megerősítették [24], míg más tanulmányok felhívják a figyelmet a zsákocskaszerű sER felhalmozódások megtermékenyülésre gyakorolt kedvezőtlen hatására [18].

Az utóbbi években lehetőség nyílt arra is, hogy az ICSI kezelést megelőzően megvizsgáljuk a meiotikus orsó állapotát a cytoplasmában [25]. Az eddigi eredmények arra utalnak, hogy a meiotikus orsó morfológiai elváltozásai szintén a petesejt, illetve az abból fejlődő praeembryo életképességének csökkenéséhez vezetnek [26, 27].

A cytoplasma rendellenességekkel kapcsolatos eredmények számos ponton ellentmondanak egymásnak, ami feltehetően azzal magyarázható, hogy a vizsgált morfológiai jegyek (cytoplasma granuláltsága; különböző cytoplasmaticus képletek és szemcsék jellemzői) nehezen definiálhatók, elbírálásuk meglehetősen szubjektív. Ugyanakkor több közleményben ezek a nagy változatosságot mutató anomáliák cytoplasma „beékelődés” (cytoplasmic inclusions) néven szerepelnek anélkül, hogy a szerzők pontosan meghatároznák, hogy milyen elváltozásokat soroltak ebbe a kategóriába, így a különböző munkacsoportok eredményei nehezen hasonlíthatók össze.

1.2.4. Extracytoplasmaticus morfológiai elváltozások a petesejtben

Az extracytoplasmaticus morfológiai elváltozások megfigyelései kiterjedtek az első sarkitest morfológiájára, a petesejt alakjára, a perivitellináris tér és a zona pellucida rendellenességeire is, amelyek szintén szerepet játszhatnak a normál megtermékenyülés és embryofejlődés alakulásában.

Az érett, MII petesejtek 1. sarkitestének vizsgálata jelentős szerepet kapott a petesejtek morfológiai bírálatában. Sikertelen IVF kezelések adatainak elemzése kapcsán rámutattak, hogy az 1. sarkitest lefűződésének elmaradása, vagy rendellenes kialakulása a megtermékenyülés teljes elmaradását eredményezheti [28]. Ezen esetek háttérében az állhat, hogy a petefészek stimuláció hatására a petesejtek egy részénél normálistól eltérő nuclearis érési folyamatok zajlanak, vagyis a petesejt nuclearis és cytoplasmaticus érése egymáshoz képest eltolódik, ami pedig a megtermékenyülés esélyének csökkenéséhez vezet. A jelenség együtt jár az 1. sarkitest degenerálódásával, valamint gyakran a perivitellináris tér megnagyobbodásával. Mindezek alapján Xia 1997-ben olyan petesejt bírálati rendszert dolgozott ki, amely az 1. sarkitest morfológiáját (intakt vagy

fragmentált), a perivitellinális tér nagyságát és a cytoplasma rendellenességek jelenlétét vette figyelembe [13]. A három vizsgált faktor mindegyike hatással van a megtermékenyülési arányra és a praeembryók minőségére. Az általa kidolgozott bírálati rendszer szerint a nuclearis és cytoplasmaticus érettség leginkább azon petesejtek esetében van szinkronban egymással, ahol normál méretű perivitellinális tér és intakt sarkitest figyelhető meg. Az ebbe a csoportba tartozó és egyéb cytoplasmaticus rendellenességeket nem mutató petesejtek közel 85%-a, míg a fragmentált sarkitesttel, nagy perivitellinális térrel és cytoplasma rendellenességekkel rendelkező petesejteknek mindössze 60%-a termékenyült meg. Ugyanakkor azokban az esetekben, amikor éretlen, az oolemmára sapkaszerűen ráboruló sarkitestet figyeltek meg, a petesejteknek csak 25%-a termékenyült meg, de azok sem jutottak túl a 2 sejtes fejlődési állapoton. Az Ebner és munkatársai által 1999-ben kidolgozott bírálati rendszer [29] az előbbtől annyiban tér el, hogy csak az 1. sarkitest morphológiáját veszi figyelembe. Optimálisnak tekinti a kerek vagy ovális, normál méretű, sima felszínű sarkitestet. A sarkitest egyenetlen felszíne, fragmentáltsága vagy a normálnál nagyobb mérete (ez utóbbi többnyire a szokásosnál nagyobb perivitellinális térrel jár együtt) rendellenességnek számít. Az ET során a 4 fokozatú sarkitest bírálati rendszer alapján legjobbnak tekintett petesejtekből fejlődő praeembryókat beültetve szignifikánsan nagyobb terhességi arányt értek el, mint a hagyományos, praeembryo minőség alapján történő szelekcióval (44% vs. 31%). Ugyanakkor olyan közlemények is napvilágot láttak, amelyekben nem tapasztaltak szignifikáns összefüggést az 1. sarkitest morphológiája és a megtermékenyülési arány, a praeembryók minősége, vagy a terhességi és beágyazódási arány között [30,31].

A megnövekedett perivitellinális tér szintén a petesejt cytoplasmaticus érési folyamatainak rendellenességére utalhat. Xia korábban már említett tanulmánya [13] igazolta, hogy a normálnál nagyobb perivitellinális tér –a sarkitest morphológiájától függetlenül– alacsonyabb megtermékenyülési arányt és gyengébb praeembryo minőséget eredményez, bár ezzel ellentétes megfigyelésről is olvashatunk beszámolót [20]. Ugyanakkor az érett, MII petesejtek 34%-ában írtak le a perivitellinális térben előforduló kisebb-nagyobb méretű szemcséket [32]. Ezek előfordulása összefügg ugyan a petefészek stimuláció során alkalmazott nagyobb mennyiségű humán menopausal gonadotrophin (HMG) alkalmazásával, azonban a jelenség nem befolyásolja sem a

petesejtek megtermékenyülésének esélyét, sem pedig a praeembryók minőségét vagy a terhességi arányt.

A zona pellucida számos rendellenessége is megfigyelhető az ICSI kezelések során. Ezek jelenthetik annak normálistól eltérő színét, vastagságát vagy szabálytalan alakját [8]. Az elváltozások többsége az ICSI kezelés alkalmazása során nincs hatással a megtermékenyülési arányra, sőt, teljesen abnormális alakú zona pellucidával rendelkező praeembryók beültetése is eredményezett már terhességet [33].

1.3. Megtermékenyült petesejtek morfológiai vizsgálata

Az IVF kezelés céljából nyert petesejtek a petesejtnyerést követően általában 4-8 óra múlva kerülnek megtermékenyítésre. Hagyományos IVF kezelés esetén a petesejteket a körülöttük lévő cumulus oophorussal együtt, a megfelelően előkészített spermiumokkal, többnyire 16-18 órán keresztül inkubáljuk. A megtermékenyülés pontos idejét ebben az esetben nem tudjuk. Ugyanakkor a rövid, 1 órás inkubációs idő alkalmazása is megfelelő megtermékenyülési arányt eredményezhet, ami arra utal, hogy hagyományos IVF kezelés esetén a megtermékenyülés a hímivarsejtek petesejtekhez történő hozzáadását követően, rövid időn belül megtörténik [34,35]. ICSI kezelés esetén viszont pontosan ismerjük a spermium penetratio időpontját, ami lehetőséget ad a praeembryo fejlődés időbeli lefolyásának pontos megfigyelésére.

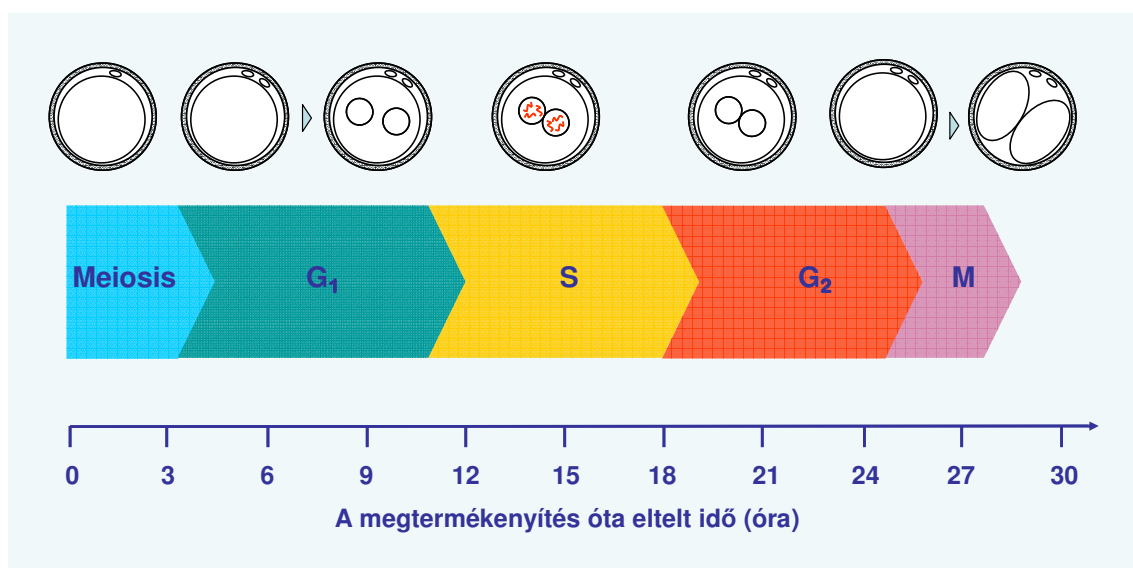
1.3.1. A petesejt megtermékenyülése

Emberi petesejtek megtermékenyülésének folyamatát számos összefoglaló tanulmány elemzi [36,37,38]. A természetes folyamat során a spermium behatol a cumulus oophorus sejtjei közé. Ebben az időpontban a petesejt az ovulációt (vagy a petesejtnyerést) követően MII állapotban van, a spermium pedig többnyire túl van a capacitatio folyamatán. Ezt követően a spermium megtapad a zona pellucidán. Lezajlik az acrosoma reakció, amelynek során enzimatikus hatások eredményeként a spermium feje áthatol a zona pellucidán, majd a perivitellinális téren, és összeolvad az oolemmával. A spermium fejének behatolása a petesejt aktiválódását váltja ki, amelynek számos, jól megfigyelhető morfológiai jele van. A petesejt cytoplasmájában lévő corticalis granulomok olyan enzimeket juttatnak a perivitellinális térbe, amelyek

megváltoztatják a zona pellucida jellemzőit, így megakadályozzák további spermiumok penetrációját.

1.3.2. A megtermékenyült petesejt első sejtciklusa

A spermium behatolásával kezdetét veszi a petesejt első sejtciklusa (5. ábra), amely átlagosan 20-22 órán át tart, bár jelentős különbségek lehetnek a zygoták között [38,39,40,41,42].



5. ábra: A sejtciklus fázisai

(G₁, S, G₂, M: A sejtciklus fázisai)

A G₁ fázis a spermium behatolását követően 2-3 órával veszi kezdetét és átlagos hossza kb. 5-6 óra [39]. Ebben a szakaszban befejeződik a petesejt meiotikus osztódási folyamata, és a petesejtből kiválik a 2. sarkitest.

Ezt követi az S fázis, amely 8-14 órával a spermium behatolása után kezdődik és átlagos hossza 4-5 óra. Ebben a szakaszban zajlik a DNS szintézis, és a petesejt kromatin állományából kialakul az anyai előmag (pronucleus, PN). A spermium maganyaga a petesejtben szintén jelentős átalakuláson megy keresztül, melynek végén az apai pronucleus jön létre. A két előmag általában egymástól távol alakul ki, majd a petesejt középső részén, a majdani első sejtosztódás tengelyében egymás mellé rendeződik.

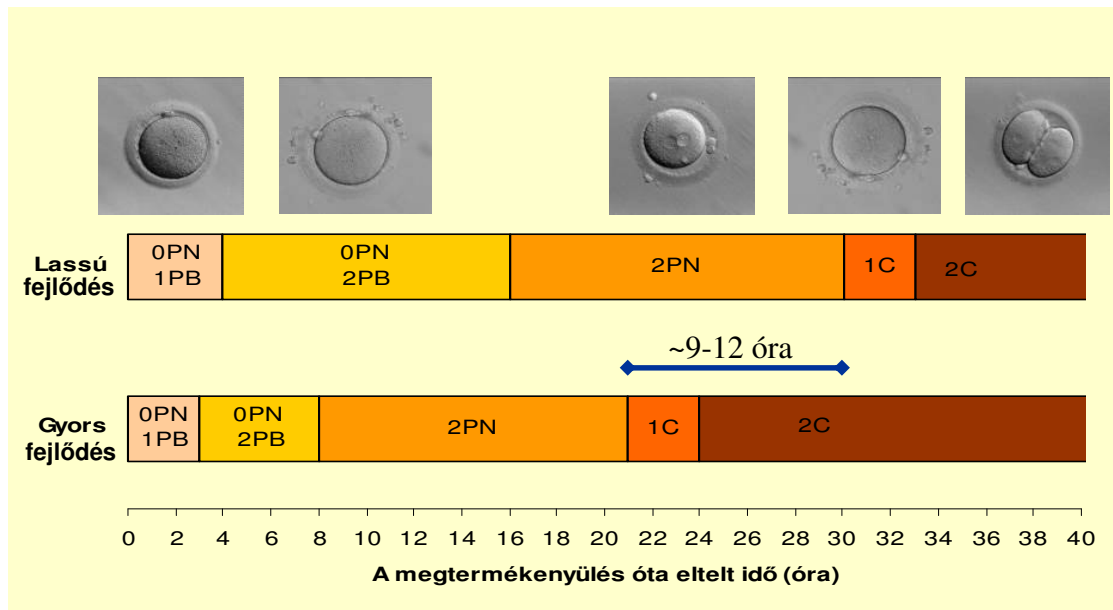
Méretük és alakjuk emberi petesejtben általában megegyezik, így az apai és anyai előmagok között speciális festési eljárás nélkül nem lehet különbséget tenni. A pronucleusokban magvacskák (nucleolus) válnak láthatóvá. Eleinte több apró magvacska van jelen, majd egymással összeolvadva néhány nagyobb nucleolust alkotnak, amelyek a pronucleusok tengelyében egymás mellé rendeződnek [43].

Az S fázis után a G₂ fázis következik, amely legkorábban 12-14 órával a megtermékenyülés után kezdődik, és átlagosan 5-6 órán át tart. Ebben az időszakban a cytoplasma centrális részében elhelyezkedő pronucleusokban már nem figyelhető meg DNS szintézis.

Az első sejtciklus M fázisa az előmaghártyák lebomlásával (pronuclear breakdown, PNBD) veszi kezdetét, és az első osztódás befejezéséig tart. Ez a szakasz a spermium behatolása után legkorábban 17-22 órával kezdődik, és a különböző zygoták esetében viszonylag állandó, 3-4 órán át tart. Ez idő alatt a hím és női előmagok magmembránja feloldódik, és az immár szabad kromoszómák a cytoplasma centrális részén összekeverednek (syngamia), majd a zygota kettéosztódik [44,45].

Mivel a sejtciklus egyes szakaszainak a hossza, az M fázis kivételével, petesejtenként változó lehet, a pronucleusok eltűnése a leggyorsabban fejlődő zygoták esetében 18-20 órával, míg a lassabban fejlődő zygoták esetében akár 30-31 órával a megtermékenyítés után következhet be [40,44,45,46]. Ennek megfelelően az M fázis végét jelző első sejtosztódás a megtermékenyítést követő 20 és 33 óra között következhet be. Így a zygoták fejlődése közti időbeli eltérés a pronucleus eltűnés vagy az első sejtosztódás tekintetében akár 12 óra is lehet (6. ábra).

Normál megtermékenyülés során tehát két pronucleus alakul ki, amelyek emberi petesejtek esetében fénymikroszkóppal jól láthatók. A megtermékenyülés ellenőrzését az *in vitro* fertilisatio vagy spermium microinjectiono kezdetétől számított 16-20 óra múlva végezzük el. Ez az az időszak ugyanis, amikor a leglassabban fejlődő zygotákban is kialakult már a két pronucleus, ugyanakkor a gyorsabban fejlődő zygotákban sem kezdődött még el a pronucleusok eltűnésével járó M fázis (6. ábra).



6. ábra: Lassú és gyors fejlődésű zygóták sejtciklusának összehasonlítása (PN = pronucleus, PB = sarkitest (polar body), 1C, 2C = a praembryo 1 és 2 sejtjes fejlődési állapota)

1.3.3. A megtermékenyülés elbírálása

Míg a megtermékenyítés előtt álló petesejt morfológiai vizsgálatára csak ICSI kezelés esetén kerülhet sor, a megtermékenyülés elbírálására és a zygota morfológiai vizsgálatára mind a hagyományos IVF, mind pedig az ICSI kezelés útján megtermékenyített petesejtek esetén egyaránt lehetőségünk van.

Elsősorban a normálisan megtermékenyült, 2 előmagot tartalmazó zygotákból (7. ábra) fejlődő praembryókat tekintjük a későbbiekben beültetésre alkalmasnak. Amennyiben a petesejtben pronucleus sem a fenti időpontban, sem néhány órával később nem látható (0PN), a petesejtet meg nem termékenyültnek tekintjük.

Rendellenes megtermékenyülésnek tekintjük, ha a petesejtben 3 vagy annál több pronucleus látható (8. ábra/II). Ez a jelenség mind hagyományos IVF, mind pedig ICSI kezelés esetén előfordul, saját tapasztalatunk szerint ~4%-os gyakorisággal. A 3 pronucleust tartalmazó zygóták az esetek többségében triploidok, így az azokból fejlődő praembryók beültetésre nem alkalmasak.



7. ábra: Normálisan megtermékenyült, 2 előmagot tartalmazó zygota

Mivel a rendellenesen megtermékenyült petesejtek a későbbiekben szabályos osztódást és normál morfológiai képet mutathatnak, azok a normális módon megtermékenyült zygotáktól csak pronucleus állapotban különíthetők el. Ezért rendkívül nagy jelentősége van az IVF-ET kezelések során a megfelelő időben elvégzett pronucleus bírálatnak. A hagyományos IVF kezeléseknél a kettőnél több PN kialakulásának leggyakoribb oka az, hogy egy petesejtet két (esetleg több) hímivarsejt termékenyít meg. Az a tény azonban, hogy ICSI kezelés után is, amikor mindenképpen csak egy spermium kerül a petesejtbe, létrejönnek 3PN-es zygoták, arra utal, hogy más oka is lehet a rendellenes megtermékenyülésnek. Ezen zygoták molekuláris genetikai vizsgálata rámutatott, hogy ICSI kezelést követően a 3PN kialakulása ellenére az esetek 36%-ában diploid kromoszómakészletet találtak [47]. A rendellenesség egyik magyarázata, hogy az ICSI kezelés során a petesejt húzófonalai sérülnek, és ennek eredményeképpen az anyai kromoszómák két különálló előmagba rendeződnek a második sarkitest kiválása után [47,48]. A 3 pronucleus kialakulásának oka azonban az esetek döntő többségében a második sarkitest kiválásának elmaradása [47]. A fenti jelenségeken kívül előfordulnak csak 1 pronucleust tartalmazó zygoták is (8. ábra/I). Ezek cytogenetikai vizsgálata kimutatta, hogy közel 50%-ban haploidok, ami a petesejtek parthenogeneticus aktiválódására utal [38]. A többi 1 PN-es zygota azonban diploid kromoszómakészletet hordoz. Ezen belül a hagyományos IVF során megtermékenyült petesejtek 73%-a, míg ICSI kezelést követően csak 37%-a diploid [49]. Ezekben a diploid zygotákban a pronucleusok aszinkron fejlődése eredményezi az 1 PN-t, és gyakran egy második

pronucleus is megjelenik néhány órával később. Ritkán ugyan, de az is előfordulhat, hogy az apai és anyai pronucleusok összeolvadása eredményezi azt, hogy csak 1 pronucleust látunk a megtermékenyülés elbírálásakor [38].

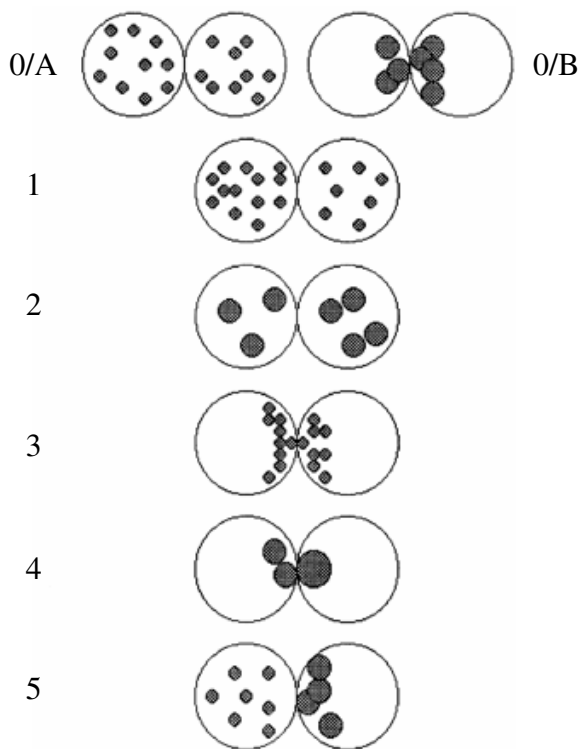


8. ábra: Kórosan megtermékenyült petesejtek. I) 1 előmagot tartalmazó zygota; II) 3 előmagot tartalmazó zygota

A pronucleusok számának meghatározása azonban csak arra vonatkozóan ad információt, hogy az adott zygotából fejlődő praeembryo beültethető-e vagy sem. Amennyiben lehetséges, normálisan megtermékenyült, 2 pronucleust tartalmazó zygotákból választunk az ET-hez. Amennyiben nincs elegendő 2 PN-es zygotából fejlődő praeembryo, úgy a hagyományos IVF kezeléssel megtermékenyített, 1 PN-es zygotából fejlődő praeembryo is beültethető [8], és eredményezhet normál terhességet, valamint egészséges újszülöttet [50]. A 2-nél több pronucleust tartalmazó zygoták, valamint az ICSI kezelés eredményeként létrejött 1 PN-es zygoták azonban a kromoszóma rendellenességek megnövekedett esélye miatt semmiképpen sem használhatók fel az embryotransferhez. Szintén nem ültethetők be azon praeembryók, amelyekben a megtermékenyülés elbírálása során pronucleus nem volt látható, azonban a későbbiekben normál osztódást mutattak, hiszen ezeknél a pronucleusok számát nem ismerjük.

1.3.4. A pronucleusok morfológiai vizsgálata

A pronucleusok számának meghatározása mellett számos egyéb morfológiai jellemző is megfigyelhető a zygotákban, amelyek a praembryo életképességére, beültetés utáni megtapadásának esélyeire is utal. Az utóbbi években több munkacsoport is foglalkozott a pronucleusok jellemzőinek (méretük, elhelyezkedésük, valamint a bennük lévő nucleolusok elhelyezkedése), és a praembryo későbbi fejlődésének összefüggéseivel. A vizsgálatok alapján két, egymástól független, alapelveiben azonban megegyező pronucleus bírálati rendszert dolgoztak ki. Tesarik és Greco [51] bírálati rendszere (9. ábra) a pronucleusokban elhelyezkedő magvacskák számát, eloszlását veszi figyelembe.



9. ábra: Megtermékenyült petesejtek morfológiai bírálata az előmagokban található magvacskák eloszlása alapján (Tesarik és Greco alapján [51])

Normálisan megtermékenyült és normálisan fejlődő zygota esetében ugyanis a két pronucleusban egymással szinkron zajlanak a folyamatok. Mindkét előmagban közel azonos számú magvacska található, amelyek eleinte egyenletesen eloszlanak a pronucleusokon belül (9. ábra, 0/A), majd nagyobb nucleolusokká összeolvadva az előmagok találkozási síkjában rendeződnek el (7. ábra; 9. ábra, 0/B). Így normál

zygotának tekinthető, ha 12-20 órával a megtermékenyítés után, mindkét pronucleusban sok (>7) apró magvacska szétszórta található, vagy ha kevés (3-7), nagyobb méretű magvacska polarizáltan helyezkedik el.

Az ettől eltérő, elsősorban aszinkron fejlődés a két pronucleus között (a magvacskák polarizált és nem polarizált elrendeződése, valamint jelentős eltérés a két előmagban lévő magvacskák száma, vagy mérete tekintetében), a meiotikus osztódás rendellenességére, esetleg kromoszóma rendellenességre utal, így az ezekből fejlődő praeembryók életképessége elmarad azokétól, ahol az anyai és apai pronucleus fejlődése szinkronban van. Azok a praeembryók, amelyek "normál" mageloszlású zygotákból fejlődnek, nagyobb arányban alakulnak morphológiájuk alapján jó minőségű praeembryókká [52], valamint nagyobb eséllyel eredményeznek terhességet, mint azok, amelyek pronucleusa aszinkron jelenséget mutat [51,53].

Az előbbihez hasonló zygota bírálati rendszert dolgozott ki Scott és munkacsoportja, amely a nucleolusok méretének és eloszlásának megfigyelése mellett figyelembe veszi a pronucleusok azonos vagy eltérő méretét, egymás mellé rendeződött, vagy egymástól távoli elhelyezkedését is [54,55]. Ez a bírálati rendszer a nucleolusok elrendeződése alapján különbséget tesz gyorsabban és lassabban fejlődő zygoták közt (0/A és 0/B kategória, 9. ábra), feltételezve, hogy a gyorsabb zygoták jobb minőségű petesejtet és életképesebb praeembryót jeleznek. A Scott-féle bírálati rendszert alkalmazva nagyobb terhességi és beágyazódási arányt sikerült elérni, mint amikor csak a beültetés előtti praeembryók morphológiáját vették figyelembe [55,56].

A megtermékenyült petesejt morphologiai vizsgálata során megfigyelték, hogy a második sarkitest gyakran nem az első mellett, hanem attól bizonyos távolságra jelenik meg [57]. A jelenség alapján feltételezhető a cytoplasma forgása a megtermékenyülés során. A sarkitestek elhelyezkedése a zygotában a pronucleusok által létrehozott tengelyhez viszonyítva írható le a legegyszerűbben. Garello és munkatársainak megfigyelése szerint a tengely és az attól távolabb eső sarkitest által bezárt szög növekedése a praeembryo morphologiai minőségének csökkenésével jár együtt [58]. A két sarkitest távolsága azonban nem hozható összefüggésbe a praeembryo minőségével. A petesejt polaritás vizsgálatát azonban néhány technikai probléma nehezíti. A hagyományos IVF kezelés során ugyanis a cumulus sejtek eltávolításával olyan mechanikai hatások érhetik a zygótát, amelyek a sarkitestek helyzetét megváltoztatják.

Másrészt a pronucleus-tengely és a sarkitestek által bezárt szög csak akkor vizsgálható pontosan, ha a mikroszkóp alatt a két sarkitest és a két pronucleus egy síkban van, ami csak a petesejt hosszas és körülményes forgatásával érhető el.

A megtermékenyült petesejtek egy részében a cytoplasma külső részén egy áttetsző gyűrű látható (7. ábra). A jelenség magyarázata, hogy a megtermékenyülést követően a cytoplasmában lévő mitochondriumok a perifériáról a középén elhelyezkedő pronucleusok közelébe vándorolnak, így biztosítva energiát a legnagyobb aktivitást mutató sejtalkotóknak. A jelenség nem minden zygotában figyelhető meg, de ahol előfordul, ott a későbbi fejlődés során nagyobb életképességgel és jobb beágyazódási eséllyel jár együtt, így fontos információ lehet a beültetésre kerülő praeembriók kiválasztásához [42,54].

1.4. Az első sejtciklus időzítésének megfigyelése az IVF/ET kezelések során

A praeembriók első sejtosztódásának a megtermékenyítéshez viszonyított időpontja és a későbbi praeembrió minőség közti összefüggéseket először egér [59] és szarvasmarha [60] kísérletekben írták le. Emberi praeembriókon végzett megfigyelések szerint az első sejtciklus befejeződése gyorsan és lassan fejlődő zygoták esetében akár 12 óra különbséget is mutathat (6. ábra). Mindezek alapján először Shoukir és munkatársai számoltak be arról, hogy azok a hagyományos IVF útján létrejött zygoták, amelyek a megtermékenyítést követő 25. óráig túljutottak az első sejtosztódáson, nagyobb életképességgel rendelkeztek, mint azok, amelyeknél csak később zajlott le az első sejtosztódás [61]. A jelenséget korai osztódásnak (early cleavage) nevezték el, és a megfigyelést később ugyanez a munkacsoport ICSI útján megtermékenyített petesejtek esetében is igazolta [62]. Azóta több közlemény is egyöntetűen alátámasztotta a korai osztódás és a jobb praeembrió minőség, illetve nagyobb terhességi arány összefüggéseit [63,64,65,66,67].

A korai osztódás vizsgálatát a legtöbb szerző a megtermékenyítést követő 24-29 óra között végezte [46,61,64,66]. Lundin és munkatársai [68] ICSI kezelések során nagyobb arányban találtak korai osztódó praeembriókat, mint hagyományos IVF kezelés esetén. Ez alapján felmerült a kérdés, hogy nem kell-e a hagyományos IVF megtermékenyítés esetén néhány órával később vizsgálni a korai osztódást, mint az ICSI kezelések során.

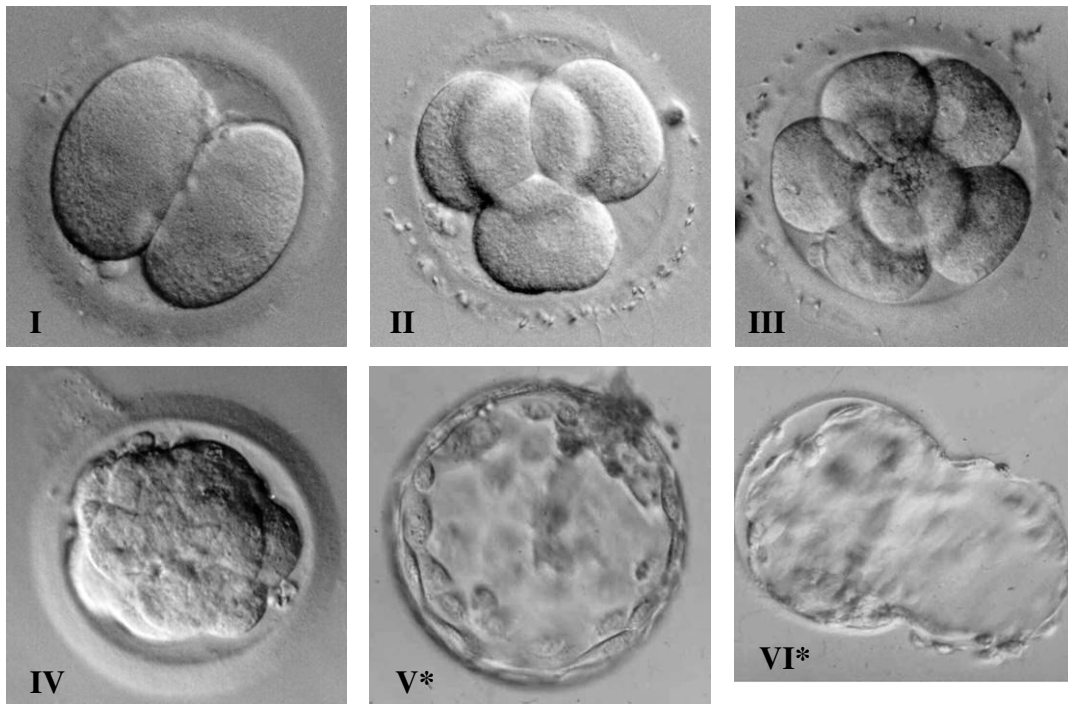
Ezeket a megfigyeléseket a megtermékenyítés módjának a korai osztódásra gyakorolt hatásával kapcsolatban azonban más szerzők nem erősítették meg [64,69].

Miután a korai osztódással foglalkozó valamennyi közlemény alátámasztotta, hogy a gyorsabban fejlődő zygotákból jobb minőségű praeembryók jönnek létre, és azokat beültetve nagyobb terhességi és beágyazódási arány érhető el, valamennyi szerző javasolja a korai osztódás vizsgálatának eredményét – mint kiegészítő szelekciós faktort – a beültetésre kerülő praeembryók kiválasztásánál figyelembe venni.

1.5. Az osztódó praeembryo morfológiai vizsgálata

1.5.1. A praeembryók fejlődése az első osztódástól a blastocysta állapotig

A megtermékenyítést követő 20-27 óra között általában lezajlik a praeembryo első sejtosztódása (10. ábra/I), amit 12-24 órán belül újabb sejtosztódás követ, így a megtermékenyítést követő 2. napon 4- (10. ábra/II), majd a harmadik napon 8 sejt körüli (10. ábra/III) fejlődési állapotba kerül a praeembryo. A megtermékenyítést követő 4-6. napig továbbtenyésztve szedercsíra (morula), majd hólyagcsíra (blastocysta) állapot alakul ki. 12-16 sejtes állapotban a praeembryo compactálódik, azaz sejtjei szoros sejtkapcsolatokkal (tight junction) egymáshoz tapadnak, a sejthatárok eltűnnek, és az egymástól független sejtek egy összefüggő sejthalmazzá, morulává alakulnak (10. ábra/IV). Ezt követően a praeembryo belső részében folyadékkal telt üreg, a blastocoel kezd kialakulni. A blastocoel eleinte csak a praeembryo egy kis részét alkotja, majd folyamatosan növekedve az előébrény szinte teljes térfogatát kitölti (10. ábra/V), végül a blastocoelt egy vékony rétegben veszik körül a praeembryo sejtjei. Ebben a sejtrétegben a blastocoel felé egy megvastagodás, az embryocsomó (inner cell mass, ICM) alakul ki, míg a külső sejtréteg trophoblasttá (trophectoderma) alakul. Ezzel egyidőben a praeembryo térfogata a blastocoelben felhalmozódott egyre nagyobb mennyiségű folyadék miatt megnövekszik, a blastocysta expandálódik, és az *in vitro* tenyésztés során ismétlődő expandálódása majd összehúzódása is megfigyelhető. A megtermékenyítést követő 6-7. napon a zona pellucida megnyílik, és a nyíláson át kibújik a praeembryo (hatching folyamata) (10. ábra/VI). A későbbiekben az embryocsomó sejtjeiből alakul ki az embryo, míg a trophoblast sejtjeiből a placenta jön létre [7].



10. ábra: Az osztódó praeembryo. I) 2 sejtés állapot; II) 4 sejtés állapot; III) 8 sejtés állapot; IV) morula állapot, V) blastocysta; VI) a zona pellucidából kibújó (hatching) blastocysta. (* Dr. Bárándi Zsolt† felvétele)

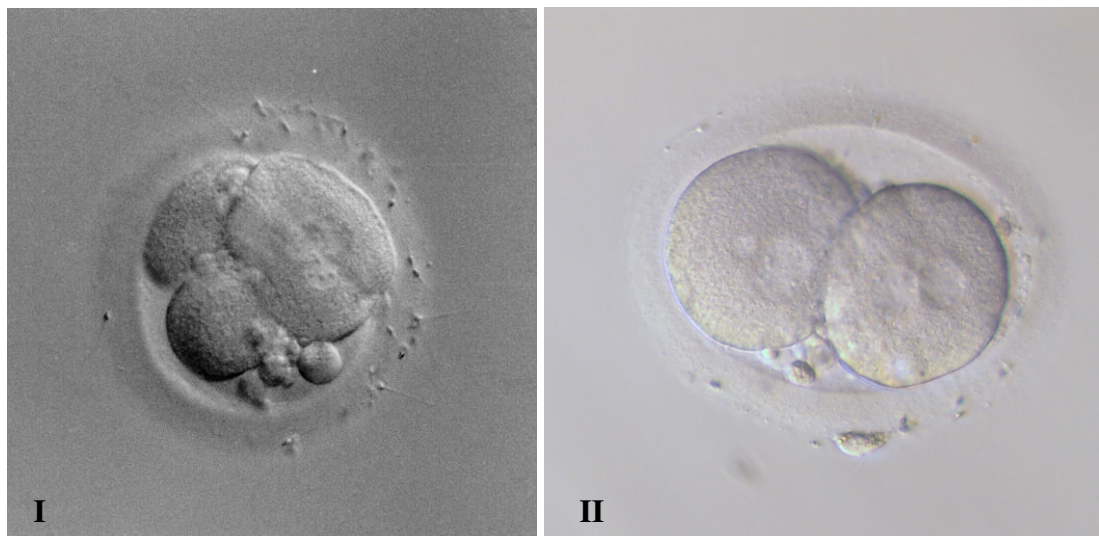
1.5.2. Praeembryók morfológiai vizsgálata és a beültetésre kerülő praeembryók kiválasztása

Az IVF kezeléseket végző központok többségében a megtermékenyítést követő 2. vagy 3. napon történik az embryotransfer. Az ekkor elvégzett morfológiai vizsgálat képezi alapját a beültetésre kerülő praeembryók kiválasztásának. Az utóbbi időben azonban az 5-6. napon végzett blastocysta transfer is egyre szélesebb körben elterjedt, amely részletes blastocysta bírálati rendszer felállítását tette indokolttá.

A praeembryók 4-8 sejtés állapotában számos olyan tulajdonság figyelhető meg, amely összefüggésbe hozható a praeembryók életképességével. A fejlődési állapot ebben az időszakban a praeembryót alkotó blastomerák számával fejezhető ki, míg az embryominőség a praeembryo morfológiai jellemzőit foglalja magában. A morfológiai jellemzők közül pedig a legjelentősebb a blastomerák szabályos alakja; azonos, vagy eltérő mérete; vacuolumok vagy cytoplasmaticus fragmentumok jelenléte, illetve azok mennyisége. Ezen jellemzők alapján számos praeembryo bírálati rendszert

dolgoztak ki, amelyek egy része csak morfológiai jellemzőket [70,71], mások a fejlődési állapotot is figyelembe veszik [72,73]. A különböző bírálati rendszerek általában 3-5 fokozatú, növekvő vagy csökkenő skálán, számszerűen fejezik ki a minőségi kategóriákat. A legelterjedtebb Veeck bírálati rendszere [4], amely a blastomerák azonos vagy eltérő méretét, valamint a sejtmagmentes fragmentumok, illetve vacuolumok mennyiségét veszi figyelembe [74]. A praeembryóban megfigyelhető eltérő méretű blastomerák, valamint jelentősebb (>20%) mennyiségű fragmentáció (11. ábra/I) egyaránt rendellenes fejlődésre és csökkent életképességre utal, így ezeket célszerű kihagyni a beültetésre szánt praeembryók közül. A fenti két tulajdonságot a bírálati rendszerek többsége azonos súllyal veszi figyelembe, és akár sejtméreteltérés, akár jelentősebb fragmentáció esetén már a 3. minőségi kategóriába sorolja a praeembryót. Ezek a praeembryók általában lassabban fejlődnek, mint a normál morfológiájúak, és gyakrabban hordoznak kromoszóma rendellenességeket. Az eltérő méretű blastomerákat tartalmazó praeembryókat vizsgálva lényegesen nagyobb gyakorisággal találtak aneuploidiát, mint normál morfológia esetén (29.4% vs. 5.5%) Ezen praeembryók nagyobb arányban tartalmaznak olyan blastomerákat, amelyekben több sejtmag is látható (21.1% vs. 2.1% [75]).

A normál morfológiájú, de többmagvú blastomerákat tartalmazó praeembryók (11. ábra/II) kizárása a beültetésre kerülők közül ritkán szerepel a praeembryo bírálati rendszerekben, pedig ezek életképessége elmarad a normál praeembryókéktól. Egyes vizsgálatok szerint többmagvú blastomerákat tartalmazó praeembryók meglepően nagy arányban (a kezelések 44%-ban) fordulnak elő [76]. Gyakoriságuk nem függ az anyai életkortól, és a normál morfológiájú, gyakran jó minőségű praeembryók 15%-ában is megfigyelhetők. Genetikai vizsgálatokkal kimutatták, hogy ezek a praeembryók több mint 75%-a hordoz valamilyen kromoszóma rendellenességet [77], és azok a kezelések, amelyek során ezeket a praeembryókat is beültették, lényegesen alacsonyabb terhességi és beágyazódási arányt eredményeztek [76,78]. Mivel az ilyen praeembryók beültetése eredményezett már normál terhességet, és egészséges újszülöttet, nem mondhatjuk ki egyértelműen, hogy alkalmatlanok az embryotransferre. Beültetésüket azonban, amennyiben rendelkezésre állnak más, normál morfológiájú praeembryók, célszerű elkerülni.



11. ábra: Súlyos morfológiai eltéréseket mutató praeembryók (I: különböző méretű blastomérák, jelentős mennyiségű fragmentáció és többmagvú blastomera egyaránt megfigyelhető; II: többmagvú blastomérákat tartalmazó 2 sejtes előébrény).

Van Royen és munkatársainak (1999) közleménye arra is rámutat, hogy mind a praeembryók sejttségét, mind pedig morfológiáját célszerű figyelembe venni a beültetésre kerülő praeembryók kiválasztásánál [79]. Ennek alapján "kiváló minőségűnek" tekintik azokat a praeembryókat, amelyek a vizsgálat idején nem mutatnak jelentős morfológiai eltérést és sejttségük a megtermékenyítést követő 2. napon legalább 4, míg a 3. napon legalább 7.

Morula állapotban (10. ábra/IV) az elmosódott sejthatárok miatt a hagyományos praeembryo bírálatra már nincsen lehetőség. A blastocysta állapotú praeembryók vizsgálatára viszont részletes bírálati rendszert dolgoztak ki, amely kiterjed a fejlődési állapotra, az embryocsomó valamint a trophoblast morfológiájára is [80]. Fejlődési állapot szerint a blastocoel növekvő mérete alapján lehet a praeembryo korai, majd kifejezett blastocysta (10. ábra/V). Amikor a blastocysta mérete lényegesen meghaladja a korai praeembryo méretét, akkor már expandált blastocystának nevezzük (10. ábra/VI). Ezt követően megkülönböztetjük a megnyílt zona pellucidán éppen kibújó (hatching) blastocystát (10. ábra/VI), és a zónából már kibújt (hatched) blastocystát. Fejlődési állapotát tekintve a zona pellucidából már kibújt blastocysta tekinthető a legfejlettebbnek. Ebben az állapotban azonban a praeembryót körülvevő védőburok hiányában az embryotransfer során a blastocysta sokkal inkább ki van téve a sérülés

veszélyének, mint a zónából történő kibújás előtt. Amennyiben a praeembryo elérte a kifejlett blastocysta állapotot, az embryocsomó bírálatát is elvégezzük annak mérete és sejtjeinek száma alapján. Ugyanígy történik a trophoctoderma bírálata a sejtek száma, mérete és a sejtréteg tömötsége alapján. Az itt bemutatott, vagy ehhez hasonló bírálati rendszerek segítségével számos kutatócsoport is igazolta, hogy blastocysta transfer esetén is szoros összefüggés van a praeembryo minősége és a terhesség létrejöttének esélye között [81,82]. A blastocysta tenyésztés és transfer egyik előnye a 2-3. napi ET-vel szemben abban áll, hogy a praeembryók az első sejtosztódásokhoz még a petesejtben készen megkapott anyagokat használják, és saját génjeik csak 4-8 sejtjes állapotban kezdenek aktiválódni [83]. Ezért súlyosabb genetikai rendellenességeket hordozó praeembryók is túljuthatnak 2-3 sejtosztódási cikluson, fejlődésük azonban ezt követően többnyire megáll. Ezeket a praeembryókat a 3. napig morphológiájuk alapján nem mindig tudjuk kizárni az ET-hez történő kiválasztás során. Blastocysta transfer esetén azonban olyan, nagyobb életképességű praeembryókat ültetünk be a méhbe, amelyek ezen a 4-8 sejtjes állapotban jelentkező un. fejlődési blokkon túljutottak. Így a hagyományos, 2-3. napon végzett ET-hez képest magasabb beágyazódási arányt lehet elérni [84,85]. Ez arra ad lehetőséget, hogy a 4-8 sejtjes állapotban beültetett 3, esetleg 4 praeembryo helyett 2, esetleg egy blastocystát ültessünk be a megtermékenyítést követő 5. vagy 6. napon. Így változatlan terhességi arány mellett csökkenthető a magas anyai és magzati kockázattal járó többes, elsősorban hármás, négyes ikerterhességek aránya [81,86]. Ugyanakkor az eljárás alkalmazásánál figyelembe kell venni, hogy még optimális laboratóriumi körülmények esetén is, a megtermékenyült petesejteknek közel 50%- a nem jut el blastocysta stádiumig [81,57]. Így előfordulhat, hogy a kezelések egy részében a megtermékenyítést követő 3. napon van beültethető praeembryo, az 5. napon, blastocysta fejlődés hiányában mégsem történik embryotransfer. Ez arra hívja fel a figyelmet, hogy a blastocysta tenyésztés alkalmazásáról nagyon körültekintően, a petesejtek, zygoták és osztódó praeembryók számát, morphológiáját figyelembe véve kell döntést hozni.

2. Célkitűzések

A "Bevezetés" (1. fejezet) során bemutatott ismeretek a petesejtek, zygoták és praeembryók fejlődésével, morphológiájával kapcsolatban korántsem teljesek. Számos olyan morphologiai elváltozás figyelhető meg a petesejtekben, zygotákban illetve praeembryókban, amelyet esetleg napról-napra tapasztalunk az embriológiai munka során, de az irodalom áttanulmányozása után sem találunk róla elegendő információt, vagy a tanulmányok egymással ellentétes eredményeket közölnek. Bonyolítja a rendelkezésre álló adatok közti eligazodást, hogy a legtöbb szerző nem egy, hanem többféle rendellenességet egyszerre vizsgált, így nehéz megállapítani, hogy az egyes elváltozásoknak milyen hatásuk lehet a praeembryók későbbi fejlődésére. Még kevesebb adat áll rendelkezésünkre arról, hogy a bemutatott morphologiai elváltozásoknak milyen orvosi, biológiai, genetikai, esetleg labortechnikai okai lehetnek, és hogy tudunk-e tenni valamit annak érdekében, hogy az IVF/ICSI kezelések során az eredményességet hátrányosan befolyásoló anomáliák minél ritkábban jelentkezzenek.

Ezért a szakirodalmi adatok részletes áttanulmányozását követően klinikánk Asszisztált Reprodukciós Osztályának Embriológiai Laboratóriumában 2001. októberében az addig rutinszerűen elvégzett morphologiai vizsgálatok kiegészítésére bevezettünk egy részletes petesejt és zygota vizsgálati rendszert. A részletes morphologiai vizsgálatok bevezetésével lehetőségünk nyílt, hogy objektíven és külön-külön értékelhessük a különböző típusú petesejt elváltozásokat. A bírálat során gyűjtött adatok jelen tanulmányban történő feldolgozásával az alábbi célokat tűztük ki:

1. Meghatározzuk, hogy a petesejtben a megtermékenyítés előtt megfigyelhető *első sarkitest morphologiai elváltozásai* mennyiben befolyásolják a petesejtek megtermékenyülését, osztódását és az osztódó praeembryók minőségét.
2. Megvizsgáljuk, hogy a petesejtben a megtermékenyítést megelőzően a *perivitellinális tér mérete* mennyiben befolyásolja a megtermékenyülést, osztódást és a praeembryók későbbi fejlődését.

3. Megvizsgáljuk, hogy a *cytoplasmában előforduló különböző méretű, számú és típusú szemcsék jelenléte* mennyiben befolyásolja a petesejtek megtermékenyülését, osztódását és az osztódó előébrények minőségét.
4. Meghatározzuk, hogy a cytoplasmában a megtermékenyítés előtt megfigyelhető *különböző számú, méretű és típusú vacuolumok* mennyiben befolyásolják a petesejtek megtermékenyülését, osztódását és az osztódó praeembryók minőségét.
5. Meghatározzuk, hogy az *in vitro* fertilisációs kezelések során megtermékenyült petesejtek első sejtciklusának vizsgálata során a *pronucleus eltűnésének megfigyeléséhez milyen időintervallum lehet a legalkalmasabb*.
6. Megvizsgáljuk, hogy a *korai pronucleus eltűnés milyen összefüggésben van az előébrények későbbi fejlődésével*, valamint hogy ez a tulajdonság alkalmazható-e – mint kiegészítő szelekciós faktor– a beültetésre kerülő praeembryók kiválasztása során.

3. Anyag és módszer

3.1. Adatgyűjtés

Jelen tanulmányunkban a Semmelweis Egyetem I. Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika Asszisztált Reprodukciós Osztályán 2001. október és 2005. február között végzett *in vitro* fertilisációs kezelések során gyűjtött adatokat dolgoztuk fel. Ez idő alatt klinikánkon 507 betegnél összesen 795 petesejtnyerést végeztünk IVF kezelés céljából. A kezelések során összesen 6090 petesejtet nyertünk. A vizsgálat időtartama alatt a megtermékenyülésre kerülő petesejtek, majd az abból létrejövő zygoták és praeembryók hagyományos vizsgálatát kiegészítve egy részletes morfológiai bírálatot is végeztünk, amelynek adatait számítógépben rögzítettük és retrospektív módon értékeltük.

3.2. Petefészek stimuláció

Az *in vitro* fertilisációs kezelést megelőzően többszörös tüszőérés céljából „hosszú protokoll” szerinti gonadotrophin releasing hormon (GnRH) agonista + gonadotrophin vagy egyszeri / többszöri dóziséjú GnRH-antagonista + gonadotrophin kombinált ellenőrzött petefészek stimulációt alkalmaztunk.

3.2.1. GnRH analóg kezelés

„Hosszú protokoll” alkalmazása [87] során a hypophysis gonadotrophin termelésének időszakos felfüggesztése céljából a nőbetegek az IVF kezelést megelőző menstruációs ciklusuk sárgatest fázisának közepétől 0.1 mg/nap GnRH-agonista triptorelin (Decapeptyl[®]; Ferring, Kiel, Németország) kezelésben részesültek mindaddig, amíg a serum oestradiol (E₂) érték 50 pg/ml, az LH érték pedig 5 NE/l alatti értékre nem csökkent. Ezt követően került sor a gonadotrophin stimulációra.

A többszörös dóziséjú GnRH-antagonista „Lübeck protokoll” szerinti [88] kezelés során a ciklus 5. napjától napi 0.25 mg cetorelix (Cetrotide[®]; Serono, Roma, Olaszország), vagy ganirelix (Orgulatron, Organon, Oss, Hollandia) kezelésre, míg az egyszeri dóziséjú „Lübeck protokoll” szerinti [89] előkezelés során a ciklus 7. napján alkalmazott 3 mg-os cetorelix kezelésre került sor.

3.2.2. Gonadotrophin stimuláció

A GnRH előkezelést követően human menopausal gonadotrophin (hMG; Humegon[®]; Organon, vagy Menogon[®]; Ferring vagy Merional[®], IBSA, Lugano, Switzerland) vagy folliculus stimuláló hormon (FSH; Fostimon HP[®]; IBSA vagy Gonal-F[®]; Serono) készítmények egyénre szabott stimulációs protokoll szerinti adagolásával többes tüszőérést indukáltunk. A gonadotrophin stimuláció 6. napjától 1-2 naponta ultrahang vizsgálattal ellenőriztük a fejlődő tüszők számát és méretét, valamint meghatároztuk a serum E₂ szintet.

3.2.3. Ovuláció indukció

Amennyiben a tüszőérés ellenőrzése során legalább egy tüsző elérte a 18 mm-es, és legalább három tüsző a 16 mm-es nagyságot, illetve a serum E₂ érték elérte a tüszőnkénti 2-300 pg/ml-es értéket, az ovuláció kiváltására került sor 5 000 - 10 000 IU human chorion gonadotrophin (hCG; Profasi[®]; Serono, vagy Choragon[®]; Ferring) adásával.

3.3. **Petesejtnyerés**

A hCG injectio adása után 36 órával került sor az ultrahang vezérelt transvaginalis tüszőpunctióra. A punctio során valamennyi 14 mm-nél nagyobb tüsző tartalmát leszívtuk, majd a tüszőket 8 NE/l heparinnal és HEPES pH pufferrel kiegészített saját készítésű Wittgenstein- féle T₆ tápoldattal (T₆H) [90] kétszer átöblítettük és a mosófolyadékot ismét leszívtuk. A leszívott tüszőfolyadékot az embriológiai laboratóriumba szállítottuk, ahol sztereomikroszkóp segítségével, 6x - 30x-os nagyítás mellett kerestük a cumulus sejtekkel körülvett petesejteket. A tüszőfolyadékban talált petesejteket 10% anyai szérummal (HS; human serum) kiegészített T₆H tápoldatban (T₆H+10%HS) megmostuk, majd 10% anyai szérumot tartalmazó T₆ tápoldatban (T₆+10%HS) vagy IVF tápoldatban (IVF-20, IVF-100; Vitrolife, Kungsbacka, Svédország) inkubáltuk a megtermékenyítésig. Az inkubációt a petesejtnyeréstől a praeembryók beültetéséig 37C°-on, 96%-os relatív páratartalom és 5% CO₂ szint biztosítása mellett Forma Scientific 3141 típusú inkubátorban végeztük.

Az IVF kezelések során alkalmazott tápoldatok nevét, felhasználási körét, az esetleges kiegészítéseket és az oldatok gyártóit az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat: Az IVF kezelések során használt tápoldatok

Felhasználás célja	Oldat neve	Kiegészítés	Gyártó
Töszőpunctio	T ₆ H*	Na-Heparin	Saját
Petesejt keresés	T ₆ H	10% HS	Saját
	Gamete	—	Vitrolife
Spermapreparálás	T ₆ H	10% HS	Saját
	Spermrinse	—	Vitrolife
Petesejtek előinkubálása	T ₆ *	15% HS	Saját
	IVF	—	Vitrolife
<i>In vitro</i> fertilisatio	T ₆	15% HS	Saját
	IVF	—	Vitrolife
Mikromanipulatio	T ₆ H	10% HS	Saját
	Gamete	—	Vitrolife
Praeembryo tenyésztés	T ₆	10% HS	Saját
	IVF	—	Vitrolife
Embryotransfer	T ₆	50% HS	Saját
	IVF	50% HS	Vitrolife

HS = Human (anyai) serum

*Wittgenstein- féle T₆ és T₆H tápoldatok [90]

3.4. Spermapreparálás

A meddő pár férfi tagja spermáját a spermiumszámtól, motilitástól függően sűrűség gradiens centrifugálás vagy „felúsztatásos” módszer (swim-up) segítségével dolgoztuk fel. A spermapreparáláshoz T₆H+10%HS oldatot, vagy Spermrinse oldatot használtunk.

3.4.1. Felúsztatásos (swim-up) módszer

Normozoospermiás ondóminták esetén, amelyek legalább 60-80 millió progresszíven mozgó spermiumot tartalmaztak, a swim-up módszert alkalmaztuk. Ennek során az ondómintát centrifugáltuk, majd a felülúszó részt eltávolítottuk. A visszamaradt pelletre 1 ml spermapreparáló tápoldatot rétegeztünk, majd 1 órán át inkubáltuk a mintát. Ez idő alatt a jól mozgó hímvarsejtek a rárétegzett tápoldatba felúsznak. A felülúszó részt óvatosan leszívtuk és ezt használtuk a petesejtek megtermékenyítéséhez.

3.4.2. Sűrűséggrádiens centrifugálás

A normálistól eltérő, gyengébb paramétereket mutató ondóminták esetében alkalmaztuk a sűrűség grádiens centrifugálás módszerét, amelynek során egy centrifugacsőbe 90%-os, majd 45%-os Puresperm oldatot (NidaCon International AB, Göteborg, Svédország) rétegeztünk, majd erre került az ondóminta. Centrifugálás során a két különböző koncentrációjú oldaton keresztül túlnyomórészt a jól mozgó hímivarsejtek jutottak el a centrifugacső aljára. Az ott összegyűlt pelletet tiszta tápoldatba fölvéve újból centrifugáltuk, majd az így tisztított mintát használtuk fel a megtermékenyítéshez.

3.4.3. Hímivarsejtek gyűjtése hereszövetből

Azoospermiás, necrozoospermiás betegeknél, illetve azoknál a súlyos cryptozoospermiás betegeknél, akiknél az előzetes spermavizsgálatok során az ondómintában nem találtunk a petesejtek megtermékenyítéséhez minimálisan elegendő mozgó hímivarsejtet, a Semmelweis Egyetem Urológiai Klinikájával együttműködve herebiopsziát végeztünk (spermiumnyerés hereszövetből; Testicular Sperm Extraction; TESE). A biopsia során nyert szövetminták egy részét hagyományos szövettani, illetve asszisztált reprodukciós módszerekkel megvizsgáltuk, hogy tartalmazzak-e hímivarsejteket. A minták többi részét pedig a későbbi IVF kezelés céljából lefagyasztottuk. A lefagyasztott hereszövetet a petesejtnyerés napján felolvasztottuk, majd 400 NE/ml koncentrációjú collagenase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) oldattal emésztettük. A mosást és centrifugálást követően nyert pelletben található hímivarsejteket használtuk fel a petesejtek megtermékenyítéséhez.

3.5. Megtermékenyítés

A petesejtek megtermékenyítésére annak módjától, illetve a laboratórium időbeosztásától függően a petesejtnyerést követő 3-8 órán belül került sor. A megtermékenyítés módjáról az ondóminta feldolgozását követően, annak eredménye, illetve a korábbi spermavizsgálatok és IVF kezelések eredménye alapján döntöttünk.

3.5.1. Hagyományos *in vitro* fertilisatio

Hagyományos *in vitro* fertilisatiós kezelést végeztünk akkor, ha az ondóminta feldolgozását követően több mint egymillió progresszíven mozgó hímivarsejt állt rendelkezésünkre, és a feldolgozott spermaminta motilitása legalább 75-80% volt. A

petesejtek megtermékenyítését ebben az esetben a hímivarsejtek morfológiájától, valamint a nőbeteg életkorától függően 100 000 - 500 000 db/ml spermium-koncentrációjú fertilisatiós médiummal végeztük. A petesejtek és hímivarsejtek együtt inkubálása a petesejtnyerés után 6 órával kezdődött, és másnap reggelig, kb. 14-18 órán át tartott.

3.5.2. ICSI kezelés

A petesejtek mikromanipulációs módszerrel történő megtermékenyítését (Intracytoplasmic Sperm Injection; ICSI) a Palermo és munkatársai [7] által leírt módon végeztük 4-8 órával a petesejtnyerést követően. ICSI kezelésre akkor került sor, ha az ondóminta feldolgozása során csak <1 millió progresszíven mozgó hímivarsejtet sikerült kinyernünk, valamint ha a normál morfológiájú spermiumok aránya a natív mintában kevesebb volt 4 %-nál. Ezen kívül andrológiai javallat nélkül is ICSI kezelést alkalmaztunk, ha a nyert petesejtszám ≤ 4 , valamint, ha a betegnél korábban elvégzett hagyományos *in vitro* fertilisatiós kezelés szokatlanul alacsony (<50%) megtermékenyülési arányt eredményezett.

Az ICSI kezelést megelőzően a petesejteket körülvevő cumulus sejteket 80 NE/ml koncentrációjú hialuronidáz oldat segítségével, valamint mechanikus úton távolítottuk el. A beavatkozást invert mikroszkópra (Diaphot 200; Nikon, Tokyo, Japán) szerelt mikromanipulátor (Narishige, Tokyo, Japán) segítségével, 200x-os nagyítás mellett végeztük. Az injektáláshoz kiválasztott hímivarsejt farki részén az injektáló üveggapillárisal membránsérülést idéztünk elő, majd az így mozgásképtelenné vált hímivarsejtet az ICSI kapillárisba (Humagen, Charlottesville, VA, USA) szívtuk fel. Ezt követően a petesejtet a tartókapillárison rögzítettük úgy, hogy az 1. sarkitást horizontális síkban 6- vagy 12 óra irányában helyeződjön el, majd a hímivarsejtet tartalmazó ICSI kapillárist a zona pellucidán át a petesejtbe szúrtuk (2. ábra). A rendkívül rugalmas oolemmát óvatos aspirálással átszakítottuk, majd a hímivarsejtet a petesejt cytoplasmájába injektáltuk.

A cumulus sejtek eltávolítását, valamint az ICSI kezelést mikromanipulációs oldatban végeztük. Ezt követően a petesejteket praeembryo tenyésztő oldatba téve visszahelyeztük az inkubátorba.

3.6. A petesejt morfológiai vizsgálata

A petesejtek morfológiai vizsgálatára csak a cumulus sejtek eltávolítása után van lehetőség. Így ez a vizsgálat csak az ICSI módszerrel megtermékenyítésre kerülő petesejtek esetében végezhető el. A hagyományos IVF kezeléssel megtermékenyített petesejtek esetében a megtermékenyítés előtti morfológia nem ítéhető meg, mert a zona pellucidához szorosan tapadó granulosa sejtek miatt mikroszkóp alatt a petesejt csak nehezen látható.

A vizsgálat, amelyet az ICSI kezelés során, közvetlenül a spermium injektálás előtt végeztük, kiterjedt az 1. sarkitest morfológiájára, a perivitellinális tér méretére, valamint a cytoplasmában előforduló szemcsék, illetve vacuolumok jellemzőire.

3.6.1. A nucleáris érettség megítélése

A petesejtek érettségének megítéléséhez a csírahólyag (germinális vesiculum; GV) valamint az 1. sarkitest megléte vagy hiánya ad segítséget.

Azok a petesejtek, amelyekben nincs 1. sarkitest, és a cytoplasmában jól látható a csírahólyag, a meiotikus osztódás I. fázisának profázisában vannak (PI vagy GV petesejt, 4. ábra/I). Ezek a petesejtek megtermékenyítésre csak *in vitro* érlelést követően, későbbi időpontban alkalmasak. Tanulmányunk időszakában a GV petesejtek *in vitro* érlelését, és későbbi időpontban történő megtermékenyítését csak akkor végeztük el, ha a többi petesejt megtermékenyítésével kevesebb praembryo jött létre, mint amennyi az adott beteg esetében beültethető.

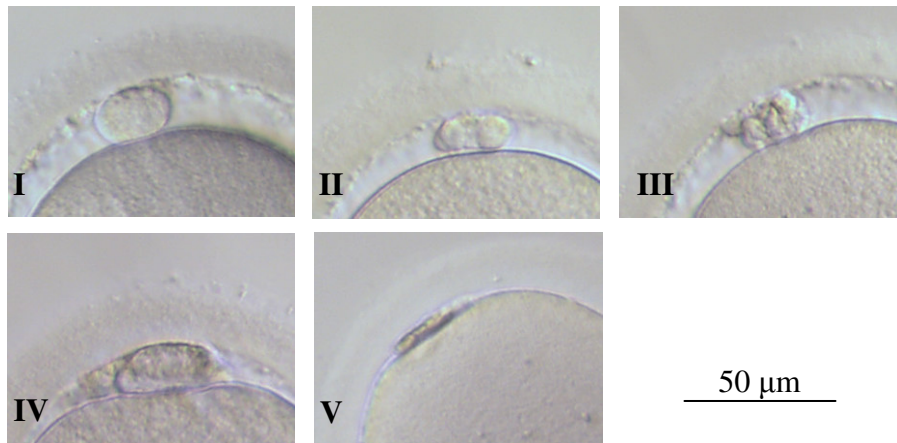
Azok a petesejtek, amelyekben csírahólyag már nem látszik, de az első sarkitest még nem vált ki, az I. meiotikus fázisának metafázisában vannak (MI petesejt, 4. ábra/II). Megtermékenyítésük megkísérrelhető, de az eredményesség elmarad az érett petesejtek megtermékenyülési arányától [9,10]. Az ilyen petesejteket is ICSI kezelésben részesítettük.

Azon petesejtek, amelyekben az 1. sarkitest látható, a meiotikus osztódás II. fázisában vannak (3. ábra). Elsősorban ezeket tekintettük érett, megtermékenyítésre alkalmas petesejteknek.

3.6.2. Az 1. sarkitest morfológiájának vizsgálata

A spermium injektálása előtt a petesejtet a mikropipetták segítségével olyan helyzetbe hoztuk, hogy az 1. sarkitest jól látható legyen. Ezt követően a sarkitest morfológiai

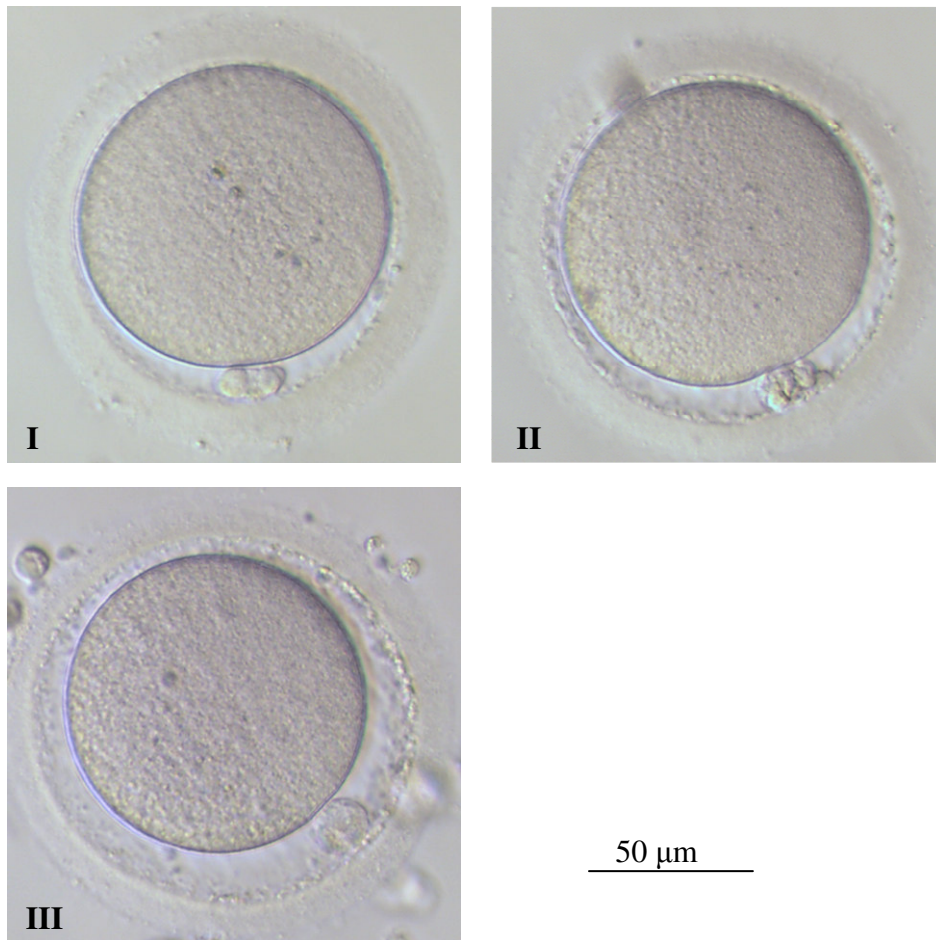
jellemzői alapján a petesejteket az alábbi csoportokba soroltuk: [I] kerek vagy ovális, sima felszínű sarkitest; [II] kerek vagy ovális, szabálytalan felszínű sarkitest; [III] fragmentált vagy degenerált sarkitest; [IV] a szokásosnál lényegesen nagyobb sarkitest (>20 μm); és [V] éretlen, a petesejtre sapkaszerűen ráboruló sarkitest (12. ábra/I-V).



12. ábra: Az 1. sarkitest morfológiája. I) enyhén ovális, sima felszínű sarkitest; II) enyhén ovális, egyenetlen felszínű sarkitest; III) fragmentált sarkitest; IV) a szokásosnál nagyobb sarkitest; V) a petesejtre sapkaszerűen ráboruló sarkitest.

3.6.3. A perivitellinális tér méretének vizsgálata

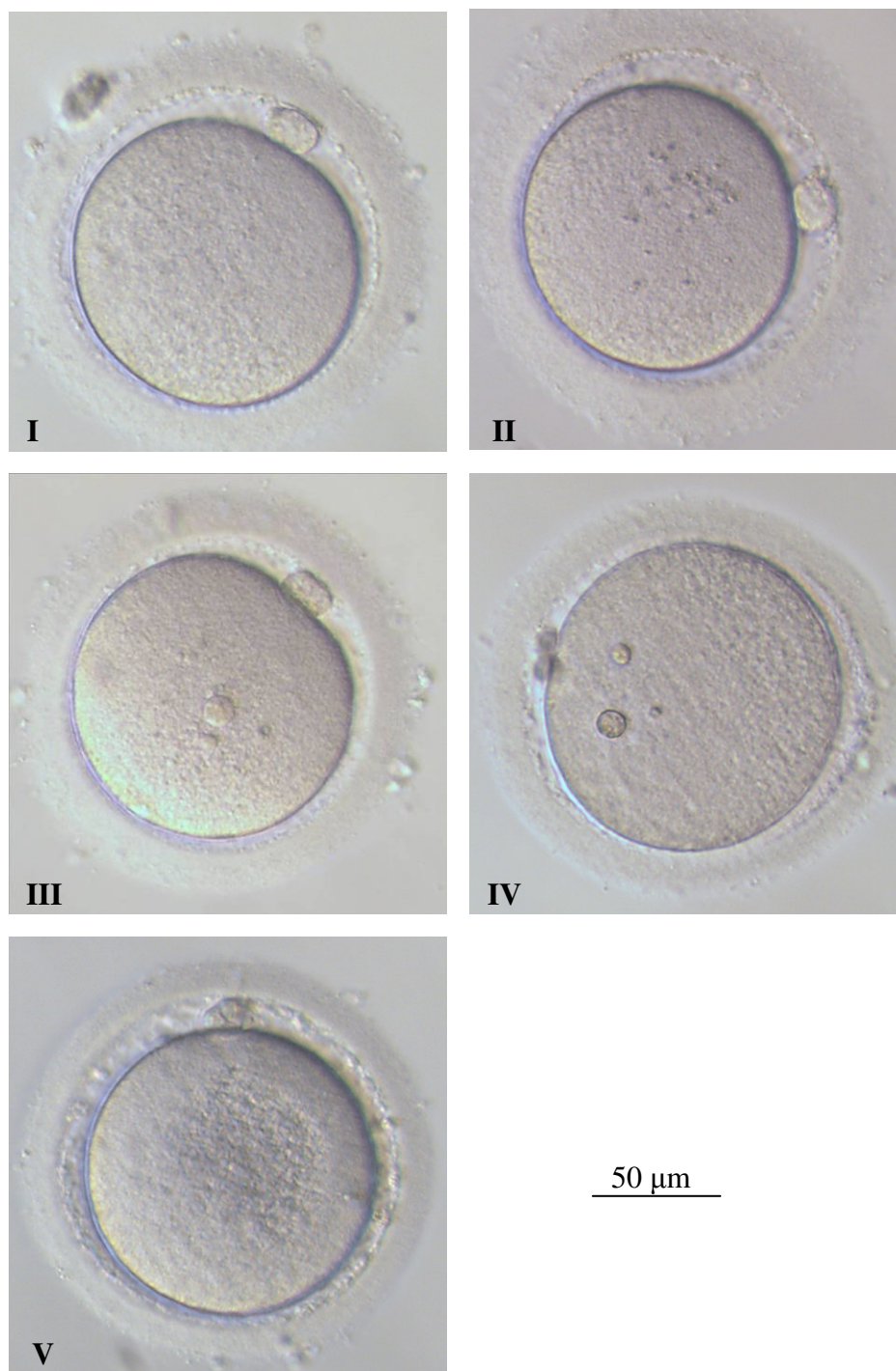
A zona pellucida és az oolemma közötti tér nagysága alapján a petesejteket az alábbi csoportokba soroltuk: [I] szűk perivitellinális tér, amely a petesejt egyik részén sem haladja meg az 5 μm -t; [II] enyhén megnagyobbodott perivitellinális tér, amely legalább egy helyen elérte az 5 μm -t, de nem haladta meg a 10 μm -t; [III] jelentősen megnagyobbodott perivitellinális tér, amely legalább egy helyen meghaladta a 10 μm -t (13. ábra/I-III).



13. ábra: A petesejtek csoportosítása a perivitellinális tér mérete alapján. I) szűk perivitellinális tér; II) enyhén megnagyobbodott perivitellinális tér (5-10 μm); III) jelentősen megnagyobbodott perivitellinális tér (>10 μm).

3.6.4. A cytoplasma szemcsézettségének vizsgálata

A petesejtek cytoplasmájában megfigyelhető szemcsézettség alapján az alábbiak szerint csoportosítottuk a petesejteket: [I] Szemcsézettség nem látható, vagy legfeljebb 1-2 kis méretű (<5 μm) szemcse; [II] több kisméretű (<5 μm) szemcse; [III] egy vagy több 5 μm -nél nagyobb szemcse, amelynek színe megegyezik a cytoplasma színével; [IV] fénytörő szemcse (refractile body), amely >5 μm , és erősen fénytörő tulajdonsága miatt színe sötétebb, mint a cytoplasma; [V] kráterszerű szemcsézettség a cytoplasma középső részén (14. ábra/I-V). Amennyiben egy petesejtben többféle szemcsézettség is előfordult, akkor mindig a legjellemzőbb szemcsetípus alapján soroltuk be a petesejtet.

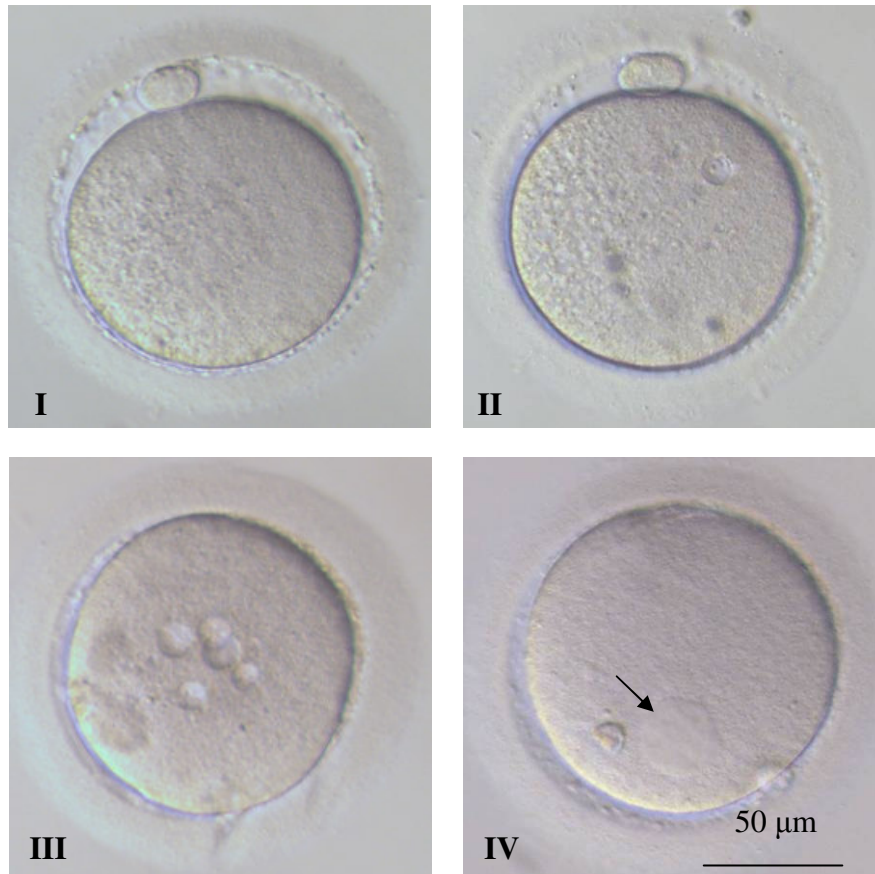


14. ábra: Petesejtek csoportosítása a cytoplasma szemcsézettsége alapján. I) szemcsézettség nélküli petesejt; II) sok apró (<5 μm) szemcse; III) 5 μm-nél nagyobb méretű szemcse; IV) fénytörő szemcse (refractile body); V) kráterszerű szemcsézettség

3.6.5. A cytoplasmában megfigyelhető vacuolumok

A cytoplasmában megfigyelt vacuolumok alapján az alábbi csoportokba soroltuk a petesejteket: [I] vacuolum nem látható; [II] 1-2 kisebb méretű (<10 μm) vacuolum; [III]

nagyobb méretű (>10 µm), vagy több kisebb méretű vacuolum; [IV] zsákocskaszerű képződmény (sima felszínű endoplazmatikus reticulum felhalmozódása) (15. ábra).



15. ábra: Petesejtek csoportosítása a cytoplasmában megfigyelhető vacuolumok alapján. I) vacuolumot nem tartalmazó petesejt; II) kisebb méretű vacuolum; III) jelentős mennyiségű vacuolum IV) zsákocskaszerű képződményt (↘) tartalmazó petesejt

3.7. A zygota vizsgálata

3.7.1. A megtermékenyülés ellenőrzése

A petesejtek megtermékenyülésének ellenőrzését az *in vitro* fertilisatiót követő napon reggel, a megtermékenyítés után 14-18 órával végeztük. Hagyományos IVF kezelés esetén ezt megelőzően a petesejteket körülvevő cumulus sejteket mechanikai úton, 135 µm átmérőjű műanyag pipettahegy (Mid-Atlantic Diagnostic, Marlton, NJ, USA) segítségével eltávolítottuk. ICSI módszerrel megtermékenyített petesejtek esetében a

cumulus sejtek eltávolítására még a mikroinjectio előtt került sor a 3.5.2. pontban leírtak szerint.

A megtermékenyülés ellenőrzését – a petesejtben látható előmagok (pronucleusok) száma alapján – invert mikroszkóp segítségével, 200x-os nagyítással végeztük. Normálisan megtermékenyültnek tekintettük azokat a petesejteket, amelyek két előmagot tartalmaztak (7. ábra). Amennyiben a petesejtben nem láttunk pronucleust, úgy a megtermékenyülés elmaradását regisztráltuk. Az egy, három vagy több pronucleust tartalmazó petesejteket (8. ábra) rendellenes megtermékenyülésűnek tekintettük.

3.7.2. A zygota morfológiai vizsgálata

A pronucleusok számának meghatározása mellett vizsgáltuk az előmagok magvacskáinak normál vagy aszimmetrikus eloszlását is a 9. ábra szerint. Normálnak tekintettük a magvacskák eloszlását abban az esetben, ha sok (>8) apró magvacska mindkét pronucleusban egyenletesen szétszórva helyezkedett el, vagy ha 3-8 nagyobb méretű magvacska a két előmag találkozási síkjában összerendezve helyezkedett el (9. ábra; 0/A, 0/B eloszlás). A vizsgálat során előfordult, hogy nem sikerült a megtermékenyült petesejtet olyan térbeli állapotba forgatni, hogy a nucleolusok eloszlása a mikroszkóp által vizsgált síkban látható legyen. Ezekben az esetekben a magvacskák eloszlásáról adatot nem rögzítettünk.

Az előmagok morfológiai vizsgálata mellett vizsgáltuk a cytoplasma külső területén megjelenő áttetsző gyűrű jelenlétét, illetve annak méretét is.

3.8. Praeembryók tenyésztése

A megtermékenyülés ellenőrzését követően a zygoták, majd az azokból fejlődő praeembryók inkubálását praeembryo tenyésztő tápoldatban végeztük (lásd még 3.3. fejezet). ICSI kezelések esetében a petesejt bírálattól, hagyományos IVF kezelések esetében pedig a pronucleus bírálattól kezdve minden petesejtet egyedileg, a többi petesejttől elkülönítve tenyésztettünk. A tenyésztés a megtermékenyítést követő 2. vagy 3. napon végzett embriotransferig tartott. Ez idő alatt naponta egy alkalommal került sor a praeembryók vizsgálatára, azok fejlődésének és morfológiájának megítélése céljából.

3.9. A korai praeembryo fejlődés vizsgálata

A megtermékenyülés ellenőrzésének napján délután, a megtermékenyítés időpontja után 20-28 órával végeztük el a korai praeembryo fejlődés vizsgálatát. A vizsgálat a pronucleusok meglétére, illetve hiányára, valamint az első osztódás bekövetkeztére irányult, és csak a szabályosan megtermékenyült zygotákra vonatkozott. A megfigyelés alapján a zygotákat az alábbi három csoportba osztottuk. [I] pronucleus állapotú zygota (mindkét pronucleus tisztán látható); [II] egy sejtes zygota (a pronucleusok a cytoplasmában már nem láthatóak, de az első sejtosztódás még nem zajlott le); [III] két (esetleg több) sejtes praeembryo.

Miután az előmagok eltűnése a II. és III. csoportban már egyaránt lezajlott, ezért a PNBD vizsgálata során ezen csoportokba tartozó zygotákat és praeembryókat, – függetlenül attól, hogy egy-, vagy több sejtesek – korai PNBD csoportba soroltuk (PNBD+), míg a 2 előmagot tartalmazó zygotákat a késői PNBD csoportba (PNBD–) soroltuk. A pronucleusok eltűnésének időpontja és az IVF kezelések eredményessége közti összefüggéseket csak azoknál az IVF kezeléseknél vizsgáltuk, ahol a PNBD időpontja szempontjából homogén embryotransfer történt, tehát vagy csak korai PNBD praeembryókat, vagy csak késői PNBD praeembryókat ültettünk be. Ennek alapján azokat az IVF kezeléseket, amelyekben a pronucleus eltűnés szempontjából homogén embryotransfer történt, korai, illetve késői PNBD kezeléseknak (IVF ciklusoknak) nevezzük.

3.10. Az osztódó praeembryo morfológiai vizsgálata

Az osztódó praeembryók morfológiai vizsgálatára a megtermékenyítés utáni 2. és 3. napon került sor. Azoknál a kezeléseknél, ahol az embryotransfert a 2. napon végeztük, a 3. napi morfológiai vizsgálatra értelemszerűen nem került sor. A vizsgálat a praeembryók sejtszámának és minőségének meghatározására irányult. A praeembryók minőségét Veeck által leírt módszer [4] alapján határoztuk meg. A minőségi besorolásokat részletesen a 2. táblázat tartalmazza.

A fragmentáció mennyiségét a praeembryo térfogatára vonatkoztatva, %-ban tüntettük fel. Eltérő méretűnek tekintettük a blastomérákat, ha két sejt mérete közötti különbség meghaladta a nagyobbik sejt méretének 30%-át. Azokat a praeembryókat, amelyekben bármelyik morfológiai vizsgálat során több sejtmagot, valamint jelentősebb

mennyiségű vacuolumot tartalmazó blastomerát találtunk, nem soroltuk A vagy B minőségi kategóriába. A többmagvú blastomerákat tartalmazó praeembryókat, függetlenül attól, hogy melyik morfológiai vizsgálat során észleltük a jelenséget, az eredmények bemutatása során a 2. napi morfológiai bírálat adatainál tüntettük fel.

Az adatok statisztikai feldolgozása során a morfológiai vizsgálat alapján megállapított minőségi kategóriákhoz számadatot rendelve morfológiai pontértéket hoztunk létre az alábbiak szerint: A minőség = 4 pont, B minőség = 3 pont, C minőség = 2 pont, D minőség = 1 pont és E minőség = 0 pont (2. táblázat).

Van Royen és munkatársai (1999) közleménye [79] alapján azokat az A és B minőségi kategóriába sorolt praeembryókat, amelyek a megtermékenyítést követő 2. napon ≥ 4 sejtesek, a 3. napon pedig ≥ 7 sejtesek voltak, "kiváló minőségű" praeembryóknak tekintettünk.

2. táblázat: Praeembryók minőség szerinti besorolása (Veeck (1991) bírálati rendszere szerint [4])

Kategória	Blastomerák jellemzői	Fragmentáció mértéke	Morphológiai pontérték
A	Egyforma méretű blastomerák	Fragmentáció nincs	4
B	Egyforma méretű blastomerák	Néhány kisebb fragmentum (<25%)	3
C	Eltérő méretű blastomerák	A fragmentumok mennyisége 25-50% között van	2
D	A blastomerák mérete lehet azonos vagy különböző is	Jelentős mennyiségű fragmentáció (50-80%)	1
E	Blastomera egyáltalán nem, vagy alig ismerhető fel	Súlyos fokú vagy teljes fragmentáció (>80%)	0

3.11. Embryotransfer

3.11.1. Az embryotransfer időpontja

A praeembryók méhüregbe történő beültetésére a megtermékenyítést követő 2. vagy 3. napon került sor. A 3. napon végeztük az embryotransfert, ha több beültethető praeembryo állt rendelkezésünkre, mint amennyit az adott beteg esetében beültethettünk. Így lehetőségünk nyílt a praeembryók közötti szelekcióra azok fejlődésének gyorsasága, valamint morfológiai jellemzőik alapján. Azon kezelések során, ahol a rendelkezésre álló praeembryók száma nem volt nagyobb, mint az adott esetben beültethető praeembryók száma, így praeembryo szelekcióra nem volt lehetőség, az embryotransfert a 2. napon végeztük.

3.11.2. A beültetett praeembryók száma

A beültethető praeembryók számát a beteggel egyetértésben, a Magyarországon hatályban lévő rendelkezéseknek megfelelően határoztuk meg. Ennek alapján általában három praeembryót ültettünk be. Háromnál kevesebb praeembryo beültetésére akkor került sor, ha csak egy vagy két beültethető praeembryo állt rendelkezésünkre, vagy, ha a házaspár az embryotransfer előtt ezt külön kérte. Négy praeembryo beültetésére került sor a házaspár erre vonatkozó írásos kérelme és az alábbi feltételek bármelyikének fennállása esetén: [1] a nőbeteg életkora elérte, vagy meghaladta a 36 évet; [2] a betegnél korábban olyan embryotransfer történt, amely nem eredményezett klinikai terhességet; [3] a nőbetegnél korai petefészek kimerülés jelei mutatkoztak.

3.11.3. A beültetésre kerülő praeembryók kiválasztása

Amennyiben egy adott házaspárnál több praeembryo állt rendelkezésre, mint amennyi esetükben beültethető, úgy a rendelkezésre álló praeembryók közül azok fejlődési állapota és morfológiai jellemzői alapján választottuk ki a legéletképesebbnek tűnő praeembryókat. A szelekció során a magasabb sejtszám és a jobb minőségi besorolás volt az elsődleges szempont. A vizsgálati időszakban a tudományos célból végzett adatgyűjtés eredményeit (részletes petesejt és zygota bírálat; korai praeembryo fejlődés vizsgálata) a beültetendő praeembryók kiválasztásánál nem vettük figyelembe. Egy pronucleust tartalmazó zygotából létrejött, valamint többmagvú blastomerát tartalmazó praeembryót csak akkor ültettünk be, ha más praeembryo nem állt rendelkezésünkre.

Három, vagy több pronucleust tartalmazó zygotából fejlődő praeembryót semmilyen körülmények között nem ültettünk be.

3.11.4. Az embryotransfer folyamata

Az embryotransfert megelőzően a beültetésre kerülő praeembryókat 50% anyai szérummal kiegészített transfer tápoldatba helyeztük át. Az embryobeültetést megelőzően a kezelőorvos Wallace katéterrel (SIMS Portex Ltd., Kent, UK) próbatransfert végzett. Eredményes próbatransfer esetén a beültetés Wallace katéterrel történt. Amennyiben a próbatransfer során a próbakatéterrel nem sikerült a méhüregbe bejutni, akkor a Wallace katéternél merevebb TDT katéterrel (Laboratoire CCD, Paris, France) végeztük el az embryotransfert.

3.12. A beültetésre nem kerülő praeembryók sorsa

Amennyiben az embryotransfert követően az adott IVF kezelésből maradt legalább két életképesnek tűnő, normálisan megtermékenyült zygotából fejlődő, A, B vagy C minőségi kategóriába tartozó praeembryo, és azok cryopreservatioját a házaspár kérte, akkor a megmaradt praeembryókat lefagyasztottuk és későbbi felolvasztás és beültetés céljából folyékony nitrogénben (-196 °C-on) tároltuk. A lefagyasztott praeembryók felolvasztása és az azt követő beültetése során nyert adatok értékelése nem szerepel jelen tanulmány célkitűzései közt.

3.13. Az *in vitro* fertilisatiós kezelések kimenetele

A terhesség létrejöttét az előébrény-beültetést követő 8. és 16. nap között kétnapos különbséggel levett szérumminták teljes β -hCG-szintjének meghatározásával igazoltuk. Biokémiai terhességet akkor állapítottunk meg, ha a két hCG-érték valamelyike elérte, vagy meghaladta a 25 NE/l-es szintet, de a két héttel később végzett hüvelyi ultrahangvizsgálat során nem látszott petezsák. A klinikai terhesség kritériumának a fenti hCG-szinten túl a petezsák jelenlétét tekintettük. Ebben az esetben a beágyazódott praeembryók számát is regisztráltuk.

Mindezek alapján az összes terhességi arány számításakor a létrejött terhességek számát elosztottuk az embryobeültetések számával, míg a klinikai terhességi arány számításakor a klinikai terhességek számát osztottuk el az embryobeültetések számával.

A beágyazódási arányt a beágyazódott praembryók száma / a beültetett praembryók száma alapján határoztuk meg.

3.14. Az adatok statisztikai értékelése

Adataink statisztikai értékelését Statistica 6.1 számítógépes program (StatSoft Inc., Tulsa, USA) segítségével végeztük. Átlagértékek összehasonlítását Kruskal-Wallis próbával, míg a gyakorisági értékek összehasonlítását Pearson χ^2 próbával végeztük. Amennyiben több csoport összehasonlítása során szignifikáns eltérést kaptunk, úgy az egyes csoportok közti különbségek vizsgálata céljából páronkénti összehasonlításokat végeztünk. Post hoc összehasonlításként átlagértékek esetén student-féle t-próbát, míg gyakorisági értékek esetén 2x2-es kontingencia tábla alapján χ^2 próbát végeztünk. A vizsgált csoportok közötti különbségeket $P < 0.05$ esetén tekintettük szignifikánsnak.

4. Eredmények

A vizsgálatok időtartama alatt a Semmelweis Egyetem I. Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika Asszisztált Reprodukciós Osztályán elvégzett IVF kezelések fontosabb adatait a 3. táblázat tartalmazza.

3. táblázat: IVF kezelések főbb adatai és eredményei a vizsgálatok időszakában (2001. október – 2005. február) klinikánkon

IVF kezelések száma	823
Petesejt nyerések száma	795
Nyert petesejtek száma	6090
Ciklusonkénti átlagos petesejtszám	7.7
ICSI kezelések aránya (%)	577/795 (72.6)
Megtermékenyülési arány (%)	3719/6090 (61.1)
Embryobeültetések száma	749
Beültetett praeembryók száma	2307
Beültetett praeembryók átlagos száma (/ET)	3.1
Összes terhességi arány (%)	330/749 (44.1)
Klinikai terhességi arány (%)	282/749 (37.6)
Beágyazódási arány (%)	429/2307 (18.6)

2001. október és 2005. február között 507 meddő házaspárnál összesen 823 esetben végeztünk hormonális petefészek stimulációt IVF kezelés céljából. Ebből 795 esetben (96.6%) került sor petesejtnyerésre, amelyek során összesen 6090 petesejtet nyertünk. A ciklusonkénti átlagos petesejtszám 7.7, a megtermékenyülési arány 61.1% volt. 749 esetben végeztünk embryotransfert, amelyek során 2294 praeembryót ültettünk be. A

kezelésenként beültetett praeembryók átlagos száma 3.1 volt a vizsgálat időtartama alatt. Összesen 174 IVF ciklusban 847 számfeletti praeembryo került fagyasztásra.

A kezelések 330 esetben (44.1%) eredményeztek terhességet. Ebből 41 biokémiai és 7 méhen kívüli terhességet regisztráltunk. Összesen 282 kezelés vezetett klinikai terhességhez, amely 37.6%-os klinikai terhességi arányt jelent. A beültetett praeembryók közül 429 ágyazódott be, ami 18.6%-os beágyazódási aránynak felel meg.

A vizsgálati időszakban 7 IVF kezelés során – összesen 68 petesejt esetében – a vizsgálati protokollban szereplő valamelyik morfológiai bírálat (részletes zygota bírálat, vagy a 2. napi praeembryo bírálat) technikai okok miatt elmaradt, így ezen ciklusok adatai nem vettek részt a további feldolgozásban. – 2 kezelésnél összesen 15 petesejt esetében – a meddő pár férfi tagjánál jelentkező mintaadási képtelenség miatt a petesejtek megtermékenyítésére csak a petesejtnyerés napját követő napon került sor hereszövetből származó hímivarsejtekkel, így ezen kezelések adatai sem vettek részt az adatfeldolgozásokban.

4.1. Adatértékelés az egyes vizsgálati paraméterek esetében

A vizsgálat időtartama alatt az adatok feldolgozása és szakmai rendezvényeken, illetve folyóiratokban történő közlése folyamatos volt. Ennek megfelelően jelen tanulmányunkban feldolgozásra került adatok az egyes vizsgálati paraméterek esetében más-más időintervallumot ölelnek fel, amelynek részleteit a 4. táblázat tartalmazza.

4. táblázat: Az egyes vizsgálati paraméterek feldolgozásának időszaka és legfontosabb adatai

Vizsgált tulajdonság	Adatfeldolgozás		Betegek száma	Kezelések száma	Petesejtek száma	Érett petesejtek száma
	kezdet	vége				
1. sarkitest	2001. dec.	2005. febr.	359	522	3800	3387
Perivitellinális tér	2001. dec.	2004. júl.	267	393	2734	2448
Szemcsézettség	2001. dec.	2004. júl.	267	393	2734	2448
Vacuolumok	2001. dec.	2005. febr.	359	522	3800	3387
Korai embryofejl.	2001. okt.	2004. febr.	334	490	3744	2280 ^a

^aNormálisan megtermékenyült (2PN) petesejtek száma

4.2. A petesejt morfológiai vizsgálatának eredményei

4.2.1. Az 1. sarkitest morfológiai vizsgálatának eredményei

Az 1 sarkitest morfológiai vizsgálatát 3387 érett (MII) petesejten végeztük el a 3.6.2. pontban (lásd még 12. ábra) leírtak alapján. A petesejtek megoszlását a különböző sarkitest morfológiájú csoportok szerint a 5. táblázat tartalmazza. A petesejtek közel felében figyeltünk meg szabályos méretű és alakú, sima vagy egyenetlen felszínű sarkitestet, míg a petesejtek másik fele fragmentált, degenerált vagy szabálytalan méretű illetve alakú sarkitestet tartalmazott.

Az ICSI kezelés eredményeként 2254 (66.5%) normálisan megtermékenyült, 2 előmagot tartalmazó zygota jött létre, amelyek közül 2194 osztódott (64.8%, az injektált petesejtekre vonatkoztatva) a megtermékenyítést követő 2. napon végzett praeembryo bírálatig.

5. táblázat: A különböző sarkitest morfológiájú petesejtek megoszlása az injektált petesejtek csoportjában

	Sarkitest típusa	N	%
I	Ovális vagy kerek, sima felszínű	714	21.1
II	Ovális vagy kerek, egyenetlen felszínű	1006	29.7
III	Fragmentált vagy degenerált	1576	46.5
IV	A szokásosnál lényegesen nagyobb (> 20 µm)	62	1.8
V	Éretlen, a petesejtre sapkaszerűen ráboruló	29	0.9
	Összesen	3387	100

A különböző morfológiájú sarkitesttel rendelkező petesejtek megtermékenyülési arányait az 6. táblázat tartalmazza. Mind a normálisan (2PN) megtermékenyült, mind a meg nem termékenyült petesejtek (0PN) aránya szignifikánsan különbözik az egyes sarkitest morfológiájú csoportok között, míg a kórosan megtermékenyült (1PN, 3PN), valamint a spermium mikroinjektálás következtében degenerálódott petesejtek aránya nem különbözik a csoportok között.

Normál megtermékenyülést a fragmentált sarkitesttel rendelkező petesejtek (III. csoport) esetében tapasztaltunk a legnagyobb arányban (69%), amely szignifikánsan

magasabb ($P=0.0195$) a II. csoportban megfigyelt megtermékenyülési aránynál (64.6%), azonban nem tér el lényegesen az I. csoportban megfigyelt eredménytől. A legkisebb megtermékenyülési arányt (50%) a szokásosnál nagyobb sarkitetttel rendelkező petesejtek esetében figyelhetjük meg (IV. csoport), amely szignifikánsan eltér az I. ($P=0.043$), a II. ($P=0.0202$) és a III. csoportban ($P=0.0016$) megfigyelhető megtermékenyülési arányoktól is. A normál megtermékenyüléshez hasonló különbségeket találtunk a csoportok között a meg nem termékenyült (OPN) petesejtek gyakoriságát vizsgálva, ahol a legnagyobb arányban (35.5%) a IV. csoportban, míg a legkisebb arányban (18.8%) a III. csoportban találtunk meg nem termékenyült petesejteket.

6. táblázat: Megtermékenyülési és osztódási arány a különböző sarkitest morfológiájú csoportokban (a petesejtek sarkitest típus szerinti csoportosítását a 5. táblázat tartalmazza)

Sarkitest típusa	Σ	I	II	III	IV	V	P -érték
Petesejtek száma	3387	714	1006	1576	62	29	—
Megtermékenyülés							
OPN (%)	723 (21.3)	144 (20.2)	254 (25.2)	296 (18.8)	22 (35.5)	7 (24.1)	0.0001 ^a
1PN (%)	172 (5.1)	43 (6.0)	37 (3.7)	89 (5.6)	3 (4.8)	0 (0.0)	NS ^a
2PN (%)	2254 (66.5)	468 (65.5)	650 (64.6)	1088 (69.0)	31 (50.0)	17 (58.6)	0.005 ^a
3PN (%)	130 (3.8)	35 (4.9)	30 (3.0)	58 (3.7)	5 (8.1)	2 (6.9)	NS ^a
Degenerált (%)	108 (3.2)	24 (3.4)	35 (3.5)	45 (2.7)	1 (1.6)	3 (10.3)	NS ^a
Osztódási arány (%)	2194 (64.8)	459 (64.3)	628 (62.4)	1061 (67.3)	30 (48.4)	16 (55.2)	0.0038 ^a

NS=nem szignifikáns

PN=pronucleus (előmag)

^aPearson χ^2 próba

Az osztódási arányt tekintve (6. táblázat) szintén szignifikáns különbséget találtunk a csoportok között. Hasonlóan a normál megtermékenyülési arányhoz, itt is a fragmentált sarkitestet tartalmazó petesejtek (III. csoport) osztódási aránya bizonyult a legmagasabbnak, míg a szokottnál nagyobb méretű sarkitest (IV. csoport) eredményezte a legalacsonyabb osztódási arányt.

A zygoták életképességét jelző nucleolus eloszlás (7. táblázat), valamint a kiterjedt külső cytoplasmagyűrű jelenléte (8. táblázat) nem mutatott eltérést a különböző sarkitest morfológiájú petesejt csoportokban.

7. táblázat: Normál nucleolus eloszlás előfordulása a különböző sarkitest morfológiájú csoportokban (a petesejtek sarkitest típus szerinti csoportosítását a 5. táblázat tartalmazza)

Sarkitest típusa	Σ	I	II	III	IV	V	<i>P</i> -érték
Petesejtek száma ^a	2205	455	637	1065	31	17	—
Normál mageloszlás (%)	1087 (49.3)	234 (51.4)	325 (51.0)	501 (47.0)	21 (67.7)	6 (35.3)	NS ^b

NS=nem szignifikáns

^aCsak 2205 petesejt adatai alapján (49 petesejtnél a mageloszlás nem volt megítélhető)

^bPearson χ^2 próba

8. táblázat: Kiterjedt külső cytoplasmagyűrű előfordulása a különböző sarkitest morfológiájú csoportokban (a petesejtek sarkitest típus szerinti csoportosítását a 5. táblázat tartalmazza)

Sarkitest típusa	Σ	I	II	III	IV	V	<i>P</i> -érték
Petesejtek száma	2254	468	650	1088	31	17	—
Külső gyűrű (%)	1797 (79.7)	366 (78.2)	519 (79.8)	879 (80.8)	23 (74.2)	10 (58.8)	NS ^a

NS=nem szignifikáns

^aPearson χ^2 próba

A sarkitest morfológiai jellemzői nem befolyásolták a petesejtekből létrejött praeembryók átlagos sejtszámát, morfológiai pontértékét, az A és B minőségi

kategóriába tartozó, valamint kiváló minőségű praeembryók gyakoriságát sem a megtermékenyítést követő 2. napon (9. táblázat), sem pedig a 3. napon (10. táblázat).

9. táblázat: Praeembryók sejtszáma és minősége a különböző sarkitest morphológiájú csoportokban a megtermékenyítést követő 2. napon (a petesejtek sarkitest típus szerinti csoportosítását a 5. táblázat tartalmazza)

Sarkitest típusa	Σ	I	II	III	IV	V	P-érték
Praeembryók száma	2194	459	628	1061	30	16	—
A praeembryók sejtszáma ^a	4.1 ±1.3	4.0 ±1.4	4.0 ±1.2	4.1 ±1.4	4.3 ±1.7	4.4 ±1.4	NS ^b
Fragmentáció mennyisége % ^a	17.1 ±13.1	17.9 ±13.9	18.2 ±13.8	16.0 ±12.2	20.5 ±12.1	19.1 ±12.8	0.0046 b
Morphologiai pontérték ^a	2.3 ±0.6	2,3 ±0.6	2,3 ±0.6	2,3 ±0.6	2,1 ±0.4	2.3 ±0.6	NS ^b
A és B minőségű praeembryók száma (%)	744 (33.9)	156 (34.0)	215 (34.2)	365 (34.4)	5 (16.7)	3 (18.8)	NS ^c
Kiváló minőségű praeembryók száma (%)	589 (26.8)	117 (25.5)	171 (27.2)	294 (27.7)	4 (13.3)	3 (18.8)	NS ^c
Többmagvú blastomerák előfordulása (%)	185 (8.4)	38 (8.3)	55 (8.8)	81 (7.6)	8 (26.7)	3 (18.8)	0.0029 c

NS=nem szignifikáns

^aA feltüntetett értékek átlagok (±szórás)

^bKruskal-Wallis próba

^cPearson χ^2 próba

A praeembryókban megfigyelhető sejtmagmentes fragmentumok mennyisége azonban mind a 2., mind pedig a 3. napon szignifikáns különbséget mutatott a csoportok között. A 2. napon megfigyelt fragmentáció mennyisége a III. csoportban (fragmentált vagy degenerált sarkitest) bizonyult a legkisebbnek (16.0%), ami szignifikánsan eltér mind az I. csoportban (17.9%; $P=0.008$), mind a II. csoportban (18.2%; $P<0.001$), mind pedig a IV. csoportban (20.5%; $P=0.048$) megfigyelt fragmentáció átlagos mennyiségétől. A megtermékenyítést követő 3. napon szintén a III. csoportban figyeltük meg a

legkevesebb átlagos fragmentációt (19.2%), az egyes csoportok közötti különbségek azonban csökkentek, így már csak a II. és III. csoport között tapasztaltunk szignifikáns eltérést ($P=0.028$).

10. táblázat: Praeembryók sejtszáma és minősége a különböző sarkitest morphológiájú csoportokban a megtermékenyítést követő 3. napon (a petesejtek sarkitest típus szerinti csoportosítását a 5. táblázat tartalmazza)

Sarkitest típusa	Σ	I	II	III	IV	V	P -érték
Praeembryók száma	1791	362	502	889	25	13	—
A praeembryók sejtszáma ^a	6.5 ± 2.0	6.5 ± 2.1	6.5 ± 1.9	6.6 ± 1.9	6.4 ± 2.6	6.3 ± 2.2	NS ^b
Fragmentáció mennyisége % ^a	19.8 ± 14.8	19.6 ± 15.4	20.9 ± 14.7	19.2 ± 14.6	20.4 ± 12.1	20.8 ± 15.0	0.0454 ^b
Morphologiai pontérték ^a	2.16 ± 0.56	2.18 ± 0.59	2.15 ± 0.56	2.15 ± 0.56	2.16 ± 0.47	2.23 ± 0.44	NS ^b
A és B minőségű praeembryók száma (%)	426 (23.8)	93 (25.7)	120 (23.9)	205 (23.1)	5 (20.0)	3 (23.1)	NS ^c
Kiváló minőségű praeembryók száma (%)	258 (14.4)	50 (13.8)	77 (15.3)	126 (14.2)	3 (12.0)	2 (15.4)	NS ^c

NS=nem szignifikáns

^a A feltüntetett értékek átlagok (\pm szórás)

^b Kruskal-Wallis próba

^c Pearson χ^2 próba

A többmagvú blastomerákat tartalmazó praeembryók gyakoriságában szintén szignifikáns eltéréseket találtunk a csoportok között (9. táblázat). A szokásosnál nagyobb sarkitestet tartalmazó petesejtekből fejlődő praeembryóknál figyeltük meg a leggyakrabban ezt az elváltozást (26.7%), amely szignifikánsan magasabb, mint az I. csoportban (8.3%; $P<0.001$), a II. csoportban (8.8%; $P=0.001$), valamint a III. csoportban (7.6%; $P<0.001$) megfigyelt előfordulási gyakoriság. Bár a többmagvú blastomerákat tartalmazó praeembryók előfordulási gyakorisága az éretlen sarkitestet tartalmazó (5.) csoportban is magasabb (18.8%), mint az I., II. vagy III. csoportban

megfigyelt érték, feltehetően az alacsony esetszám miatt ebben az esetben nem sikerült szignifikáns különbséget kimutatni.

4.2.2. A perivitellináris tér vizsgálatának eredményei

A petesejtben megfigyelhető perivitellináris tér méretének vizsgálatát 2448 érett (MII) petesejten végeztük el a 3.6.3 pontban (lásd még 13. ábra) leírtak alapján. A különböző méretű perivitellináris térrel rendelkező petesejtek megoszlását a 11. táblázat tartalmazza. A petesejtek közel 60%-ában figyeltünk meg normál, vagy enyhén megnagyobbodott perivitellináris teret, míg a petesejtek több mint 40%-a a szokásosnál jelentősen nagyobb perivitellináris térrel rendelkezett.

Az ICSI kezelésben részesített 2448 érett petesejtből 1660 (67.8%) termékenyült meg normálisan, amelyek közül 1612 (65.8%, az injektált petesejtekre vonatkoztatva) osztódott a megtermékenyítést követő 2. napon végzett praeembryo bírálattig.

11. táblázat: Petesejtek megoszlása a perivitellináris tér mérete alapján

	Perivitellináris tér mérete	N	%
I	Normál	648	26.5
II	Enyhén megnagyobbodott	786	32.1
III	Jelentősen megnagyobbodott	1014	41.4
	Összesen	2448	100

A különböző méretű perivitellináris térrel rendelkező petesejtek megtermékenyülési és osztódási arányai a 12. táblázatban láthatók. Sem a normál megtermékenyülés (2PN), sem pedig a kóros megtermékenyülés (1PN, 3PN) gyakorisága nem tér el egymástól az egyes csoportok között. Az ICSI kezelést követően degenerálódott petesejtek aránya növekvő tendenciát mutat a perivitellináris tér méretének növekedésével, de a csoportok közötti különbség nem szignifikáns. Az injektált petesejtek számára vonatkoztatott osztódási arány is hasonlóan bizonyult a különböző méretű perivitellináris térrel rendelkező petesejtek között.

A zygoták életképességét jelző nucleolus eloszlás (13. táblázat), valamint a kiterjedt külső cytoplasmagyűrű jelenléte (14. táblázat) nem mutatott eltérést a különböző méretű perivitellináris térrel rendelkező petesejt csoportokban.

12. táblázat: Megtermékenyülési és osztódási arány a perivitellináris tér méretének függvényében (a petesejtek perivitellináris terének mérete szerinti csoportosítását a 11. táblázat tartalmazza)

Perivitellináris tér mérete	Σ	I	II	III	<i>P</i> -érték
Petesejtek száma	2448	648	786	1014	—
Megtermékenyülés					
0PN (%)	479 (19.6)	143 (22.1)	140 (17.8)	196 (19.3)	NS ^a
1PN (%)	117 (4.8)	24 (3.7)	36 (4.6)	57 (5.6)	NS ^a
2PN (%)	1660 (67.8)	440 (67.9)	550 (70.0)	670 (66.1)	NS ^a
3PN (%)	98 (4.0)	22 (3.4)	35 (4.5)	41 (4.0)	NS ^a
Degenerált (%)	94 (3.8)	19 (2.9)	25 (3.2)	50 (4.9)	NS ^a
Osztódási arány (%)	1612 (65.8)	427 (65.9)	538 (68.4)	647 (63.8)	NS ^a

NS=nem szignifikáns

PN=pronucleus (előmag)

^aPearson χ^2 próba

13. táblázat: Normál nucleolus eloszlás előfordulása a különböző PVS (perivitellináris tér) csoportokban (a petesejtek perivitellináris terének mérete szerinti csoportosítását a 11. táblázat tartalmazza)

PVS	Σ	I	II	III	<i>P</i> -érték
Petesejtek száma ^a	1575	421	523	631	—
Normál mageloszlás (%)	813 (51.6)	216 (51.3)	276 (52.8)	321 (50.9)	NS ^b

NS=nem szignifikáns

^aCsak 1575 petesejt adatai alapján (37 petesejtnél a mageloszlás nem volt megítélhető)

^bPearson χ^2 próba

14. táblázat: Kiterjedt külső cytoplasmagyűrű előfordulása a különböző PVS (perivitellinális tér) csoportokban (a petesejtek perivitellinális terének mérete szerinti csoportosítását a 11. táblázat tartalmazza)

PVS	Σ	I	II	III	<i>P</i> -érték
Petesejtek száma	1612	427	538	647	—
Külső gyűrű (%)	1277 (79.2)	324 (75.9)	428 (79.6)	525 (81.1)	NS ^b

NS=nem szignifikáns

^aPearson χ^2 próba

A különböző PVS csoportba tartozó praeembryók megtermékenyítés utáni 2. napon megfigyelt sejtszámát és minőségét a 15. táblázat, míg a 3. napon végzett megfigyelések eredményét a 16. táblázat tartalmazza.

A leggyorsabb fejlődést a szűk perivitellinális térrel rendelkező petesejtekből létrejött praeembryók (I. csoport) mutatták. Ezen praeembryók átlagos blastomeraszáma a megtermékenyítést követő 2. napon (4.3 ± 1.5) szignifikánsan magasabb volt, mint a II. csoportban (4.0, $P=0.008$), és a III. csoportban (3.8, $P<0.001$). A II. és III. csoport között is szignifikánsnak ($P=0.007$) bizonyult a különbség. Hasonló tendencia volt megfigyelhető a megtermékenyítést követő 3. napon is a különböző PVS csoportokba tartozó praeembryók sejtszámát illetően, bár a statisztikai próbák a 2. napi adatoknál alacsonyabb szignifikancia szintet eredményeztek.

A sejtmagmentes fragmentáció átlagos mennyisége a PVS csoportokban a megtermékenyítést követő 2. napon szintén jelentős eltérést mutatott. Az I. csoportba tartozó praeembryókban figyeltük meg a legtöbb fragmentumot (20.2%), amely szignifikánsan magasabb volt mind a II. csoportban (18.1%, $P=0.022$), mind pedig a III. csoportban megfigyelt (15.5%, $P<0.001$) fragmentáció mennyiségénél. Továbbá a II. és III. csoport között is szignifikánsnak bizonyult ($P<0.001$) a fragmentáció mennyiségében megfigyelt különbség. A megtermékenyítést követő 3. napon a 2. napihoz hasonló különbségek mutatkoztak a fragmentáció mennyiségében a különböző PVS csoportok között.

15. táblázat: Sejtszám és praeembryo minőség a különböző PVS csoportokban a 2. napon (a petesejtek perivitellináris terének mérete szerinti csoportosítását a 11. táblázat tartalmazza)

Perivitellináris tér mérete	Σ	I	II	III	<i>P</i> -érték
Petesejtek száma	1612	427	538	647	—
A praeembryók sejtszáma ^a	4.0 ±1.4	4.3 ±1.5	4.0 ±1.3	3.8 ±1.3	<0.0001 ^b
Fragmentáció mennyisége % ^a	17.6 ±13.6	20.2 ±13.9	18.1 ±14.2	15.5 ±12.5	<0.0001 ^b
Morphologiai pontérték ^a	2.3 ±0.6	2.2 ±0.5	2.3 ±0.6	2.4 ±0.6	0.0028 ^b
A és B minőségű praeembryók száma (%)	520 (32.3)	114 (26.7)	170 (31.6)	236 (36.5)	0.0033 ^c
Kiváló minőségű praeembryók száma (%)	384 (23.8)	86 (20.1)	129 (24.0)	169 (26.1)	NS ^c
Többmagvú blastomerák előfordulása (%)	124 (7.7)	42 (9.8)	49 (9.1)	33 (5.1)	0.0055 ^c

NS=nem szignifikáns

^aA feltüntetett értékek átlagok (±szórás)

^bKruskal-Wallis próba

^cPearson χ^2 próba

A fragmentáció mennyiségét és a blastomerák méretét, valamint alakját is magában foglaló morphologiai pontérték szintén szignifikáns eltérést mutatott a csoportok között. A jobb praeembryo minőséget jelző legmagasabb morphologiai pontértéket a III. csoportban (a szokásosnál lényegesen nagyobb PVS) figyeltük meg (2.4±0.6), amely szignifikánsan különbözött az I. csoportban (2.2±0.6, *P*=0.001), valamint a II. csoportban megfigyelt értéktől (2.3±0.5, *P*=0.013). Hasonló tendencia volt megfigyelhető a megtermékenyítést követő 3. napon is a különböző PVS csoportba tartozó praeembryók morphologiai pontértékét illetően, bár a statisztikai próbák a 2. napi adatoknál alacsonyabb szignifikancia szintet eredményeztek.

Az A és B minőségű praeembryók előfordulási gyakorisága a 2. napon szintén eltért a csoportok között. A legnagyobb arányban a III. csoportban (36.5%), míg a legkisebb arányban az I. csoportban (26.7%) figyeltünk meg jó minőségű praeembryókat ($P < 0.001$), míg a II. csoportban a jó minőségű praeembryók gyakorisága (31.6%) nem tért el jelentősen sem az I., sem a III. csoportban megfigyelt értékektől. A megtermékenyítést követő 3. npra az A és B minőségű praeembryók gyakorisága közti különbségek csökkentek, így ebben az esetben már nem mutatható ki szignifikáns eltérés a csoportok között.

16. táblázat: Praeembryók sejtszáma és minősége a különböző PVS csoportokban a 3. napon (a petesejtek perivitellinális terének mérete szerinti csoportosítását a 11. táblázat tartalmazza)

Perivitellinális tér mérete	Σ	I	II	III	<i>P</i> -érték
Petesejtek száma	1293	352	443	498	—
A praeembryók sejtszáma ^a	6.4 ±2.0	6.8 ±2.2	6.5 ±1.9	6.2 ±2.0	0.0001 ^b
Fragmentáció mennyisége % ^a	20.3 ±15.7	23.3 ±16.4	20.8 ±16.4	17.8 ±14.1	<0.0001 ^b
Morphologiai pontérték ^a	2.13 ±0.57	2.09 ±0.59	2.09 ±0.56	2.18 ±0.58	0.0252 ^b
A és B minőségű praeembryók száma (%)	286 (22.1)	74 (21.0)	87 (19.6)	125 (25.1)	NS ^c
Kiváló minőségű praeembryók száma (%)	152 (11.8)	41 (11.7)	53 (12.0)	58 (11.6)	NS ^c

NS=nem szignifikáns

^aA feltüntetett értékek átlagok (±szórás)

^bKruskal-Wallis próba

^cPearson χ^2 próba

A kiváló minőségű (gyorsan osztódó, A vagy B minőségi kategóriába sorolt) praeembryók gyakorisága sem a 2. sem a 3. napon nem tért el lényegesen a különböző PVS csoportok között.

A többmagvú blastomerát tartalmazó praeembriókat (15. táblázat) a szokásosnál jelentősen nagyobb perivitellináris térrel rendelkező petesejtek közül fejlődött praeembriók csoportjában figyeltünk meg a legritkábban (5.1%). Ennél lényegesen gyakrabban figyeltünk meg többmagvú blastomerát mind az I. csoportban (9.8%, $P=0.003$), mind pedig a II. csoportban (9.1%, $P=0.007$).

4.2.3. A cytoplasma szemcsézettség vizsgálatának eredményei

A cytoplasma szemcsézettségének vizsgálatát 2448 érett (MII) petesejtnél végeztük el a 3.6.4. pontban (lásd még 14. ábra) leírtak alapján. A petesejtek megoszlását a különböző cytoplasma szemcsézettségű csoportok szerint a 17. táblázat tartalmazza. A petesejtek 5%-a nem tartalmazott semmilyen szemcsézettséget, vagy csak minimális szemcsézettséget mutatott. További 45% több kisebb méretű szemcsét tartalmazott, míg a petesejtek felében nagyméretű vagy fénytörő szemcsét, esetleg kráterszerű szemcsézettséget figyeltünk meg.

Az ICSI kezelésben részesített 2448 érett petesejtből 1660 (67.8%) termékenyült meg normálisan, amelyek közül 1612 (65.8%, az injektált petesejtekre vonatkoztatva) osztódott a megtermékenyítést követő 2. napon végzett praeembryo bírálatig.

17. táblázat: Cytoplasma szemcsézettség típusok megoszlása az injektált MII petesejtek között

	Szemcsézettség típusa	N	%
I	Szemcsézettség nem látható, vagy legfeljebb 1-2 kisméretű (<5 µm) szemcse	125	5.1
II	Több kisméretű (<5 µm) szemcse	1108	45.3
III	5 µm-nél nagyobb szemcse	584	23.9
IV	fénytörő szemcse	263	10.7
V	kráterszerű szemcsézettség a cytoplasma közepén	368	15.0
	Összesen	2448	100

A különböző cytoplasma szemcsézettségű petesejtek megtermékenyülési és osztódási arányait a 18. táblázat tartalmazza. Sem a normál megtermékenyülés (2PN), sem a

kóros megtermékenyülés (1PN, 3PN) gyakorisága, sem pedig a degenerált petesejtek aránya nem tér el jelentősen a különböző szemcsézetségű csoportok között.

Az injektált petesejtek számára vonatkoztatott osztódási arány azonban szignifikáns különbséget mutatott az egyes csoportok között. A legmagasabb osztódási arányt a minimális szemcsézetséget tartalmazó petesejtek esetében (I. csoport) figyeltük meg (72.8%), ami jelentősen meghaladta a fénytörő szemcsét tartalmazó petesejtek osztódási arányát (60.8%, $P=0.021$). A nagyobb méretű szemcsét tartalmazó petesejtek csoportjában (III. csoport) szintén az átlagot meghaladó osztódási arányt figyeltünk meg (69.5%), amely magasabb, mint a II. csoportban (64.6%, $P=0.043$), valamint a IV. csoportban (60.8%, $P=0.013$) megfigyelt osztódási arány.

18. táblázat: Megtermékenyülési és osztódási arány a különböző szemcsézetségű petesejt csoportokban (a petesejtek cytoplasma szemcsézetség szerinti csoportosítását a 17. táblázat tartalmazza)

Szemcsézetség típusa	Σ	I	II	III	IV	V	P -érték
Petesejtek száma	2448	125	1108	584	263	368	—
Megtermékenyülés							
0PN (%)	479 (19.6)	26 (20.8)	223 (20.1)	94 (16.1)	62 (23.6)	74 (20.1)	NS ^a
1PN (%)	117 (4.8)	1 (0.8)	54 (4.9)	33 (5.7)	13 (4.9)	16 (4.3)	NS ^a
2PN (%)	1660 (67.8)	92 (73.6)	733 (66.2)	419 (71.7)	168 (63.9)	248 (67.4)	NS ^a
3PN (%)	98 (4.0)	3 (2.4)	45 (4.1)	25 (4.3)	9 (3.4)	16 (4.3)	NS ^a
Degenerált (%)	94 (3.8)	3 (2.4)	53 (4.8)	13 (2.2)	11 (4.2)	14 (3.8)	NS ^a
Osztódási arány (%)	1612 (65.8)	91 (72.8)	716 (64.6)	406 (69.5)	160 (60.8)	239 (64.9)	0.0404 ^a

NS=nem szignifikáns

PN=pronucleus (előmag)

^aPearson χ^2 próba

A zygoták életképességét jelző nucleolus eloszlás (19. táblázat), valamint a kiterjedt külső cytoplasmagyűrű jelenléte (20. táblázat) nem mutatott eltérést a különböző szemcsézettségű cytoplasmával rendelkező petesejt csoportokban.

19. táblázat: Normál nucleolus eloszlás előfordulása a különböző szemcsézettségű csoportokban (a petesejtek cytoplasma szemcsézettség szerinti csoportosítását a 17. táblázat tartalmazza)

Szemcsézettség típusa	Σ	I	II	III	IV	V	<i>P</i> -érték
Petesejtek száma ^a	1619	86	713	413	164	243	—
Normál nucleolus eloszlás (%)	842 (52.0)	39 (45.3)	365 (51.2)	222 (53.8)	92 (56.1)	124 (51.0)	NS ^b

NS=nem szignifikáns

^aCsak 1619 petesejt adatai alapján (41 petesejtnél a mageloszlás nem volt megítélhető)

^bPearson χ^2 próba

20. táblázat: Kiterjedt mértékű külső cytoplasmagyűrű előfordulása a különböző szemcsézettségű csoportokban (a petesejtek cytoplasma szemcsézettség szerinti csoportosítását a 17. táblázat tartalmazza)

Szemcsézettség típusa	Σ	I	II	III	IV	V	<i>P</i> -érték
Petesejtek száma	1660	92	733	419	168	248	—
Külső gyűrű	1312 (79.0)	65 (70.7)	577 (78.7)	330 (78.8)	134 (79.8)	206 (83.1)	NS ^a

NS=nem szignifikáns

^aPearson χ^2 próba

A különböző cytoplasma szemcsézettségű csoportokba tartozó praeembryók megtermékenyítés utáni 2. napon megfigyelt sejtszámát és minőségét a 21. táblázat, míg a 3. napon végzett megfigyelések eredményeit a 22. táblázat tartalmazza.

A különböző szemcsézettségű csoportok között a megtermékenyítést követő 2. napon az átlagos sejtszám, valamint morfológiai pontérték tekintetében nem találtunk különbségeket.

A minimális szemcsézettséget tartalmazó petesejtekből fejlődő praeembryók csoportjában figyeltük meg a legkevesebb fragmentációt (15.8%), míg a fénytörő szemcsét tartalmazó csoportban az átlagosnál nagyobb mennyiségű fragmentációt (20.3%) tartalmaztak a praeembryók, azonban a csoportok közötti eltérések nem szignifikánsak.

Az A és B minőségű praeembryók gyakorisága, valamint a kiváló minőségű praeembryók gyakorisága szintén az I. csoportban volt a legnagyobb (39.6%, valamint 28.6%), míg a IV. csoportban a legkisebb (27.5%, valamint 20%), azonban szignifikáns eltérést a csoportok között ebben az esetben sem tudunk kimutatni.

21. táblázat: Sejtszám és praeembryo minőség a különböző cytoplasma szemcsézettű csoportokban a megtermékenyítést követő 2. napon (a petesejtek cytoplasma szemcsézettű szerinti csoportosítását a 17. táblázat tartalmazza)

Szemcsézettű típusa	Σ	I	II	III	IV	V	P-érték
Petesejtek száma	1612	91	716	406	160	239	—
A praeembryók sejtszáma ^a	4.0 ±1.4	3.8 ±1.2	4.1 ±1.3	4.0 ±1.5	3.9 ±1.3	4.1 ±1.4	NS ^b
Fragmentáció mennyisége % ^a	17.6 ±13.6	15.8 ±11.4	17.2 ±13.4	17.6 ±13.8	20.3 ±14.2	17.7 ±14.0	NS ^b
Morphologiai pontérték ^a	2.3 ±0.6	2.4 ±0.5	2.3 ±0.6	2.3 ±0.6	2.3 ±0.5	2.3 ±0.6	NS ^b
A és B minőségű praeembryók gyakorisága (%)	520 (32.3)	36 (39.6)	226 (31.6)	137 (33.7)	44 (27.5)	77 (32.2)	NS ^c
Kiváló minőségű praeembryók gyakorisága (%)	384 (23.8)	26 (28.6)	181 (25.3)	89 (21.9)	32 (20.0)	56 (23.4)	NS ^c
Többmagvú blastomerák előfordulása (%)	124 (7.7)	8 (8.8)	53 (7.4)	33 (8.1)	7 (4.4)	23 (9.6)	NS ^c

NS=nem szignifikáns

^a A feltüntetett értékek átlagok (±szórás)

^b Kruskal-Wallis próba

^c Pearson χ^2 próba

A többmagvú blastomerákat tartalmazó praeembryók előfordulási gyakorisága (21. táblázat) a fénytörő szemcsét tartalmazó petesejtekből kifejlődött praeembryókban volt a legkisebb (4.4%), míg a krátterszerű szemcsézettséget mutató petesejtek csoportjában a legnagyobb (9.6%), de a csoportok közötti eltérés nem bizonyult szignifikánsnak.

22. táblázat: Praeembryók sejtszáma és minősége a különböző szemcsézettségű csoportokban a 3. napon (a petesejtek cytoplasma szemcsézettség szerinti csoportosítását a 17. táblázat tartalmazza)

Szemcsézettség típusa	Σ	I	II	III	IV	V	P-érték
Petesejtek száma	1293	72	589	321	121	190	—
A praeembryók sejtszáma ^a	6.4 ±2.0	6.5 ±1.9	6.5 ±2.0	6.5 ±2.1	6.3 ±1.9	6.5 ±2.1	NS ^b
Fragmentáció mennyisége % ^a	20.3 ±15.7	19.7 ±14.1	19.0 ±15.1	20.2 ±16.4	25.1 ±17.7	21.9 ±14.9	0.0007 ^b
Morphologiai pontérték ^a	2.1 ±0.6	2.1 ±0.5	2.1 ±0.6	2.1 ±0.6	2.1 ±0.6	2.1 ±0.5	NS ^b
A és B minőségű praeembryók gyakorisága (%)	286 (22.1)	14 (19.4)	140 (23.8)	73 (22.7)	25 (20.7)	34 (17.9)	NS ^c
Kiváló minőségű praeembryók gyakorisága (%)	152 (11.8)	9 (12.7)	69 (11.7)	43 (13.4)	15 (12.4)	16 (8.4)	NS ^c

NS=nem szignifikáns

^aA feltüntetett értékek átlagok (±szórás)

^bKruskal-Wallis próba

^cPearson χ^2 próba

A megtermékenyítést követő 3. napon végzett morphologiai bírálat során a blastomerák számát, az átlagos morphologiai pontértéket, az A és B minőségű praeembryók gyakoriságát, valamint a kiváló minőségű praeembryók gyakoriságát tekintve a 2. napi vizsgálatokhoz hasonló eredményeket kaptunk (22. táblázat). A fragmentáció mennyiségének tekintetében azonban, szemben a 2. napi vizsgálat eredményeivel, a 3. napon szignifikáns különbségeket találtunk a különböző szemcsézettségű csoportok között. A legnagyobb mennyiségű fragmentációt a 3. napon is a fénytörő szemcsét

tartalmazó csoportban figyeltük meg (25.1%) amely szignifikánsan magasabb, mint a II. csoportban (19%, $P<0.001$), valamint a III. csoportban (20.2%, $P=0.006$) talált érték. A kráterszerű szemcsézettséget mutató petesejtekből létrejött praeembryók átlagosan 20.3% fragmentációt tartalmaztak, amely szintén több, mint a II. csoportban (19%, $P<0.002$), valamint a III. csoportban (20.2%, $P=0.026$) megfigyelt érték. Az I. csoportban megfigyelt fragmentáció mennyisége nem tér el szignifikánsan a többi csoportban megfigyelt értéktől.

4.2.4. A cytoplasmában megfigyelhető vacuolumok vizsgálatának eredményei

A cytoplasmában megfigyelhető vacuolumok vizsgálatát 3387 érett (MII) petesejtben figyeltük meg a 3.6.5. pontban (lásd még 15. ábra) leírtak alapján.

A különböző típusú vacuolumok előfordulását a 23. táblázat mutatja. A petesejtek 90%-a semmilyen vacuolumot nem tartalmazott a spermium mikroinjektálás időpontjában. A petesejtek további 5.4%-a csak 1-2 kisebb vacuolumot tartalmazott, és a jelentősebb mennyiségű vacuolumot, vagy zsákocskaszerű képletet tartalmazó petesejtek gyakorisága sem haladta meg az 5%-ot.

Az ICSI kezelés eredményeként 2254 (66.5%) normálisan megtermékenyült, 2 előmagot tartalmazó zygota jött létre, amelyek közül 2194 (64.8%, az injektált MII petesejtekre vonatkoztatva) osztódott a megtermékenyítést követő 2. napon végzett praeembryo bírálatig.

23. táblázat: A különböző típusú vacuolumokat tartalmazó petesejtek megoszlása az injektált petesejtek csoportjában

	Vacuolum típusa	N	%
I	Vacuolum nem látható	3048	90.0
II	1-2 kisebb méretű vacuolum	182	5.4
III	Nagyobb méretű, vagy 2-nél több vacuolum	73	2.2
IV	Zsákocskaszerű képződmény	84	2.5
	Összesen	3387	100

A megtermékenyülési és osztódási arányokat a különböző típusú vacuolumokat tartalmazó petesejtek esetében a 24. táblázat mutatja. A vacuolumokat nem tartalmazó petesejtek (I. csoport) megtermékenyülési aránya (67.6%) lényegesen magasabb, mint a jelentős mennyiségű vacuolumot tartalmazó III. csoportban (45.1%, $P<0.001$), vagy a zsákocskaszerű vacuolumot tartalmazó IV. csoportban (51.1%, $P=0.002$) megfigyelt megtermékenyülési arány. A néhány kisebb vacuolumot tartalmazó II. csoportban megfigyelt megtermékenyülési arány (66.5%) szintén jelentősen meghaladja a III. csoport (45.1%, $P<0.002$), valamint IV. csoport (51.1%, $P=0.017$) megtermékenyülési arányát.

Ennek megfelelően a meg nem termékenyült petesejtek aránya is hasonlóan alakul a csoportok között, azzal a különbséggel, hogy itt csak a I. és IV. csoport közti különbség szignifikáns (20.6% vs. 33.3%; $P=0.005$).

Az 1 pronucleust tartalmazó zygoták aránya a III. csoportban 2-3-szor nagyobb, mint a többi csoportban, azonban ez az eltérés nem szignifikáns. A 3 előmagot tartalmazó zygoták aránya a zsákocskaszerű vacuolumot tartalmazó petesejtek esetében volt a legmagasabb (11.9%), ami meghaladja mind az I. csoportban (3.5%, $P<0.001$), mind pedig a II. csoportban megfigyelt (3.8%, $P<0.012$) 3PN arányt. Ugyanakkor a jelentős mennyiségű vacuolumot tartalmazó (III.) csoportban is magasabb a 3PN arány (8.2%), mint a vacuolumot nem tartalmazó (I.) csoportban (3.5%, $P=0.033$). Az ICSI kezelés következtében degenerálódott petesejtek aránya nem különbözött a csoportok között.

Az osztódási arányt vizsgálva a normál megtermékenyüléshez hasonló eredményeket találtunk, tehát a vacuolumokat nem, vagy csak minimális mértékben tartalmazó petesejtek jelentősen nagyobb arányban osztódtak, mint azok a petesejtek, amelyek nagyobb mennyiségű vacuolumot, vagy zsákocskaszerű képletet tartalmaznak.

24. táblázat: Megtermékenyülési és osztódási arány a különböző típusú vacuolumokat tartalmazó petesejtekben (a petesejtek különböző típusú vacuolumok szerinti csoportosítását a 23. táblázat tartalmazza)

Vacuolum típusa	Σ	I	II	III	IV	<i>P</i> -érték
Petesejtek száma	3387	3048	182	73	84	—
Megtermékenyülés						
0PN	723 (21.3)	629 (20.6)	44 (24.2)	22 (30.1)	28 (33.3)	0.0063 ^a
1PN	172 (5.1)	154 (5.1)	7 (3.8)	8 (11.0)	3 (3.6)	NS ^a
2PN	2254 (66.5)	2057 (67.5)	121 (66.5)	33 (45.2)	43 (51.2)	<0.0001 ^a
3PN	130 (3.8)	107 (3.5)	7 (3.8)	6 (8.2)	10 (11.9)	0.0002 ^a
DEG	108 (3.2)	101 (3.3)	3 (1.6)	4 (5.5)	0 (0.0)	NS ^a
Osztódási arány	2194 (64.8)	2002 (65.7)	119 (65.4)	30 (41.1)	43 (51.2)	<0.0001 ^a

NS=nem szignifikáns

PN=pronucleus (előmag)

^aPearson χ^2 próba

A zygoták életképességét jelző normál nucleolus eloszlás (25. táblázat), valamint a kiterjedt külső cytoplasmagyűrű előfordulásának gyakorisága (26. táblázat) nem mutatott eltérést a különböző típusú vacuolumokat tartalmazó petesejtek csoportjában.

25. táblázat: Normál nucleolus eloszlás gyakorisága a különböző mértékben vacuolumos petesejtekből létrejött zygotákban (a petesejtek különböző típusú vacuolumok szerinti csoportosítását a 23. táblázat tartalmazza)

Vacuolum típusa	Σ	I	II	III	IV	<i>P</i> -érték
Petesejtek száma	2205	2013	118	32	42	—
Normál nucleolus eloszlás (%)	1087 (49.3)	993 (49.3)	54 (45.8)	17 (53.1)	23 (54.8)	NS ^a

NS=nem szignifikáns

^aCsak 2205 petesejt adatai alapján (49 petesejtnél a mageloszlás nem volt megítélhető)

^bPearson χ^2 próba

26. táblázat: Kiterjedt külső cytoplasmagyűrű előfordulása a különböző mértékben vacuolumos petesejtekből létrejött zygotákban (a petesejtek különböző típusú vacuolumok szerinti csoportosítását a 23. táblázat tartalmazza)

Vacuolum típusa	Σ	I	II	III	IV	<i>P</i> -érték
Petesejtek száma	2254	2057	121	33	43	—
Külső gyűrű előfordulása (%)	1797 (79.7)	1639 (79.7)	105 (86.8)	23 (69.7)	30 (69.8)	NS ^a

NS=nem szignifikáns

^aPearson χ^2 próba

A különböző típusú vacuolumokat tartalmazó petesejtekből fejlődő praeembryók megtermékenyítés utáni 2. napon megfigyelt sejtszámát és minőségét a 27. táblázat, míg a 3. napon végzett megfigyelések eredményét a 28. táblázat tartalmazza.

Az osztódó praeembryók sejtszámát vizsgálva nem találtunk elétrést a különböző mértékben vacuolumos csoportok között sem a 2., sem pedig a 3. napon. Ugyanakkor a fragmentáció mennyiségében, a praeembryók morfológiai pontértékében, valamint az A és B minőségű praeembryók gyakoriságában szignifikáns különbséget találtunk az egyes csoportok között.

A sejtmagmentes fragmentumok átlagos mennyisége a megtermékenyítést követő 2. napon 17-18% között volt a I., II. és III. csoportban, míg a zsákocskaszerű vacuolumot tartalmazó petesejtekből létrejött praeembryók esetében (IV. csoport) ennél lényegesen

kevesebb, mindössze 12.1% fragmentációt figyeltünk meg. Az eltérés az I. és IV. csoport között ($P=0.011$), valamint a II. és IV. csoport között ($P=0.014$) volt szignifikáns. A megtermékenyítést követő 3. napon a 2. napihoz hasonló eltérés volt a csoportok között a fragmentáció mennyiségében, ekkor azonban már a III. és IV. csoport között is szignifikánsnak bizonyult a különbség ($P=0.005$).

A morfológiai pontérték szintén a zsákocskaszerű vacuolumot tartalmazó petesejtekből létrejött praeembryók csoportjában volt a legmagasabb (2.6 ± 0.6) a megtermékenyítést követő 2. napon, amely szignifikánsan eltért a vacuolumot nem tartalmazó (I.) csoport (2.3 ± 0.6 , $P=0.006$), valamint a jelentős mennyiségű vacuolumot tartalmazó (III.) csoport (2.2 ± 0.4 , $P=0.005$) eredményeitől. Ezek a különbségek a megtermékenyítést követő 3. napon is megfigyelhetőek, azonban ekkor már a II. és IV. csoport között is szignifikáns ($P<0.001$) az eltérés.

Az A és B minőségű praeembryók gyakorisága is a IV. csoportban (zsákocskaszerű képződményt tartalmazó petesejtek) volt a legmagasabb mind a megtermékenyítést követő 2. napon (55.8%), mind pedig a 3. napon (60%). Ebben (a IV. csoportban) a jó minőségű praeembryók gyakorisága szignifikánsan magasabb volt ($P\leq 0.01$), mint amennyit a másik három csoportban megfigyeltünk akár a 2. akár a 3. napon.

A kiváló minőségű praeembryók gyakorisága a megtermékenyítést követő 2. napon nem, csak a 3. napon mutatott szignifikáns eltérést a csoportok között. Ekkor a zsákocskaszerű vacuolumot tartalmazó petesejtekből fejlődő kiváló minőségű praeembryók gyakorisága haladta meg jelentősen a vacuolumot nem tartalmazó petesejtekből fejlődött praeembryók csoportját (33.3% vs. 13.8%; $P=0.002$), míg a többi csoportot összehasonlítva szignifikáns különbséget nem találtunk.

27. táblázat: A különböző mértékben vacuolumos petesejtekből fejlődő praeembryók sejtszáma és minősége a 2. napon (a petesejtek különböző típusú vacuolumok szerinti csoportosítását a 23. táblázat tartalmazza)

Vacuolum típusa	Σ	I	II	III	IV	P-érték
Petesejtek száma	2194	2002	119	30	43	—
A praeembryók sejtszáma ^a	4.1 ±1.3	4.1 ±1.3	4.2 ±1.3	4.0 ±1.6	3.8 ±1.0	NS ^b
Fragmentáció mennyisége % ^a	17.1 ±13.1	17.2 ±13.1	17.8 ±13.5	17.2 ±11.2	12.1 ±10.5	0.0291 ^b
Morphologiai pontérték ^a	2.3 ±0.6	2.3 ±0.6	2.4 ±0.6	2.2 ±0.4	2.6 ±0.6	0.0143 ^b
A és B minőségű praeembryók gyakorisága (%)	744 (33.9)	670 (33.5)	44 (37.0)	6 (20.0)	24 (55.8)	0.0059 ^c
Kiváló minőségű praeembryók gyakorisága (%)	589 (26.8)	531 (26.5)	39 (32.8)	4 (13.3)	15 (34.9)	NS ^c
Többmagvú blastomerák előfordulása (%)	185 (8.4)	167 (8.3)	10 (8.4)	4 (13.3)	4 (9.3)	NS ^c

NS=nem szignifikáns

^aA feltüntetett értékek átlagok (±szórás)

^bKruskal-Wallis próba

^cPearson χ^2 próba

A többmagvú blastomerákat tartalmazó praeembryók gyakorisága (27. táblázat) a jelentős mennyiségű vacuolumot tartalmazó petesejtekből fejlődő praeembryók csoportjában volt a legmagasabb (13.3%) azonban feltehetően a csoportokon belüli alacsony esetszámok miatt ez az érték nem tér el szignifikánsan a többi csoportban megfigyelt alacsonyabb (8.3%-9.3%) gyakoriságtól.

28. táblázat: A különböző mértékben vacuolumos petesejtekből fejlődő praeembryók sejtszáma és minősége a 3. napon (a petesejtek különböző típusú vacuolumok szerinti csoportosítását a 23. táblázat tartalmazza)

Vacuolum típusa	Σ	I	II	III	IV	P-érték
Petesejtek száma	1791	1644	93	24	30	—
A praeembryók sejtszáma ^a	6.5 ±2.0	6.5 ±2.0	7.0 ±1.9	6.5 ±2.3	6.7 ±1.8	NS ^b
Fragmentáció mennyisége % ^a	19.8 ±14.8	19.9 ±14.8	20.7 ±15.4	20.2 ±12.9	11.5 ±8.7	0.0291 ^b
Morphologiai pontérték ^a	2.2 ±0.6	2.1 ±0.6	2.2 ±0.6	2.2 ±0.5	2.6 ±0.5	0.0143 ^b
A és B minőségű praeembryók gyakorisága (%)	426 (23.8)	380 (23.1)	22 (23.7)	6 (25.0)	18 (60.0)	<0.0001 ^c
Kiváló minőségű praeembryók gyakorisága (%)	258 (14.4)	227 (13.8)	16 (17.2)	5 (20.8)	10 (33.3)	0.0142 ^c

NS=nem szignifikáns

^aA feltüntetett értékek átlagok (±szórás)

^bKruskal-Wallis próba

^cPearson χ^2 próba

4.3. A korai praeembryo fejlődés vizsgálatának eredményei

A korai praeembryo fejlődés vizsgálatát 2001. október és 2004. február között elvégzett 490 IVF kezelés során, 2280 normálisan megtermékenyült (2 előmagot tartalmazó) zygota esetében végeztük el, amelyek közül 2216 osztódott a megtermékenyítést követő 2. napon végzett morphologiai vizsgálat idejére.

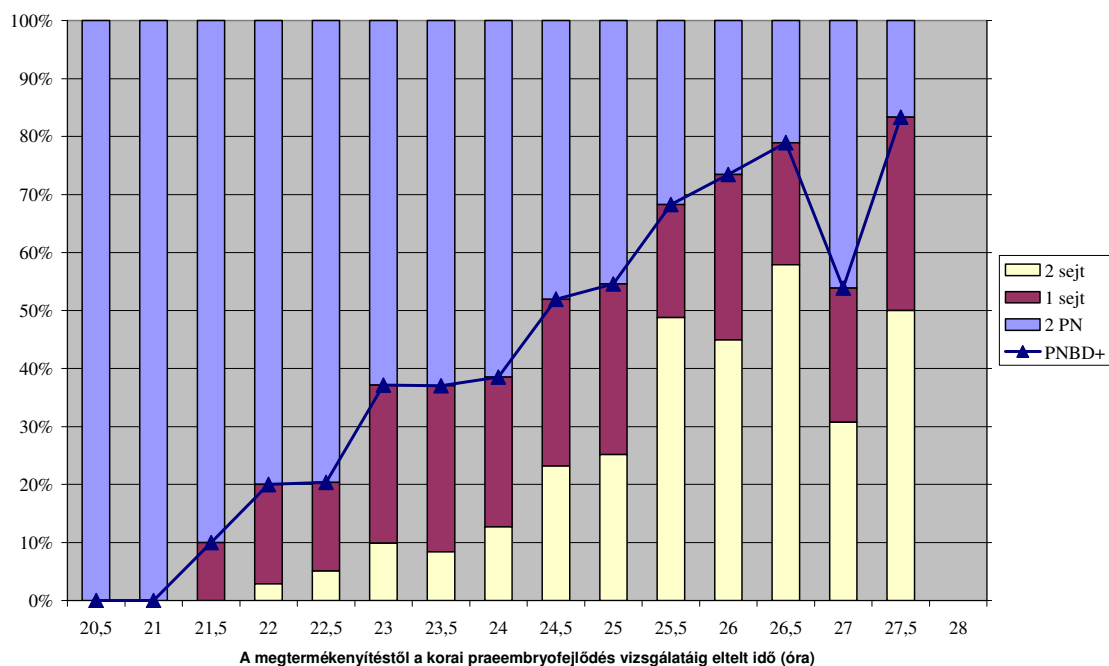
62 IVF/ICSI kezelés (291 petesejt) esetében a korai praeembryo fejlődés vizsgálata olyan időpontban lett volna esedékes, amikor az Embriológiai Laboratórium munkarendje nem tette lehetővé annak elvégzését. Így a fenti időszakban történt IVF kezeléseket közül összesen 308 beteg 428 kezelésénél végeztük el a korai praeembryo fejlődés vizsgálatát, amelynek során 1921 normálisan megtermékenyült és a későbbiekben osztódott zygota adatait dolgoztuk fel.

4.3.1. A korai praeembryo fejlődés optimális vizsgálati időpontjának meghatározása

A zygotákban megfigyelhető elömagok jelenlétét, illetve a korai osztódás bekövetkeztét a megtermékenyítést követő 20-28. órában vizsgáltuk. A megfigyelések időpontját ezen időtartamon belül nem határoztuk meg előre, így a vizsgálatok idejét elsősorban az Embriológiai Laboratórium munkarendje határozta meg. Ennek következtében a megfigyelések jelentős része (83.7%-a) a megtermékenyítés után 24 ± 2 órával történt, míg 20 és 22 óra között a vizsgálatok 9.7%-a, 26 és 28 óra között pedig a megfigyelések 6.7%-a történt. A szélső időpontokban rendelkezésünkre álló alacsony esetszám ellenére a 16. ábra egyértelműen mutatja, hogy a pronucleusok eltűnése legkorábban 21.5 órával a megtermékenyítést követően jelentkezett, míg az első osztódás legkorábban a 22. órában történt. Ezt követően a 2 pronucleust tartalmazó zygoták aránya fokozatosan csökkent, míg az első sejtosztódáson túljutott praeembryók gyakorisága növekedett a vizsgált időtartományban. A pronucleust már nem mutató, de még nem osztódott zygoták gyakorisága a megtermékenyítést követő 23. óráig emelkedett, majd a zygoták 20-30%-ában a vizsgálati idő végéig fennállt.

Amennyiben a vizsgálat idején az 1 sejtes zygotákat, valamint a már osztódott praeembryókat a 3.9. pontban leírtak szerint egy csoportba vonjuk össze (PNBD+ csoport) úgy lehetőségünk nyílik az elömagok eltűnésének optimális időszakát meghatározni.

A 16. ábraán sötétkék vonal mutatja, hogy a megtermékenyítés után 21 órával még valamennyi vizsgált zygotában látszottak az elömagok. 21.5 órával a megtermékenyítés után tapasztaltuk először a PNBD jelenségét, amely a következő egy órában nem haladta meg a 20%-os gyakoriságot. A megtermékenyítés után 23-24 órával végzett megfigyelések során a PNBD gyakorisága 35-40% között volt, majd 24.5-25 órával a megtermékenyítés után 50-55%-ra emelkedett. Ezt követően az elömagok eltűnése a zygoták több mint 70%-ban volt megfigyelhető.



16. ábra: Proculeust tartalmazó (2PN) és nem tartalmazó (1 sejtes) zygoták, valamint 2 sejtes praeembryók gyakoriságának előfordulása a vizsgálat időpontjának függvényében. Az ábrán sötétkék vonal jelöli azon zygoták gyakoriságát, ahol a pronucleus már nem látható (PNBD+ csoport). Ez a csoport magában foglalja a pronucleust már nem mutató 1 sejtes zygotákat, valamint az első sejtosztódáson túljutott praeembryókat.

Mindezek alapján a korai pronucleus eltűnés további vizsgálata során csak azon IVF/ICSI kezelések adatait használtuk fel, amelyekben a PNBD vizsgálata a megtermékenyítés után 22-25 órával történt. Így a tanulmány ezen részébe összesen 286 betegnél elvégzett 383 IVF/ICSI kezelés során normálisan megtermékenyült és osztódott 1736 praeembryo adatait használtuk fel.

4.3.2. A megtermékenyítés módja és a korai praeembryo fejlődés kapcsolata

A megtermékenyítés után 22-25 órával elvégzett PNBD vizsgálat ideje alatt 618 zygotát hagyományos IVF kezelés útján, míg 1118 zygotát ICSI kezelés eredményeként jött létre. Az ICSI kezelés útján létrejött zygoták 41.1%-a, míg az IVF kezelés útján létrejött zygoták 37.1%-a mutatott korai pronucleus eltűnést (29. táblázat). A különbség a két csoport között nem szignifikáns.

29. táblázat: A megtermékenyítés módja és az előmagok korai eltűnésének gyakorisága

Megtermékenyítés módja	Σ	IVF	ICSI	P-érték
Petesejtek száma	1736	618	1118	—
Korai PNBD zygóták száma (%)	688 (39.6)	229 (37.1)	459 (41.1)	NS ^a

NS = nem szignifikáns

^aχ² próba

4.3.3. Az előmagok korai eltűnése és a praeembryók fejlődésének kapcsolata

A megtermékenyítést követő 22-25. óra között elvégzett vizsgálatok eredményeit, a praeembryók sejtszámát és minőségét az előmagok eltűnésének korai, illetve késői bekövetkezésének függvényében a 30. táblázatban tüntettük fel.

A praeembryók sejtszáma korai PNBD csoportban jelentősen meghaladta a késői PNBD csoportban megfigyelt átlagos értéket a megtermékenyítést követő 2. és 3. napon is. Ugyanakkor a praeembryók minőségére utaló fragmentáció mennyisége, a morfológiai pontérték, valamint az A és B minőségű praeembryók gyakorisága hasonlóan bizonyult a két csoportban mindkét praeembryo vizsgálati időpontban.

A kiváló minőségű praeembryók gyakorisága szintén szignifikánsan ($P < 0.0001$) magasabb volt a korai mint a késői PNBD csoportban a megtermékenyítést követő 2. és 3. napon egyaránt.

A többmagvú blastomerák gyakorisága (30. táblázat) a korai PNBD csoportban lényegesen alacsonyabb volt, mint a késői PNBD csoportban megfigyelt gyakoriság (4.8% vs. 9.3%, $P = 0.0006$)

30. táblázat: Korai és késői PNBD praeembryók morphologiai sajátosságainak összehasonlítása a megtermékenyítést követő 2. napon

	Korai PNBD	Késői PNBD	<i>P</i> -érték
Praeembryók száma	688	1048	—
A praeembryók sejtszáma ^a	4.4 ±1.2	3.6 ±1.4	<0.0001 ^b
Fragmentáció mennyisége % ^a	16.6 ±13.1	16.9 ±13.4	NS ^b
Morphologiai pontérték ^a	2.4 ±0.6	2.3 ±0.6	NS ^b
A és B minőségű praeembryók gyakorisága (%)	255 (37.1)	348 (33.2)	NS ^c
Kiváló minőségű praeembryók gyakorisága (%)	247 (35.9)	206 (19.7)	<0.0001 ^c
Többmagvú blastomerák előfordulása (%)	33 (4.8)	97 (9.3)	0.0006 ^c

NS=nem szignifikáns

^aA feltüntetett értékek átlagok (±szórás)

^bStudent-féle t-próba

^c χ^2 próba

31. táblázat: Korai és késői PNBD praeembryók morphologiai sajátosságainak összehasonlítása a megtermékenyítést követő 3. napon

	Korai PNBD	Késői PNBD	<i>P</i> -érték
Praeembryók száma	585	889	—
A praeembryók sejtszáma ^a	7.1 ±1.9	5.9 ±2.0	<0.0001 ^b
Fragmentáció mennyisége % ^a	18.2 ±14.5	19.0 ±15.7	NS ^b
Morphologiai pontérték ^a	2.17 ±0.5	2.13 ±0.6	NS ^b
A és B minőségű praeembryók gyakorisága (%)	135 (23.1)	205 (23.1)	NS ^c
Kiváló minőségű praeembryók gyakorisága (%)	109 (18.6)	71 (8.0)	<0.0001 ^c

NS=nem szignifikáns

^aA feltüntetett értékek átlagok (±szórás)

^bStudent-féle t-próba

^c χ^2 próba

4.3.4. Előmagok korai eltűnését mutató praeembryók beültetésének hatása az IVF kezelések kimenetelére

A pronucleus eltűnés időpontja és az IVF kezelések eredményessége közti összefüggések vizsgálata során csak azoknak az embryotransferrel zárult IVF kezeléseknél az adatait értékeltük, ahol valamennyi beültetett praeembryo vagy csak korai, vagy csak késői PNBD zygótából fejlődött (homogén embryotransferek). Így azok a kezelések, ahol a beültetett praeembryók között korai és késői PNBD praeembryók is voltak (kevert embryotransfer) a további vizsgálatokban nem vettek részt. Így az IVF kezelések eredményességének vizsgálatában 58 korai, és 139 késői PNBD ciklust hasonlítottunk össze, amelyeknek fontosabb adatait a 32. táblázatban tüntettük fel.

32. táblázat: Korai és késői PNBD ciklusok összehasonlítása

	PNBD				P-érték
	Korai		Késői		
Kezelési ciklusok száma	58		139		—
Anyai életkor ^a	33.6	±5.2	33.4	±4.9	NS ^b
Bazális FSH (NE/l) ^a	6.6	±2.3	6.7	±2.5	NS ^b
E ₂ hormonszint az ovuláció indukció napján (NE/l) ^a	2384	±1185	2487	±1133	NS ^b
Leszívott tüszők száma ^a	10.9	±5.1	10.9	±4.6	NS ^b
Nyert petesejtek száma ^a	6.7	±4.0	7.2	±3.6	NS ^b
Érett (MII) petesejtek száma ^a	5.4	±3.4	5.6	±3.7	NS ^b
Megtermékenyült petesejtek száma ^a	4.5	±2.9	4.0	±2.6	NS ^b
Beültetett praeembryók átlagos sejtszáma ^a	6.7	±2.1	5.0	±2.0	<0.0001 ^b
Fragmentáció átlagos mennyisége (%) a beültetett praeembryókban ^a	12.9	±9.4	15.8	±11.6	NS ^b
Beültetett praeembryók morfológiai pontértéke ^a	2.4	±0.4	2.2	±0.5	0.030 ^b
Kiváló minőségű beültetett praeembryók száma ^a	1.4	±0.9	0.6	±0.7	<0.0001 ^b
Beültetett praeembryók száma ^a	2.7	±1.0	2.9	±0.9	NS ^b
Összes terhesség (%)	32/58	(55.2)	46/139	(33.1)	0.0039 ^c
Klinikai terhesség (%)	28/58	(48.3)	38/139	(27.3)	0.0045 ^c
Beágyazódás (%)	41/155	(26.5)	61/404	(15.1)	0.0019 ^c

NS=nem szignifikáns

^aA feltüntetett értékek átlagok (±szórás)

^bStudent-féle t-próba

^c χ^2 próba

A vizsgálatba bevont korai és késői PNBD ciklusokat összehasonlítva nem találtunk szignifikáns különbséget az anyai életkor, bazális FSH szint, az ovuláció indukció napján mért serum oestradiol szint, a leszívott tüszők száma, nyert petesejtek-, érett (MII) petesejtek, megtermékenyült petesejtek, valamint a beültetett praeembryók száma

tekintetében a két csoport között. A korai PNBD csoportban a beültetett praeembryók átlagos sejtszáma jelentősen meghaladta a késői PNBD csoportban megfigyelt átlagos sejtszámot. Ugyanakkor a fragmentáció mennyisége nem tért el jelentősen az említett két csoportban. A beültetett praeembryók morfológiai pontértéke szignifikánsan magasabb, és a kiváló minőségű praeembryók gyakorisága is nagyobb volt a korai PNBD csoportban.

Az IVF kezelések kimenetelét tekintve a korai PNBD csoportban több mint 20%-kal magasabb összes terhességi és klinikai terhességi arányt tapasztaltunk, és a beágyazódási arány is több mint 10%-kal magasabb volt, mint a késői PNBD csoportban.

5. Megbeszélés

Az asszisztált reprodukciós beavatkozások jelentős fejlődésen mentek keresztül az elmúlt 10-15 évben. A meddőség kezelését végző szakemberek egyre újabb és hatékonyabb petefészek stimulációs protokollok alkalmazásával, míg az embriológiai laboratóriumok újabb és újabb technikai lehetőségek bevezetésével, valamint a megtermékenyítés és a praeembryo tenyésztés körülményeinek javításával igyekeznek az IVF kezelések eredményességét tovább fokozni. A kezelések egyre szélesebb javallati körben alkalmazhatók. Az ICSI kezelés 1990-es évek elején történt rutinszerű bevezetése, majd a hereszövetből történő hímivarsejtnyerés különböző formáinak alkalmazása a legsúlyosabb andrológiai kórképek esetében is lehetőséget adott a sikeres asszisztált reprodukciós kezelésekre.

Az IVF kezelések során az eredményesség kifejezésének egyik legjobb módja a beágyazódási arány megfigyelése. Bár a beágyazódási arány asszisztált reprodukciós központként, vagy betegcsoportonként is változik, általánosságban mégis elmondható, hogy 100 beültetett praeembryóból mindössze 10-15 ágyazódik be. A sokszor normálisan fejlődő praeembryók beágyazódásának elmaradását a legtöbb szerző genetikai okokkal magyarázza. *In vitro* fertilisatio céljából nyert petesejtek 18-20%-a, hímivarsejtek 3-4%-a hordoz valamilyen kromoszóma rendellenességet [91]. Ugyanez az arány az osztódó praeembryók esetében az anyai életkortól, valamint a praeembryók morphologiai jellemzőitől függően 20-40% között lehet [92].

A genetikai rendellenességek kiszűrésére a petesejtek és a zygoták esetében sarkitest biopsia, míg az osztódó praeembryók esetében blastomera vagy trophectoderma biopsia végezhető. Ezek a módszerek azonban nem tekinthetők valamennyi IVF kezelés során rutinszerűen alkalmazható eljárásnak. Ugyanakkor számos munkacsoport megfigyelte, hogy a beültetésre kerülő praeembryók morphologiai vizsgálata lehetőséget adhat arra, hogy megítéljük a praeembryók életképességét [4,93,94,95].

Így a legtöbb asszisztált reprodukciós kezelést végző intézetben a rendelkezésre álló praeembryók morphologiai vizsgálata alapján választják ki – az embryotranszfert megelőzően – a legéletképesebbnek tűnő, beültetésre kerülő praeembryókat. A 90-es évek második felétől kezdve azonban számos IVF központban egyre nagyobb súlyt

fektettek arra, hogy a többes terhességek gyakoriságának csökkentése céljából mind kevesebb praeembryót ültessenek be úgy, hogy közben ne csökkenjen a terhességi arány [74,96,97,98]. Így ma már több IVF központban is – bizonyos feltételek teljesülése mellett – mindössze egy praeembryo beültetésével (elective single embryo transfer) végzik az IVF kezeléseket egy részét [79,99,100]. Az új embryotransfer stratégiák alkalmazásához azonban a morfológiai bírálati rendszerek bővítése vált szükségessé, hogy az egyes praeembryókról rendelkezésünkre álló minél több információ alapján választhassuk ki a beültetésre kerülő előébrényeket.

A praeembryók morfológiai vizsgálata mellett így kiemelt szerepet kapott a megtermékenyült petesejtek vizsgálata is. Két különböző munkacsoport egymástól függetlenül igazolta, hogy a megtermékenyült petesejtben megfigyelhető előmagok morfológiai jellemzői szoros összefüggésben vannak a zygotából fejlődő praeembryo későbbi életképességével [51,54]. A pronucleusok morfológiai vizsgálata során azok a zygoták tekinthetők jobb életképességűeknek, amelyek előmagjai azonos méretűek, és a magokban megfigyelhető magvacskák eloszlása szimmetrikus.

Ugyanakkor a zygoták egy részében megfigyelhető, hogy a mikrotubulusok közreműködésével a mitokondriumok és más sejtalkotók az előmagok körüli részre húzódnak be, így a megtermékenyült petesejt külső részén egy áttetsző cytoplasmagyűrű figyelhető meg. A jelenség előfordulása szorosan összefügg a zygotából fejlődő praeembryók jobb minőségével és nagyobb életképességével [101,102,103].

Az anyai életkor 35 év feletti növekedése a kezelések eredményességének fokozatos csökkenését eredményezi. Az életkor növekedésével csökken ugyan a kezelésként nyert petesejtek és praeembryók száma, ez azonban önmagában még nem indokolja a kezelések eredményességének drámai csökkenését. Donor petesejtek IVF kezeléseknél történő felhasználásával azonban magasabb anyai életkor esetén is elfogadható terhességi és beágyazódási arányt lehet elérni. Mindez arra utal, hogy az IVF kezeléseknél során az anyai életkor előrehaladtával tapasztalható gyengébb eredményességért elsősorban a praeembryo és nem a méhen belüli környezet tehető felelőssé. Mivel a férfiak életkora nem befolyásolja lényegesen az IVF kezeléseknél eredményességét, az a következtetés is levonható, hogy a praeembryók gyengébb életképességéért az esetek többségében nem a hímivarsejtek, hanem a petesejtek tehető felelőssé [104].

5.1. A petesejtek morfológiai vizsgálatainak értékelése

5.1.1. Az első sarkitest morfológiai vizsgálatának értékelése

Az *in vitro* fertilisációs kezelések során nyert érett petesejtekben az 1. sarkitest jól megfigyelhető. Megjelenése egyértelműen jelzi a petesejt meiotikus érési folyamatának befejeződését. A sarkitest morfológiája nem csak a petesejt érettségére, de ovuláció utáni "öregedésére" is utalhat. A nem megfelelő nucleáris érési folyamat esetén a sarkitest kiválása akár el is maradhat, míg a petesejtnyerés előtt túlságosan gyorsan bekövetkező maturáció, majd a megtermékenyítésig tartó MII állapotban történő hosszas várakozás során az 1. sarkitest degenerálódása vagy fragmentálódása következhet be [28].

Mindezek alapján néhány kutatócsoportban felmerült annak lehetősége, hogy megkísérelje az 1. sarkitest állapota alapján megítélni a petesejtek, és az abból fejlődő praeembriók életképességét. Hagyományos *in vitro* fertilisációs kezelések során tett megfigyelések alapján úgy tűnik, hogy a normálistól eltérő sarkitest (fragmentált, a szokásosnál kisebb, vagy lényegesen nagyobb) a normális megtermékenyülés gyakoriságának csökkenését, míg a rendellenes megtermékenyülés előfordulásának növekedését eredményezi [105]. Ugyanakkor meg kell jegyezni, hogy hagyományos IVF kezelés során az 1. sarkitest megtermékenyülés előtti állapota nehezen figyelhető meg. ICSI kezelés során először Xia (1997) közölt adatokat a sarkitest morfológiai jellemzői és a későbbi praeembryo fejlődés összefüggéseiről [13]. Megfigyelései szerint az intakt illetve fragmentált sarkitestet tartalmazó petesejtek, amennyiben más rendellenességet nem mutattak, azonos arányban termékenyültek meg, és sejtszámuk is hasonlóan alakult a megtermékenyítést követő 2. napon. Ugyanakkor a jó minőségű praeembriók gyakorisága intakt sarkitest esetében jelentősen meghaladta a fragmentált sarkitestet tartalmazó petesejtek csoportjában megfigyelt gyakoriságot (66.7 vs. 39.1; $P < 0.01$). Ugyanez a tanulmány beszámol arról is, hogy a petesejtre sapkaszzerűen ráboruló, éretlen sarkitest esetében a megtermékenyülési arány mindössze 25%, és az így létrejött praeembriók egyike sem jutott túl a 2 sejttes állapoton.

Ugyanakkor Ebner munkacsoportja nem csak a praeembryo minőségben, de a megtermékenyülési arányban [14], valamint a blastocysta állapotig fejlődő praeembriókat eredményező petesejtek gyakoriságában is [106] szignifikáns különbséget talált az 1. sarkitest morfológiájától függően. Más tanulmányok ezzel

szemben nem találtak összefüggést az 1. sarkitest morfológiája és a petesejtek megtermékenyülési aránya, a praeembryók minősége vagy a praeembryókban kimutatott aneuploidia gyakoriság között [30,31].

Saját vizsgálataink során az 1. sarkitest valamennyi olyan morfológiai sajátosságát együttesen vettük figyelembe, amelyeket korábbi tanulmányokban külön-külön már leírásra kerültek. Tanulmányunk időszakában a normálnál nagyobb, valamint az éretlen sarkitest azonban rendkívül ritkán (1.8% illetve 0.9%) fordult elő, ami az alacsony esetszám miatt megnehezítette a statisztikai értékelést. Eredményeink szerint a fragmentált sarkitestet tartalmazó petesejtek termékenyültek meg és osztódtak a legnagyobb arányban, míg a szabályos alakú, de egyenetlen felszínű, valamint a szokásosnál nagyobb petesejtek esetében az átlagosnál alacsonyabb megtermékenyülési és osztódási arányt tapasztaltunk. Hasonló tendenciáról számolt be Verlinsky [31], valamint Ciotti [30] munkacsoportja is, azonban az általuk közölt tanulmányokban – feltehetően az itt bemutatottnál alacsonyabb petesejtszám miatt – az egyes csoportok közti különbség nem bizonyult szignifikánsnak. Eredményeink ugyanakkor csak részben támasztják alá Ebner és munkatársai korábbi megfigyelését [14], amelyben a normálnál nagyobb sarkitest esetén szintén alacsony (50%-os) megtermékenyülési arányról számolnak be. Ugyanebben a tanulmányban azonban normál méretű sarkitest esetén a fragmentált sarkitest jelenléte alacsonyabb megtermékenyülési arányt eredményezett, mint az intakt sarkit testet tartalmazó petesejtek csoportjában megfigyelt megtermékenyülési arány, és ez eltér a saját eredményeinktől.

Saját tanulmányunkban a praeembryókban megfigyelt fragmentáció mennyisége a fragmentált sarkitestet tartalmazó petesejtek csoportjában volt a legalacsonyabb a megtermékenyülést követő 2. napon, a különbségek azonban minimálisra csökkentek a csoportok között a 3. napi praeembryo bírálathoz idejére. Ugyanakkor a praeembryók sejtisége, a morfológiai pontérték, a jó minőségű valamint a kiváló minőségű praeembryók gyakorisága nem mutatott eltérést a csoportok között. Mindez alátámasztja azokat a korábbi megfigyeléseket, amelyek igazolták, hogy a sarkitest morfológiai jellemzői és a praeembryo minőség között nincs közvetlen összefüggés [30,31].

A többmagvú blastomerák gyakorisága a normál méretű intakt, valamint fragmentált sarkitestet tartalmazó petesejtek csoportjában közel azonos volt. Ugyanakkor a

normálisnál nagyobb, valamint éretlen sarkitestet tartalmazó csoportokban lényegesen gyakrabban láttunk többmagvú blastomerát a praeembryókban.

Mindez – összevetve a két utóbbi petesejt csoporttal kapcsolatban tett korábbi megfigyelésekkel – arra enged következtetni, hogy a szokásosnál nagyobb, valamint éretlen sarkitestet tartalmazó petesejtekből fejlődő praeembryókat gyengébb minőségük miatt ne ültessük be a kezelések során, amennyiben lehetőségünk van más praeembryót választani.

A fragmentált sarkitestet tartalmazó petesejtek csoportjára vonatkozó megfigyeléseink, valamint Verlinsky és Ciotti korábban már említett tanulmányai [30,31] ugyanakkor nem támasztották alá Ebner munkacsoportjának korábbi megállapításait [106,109]. Miután a sarkitest megfigyelése és morfológiai besorolása meglehetősen objektívnek tekinthető, az eltérő eredményeket nem valószínű, hogy az eltérő bírálati paraméterek okozzák. Ciotti tanulmányában ugyanakkor rámutat arra, hogy a cumulus sejtek zona pellucidáról történő eltávolítása és az ICSI kezelés között eltelt idővel arányosan nőtt a fragmentált sarkitestek gyakorisága [30]. Mindez alátámasztja azt a korábban már említett megfigyelést, miszerint az 1. sarkitest fragmentálódása az érett, MII petesejt öregedésének a jele [28]. Amennyiben a petesejtnyerést követő 7-9 órán belül megtörténik a spermium mikroinjektio, úgy a petesejtek öregedése feltehetően még nem éri el azt a mértéket, hogy az akár a petesejt megtermékenyülését, akár a belőle fejlődő praeembryó minőségét hátrányosan befolyásolja [30]. Mindez felhívja a figyelmet arra is, hogy a különböző intézetekben végzett tanulmányok összehasonlíthatóságát a vizsgálatok tárgyát (jelen esetben a petesejt morfológiáját) közvetlenül nem érintő laboratóriumi körülmények eltérései is nehezítik.

Összességében elmondhatjuk, hogy eredményeink alapján a fragmentált sarkitestet tartalmazó petesejtekből fejlődő praeembryók, éppúgy beültethetők, mint a normál méretű, kerek vagy ovális sarkitestet tartalmazó petesejtekből fejlődő praeembryók, míg a szokásosnál nagyobb, vagy éretlen sarkitestet tartalmazó petesejtekből fejlődő praeembryók beültetését lehetőség szerint kerülni kell.

5.1.2. A perivitellináris tér morfológiai vizsgálatának értékelése

A petesejtek érése során a nucleáris és cytoplasmikus érési folyamatok egymással párhuzamosan zajlanak. A két folyamat lefolyásában jelentkező időbeli eltérések

(aszinkronia) számos morphologiai elváltozás kialakulását eredményezhetik a petesejtben. A perivitellináris tér mérete jól mutathatja a cytoplasma pillanatnyi állapotát, így a normálnál jelentősen nagyobb perivitellináris tér a cytoplasma éretlenségére utalhat. Több korábbi tanulmány is foglalkozott a perivitellináris tér mérete és a petesejt, illetve az abból fejlődő előébrény életképessége közötti összefüggésekkel. Ezek közül azonban viszonylag kevés az, amelyben a perivitellináris tér vizsgálata különválasztható egyéb petesejt rendellenességek hatásának vizsgálatától. Korábbi tanulmányok a normálnál nagyobb perivitellináris térrel rendelkező petesejtek gyakoriságát 9% és 47% között írták le [12,13,20,21,107]. Ez a nagy eltérés a megnagyobbodott PVS-t tartalmazó petesejtek gyakoriságában arra utal, hogy a különböző szerzők más-más határt húztak meg a normál- és megnagyobbodott perivitellináris tér elkülönítésére. Az idézett közlemények egyike sem írja le pontosan, hogy milyen objektív mérés alapján sorolták a petesejteket a normálnál nagyobb PVS csoportba. Saját tanulmányunk a korábbiakkal szemben nem két, hanem három csoportba sorolja a petesejteket a perivitellináris tér mérete alapján: szűk, enyhén nagyobb és jelentősen megnagyobbodott PVS kategóriákat létrehozva. Ez alapján a jelentősen megnagyobbodott perivitellináris térrel rendelkező petesejtek gyakorisága 41.4%, míg a szűk PVS csoportba a petesejtek mindössze 25.5%-a tartozik (11. táblázat). Mindez arra utal, hogy a korábbi tanulmányokban leírt "normálnál nagyobb perivitellináris tér" saját tanulmányunkban a jelentősen megnagyobbodott perivitellináris tér kategóriának felel meg. Ugyanakkor az általunk szűk, illetve enyhén megnagyobbodott PVS kategóriákba sorolt petesejteket a korábbi tanulmányok egységesen a normál kategóriába sorolták.

A megnagyobbodott PVS-sel rendelkező petesejtek megtermékenyülési arányát elsőként De Sutter munkacsoportja hasonlította össze [12] az "ideális" morphológiájú petesejtekével. Sem a normál megtermékenyülés gyakoriságában, sem pedig a különböző kóros megtermékenyülés, illetve az ICSI kezelés következtében degenerálódott petesejtek arányában nem találtak szignifikáns különbséget a két csoport között. Ugyanakkor megemlítenéd, hogy ebben a tanulmányban 194 ideális morphológiájú petesejt megtermékenyülését hasonlították össze 66 megnagyobbodott PVS-sel rendelkező petesejttel. A normál megtermékenyülési arányban 12% különbség mutatkozott (72% vs 60%), ami feltehetően az alacsony esetszám miatt nem

szignifikáns, tendenciájában azonban mindenképpen jelentős eltérésnek tekinthető. Xia hasonló tanulmányában (1997) [13] már szignifikánsan magasabb megtermékenyülési arányt írt le normál PVS-sel rendelkező petesejtekénél, mint a megnagyobbodott PVS esetében. A különbség ebben az esetben 12-16% ($P < 0.01$), attól függően, hogy a jelenség társult-e az 1. sarkitest fragmentáltságával, vagy sem. Ezt a megfigyelést támasztotta alá Plachot és munkatársainak munkája [21], amely szintén az átlagosnál alacsonyabb megtermékenyülési arányt írt le a normálisnál nagyobb perivitellináris térrel rendelkező petesejtek esetében (61.3% vs. 53.4%; $P < 0.05$). Mindezek mellett olyan közlemény is megjelent az elmúlt években, amely szinte teljesen azonos megtermékenyülési arányt ír le a két vizsgált csoport esetében [20].

Saját vizsgálataink ez utóbbi tanulmányt látszanak megerősíteni, miszerint sem az enyhén, sem a jelentősen megnagyobbodott perivitellináris tér nem befolyásolta lényegesen a megtermékenyülési és osztódási arányokat (12. táblázat). Ugyanígy nem találtunk különbséget a zygota morfológiai jellemzői tekintetében a különböző PVS csoportok között.

Az osztódó praeembryók morfológiai sajátosságait vizsgálva is ellentmondó eredmények születtek a perivitellináris tér mérete szempontjából. Az osztódó praeembryók sejtszámáról a korábbi tanulmányok közül egyedül Xia közöl adatokat [13]. Megfigyelései szerint a normál perivitellináris térrel rendelkező petesejtek a megtermékenyítést követő 2. napra nagyobb arányban jutottak el 3-8 sejtes állapotba, mint a megnagyobbodott perivitellináris térrel rendelkező petesejtekből fejlődő praeembryók. Ezt a megfigyelést saját eredményeink is alátámasztják, miszerint a megnagyobbodott perivitellináris tér lassabb embryofejlődést eredményezett. A megnövekedett PVS csoportokban az alacsonyabb sejtszám ugyanakkor kisebb mértékű fragmentációval párosult.

A praeembryókban a sejtmagmentes fragmentumok többnyire a sejtsztódások során keletkeznek. Ez magyarázatot adhat arra, hogy a gyorsabban fejlődő, több sejtet tartalmazó praeembryókban nagyobb mennyiségű fragmentumot figyeltünk meg, de ez a jelenség önmagában nem indokolja a szignifikáns különbséget a fragmentáció tekintetében a normál és megnagyobbodott PVS csoportok között. Ugyanakkor Racowsky és munkatársainak tanulmánya (2003) felhívja a figyelmet arra, hogy az

osztódó praeembryók sejtszáma sokkal inkább meghatározza a beágyazódás esélyét, mint a fragmentáció mennyisége, vagy a blastomerák azonos, vagy eltérő mérete [108]. Tanulmányunkban a fragmentáció mértékét, valamint a blastomerák szabályos vagy szabálytalan alakját, azonos vagy eltérő méretét is magában foglaló morfológiai pontérték szintén magasabb volt a megnagyobbodott perivitellináris térrel rendelkező petesejtek csoportjában, ami véleményünk szerint elsősorban a nagyobb mértékű fragmentációnak köszönhető. Ugyanakkor arra is fel kell hívni a figyelmet, hogy bár a csoportok közti eltérés szignifikáns, a morfológiai pontértékben mutatkozó eltérés nem jelentős. Ilyen minimális különbség megfelelően nagy mintaelemszám esetén a rendelkezésünkre álló statisztikai módszerekkel kimutatható ugyan, de kérdéses, hogy van-e valóságos biológiai jelentősége. De Sutter korábban már idézett tanulmányában (1996) saját eredményeinkhez hasonló, de annál lényegesen nagyobb különbséget mutatott ki a két csoport között a morfológiai pontérték tekintetében, ami azonban, feltehetően az alacsonyabb elemszám miatt nem volt szignifikáns [12]. Ugyanakkor a megnagyobbodott PVS csoportba tartozó praeembryók jobb minőségét igazolja a többmagvú blastomerákkal rendelkező praeembryók ritkább előfordulása is.

Összességében elmondhatjuk, hogy a perivitellináris tér méretének nincs hatása a petesejtek megtermékenyülési folyamatára az ICSI kezelések során. Ugyanakkor saját tanulmányunkban a szűk perivitellináris térrel rendelkező petesejtekből létrejött praeembryók fejlődése gyorsabb, morfológiai minősége viszont valamivel kedvezőtlenebb, mint a megnagyobbodott perivitellináris térrel rendelkező petesejtekből fejlődött praeembryóké. A meglehetősen ellentmondásos eredményeink, összevetve a szintén egymásnak ellentmondó korábbi irodalmi adatokkal, nem adnak elfogadható magyarázatot a perivitellináris tér mérete és a praeembryo minősége közti összefüggésekre. Ezen a területen a biológiai okok további vizsgálata mellett a különböző méretű perivitellináris térrel rendelkező petesejtek fejlődésének további megfigyelésére van szükség, esetleg tovább differenciálva a petesejtek PVS mérete szerinti felosztását, valamint a praeembryo morfológia megfigyelése mellett a beágyazódási arány vizsgálata is indokoltnak tűnik.

5.1.3. A cytoplasma szemcsézettség morphologiai vizsgálatának értékelése

A jelen tanulmányban vizsgált morphologiai jellemzők közül talán a cytoplasma szemcsézettség az, amely a legváltozatosabb képet mutatja. A legtöbb, e területen megjelent közlemény hiányossága, hogy nem ad részletes leírást a vizsgált elváltozásokról, így nehéz a különböző munkacsoportok eredményeit egybevetni, értékelni.

Az általunk alkalmazott vizsgálati rendszer a szemcsék típusa, mérete és száma alapján 5 csoportba osztja a petesejteket. Így lehetőség nyílt az egyes szemcsézettség típusok hatását külön-külön értékelni.

Korábbi tanulmányok rámutattak, hogy a petesejtek 60-65%-a hordoz valamilyen morphologia rendellenességet, és közel 25-30%-ukban kettő vagy annál több elváltozás is megfigyelhető [12,20,21]. Saját adataink alapján a petesejtek mindössze 5%-a volt olyan, amelyik egyáltalán nem, vagy csak minimális mértékben tartalmazott fénymikroszkóppal látható szemcséket. Ugyanakkor a petesejtek több mint 50%-a nagyméretű szemcsét, fénytörő szemcsét vagy kráterszerű szemcsézettséget tartalmazott. A korábbi irodalmi adatok és saját eredményeink közti eltérés a rendellenes petesejtek gyakoriságával kapcsolatban feltehetően abból adódik, hogy a korábbi tanulmányok nem vették figyelembe a kisebb méretű szemcsék jelenlétét.

A legtöbb tanulmány, amely többféle cytoplasma elváltozás hatását vizsgálta, megállapította, hogy egy-egy morphologiai eltérésnek önmagában nincsen hatása a petesejtek megtermékenyülési esélyére ICSI kezelést követően [12,20,23]. Hagyományos IVF kezelések során azonban a petesejtek jelentős szemcsézettsége, bár a megtermékenyülési arányt nem befolyásolta, magasabb kóros megtermékenyülési arányt (triploid praeembryók) eredményezett. Ugyanakkor a több mint 10 µm átmérőjű fénytörő szemcsék jelenléte egyes megfigyelések szerint rendkívül alacsony (2%) megtermékenyülési aránnyal társult [4]. A fénytörő szemcsék megtermékenyülésre gyakorolt hatására Xia is felhívja a figyelmet tanulmányában [13], amely szerint fénytörő szemcse jelenléte a cytoplasmában, amennyiben az nem társul a sarkitost, vagy a perivitellinális tér rendellenességeivel, alacsonyabb megtermékenyülési arányt eredményez, mint ami az ideális morphológiájú petesejtek esetében megfigyelhető (64.5% vs. 84.9%; $P < 0.01$). Ugyanakkor Plachot és munkatársai, meglepő módon ennek a megfigyelésnek az ellenkezőjét írták le, miszerint a fénytörő szemcsét

tartalmazó petesejtek esetében az átlagosnál több mint 7%-kal magasabb megtermékenyülési arányt figyeltek meg [21]. Az itt idézett tanulmányokból azonban nem derül ki egyértelműen, hogy a szerzők mit tekintettek fénytörő szemcsének, és tettek-e különbséget a nagyméretű, de a cytoplasma színével azonos szemcsék, valamint a cytoplasma színénél sötétebb, fénytörő tulajdonságú szemcsék között. Véleményünk szerint az egymásnak ellentmondó szakirodalmi adatok elsősorban a morfológiai elváltozások nem teljesen egyértelmű besorolásából adódnak.

Saját adataink alapján sem a normál megtermékenyülés, sem a különböző típusú kóros megtermékenyülés, vagy a degenerált petesejtek gyakorisága nem tért el a különböző szemcsézettség típusú csoportokban. Ugyanakkor az általunk vizsgált, injektált petesejtekre vonatkoztatott osztódási arány, amely a megtermékenyülést és az osztódást egyaránt magában foglalja, már szignifikáns eltéréseket mutatott az egyes csoportok között. A legszembetűnőbb különbség a fénytörő szemcsét tartalmazó csoportban figyelhető meg, amelynél az osztódási arány 9-12%-kal marad el a szemcséket nem, vagy alig tartalmazó, valamint a nagyméretű szemcsét tartalmazó csoportoktól. Megfigyelésünk megerősíti Xia [13] és Veeck [4] korábbi eredményeit, amelyek igazolták, hogy a fénytörő szemcsék jelenléte csökkenti a normális megtermékenyülés esélyét. Ugyanakkor a cytoplasma színével megegyező nagyméretű szemcsék, valamint az annál lényegesen sötétebb, fénytörő szemcsék osztódási arányra gyakorolt eltérő hatása igazolja, hogy petesejt bírálati rendszerünkben indokolt volt ezt a kétféle elváltozást külön vizsgálni.

A kráterszerű szemcsézettséget tartalmazó petesejtek csoportjában megfigyelt megtermékenyülési és osztódási arány nem tért el a többi csoporttól. Mindez megerősíti Kahraman és munkatársainak megfigyelését [15], amely szerint a kráterszerű szemcsézettség enyhébb vagy jelentősebb előfordulása sem befolyásolja a petesejtek megtermékenyülési esélyét.

A különböző petesejt szemcsézettségi csoportok között nem találtunk különbséget sem a zygotákban megfigyelhető nucleolus eloszlás, sem pedig az áttetsző külső gyűrű előfordulása tekintetében. A megtermékenyítést követő 2. napon a praeembryók sejtszáma, a fragmentáció mennyisége, valamint a praeembryók minősége is hasonló volt a különböző szemcsézettségű petesejtekből létrejött praeembryók csoportjaiban. Meg kell azonban jegyezni, hogy a kiváló minőségű praeembryók gyakorisága 5-8%-

kal elmarad a fénytörő szemcsét tartalmazó petesejtekből létrejött praeembryók csoportjában, szemben a szemcséket nem, vagy alig tartalmazó petesejtek csoportjával, bár az eltérés statisztikailag nem szignifikáns.

A megtermékenyítést követő 3. napon végzett megfigyelések azt mutatják, hogy mind a fénytörő szemcsét, mind pedig a krátterszerű szemcsézettséget tartalmazó csoportokban szignifikánsan nagyobb a fragmentáció mennyisége, mint a nagyméretű, vagy sok apró szemcsét tartalmazó csoportokban.

Számos korábbi tanulmány úgy találta, hogy a petesejtek morphologiai jellemzői nincsenek hatással a praeembryo későbbi fejlődésére [15,20,21,23]. Ezek a tanulmányok a praeembryo minőséget többnyire a megtermékenyítés utáni 2. napon vizsgálták, és csak ritkán fordult elő, hogy valamelyik közlemény a 3. napi morphologiai vizsgálat eredményéről is beszámolt [15]. Úgy gondoljuk, hogy a praeembryók gyengébb életképességét kifejező morphologiai jellemzők fokozatosan, és az esetek egy részében csak lassan alakulnak ki, ezért dolgoztuk fel tanulmányunkban a megtermékenyülés utáni 3. napi praeembryo morphologiai vizsgálat eredményeit is. Elméletünk helyességét igazolták saját eredményeink, miszerint a megtermékenyítést követő 2. napon még nem, a 3. napon azonban már szignifikáns eltérést találtunk a praeembryók életképességét jól tükröző fragmentáltság tekintetében [109].

A vizsgálat időtartama alatt végzett IVF-ET kezelések során az esetek többségében 3 vagy 4 praeembryót ültettünk be, és a beültetésre kerülő praeembryók kiválasztása során nem vettük figyelembe a petesejtek morphológiáját. Így a kezelések jelentős részében a petesejtek morphológiája szempontjából kevert embryotransfer történt, amikor terhesség létrejött esetén nem tudjuk, hogy milyen morphológiájú petesejtből fejlődött praeembryo ágyazódott be. Ezért a különböző morphologiai rendellenességgel bíró petesejtekből létrejött praeembryók beágyazódási esélyeit nem volt módunk vizsgálni. Korábbi tanulmányok azonban szignifikánsan alacsonyabb terhességi arányról [22,23], és magasabb vetélési arányról [15,110] számoltak be azokban az esetekben, amikor morphologiailag rendellenes petesejtekből létrejött praeembryókat ültettek be.

Mindez, összevetve saját eredményeinkkel, arra utal, hogy a cytoplasmában megfigyelhető fénytörő szemcse, valamint krátterszerű szemcsézetség a praeembryo fejlődésére kedvezőtlen hatást gyakorol, ami csak lassan kialakulva, hosszabb idő alatt jelentkezik. Ugyanakkor a fénytörő tulajdonságokkal nem rendelkező, a cytoplasma

színével megegyező, kisebb vagy nagyobb méretű szemcsék jelenléte nem befolyásolja lényegesen a praeembriók fejlődését.

5.1.4. A cytoplasmában megfigyelhető vacuolumok vizsgálatának értékelése

A petesejtek cytoplasmájában előforduló vacuolumok a legszembetűnőbb morfológiai elváltozások közé tartoznak. Ennek ellenére viszonylag kevés adat áll rendelkezésünkre a petesejtekben megfigyelhető vacuolumok kialakulásáról, valamint azoknak a későbbi praeembryo fejlődésre gyakorolt hatásáról. Néhány munkacsoport foglalkozott ugyan a vacuolumok vizsgálatával, de az adatokat csak más cytoplasma rendellenességekkel együtt értékelték, így ezen tanulmányokból a vacuolumok egyedüli hatásáról nem kapunk információt [23, 111]. A vacuolumok előfordulását vizsgáló tanulmányokban azok gyakorisága az érett MII petesejtek esetében 5.7% és 12.4% között változott [12, 110]. Saját munkánk során a petesejtek 10%-ában figyeltünk meg vacuolumokat. Ezen belül a vacuolumos petesejtek közel felében csak minimális, míg a másik felében jelentős mennyiségű vacuolumot, vagy zsákocskaszerű képletet figyeltünk meg.

A korábbi eredmények ellentmondóak a vacuolumok megtermékenyülési arányra gyakorolt hatását tekintve. Míg egyes tanulmányok vacuolumos petesejtek normál megtermékenyülési arányát írták le [110], addig más szerzők a vacuolumot tartalmazó petesejtek esetében jelentősen alacsonyabb megtermékenyülési arányról számoltak be, mint az "ideális" morfológiájú petesejtek esetében (40% vs. 69.6%, $P < 0.02$, [12]; 48.9% vs. 65.3%, $P < 0.05$, [24]).

Saját eredményeink azt mutatják, hogy a minimális vacuolumot tartalmazó petesejtek a normál petesejtekhez hasonló arányban termékenyültek meg. Azonban a jelentős mennyiségű vacuolumot tartalmazó petesejtek megtermékenyülési aránya elmaradt az előbbi két csoporttól. Ugyanakkor a 3 pronucleust eredményező, kóros megtermékenyülés gyakorisága magasabb volt a jelentősen vacuolumos csoportban, mint a vacuolumot minimális mennyiségben, vagy egyáltalán nem tartalmazó csoportban.

Eredményeink megerősítik azokat a korábbi megfigyeléseket, amelyek szerint a kisebb méretű vacuolumok nem befolyásolják a megtermékenyülési arányt, míg a nagyobb méretű vacuolumok jelentősen csökkentik azt [4, 24]. Ebner és munkatársai 14 μm -ben határozták meg azt a vacuolum méretet, amely fölött már egyáltalán nem

termékenyültek meg a petesejtek [24]. A jelenség egyik lehetséges oka, hogy jelentősebb mennyiségű vacuolum jelenléte esetében a mikrotubulusok nem képesek normálisan irányítani a megtermékenyülés folyamatait [24]. Egy másik elmélet szerint pedig a nagyméretű vacuolumok kiszorítják a meiotikus orsót optimális helyéről, ami szintén a megtermékenyülés, vagy az osztódás elmaradásához vezethet [16].

A vacuolumos petesejtekből létrejött praeembryók későbbi fejlődéséről még kevés adat áll rendelkezésünkre. De Sutter és munkatársai [12] tanulmányában az ideális morphológiájú petesejtekből létrejött praeembryók morphologiai pontértéke nem tér el jelentősen a vacuolumos petesejtek csoportjában talált értéktől (3.08 ± 1.07 vs. 3.00 ± 1.04), míg Plachot és munkatársainak (2002) megfigyelése szerint a vacuolumos petesejtekből az átlagosnál kevesebb kiváló minőségű praeembryo jött létre (21.4% vs. 31.2%), bár az eltérés a csoportok között nem volt szignifikáns [21].

Saját eredményeink szintén azt mutatják, hogy a jelentős mennyiségű vacuolumot tartalmazó petesejtekből a megtermékenyülést követően hasonló sejtszámú és minőségű praeembryók jöttek létre, mint a kevesebb vacuolumot tartalmazó, vagy vacuolumot egyáltalán nem tartalmazó petesejtekből létrejött praeembryók csoportjában. Mindez arra utal, hogy amennyiben a petesejtben jelenlévő jelentősebb mennyiségű vacuolum a megtermékenyülés és az osztódás során nem fejtett ki kedvezőtlen hatást, úgy azok jelenléte már a későbbi sejtosztódásokat sem zavarja.

Ugyanakkor a vacuolumos petesejtekből létrejött praeembryók fejlődésének megfigyelése arra is rámutatott, hogy a petesejtek egy részében (28.6%) az ICSI kezelés előtt megfigyelt vacuolumok a megtermékenyítést követő 2. napra eltűntek, míg a vacuolumok másik része (a petesejtek 40%-ban) kisebb vacuulumokra vált szét [24]. Ez a megfigyelés magyarázatot adhat arra, hogy saját tanulmányunkban az ICSI kezelés előtt vacuolumos petesejtek a megtermékenyülést követően miért mutattak a normál petesejtekből létrejött praeembryókhöz hasonló morphologiai jellemzőket.

A sER felhalmozódást tartalmazó zsákocskaszerű képződmények a nagyobb méretű, folyadékkal telt vacuulumoktól a mikroszkópos morphologiai vizsgálat során jól elkülöníthetők. Ezért tanulmányunkban e két morphologiai eltérést külön-külön értékeltük.

A zsákocskaszerű képződményt tartalmazó petesejtek normál megtermékenyülési aránya elmaradt, míg a 3 előmagot tartalmazó, kóros megtermékenyülés aránya közel

háromszor magasabb volt, mint a vacuolumot nem, vagy alig tartalmazó petesejtek csoportjában. Ezt a megfigyelést nem támasztotta alá Otsuki és munkatársainak korábbi tanulmánya [18], amely szerint a sER felhalmozódás nem befolyásolja a megtermékenyülési arányt. Meg kell azonban jegyezni, hogy ebben a tanulmányban nem az egyes petesejtek morfológiájának későbbi praeembryo fejlődésre gyakorolt hatását vizsgálták, hanem azon IVF ciklusokat hasonlították össze, amelyekben előfordultak, illetve nem fordultak elő sER felhalmozódást mutató petesejtek. Így a vizsgált morfológiai elváltozás közvetlen hatását a korábbi tanulmány alapján nem tudjuk értékelni.

Saját eredményeink ugyanakkor azt mutatják, hogy a zsákocskaszerű képződményt tartalmazó petesejtekből fejlődő praeembryók a megtermékenyítést követő 2. és 3. napon is lényegesen kevesebb fragmentációt tartalmaztak, mint a többi petesejt. Ugyanakkor az osztódó praeembryók sejtszáma nem különbözött az egyes csoportok között. A csökkent mennyiségű fragmentáció eredményezte azt, hogy a sER felhalmozódást tartalmazó petesejtekből létrejött praeembryók esetében a morfológiai pontérték magasabb, és a jó minőségű praeembryók gyakorisága is nagyobb, mint a többi csoportban. Otsuki és munkatársai a korábban már említett tanulmányukban [18] hasonló megfigyeléseket tettek, miszerint azokban az IVF ciklusokban, amelyekben előfordult sER felhalmozódást tartalmazó petesejt, nagyobb arányban kerültek beültetésre "A" minőségű praeembryók, mint azokban az IVF ciklusokban, amelyekben ilyen petesejt rendellenesség nem volt megfigyelhető (82.0% vs. 62.1%; $P < 0.05$). Ugyanakkor a sER+ ciklusokban az ovuláció indukció napján mért magasabb oestradiol szintet figyeltek meg, amely egy lehetséges oka lehet a sER felhalmozódás kialakulásának. A sER+ ciklusokban, a beültetett praeembryók között megfigyelt jobb praeembryo minőség, valamint a saját tanulmányunk során megfigyelt alacsonyabb fragmentáció arra utal, hogy a sima felszínű endoplasmikus retikulum felhalmozódás valamilyen módon összefüggésben lehet a cytoplasma érettségével.

Ugyanakkor a sER felhalmozódás előfordulásával foglalkozó korábbi tanulmány [18] arra is felhívja a figyelmet, hogy a sER+ ciklusokban a klinikai terhességi arány és a beágyazódási arány is elmarad a sER– ciklusokban megfigyelt eredményektől, ami arra utal, hogy bár a sER felhalmozódás kialakulása csak néhány petesejtetben volt

megfigyelhető az IVF kezelések során, az érintett ciklusokban a jelenséget nem mutató petesejtek életképessége is elmarad a sER– ciklusokban nyert petesejtekétől.

A rendelkezésre álló adatok alapján nem állíthatjuk, hogy a sER felhalmozódást mutató petesejtekből létrejött praeembryók beültetését kerülni kell, azonban mind a jelentősebb mennyiségű vacuolumot, mind pedig sER felhalmozódást mutató petesejtek esetén a beültetésre kerülő praeembryók kiválasztásánál rendkívül körültekintően kell eljárni.

5.2. A korai praeembryo fejlődés vizsgálatának értékelése

A megtermékenyült petesejt első osztódása az első sejtciklus egyes szakaszai során lezajló sejtbioológiai folyamatok szigorú rendben egymás után bekövetkező lépéseinek eredménye. Ugyanakkor az egyes szakaszok lefolyásának időtartama petesejtenként változó lehet, ami gyorsabb és lassabb fejlődésű praeembryók létrejöttét eredményezi. Régóta ismert, hogy a gyorsabban osztódó, az embryo transfer napján nagyobb blastomeraszámú praeembryók életképesebbek, így beültetésük az IVF-ET kezelések során magasabb terhességi arányt eredményez [112]. Ugyanakkor tudjuk azt is, hogy az osztódó praeembryókban egy-egy sejtosztódás viszonylag rövid idő alatt lezajlik, míg két sejtosztódás között lényegesen hosszabb idő telik el. Így gyakran előfordul, hogy egy gyorsabban és egy lassabban fejlődő praeembryo egy adott időpontban azonos sejtszámmal rendelkezik. Ebben az esetben a praeembryo beültetést megelőzően végzett egyszeri morfológiai vizsgálattal nem kapunk képet a fejlődés sebességéről, pedig az fontos szempont lenne az életképesebb praeembryók kiválasztása során. A praeembryo fejlődés dinamikája csak többszöri vizsgálattal ítélni lehet meg, amely vizsgálatok között fontos szerepet kaphat az első sejtosztódás megfigyelése.

Korábbi vizsgálatok rámutattak arra, hogy az osztódó praeembryók fejlődésében mutatkozó időbeli különbségek már az első sejtciklus során jelentkeznek [38,40,44]. A megtermékenyítéstől az első sejtosztódásig eltelt idő tekintetében gyorsan és lassan fejlődő praeembryók között akár 12 óra eltérés is lehet (6. ábra). Az első sejtciklus befejeződésének várható időpontját figyelembe véve a korai sejtosztódást eddig vizsgáló szerzők többsége a megtermékenyítés utáni 25-29. órát javasolták a vizsgálatok elvégzésére alkalmas időpontnak [46,61,62,63,64,68,69]. Számos embriológiai laboratóriumban, így klinikánk Asszisztált Reprodukciós Osztályán is, ezt a vizsgálatot rendkívül nehéz beilleszteni a laboratórium munkarendjébe. Esetünkben ugyanis a

petesejtnyerések a délelőtti órákban, általában 8³⁰ és 12⁰⁰ között zajlanak. Hagyományos IVF kezelés esetén a megtermékenyítésre a petesejtnyerést követő 6 órás előinkubáció után, délután 15⁰⁰ és 18⁰⁰ között kerül sor. ICSI kezelés esetén az előinkubáció ideje nincs ugyan pontosan meghatározva, de az aznapi időbeosztásától függően szintén többnyire 15⁰⁰ és 18⁰⁰ között kerül sor a petesejtek megtermékenyítésére. Sőt, bizonyos esetekben a mikroinjectio még ennél későbbi időpontokban is történhet. Így a késő délután végzett megtermékenyítések esetében a korai osztódás elbírálásának optimális időpontja a következő nap esete 19⁰⁰ és 23⁰⁰ óra között lenne, ami rendkívüli terhelést jelentene az embriológiai laboratórium dolgozói számára.

Ugyanakkor a zygota első sejtciklusát vizsgáló tanulmányok egybehangzóan megállapították, hogy a sejtciklus M fázisa, függetlenül a korábbi szakaszok gyorsabb vagy lassabb lezajlásától, viszonylag állandónak tekinthető, 3-4 óra alatt zajlik le. Az M fázis a pronucleusok membránjának a lebomlásával és az előmagok eltűnésével kezdődik, befejező lépése pedig az első sejtosztódás. Ugyanakkor az előmagok eltűnése fénymikroszkópos vizsgálattal éppoly jól megfigyelhető, mint az első sejtosztódás. Ennek megfelelően a korai praeembryo fejlődés megfigyelése során nem csak az osztódás, de a pronucleusok eltűnésének bekövetkeztét is megfigyeltük. A vizsgálatokat szigorú időmegkötés nélkül, a megtermékenyítést követő 20. és 28. óra között végeztük. A korai osztódást vizsgáló korábbi tanulmányok között is előfordult olyan, amely a nem osztódott zygotákat két kategóriába sorolta attól függően, hogy a pronucleus eltűnés bekövetkezett-e vagy sem [46,69]. Ezen eredmények alapján Neuber és munkatársai [46] arra a következtetésre jutottak, hogy a vizsgálatok optimális időpontja a korábban javasoltaktól eltérően a megtermékenyítést követően 24 és 26 óra között van, mert ez az időszak, amikor mindhárom fejlődési állapot (intakt 2 PN; PNBD; 2 sejtes) jelen van. Fel kell hívnunk azonban a figyelmet arra, hogy ezek a vizsgálatok figyelembe veszik ugyan a PNBD bekövetkezését, de azok időpontja sokkal inkább a korai osztódás, nem pedig a korai pronucleus eltűnés vizsgálatának optimális időpontjára esik.

Saját vizsgálataink során a megtermékenyítés utáni 22. órát megelőzően a zygoták csak alacsony arányban mutatták a PNBD jelenségét, ezért ebben az időszakban végzett megfigyelések nem adnak elegendő információt a gyorsan fejlődő praeembryók kiválasztásához. Ugyanakkor a megtermékenyítés utáni 25. órát követő vizsgálatok során a zygoták jelentős részében már eltűnt a pronucleus, így ez az időszak sem

tekinthető optimálisnak a korai PNBD megfigyelésére. A megtermékenyítést követő 22. és 25. óra között elvégzett vizsgálatok esetén a zygoták 20-55%-ában tűntek el a pronucleusok, így ez az időszak tűnik optimálisnak, amennyiben a PNBD jelenségének vizsgálatát fel szeretnénk használni a későbbi praeembryo szelekció során. Mindezek alapján a korai PNBD megfigyelésének optimális időpontja a megtermékenyítést követő 22. és 25. óra közötti időszakra tehető. Mindez 3 órával előzi meg a korai osztódás megfigyelésének korábbi tanulmányokban feltüntetett optimális időpontját. Ez a 3 órás időkülönbség pedig megfelel a sejtciklus M fázisának – korábban már említett – 3-4 órás hosszának [38,40,44]. Ugyanakkor azt is megfigyelhetjük, hogy jelentős különbség van a PNBD bekövetkezésének gyakoriságában az általunk optimálisnak tekintett 22-25 órás időintervallumon belül is (16. ábra). Míg 22-23. óra között a petesejtek közel 20%-ában figyeltük meg a jelenséget, addig 24-25. óra között a petesejtek több mint 50%-ában tapasztaltuk az előmagok eltűnését vagy a korai osztódást. Mindez lehetőséget ad arra is, hogy a rendelkezésünkre álló megtermékenyült petesejtek számától, valamint a beültetésre kerülő praeembryók számától függően korábban vagy később végezzük el a vizsgálatot. Azon betegeknél tehát, akiknél sok megtermékenyült petesejt áll a rendelkezésünkre, célszerű a PNBD vizsgálatot korábban, 22-23 órával a megtermékenyítés után elvégezni. Így a vizsgálat hozzásegíthet minket ahhoz, hogy a rendelkezésre álló 10-12 zygotából könnyen kiválaszthassuk a 2-3 legéletképesebbet. Az optimális tartomány későbbi időszakában pedig azon betegeknél érdemes a vizsgálatot elvégezni, akiknél a megtermékenyült petesejtek száma kevéssel haladja meg a beültethető praeembryók számát.

A korai osztódás és a későbbi praeembryo fejlődés összefüggéseit vizsgálva a leginkább elvárható eredmény, hogy azok a zygoták, amelyek korábban osztódnak, a gyorsabb fejlődés miatt a későbbi praeembryo vizsgálatok alkalmával, valamint az embryobeültetés idején is nagyobb sejtszámmal rendelkezzenek. Ezt a hipotézist a korai osztódás vizsgálatával foglalkozó tanulmányok többsége alátámasztotta [46,61,62,68,69], és a korai pronucleus eltűnés esetében is igazolták a jelenséget [46,69]. Saját eredményeink is megerősítik a korábbi megfigyeléseket, miszerint a PNBD korai bekövetkezése a későbbiekben gyorsabb sejtosztódást eredményezett.

A praeembryók életképességét azonban nem csak osztódásuk sebessége alapján, hanem egyéb morfológiai jellemzőiket is figyelembe véve igyekszünk megállapítani. Így

felmerül a kérdés, hogy a korai pronucleus eltűnést mutató praeembryók csak a sejtosztódás dinamikájában, vagy egyéb tulajdonságaikban is eltérnek-e a lassabban fejlődőektől. Korábbi tanulmányok azt igazolták, hogy a gyorsabban osztódó praeembryók kevésbé voltak fragmentáltak, morfológiai pontértékük pedig magasabb volt, mint azoknak, amelyek a vizsgálat idején még nem osztódtak [46,100,113,114]. Saját eredményeink ezzel szemben azt mutatják, hogy a praeembryók minősége nem különbözik lényegesen a korai és késői PNBD csoportokban. Ugyanakkor a többmagvú blastomerák ritkább előfordulása a gyorsabban fejlődő csoportban mégis arra utal, hogy az első sejtciklus gyorsabb lefolyásának nem csak a sejtosztódás sebességére, de valamilyen közvetett módon a praeembryo minőségre is hatása lehet. Az összes vizsgált morfológiai tulajdonságot egybevetve (sejtszám, fragmentáció mennyisége, blastomerák azonos vagy eltérő mérete, többmagvú blastomerák előfordulása), a korai pronucleus eltűnést mutató csoportban a kiváló minőségű praeembryók nagyobb gyakorisággal fordultak elő, mint a késői PNBD csoportban. Ezt a megfigyelést megerősítik Neuber és munkatársainak eredményei is [46], amely szerint nem csak a megtermékenyítést követő 2. és 3. napon volt nagyobb a kiváló minőségű praeembryók gyakorisága a korai PNBD csoportban, hanem ebben a csoportban a praeembryók egyúttal nagyobb arányban fejlődtek jó minőségű blastocystává az 5. napig, mint a késői PNBD csoportban lévő praeembryók.

Az ICSI technika bevezetése óta lehetőségünk van arra is, hogy összehasonlítsuk a különböző módszerekkel megtermékenyített petesejtekből létrejött praeembryók fejlődését. Korábbi tanulmányok arról számoltak be, hogy a hagyományos IVF kezelés során megtermékenyült petesejtek első sejtciklusa 2-4 órával lassabban zajlik le, mint az ICSI módszerrel megtermékenyített petesejteké [40,44,115]. A jelenség oka az lehet, hogy a hagyományos IVF kezelés esetén a hímivarsejtnek keresztül kell jutnia a cumulus sejtek halmazán, majd a zona pellucidán és az oolemmán, ami több órán át is tarthat. Ugyanakkor az ICSI módszer alkalmazása során a spermium mikroinjektálásával ezek az időigényes lépések kimaradnak.

Ezt az elméletet támasztották alá azok a tanulmányok, amelyek kimutatták, hogy ICSI útján létrejött praeembryók nagyobb arányban mutatnak korai osztódást mint azok, amelyek hagyományos IVF kezelés során jöttek létre [68,69,116]. Ugyanakkor ezzel ellentmondó adatok is közlésre kerültek, miszerint a megtermékenyítés módja nem

befolyásolja a pronucleus képződés és a korai osztódás időpontját [64,117]. Saját eredményeink azt a tendenciát jelzik, miszerint az ICSI útján megtermékenyített petesejtek valamivel gyorsabban fejlődnek, így nagyobb arányban mutatnak korai pronucleus eltűnést mint a hagyományos IVF során létrejött zygoták. Szignifikáns különbséget azonban nem sikerült kimutatnunk a két csoport között. Az egymásnak ellentmondó adatok miatt egy nagyobb tanulmány végzését látjuk indokoltnak az IVF és ICSI megtermékenyítéssel létrejött zygoták optimális vizsgálati időpontjának meghatározásához.

A korai osztódásnak a terhességi és beágyazódási arányra gyakorolt hatását vizsgáló tanulmányok többségében a legalább egy korán osztódott praeembryo beültetésével végzett embryotransferek eredményességét hasonlították össze a kizárólag későn osztódott praeembryók beültetésével végzett kezelések eredményességével. Ilyenkor legtöbbször korán és későn osztódott praeembryókat együtt ültettek be, ezért a kapott eredményekből, mivel nem tudjuk pontosan melyik praeembryo ágyazódott be, nehéz következtetéseket levonni azok sorsát illetően [46,61,62,64]. Ezért saját tanulmányunkban csak a homogén, tehát kizárólag gyorsan vagy kizárólag lassan fejlődő praeembryók beültetésével végzett embryotransferek eredményességét hasonlítottuk össze. A betegek azon csoportjában, ahol olyan praeembryókat ültettünk be, amelyek mindegyike korai pronucleus eltűnést mutató zygotákból fejlődött, szignifikánsan magasabb terhességi és beágyazódási arányt figyeltünk meg, mint azoknál a betegeknél, ahol csak késői PNBD zygotákból fejlődő praeembryók kerültek beültetésre. Ez az eredmény hasonló a korai osztódás vizsgálatával kapcsolatban közölt korábbi adatokkal [46,61,62,63,64,68,113]. Ugyanakkor Wharf és munkatársainak tanulmánya [69] szintén utal arra, hogy a korai pronucleus eltűnést mutató zygotákból fejlődő praeembryók beültetésével nagyobb terhességi és beágyazódási arány érhető el. Sakkas és munkatársai [62] a korai osztódást mutató zygotában, vagy az abból létrejövő praeembryóban egy máig ismeretlen intrinsic faktor jelenlétét feltételezik, amely segíti a praeembryo fejlődését a megtermékenyítést követően. Saját adataink arra utalnak, hogy ez a kedvező hatás elsősorban a sejtosztódás ütemét befolyásolja, míg a praeembryo minőségre gyakorolt hatása nem teljesen egyértelmű. A kiváló minőségű praeembryók nagyobb gyakorisága a korai PNBD csoportokban mind a beültetett praeembryók esetében, mind az egyedi morfológiai vizsgálatok értékelésekor elsősorban a gyorsabb

sejtosztódásnak köszönhető. A fragmentáció mennyisége nem különbözött jelentősen a csoportok között és a morfológiai pontértékben is csak a beültetett praeembryók esetén találtunk minimális, bár szignifikáns különbséget.

A terhességi és beágyazódási aránnyal kapcsolatos eredményeink, összevetve a korai osztódással kapcsolatban korábban közölt adatokkal, arra utalnak, hogy megfelelő időpontban, a megtermékenyítést követő 22-25. óra között vizsgálva, a pronucleusok eltűnése éppolyan jól előrejelzi a fejlődő praeembryo életképességét, mint 3 órával később vizsgálva a korai osztódás. Ez alapján a korai pronucleus eltűnés vizsgálata, hasonlóan a korai osztódás vizsgálatához, kiegészítő szelekciós faktorként alkalmazható a beültetésre kerülő praeembryók kiválasztásában.

6. Következtetések

Az értekezés alapjául szolgáló tanulmány során alkalmazott részletes petesejt és zygota morfológiai vizsgálatok segítségével lehetőségünk nyílt a különböző típusú morfológiai elváltozások megtermékenyülésre és a későbbi praeembryo fejlődésre gyakorolt hatásának értékelésére. Eredményeink alapján az alábbi következtetéseket vontuk le:

1. Az 1. sarkitest morfológiai jellemzőinek vizsgálata

Az 1. sarkitest *fragmentáltsága nem befolyásolja hátrányosan a petesejtek megtermékenyülési arányát, valamint a fejlődő praeembryók minőségét* az intakt sarkitestet tartalmazó petesejtekkel szemben. Ezekből a fragmentált sarkitestet tartalmazó petesejtekből fejlődő praeembryók éppúgy alkalmasak a beültetésre, mint az intakt, normál méretű, kerek vagy ovális sarkitestet tartalmazó petesejtekből fejlődő praeembryók.

A *szokásosnál nagyobb, vagy éretlen sarkitest* jelenlétének hatása a jelenség ritka előfordulása miatt nehezen értékelhető. Eredményeink alapján úgy tűnik, hogy ez utóbbi sarkitest eltérések *jelentősen csökkentik az érintett petesejtek megtermékenyülési esélyét és a praeembryók életképességét*, ezért ezen rendellenességekkel bíró petesejtekből fejlődő praeembryók beültetését lehetőség szerint kerülni kell.

2. A perivitellináris tér méretének vizsgálata

A perivitellináris tér méretének *nincs hatása a petesejtek megtermékenyülési és osztódási arányára*. Ugyanakkor a *normál nagyságú perivitellináris térrel* rendelkező petesejtekből létrejött *praeembryók fejlődése gyorsabb, morfológiai minősége viszont gyengébb*, mint a megnagyobbodott perivitellináris térrel rendelkező petesejtekből fejlődött praeembryóké. A meglehetősen ellentmondásos eredmények – összevetve a szintén egymásnak ellentmondó korábbi irodalmi adatokkal – nem adnak elfogadható magyarázatot a perivitellináris tér méretének praeembryo minőségre gyakorolt hatásáról. Ezen a területen a biológiai okok további vizsgálata mellett *a különböző méretű perivitellináris térrel rendelkező petesejtek fejlődésének további megfigyelésére van szükség*.

3. A cytoplasma szemcsézettségének vizsgálata

A kisebb vagy nagyobb méretű cytoplasma szemcsézettségnek *nincs jelentős hatása a megtermékenyülésre és a későbbi praeembryo fejlődésre*. A cytoplasma színénél sötétebb fénytörő szemcsék, valamint krátterszerű szemcsézettség jelenléte a praeembryók fejlődésére *kedvezőtlen hatást gyakorolt*, amely csak lassan kialakulva, *hosszabb idő alatt jelentkezik*. Ezért úgy ítéljük meg, hogy ezen cytoplasma rendellenességeket mutató petesejtekből fejlődő praeembryók beültetését lehetőség szerint kerülni kell.

4. A cytoplasmában megfigyelhető vacuolumok hatásának vizsgálata

A petesejtek cytoplasmájában megfigyelhető vacuolumok közül *a kisebb méretűek nem, a jelentősebb mennyiségű vacuolum, valamint a zsákocskaszerű képletként jelentkező sima felszínű endoplasmaticus reticulum (sER) felhalmozódások jelenléte viszont jelentősen csökkenti a normális megtermékenyülés esélyét*. A jelentősebb mennyiségű vacuolumot tartalmazó petesejtekből fejlődő praeembryók minőségével kapcsolatban messzemenő következtetések ugyan nem vonhatók le, de adataink arra utalnak, hogy ezen praeembryók beültetését lehetőség szerint kerülni kell.

Amennyiben a petesejtben megfigyelhető *sER felhalmozódás* a megtermékenyülést és az első osztódást nem akadályozta, úgy az már *a későbbi sejtosztódásokat nem befolyásolja hátrányosan*. Az így létrejött praeembryók jobb minőségűek, mint a vacuolumot nem tartalmazó petesejtekből fejlődő praeembryók. A rendelkezésünkre álló adatok nem adnak egyértelmű magyarázatot a megfigyelt jelenségekre, ezért a *sER felhalmozódást tartalmazó petesejtek, és az abból fejlődő praeembryók részletes sejtbioológiai vizsgálata javasolt* annak érdekében, hogy a sER felhalmozódást tartalmazó petesejtekből fejlődő praeembryók beültetéséről körültekintő és megalapozott döntést hozhassunk.

5. A pronucleus eltűnés optimális vizsgálati időpontjának meghatározása

Szervezetén kívüli megtermékenyítést követően a praeembryók korai fejlődésének megítélése céljából *a pronucleusok eltűnésének vizsgálatára a megtermékenyítést követő 22. és 25. óra közötti idő a legalkalmasabb*. Ezen belül, a korábbi időszakban inkább azon kezelések esetében célszerű a vizsgálatot elvégezni, ahol a normálisan megtermékenyült petesejtek száma jelentősen meghaladja a beültethető

praeembryók számát. Kevesebb megtermékenyült petesejt esetében pedig inkább a megtermékenyítés utáni 24-25. órában érdemes az előmagok jelenlétét vizsgálni.

6. A korai pronucleus eltűnés hatása a praeembryók fejlődésére

A korai pronucleus eltűnés elsősorban a *sejtosztódás gyorsabb ütemét jelzi*, míg a praeembryo minőségre gyakorolt hatása adataink alapján nem igazolható. A pronucleus eltűnés vizsgálata alapján *gyorsabban fejlődő praeembryók beültetése nagyobb terhességi és beágyazódási arányt eredményezett*, mint a vizsgálat során intact pronucleust mutató praeembryók beültetése. Mindez arra utal, hogy *a pronucleusok eltűnése éppolyan jól előrejelzi a fejlődő praeembryo életképességét, mint 3 órával később vizsgálva a korai osztódás*. Ez alapján a korai pronucleus eltűnés vizsgálata, hasonlóan a korai osztódás vizsgálatához, *kiegészítő szelekciós faktorként alkalmazható* a beültetésre kerülő praeembryók kiválasztásában. További vizsgálatokat tartunk indokoltnak az IVF és ICSI megtermékenyítéssel létrejött zygóták vizsgálata optimális időpontjának meghatározásához.

7. Összefoglalás

A szervezeten kívüli megtermékenyítés (in vitro fertilisatio; IVF) során morfológiai jellemzőik alapján választják ki beültetésre kerülő praeembryókat. Ugyanakkor egyre több adat áll rendelkezésünkre arról, hogy a petesejtek és zygoták morfológiai jellemzői is előre jelezhetik a praeembryók életképességét. Jelen tanulmányunkban a petesejtek morfológia jellemzőit, valamint a korai praeembryo fejlődés időzítését megfigyelve azt vizsgáltuk, hogy e tulajdonságok milyen összefüggésben vannak a praeembryók későbbi fejlődésével és az IVF kezelések kimenetelével. Retrospektív tanulmányunk során a Semmelweis Egyetem I. Sz. Szülészeti és Nőgyógyászti Klinika Asszisztált Reprodukciós Osztályán 2001. október és 2005. február között végzett IVF kezelések adatait dolgoztuk fel. A petesejtek morfológiai vizsgálata során megfigyeltük az 1. sarki test jellemzőit, a perivitellináris tér méretét, valamint a különböző típusú szemcsék és vacuolumok előfordulását a cytoplasmában. A korai praeembryo fejlődés időzítését vizsgálva megfigyeltük a pronucleusok eltűnésének illetve az első sejtosztódás bekövetkezéének időpontját. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy az 1. sarkitest fragmentáltsága, a perivitellináris tér szokásosnál nagyobb mérete, a cytoplasma kisebb mértékű szemcsézettsége, valamint kisebb vacuolumok jelenléte nem befolyásolja hátrányosan a petesejtek megtermékenyülését és a praeembryók későbbi fejlődését. Ugyanakkor a szokásosnál lényegesen nagyobb, vagy éretlen sarkitest jelenléte, illetve fénytörő szemcsék, kráterszerű szemcsézetség, jelentősebb mennyiségű vacuolum valamint zsákocskaszerű képződmény előfordulása kedvezőtlenül befolyásolja a petesejtek megtermékenyülését és a praeembryók életképességét, ezért e petesejtekből létrejött praeembryók beültetését lehetőség szerint kerülni kell. A pronucleus eltűnés vizsgálatát a megtermékenyítést követő 22-25. óra között javasoljuk elvégezni. Ebben az időszakban vizsgálva a korai pronucleus eltűnést mutató praeembryók későbbi fejlődése is gyorsabb, morfológiai minőségük jobb, beültetésük pedig magasabb terhességi és beágyazódási arányt eredményez, mint azon praeembryók beültetése, amelyek a vizsgálat idején még intact pronucleusokat tartalmaztak. Mindezek alapján a korai pronucleus eltűnés vizsgálatát, mint kiegészítő szelekciós faktort javasoljuk a praeembryo morfológiai bírálati rendszerekbe beépíteni.

8. Abstract

Morphological assessment of oocytes, zygotes and embryos in a human in vitro fertilisation programme

During in vitro fertilization treatments embryos are selected for transfer on the basis of their developmental stage and morphology. However, more and more data are published, which demonstrate that morphological features of oocytes and zygotes can be related to the embryo viability. The aim of this study was to correlate morphological characteristics of oocytes and the timing of early embryonic development to the further embryo quality and the outcome of IVF treatments.

During our retrospective study we analysed the data of IVF treatments performed between 2001. October and 2005. February in the Division of Assisted Reproduction, First Department of Obstetrics and Gynaecology, Semmelweis University School of Medicine, Budapest. Assessment of oocyte morphology were included the characteristics of first polar body, the size of perivitelline space and granules or vacuoles occurred in the cytoplasm. During assessment of early embryonic development we observed the timing of the pronuclear membrane breakdown and the first cleavage.

On the basis of our results, we concluded that fragmented first polar body, enlarged perivitelline space, minor granulation of cytoplasm and occurrence of insignificant vacuolisation have no detrimental effect on fertilization and further embryo development. However, large or immature polar body, refractile bodies, dense centrally located granularity, considerable vacuolisation or occurrence of sacculus-like structure in the cytoplasm correlated to lower chance for fertilization and decreased embryo quality. Thus, we do not suggest transferring embryos developed from oocytes with these anomalies.

We suggest performing the assessment of early pronuclear breakdown between 22-25 hours post-insemination. Those embryos which passed pronuclear breakdown by this period have faster development and better morphological quality. Transferring these early developing embryos resulted in a higher pregnancy and implantation rate than those which had intact pronuclei at the assessment of early embryonic development. On the basis of our result, we suggest that assessment of early pronuclear breakdown should be included in the scoring system to select the most viable embryos for transfer.

9. Irodalomjegyzék

- 1 Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978;2:366.
- 2 The European IVF-monitoring programme, for the European Society of Hum Reproduction and Embryology (ESHRE): Assisted reproductive technology in Europe, 1997. Results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2001;16:384-391.
- 3 The European IVF-monitoring programme, for the European Society of Hum Reproduction and Embryology (ESHRE): Assisted reproductive technology in Europe, 2001. Results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2005;20:1158-1176.
- 4 Veeck LL. Atlas of the human oocyte and early conceptus. Baltimore: Williams & Wilkins. 1991; Vol II.1-255.
- 5 Hammitt DG, Syrop CH, Van Voorhis BJ, Walker DL, Miller TM, Barud KM. Maturational asynchrony between oocyte cumulus-coronal morphology and nuclear maturity in gonadotropin-releasing hormone agonist stimulations. *Fertil Steril* 1993;59:375-381.
- 6 Laufer N, Tarlatzis BC, DeCherney AH, Masters JT, Haseltine FP, MacLusky N, Naftolin F. Asynchrony between human cumulus-corona cell complex and oocyte maturation after human menopausal gonadotropin treatment for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1984;42:366-372.
- 7 Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992;340:17.
- 8 Veeck LL. An atlas of human gametes and conceptuses. New York: The Parthenon Publishing Group. 1999;46-51.
- 9 De Vos A, Van de Velde H, Joris H, Van Steirteghem A. In-vitro matured metaphase-I oocytes have a lower fertilization rate but similar embryo quality as

mature metaphase-II oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1999;14:1859-1863.

- 10 Fancsovits P, Tóthné GZs, Takács FZ, Murber Á, Papp Z, Urbancsek J. Éretlen (MI) petesejtek megtermékenyítésének lehetősége ICSI kezelések során. A Magyar Asszisztált Reprodukciós Társaság V. Nemzeti Kongresszusa. Visegrád. 2005. április 22-23, p17-18.
- 11 Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Tews G. Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: a review. *Hum Reprod Update* 2003;9:251-262.
- 12 De Sutter P, Dozortsev D, Quian C, Dhont M. Oocyte morphology does not correlate with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1996;11:595-597.
- 13 Xia P. Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. *Hum Reprod* 1997;12:1750-1755.
- 14 Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Feichtinger O, Tews G. Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 2000;15:427-430.
- 15 Kahraman S, Yakin K, Dönmez E, Samli H, Bahce M, Cengiz G, Sertyel S, Samli M, Imirzahoglu N. Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 2000;15:2390-2393.
- 16 Van Blerkom J. Occurrence and developmental consequences of aberrant cellular organization in meiotically mature human oocytes after exogenous ovarian hyperstimulation. *J Electron Microsc Tech* 1990;16:324-346.
- 17 El-Shafie M, Suosa M, Windt ML, Kruger TF. An atlas of the ultrastructure of human oocytes. A guide for assisted reproduction. Parthenon Publishing, New York, London, 2000;151-171.

- 18 Otsuki J, Okada A, Korimoto K, Nagai Y, Kubo H. The relationship between pregnancy outcome and smooth endoplasmatic reticulum clusters in MII human oocytes. *Hum Reprod* 2004;19:1591-1597.
- 19 Satthanathan AH. Ultrastructure of the human egg. *Hum Cell* 1997;10:21-38.
- 20 Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R. Oocyte morphology does not affect fertilization rate, embryo quality and implantation rate after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998;13:3431-3433.
- 21 Plachot M, Selva J, Wolf JP, Bastit P, de Mouzon J. Conséquences d'une dysmorphie ovocytaire sur la fécondation et le développement embryonnaire après injection intracytoplasmique d'un spermatozoïde. Étude prospective, multicentrique. *Gynéc Obst Fertil* 2002;30:772-779.
- 22 Loutradis D, Drakakis P, Kallianidis K, Milingos S, Dendrinos S, Michalas S. Oocyte morphology correlates with embryo quality and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection *Fertil Steril* 1999;72:240-244.
- 23 Sheral PF, Ranieri DM, Kinis A, Marchant S, Davies M, Khadum IM. Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1997;12:1267-1270.
- 24 Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Gaiswinkler U, Shebl O, Jesacher K, Tews G. Occurrence and developmental consequences of vacuoles throughout preimplantation development. *Fertil Steril* 2005;83:1635-1640.
- 25 Oldenbourg R. Polarized light microscopy of spindles. *Methods in Cell Biology* 1999 ; 61:175–208.
- 26 Konc J, Kanyo K, Cseh S. Visualization and examination of the meiotic spindle in human oocytes with polscope. *J Assist Reprod Genet.* 2004;21:349-53.
- 27 Rienzi L, Ubaldi F, Iacobelli M, Minasi MG, Romano S, Greco E. Meiotic spindle visualization in living human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005;10:192-198.
- 28 Eichenlaub-Ritter U, Schmiady H, Kentenich H, Soewarto D. Recurrent failure in polar body formation and premature chromosome condensation in oocytes from a human patient: indicators of asynchrony in nuclear and cytoplasmic maturation. *Hum Reprod* 1995;10:2343-2349.

- 29 Ebner T, Moser M, Yaman C, Feichtinger O, Hartl J, Tews G. Elective transfer of embryos selected on the basis of first polar body morphology is associated with increased rates of implantation and pregnancy. *Fertil Steril* 1999;72:599-603.
- 30 Ciotti PM, Notarangelo L, Morselli-Labate AM, Felletti V, Porcu E, Venturoli S. First polar body morphology before ICSI is not related to embryo quality or pregnancy rate. *Hum Reprod* 2004;19:2334-2339.
- 31 Verlinsky Y. Is there any predictive value of first polar body morphology for embryo genotype or developmental potential? *Reprod Biomed Online* 2003;7:336-341.
- 32 Hassan-Ali H, Hisham-Saleh A, El-Gezeiry D, Baghdady I, Ismaeil I, Mandelbaum J. Perivitellin space granularity: a sign of human menopausal gonadotrophin overdose in intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998;13:3425-3430.
- 33 Paz G, Amit A, Yavetz H. Case Report: Pregnancy outcome following ICSI of oocytes with abnormal cytoplasm and zona pellucida. *Hum Reprod* 2004;19:586-589.
- 34 Quinn P, Lydic ML, Ho M, Bastuba M, Hendee F, Brody SA. Confirmation of the beneficial effects of brief coincubation of gametes in human *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 1998;69:399-402.
- 35 Gianaroli L, Magli C, Ferraretti AP, Fiorentino A, Tosti E, Panzella S, Dale B. Reducing the time of sperm-oocyte interaction in human *in vitro* fertilization improves the implantation rate *Hum Reprod* 1996;11:166-171.
- 36 Van Vlerkom J, Davis P, Merriam J, Sinclair J. Nuclear and cytoplasmic dynamics of sperm penetration, pronuclear formation and microtubule organisation during fertilization and early preimplantation development in the human. *Hum Reprod Update* 1995;1:429-461.
- 37 Brewis IA, Moore DM. Molecular mechanisms of gamete recognition and fusion at fertilization. *Hum Reprod* 1997; 12 (Natl. Suppl.) JBFS, 2:156-165.
- 38 Plachot M. Fertilization. *Hum Reprod* 2000;15(S4):19-30.

- 39 Balakier H, MacLusky NJ, Casper RF. Characterization of the first cell cycle in human zygotes: implication for cryopreservation. *Fertil Steril* 1993;59:359-365.
- 40 Nagy ZP, Liu J, Joris H, Devroy P, Van Steirteghem A. Time-course of oocyte activation, pronucleus formation and cleavage in human oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1994;9:1743-1748.
- 41 Drosortsev D, De Sutter P, Rybouchkin A, Dhont M. Timing of sperm and oocyte nuclear progression after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1995;10:3012-3017.
- 42 Payne D, Flaherty SP, Barry MF, Matthews CD. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using a time-lapse video cinematography. *Hum Reprod* 1997;12:532-541.
- 43 Tesarik J, Kopecny V. Development of human male pronucleus: Ultrastructure and timing. *Gamete Research* 1989;24:135-149.
- 44 Van Wissen B, Wolf JP, Bomsel-Helmreich O, Frydman R, Jouannet P. Timing of pronuclear development and first cleavages in human embryos after subzonal insemination: influence of sperm phenotype. *Hum Reprod* 1995;10:642-648.
- 45 Capmany G, Taylor A, Braude PR, Bolton VN. The timing of pronuclear formation, DNA synthesis and cleavage in the human 1-cell embryo. *Mol Hum Reprod* 1996;2:299-306.
- 46 Neuber E, Rinaudo P, Trimarchi JR, Sakkas D. Sequential assessment of individually cultured human embryos as an indicator of subsequent good quality blastocyst development. *Hum Reprod* 2003;18:1307-1312.
- 47 Grossmann M, Calafell JM, Brandy N, Vanrell JA, Rubio C, Pellicer A, Egozcue J, Vidal F, Santaló J. Origin of triprounucleate zygotes after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1997;12:2762-2765.
- 48 Macas E, Imthurn B, Rosselli M, Keller PJ. The chromosomal complements of multipronuclear human zygotes resulting from intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1996;11:2496-2501.
- 49 Lim AST, Goh VHH, Su CL, Yu SL. Microscopic assessment of pronuclear embryos is not definitive. *Hum Genet* 2000;107:62-68.

- 50 Gras L, Trounson AO. Pregnancy and birth resulting from transfer of a blastocyst observed to have one pronucleus at the time of examination for fertilization. *Hum Reprod* 1999;14:1869-1871.
- 51 Tesarik J, Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod* 1999;14:1318-1323.
- 52 Wittemer C, Betthar-Lebugle K, Ohl J, Rongieres C, Nisand I, Gerlinger P. Zygote evaluation: an efficient tool for embryo selection. *Hum Reprod* 2000;15:2591-2597.
- 53 Tesarik J, Junca AM, Hazout A, Aubriot FX, Nathan C, Cohen-Bacrie P, Dumont-Hassan M. Embryos with high implantation potential after intracytoplasmic sperm injection can be recognised by a single, non-invasive examination of pronuclear morphology. *Hum Reprod* 2000;15:1396-1399.
- 54 Scott LA, Smith S. The successful use of pronuclear embryo transfer the day following oocyte retrieval. *Hum Reprod* 1998;13:1003-1013.
- 55 Schott L, Alvero R, Leondires M, Miller B. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod* 2000;15:2394-2403.
- 56 Ludwig M, Schöpfer B, Al-Hasani S, Diedrich K. Clinical use of a pronuclear stage score following intracytoplasmic sperm injection: impact on pregnancy rates under the conditions of the German embryo protection law. *Hum Reprod* 2000;15:325-329.
- 57 Gardner R. The early blastocyst is bilaterally symmetrical and its axis of symmetry is aligned with the animal-vegetal axis of the zygote in mouse. *Development* 1997;124:289-301.
- 58 Garello C, Baker H, Ray J, Montgomery S, Wilson P, Kennedy CR, Hartshorne GM. Pronuclear orientation, polar body placement, and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilisation: further evidence for polarity in human oocytes? *Hum Reprod* 1999;14:2588-2595.

- 59 McLaren A, Bowman P. Genetic effects on the timing of early development in the mouse. *J Embryol Exp Morphol* 1973;30:491-8.
- 60 Grisart B, Massip A, Dessy F. Cinematographic analysis of bovine embryo development in serum-free oviduct-conditioned medium. *J Reprod Fertil* 1994;101:257-64.
- 61 Shoukir Y, Campona A, Farley T, Sakkas D. Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Hum Reprod* 1997;12:1531-1536.
- 62 Sakkas D, Shoukir Y, Chardonnnes D, Bianchi PG, Campona A. Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability. *Hum Reprod* 1998;13:182-187.
- 63 Sakkas D, Percival G, D'Arcy Y, Khaldoun S, Afnan M. Assessment of early cleaving in vitro fertilized human embryos at 2-cell stage before transfer improves embryo selection. *Fertil Steril* 2001;76:1150-1156.
- 64 Bos-Mikich A, Mattos ALG, Ferrari AN. Early cleavage of human embryos: an effective method for predicting successful IVF/ICSI outcome. *Hum Reprod* 2001;16:2658-2661.
- 65 Petersen CG, Mauri AL, Ferreira R, Baruffi RLR, Franco Jr JG. Embryo selection by the first cleavage parameter between 25 and 27 hours after ICSI. *J Assist Reprod Genet* 2001;18:209-212.
- 66 Tsai YC, Chung MT, Sung YH, Tsai TF, Tsai YT, Lin LY. Clinical value of early cleavage embryo. *Int J Gynec Obst* 2002;76:293-7.
- 67 Windt ML, Kruger TF, Coetzee K, Lombard CJ. Comparative analysis of pregnancy rates after the transfer of early dividing embryos versus slower dividing embryos. *Hum Reprod* 2004;19:1155-1162.
- 68 Lundin K, Bergh C, Hardarson T. Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Hum Reprod* 2001;16:2652-7.
- 69 Wharf E, Dimitrakopulos A, Khalaf Y, Pickering S. Early embryo development is an indicator of implantation potential. *Reprod Biomed Online* 2004;8:212-8.

- 70 Hill GA, Freeman M, Bastias MC, Rogers BJ, Herbert CM, Osteen KG, Wentz AC. The influence of oocyte maturity and embryo quality on pregnancy rate in a program for in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 1989;52:801-806.
- 71 Staessen C, Camus M, Bollen N, Devroey P, Van Steirteghem AC. The relationship between embryo quality and the occurrence of multiple pregnancies. *Fertil Steril* 1992;57:626-630.
- 72 Cumminis JM, Breen TM, Harrison KL, Shaw JM, Wilson LM, Hennessey JF. A formula for scoring human embryo growth rates in in vitro fertilization: its value in predicting pregnancy and in comparison with visual estimates of embryo quality. *J In Vitro Fertil Embryo Transf* 1986;3:284-295.
- 73 Puissant F, Van Rysselberge M, Barlow P, Deweze J, Leroy F. Embryo scoring as a prognostic tools in IVF treatment. *Hum Reprod* 1987;2:705-708.
- 74 Fancsovits P, Bárándi Zs, Tóthné Gilán Zs, Urbancsek J. In vitro fertilisatiós kezelések során beültetett praeembryók minőségének hatása a többes terhességek gyakoriságára. *Magy Nőorv L* 2001;64:277-283.
- 75 Hardarson T, Hanson C, Sjögren A, Lundin K. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indicators for aneuploidy and multinucleation. *Hum Reprod* 2001;16:313-318.
- 76 Balakier H, Cadesky K. The frequency and developmental capability of human embryos containing multinucleated blastomeres. *Hum Reprod* 1997;12:800-804.
- 77 Kligman I, Benadiva C, Alikani M, Munné S. The presence of multinucleated blastomeres in human embryos is correlated with chromosomal abnormalities. *Hum Reprod* 1996;11:1492-1498.
- 78 Pelinck MJ, De Vos M, Dekens M, Van der Elst J, De Sutter P, Dhont M. Embryos cultured in vitro with multinucleated blastomeres have poor implantation potential in human in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998;13:960-963.
- 79 Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Valkenburg M, Van de Meerssche M, Ryckaert G et al.: Characterization of a top quality embryo, a step towards single embryo transfer. *Hum Reprod* 1999;14:2345-9.

- 80 Gardner DK, Schoolcraft WB. In vitro culture of human blastocyst. In: Jansen R, Mortimer D, szerk. Towards reproductive certainty: infertility and genetics beyond. Carnforth: Parthenon Press. 1999;378-388.
- 81 Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft B. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: toward a single blastocyst transfer. *Fertil Steril* 2000;73:1155-1158.
- 82 Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R. Blastocyst quality affects success of blastocyst-stage embryo transfer. *Fertil Steril* 2000;74:282-287.
- 83 Braude P, Bolton V, Moore S. Human gene expression first occurs between the four and eight cell stages of preimplantation development. *Nature* 1988;332:458-461.
- 84 Gardner, DK, Schoolcraft, WB, Wagley L, Schlenker T, Stevens J, Hesla J. A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1998;12:3434-3440.
- 85 Milki AA, Hinckley MD, Fisch JD, Dasig D, Behr B. Comparison of blastocyst transfer with day 3 embryo transfer in similar patient populations. *Fertil Steril* 2000;73:126-129.
- 86 Milki AA, Fish JD, Behr B. Two-blastocyst transfer has similar pregnancy rates and decreased multiple gestation rate compared with three blastocyst transfer. *Fertil Steril* 1999;72:225-228.
- 87 Urbancsek J, Bárándi Zs, Sztanyik L. Szervezeten kívüli megtermékenyítés (In: Nőgyógyászati endokrinológia, szerk: Urbancsek J., Papp Z.) Budapest: Springer Hungarica Kiadó. 1997;287-380.
- 88 Diedrich K, Diedrich C, Santos E, Zoll C, Al-Hasani S, Reissmann T, Krebs D, Klingmüller D. Suppression of the endogenous luteinizing hormone surge by the gonadotrophin-releasing hormone antagonist Cetrorelix during ovarian stimulation. *Hum Reprod* 1994;5:788-791.
- 89 Olivennes F, Fanchin R, Bouchard P, Taïeb J, Selva J, Frydman R. Scheduled administration of a gonadotrophin-releasing hormone antagonist (Cetrorelix) on

- day 8 of in-vitro fertilization cycles: a pilot study. *Hum Reprod* 1995;10:1382-1386.
- 90 Whittingham DG. Culture of mouse ova. *J Reprod Fertil* 1971;14S:7-21
- 91 Martin RH, Ko E, Rademaker A. Distribution of aneuploidy in human gametes: Comparison between human sperm and oocytes. *Am J Med Genet* 1991;39:321-331.
- 92 Munné S, Cohen J. Chromosome abnormalities in human embryos. *Hum Reprod Update* 1998;6:842-855.
- 93 Jones HW, Acosta A, Andrews MC, Garcia EJ, Jones GS, Mantzavinos T, McDowell J, Sandow B, Veeck L, Whibley T, Wilkes C, Wright G. Three years of in vitro fertilization at Norfolk. *Fertil Steril* 1984;42:826-834.
- 94 Puissant F, Van Rysselberge M, Barlow P, Deweze J, Leroy F. Embryo scoring as a prognostic tools in IVF treatment. *Hum Reprod* 1987;2:705-708.
- 95 Hill GA, Freeman M, Bastias MC, Rogers BJ, Herbert CM, Osteen KG, Wentz AC. The influence of oocyte maturity and embryo quality on pregnancy rate in a program for in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 1989;52:801-806.
- 96 Devreker F, Emiliani S, Revelard P, Van den Bergh M, Govaerts I, Engelert Y. Comparison of two elective transfer policies of two embryos to reduce multiple pregnancies without impairing pregnancy rates. *Hum Reprod* 1999;14:83-89.
- 97 Staessen C, Nagy ZP, Liu J, Janssenswillen C, Camus M, Devroey P, Van Sterteghem AC. One year's experience with elective transfer of two good quality embryos in the human in vitro fertilization and intracytoplasmatic sperm injection programmes. *Hum Reprod* 1995;10:3305-3312.
- 98 Steer CV, Millis CL, Tan SL, Campbesss S, Edwards RG. The cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an in-vitro fertilization and embryo transfer programme. *Hum Reprod* 1992;7:117-119.
- 99 Bergh, C. Single embryo transfer: a mini review. *Hum Reprod*, 2005;20:323-327.

- 100 Van Monfoort APA, Dumoulin JCM, Land JA, Coonen E, Derhaag JG, Evers JLH. Elective single embryo transfer (eSET) policy in the first three IVF/ICSI treatment cycles. *Hum Reprod* 2005;20:433-436.
- 101 Salumets A, Hydén-Granskog C, Suikkari AM, Tiitinen A, Tuuri T. The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality. *Hum Reprod* 2001;16:2177-2181.
- 102 Scott LA. Pronuclear scoring as a predictor of embryo development. *Reprod Biomed Online* 2003;6:201-214.
- 103 Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Gaiswinkler U, Wiesinger R, Puchner M, Tews G. Presence, but not type or degree of extension of a cytoplasmic halo has a significant influence on preimplantation development and implantation behaviour. *Hum Reprod* 2003;18:2406-2412.
- 104 Krey, LC, Grifo JA. Poor embryo quality: the answer lies (mostly) in the egg. *Fertil Steril* 2001;75:466-468.
- 105 Veeck LL. Oocyte assessment and biological performance. *Ann NY Acad Sci* 1998;541:259-274.
- 106 Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Yaman C, Pflieger U, Tews G. First polar body morphology and blastocyst formation rate in ICSI patients. *Hum Reprod* 2002;17:2415-2418.
- 107 Fancsovits P, Tothné GZs, Takács FZ, Murber Á, Papp Z, Urbancsek J. Effect of enlarged perivitelline space on embryo development. *Hum Reprod* 2005;20S:90.
- 108 Racowsky, C, Combelles CMH, Nureddin A, Pan Y, Finn A, Miles L, Gale S, O'Leary T, Jackson KV. Day 3 and day 5 morphological predictors of embryo viability. *Reprod Biomed Online* 2003;6:323-331.
- 109 Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Pölz W, Tews G. Embryo fragmentation in vitro and its impact on treatment and pregnancy outcome. *Fertil Steril* 2001;76:281-285.
- 110 Alikani M, Palermo G, Adler A, Bertoli M, Blake M, Cohen J. Intracytoplasmic sperm injection in dysmorphic human oocytes. *Zygote* 1995;3:283-288.

- 111 Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Jesacher K, Tews G. A prospective study on oocyte survival rate after ICSI: influence of injection technique and morphological features. *J Assist Reprod Genet* 2001;18:623-628.
- 112 Edwards RG, Fishel SB, Cohen J, Fehilly CB, Purdy JN, Slater JM, Steptoe PC, Webster JM. Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. *J In Vitro Fertil Embryo Transfer* 1984;1:3-23.
- 113 Salumets A, Hydén-Granskog C, Mäkinen S, Suikkari AM, Tiitinen A, Tuur T. Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures *Hum Reprod* 2003;18:821-825.
- 114 Fenwick J, Platteau P, Murdoch AP, Herbert M. Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos in vitro. *Hum. Reprod.*, 2002;17:407-412.
- 115 Nagy ZP, Janssenswillen C, Janssens, R et al. Timing of oocyte activation, pronucleus formation and cleavage in humans after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with testicular spermatozoa and after ICSI or in-vitro fertilization on sibling oocytes with ejaculated spermatozoa. *Hum Reprod* 1998;13:1606-1612.
- 116 Lundqvist M, Johansson U, Lundqvist Ö, Milton K, Westin C, Simberg N. Does pronuclear morphology and/or early cleavage rate predict embryo implantation potential? *Reprod Biomed Onlin* 2000;2:12-16.
- 117 Wittemer C, Bettahar-Lebugle K, Ohl J, Rongiéres C, Nisand I, Gerlinger P. Zygote evaluation: an efficient tool for embryo selection *Hum Reprod* 2000;15:2591-2597.

10. A doktori értekezés alapjául szolgáló saját közlemények jegyzéke

10.1. A doktori értekezés témájával kapcsolatos saját közlemények

1. Fancsovits P, Dinnyés A, Dohy J. Emlős embriók in vitro kultivációja (Szemleciikk). Magyar Állatorvosok Lapja 1998;120:152-158.
IF: 0,073
2. Fancsovits P, Bárándi Zs†, Tóthné GZs, Urbancsek J. In vitro fertilisatiós kezelések során beültetett praeembriók minőségének hatása a többes terhességek gyakoriságára. Magyar Nőorvosok Lapja 2001;64:277-283.
3. Fancsovits P, Bán Z, Tóthné GZs, Urbancsek J, Papp Z. Első lépéseink a praeimplantációs genetikai diagnosztikában: Blastomera biopsia. Orvosi Hetilap 2001;142:2427-2430.
4. Fancsovits P, Urbancsek J, Papp Z. In vitro fertilisatióval létrehozott praeembriók beágyazódási esélye a petesejt, a zigóta és a praeembryo morfológiai jellemzői alapján. Magyar Nőorvosok Lapja 2002;65:231-242.
(A közlemény elnyerte a Magyar Nőorvos Társaság és a Magyar Nőorvosok Lapja 2002. évi nívódíját)
5. Papp Z, Fancsovits P, Bán Z, Tóthné GZs, Urbancsek J. Előébrény-diagnosztikát követően fogant sikeres terhesség első hazai esete. Orvosi Hetilap 2002;143:2881-2883.
6. Fancsovits P, Toth L, Murber A, Szendei Gy, Papp Z, Urbancsek J. Catheter type does not affect the outcome of intrauterine insemination treatment: a prospective randomised study. Fertility and Sterility 2005;83:699-704.
IF: 3,170
7. Fancsovits P, Toth L, Takacs, FZ, Murber A, Papp Z, Urbancsek, J. Early pronuclear breakdown is a good indicator of embryo quality and viability. Fertility and Sterility 2005;84:881-887.
IF: 3,170
8. Urbancsek J, Fancsovits P, Murber Á, Tóthné G Zs, Hauzman E, Papp Z. In vitro fertilizációs kezelések klinikánkon: Tíz év munkája a számok és eredmények tükrében (1994–2003). Orvosi Hetilap 2006;147:7-14.
9. Fancsovits P, Takács FZ, Tóthné GZs, Urbancsek J. A korai praeembryo fejlődés vizsgálata és ennek jelentősége in vitro fertilizációs kezelések során. Magyar Nőorvosok Lapja 2006;69:31-39.

10. Fancsovits P, Tóthné GZs, Murber Á, Takács FZ, Papp Z, Urbancsek J. Correlation between first polar body morphology and further embryo development. Acta Biologica Hungarica 2006; (közlésre elfogadva)

IF: 0,425

11. Fancsovits P, Takács FZ, Tóthné GZs, Murber Á, Urbancsek J. In vitro fertilisatiós kezelések során nyert petesejtekben megfigyelhető vacuolumok hatása a praeembryók életképességére. Magyar Nőorvosok Lapja 2006; (közlésre elfogadva)

10.2. A doktori értekezés témájával kapcsolatos, nemzetközi folyóiratokban megjelent idézhető absztraktok

12. Fancsovits P, Bárándi Zs†, Fedorcsák P, Tóthné GZs, Papp Z, Urbancsek J. Effect of quality and cell number of transferred embryos on multiple pregnancy rate. Human Reproduction 2000;15S:124-125.

IF: 2,997

13. Fancsovits P, Tóthné GZs, Papp Z, Urbancsek J. Effect of oxygen concentration on embryonic development in vitro. Human Reproduction 2001;16(S1):165.

IF: 2,987

14. Fancsovits P, Bán Z, Tóthné GZs, Urbancsek J, Papp Z. Blastomere biopsy as the first step in preimplantation diagnosis. Fetal Diagnosis and Therapy 2002;17(S1):31.

IF: 1,053

15. Fancsovits P, Tothne GZs, Takacs FZ, Papp Z, Urbancsek J. Is there a relationship between the size of perivitelline space of oocytes and fertilization rate, cleavage rate and embryo morphology? Reproductive Biomedicine Online, 2003;7(S1):26.

16. Fancsovits P, Tothne GZs, Takacs FZ, Papp Z, Urbancsek J. Relationship between cytoplasmic granularity of oocytes and development of human embryos. Human Reproduction 2004, 19(S1):i23.

IF: 3,365

17. Fancsovits P, Tothne G.Zs, Takacs F.Z, Murber A, Papp Z, Urbancsek J. Effect of enlarged perivitelline space on embryo development. Human Reproduction 2005;20(S1):i90.

IF: 3,365

18. Fancsovits P, Tóthné GZs, Takács FZ, Murber Á, Papp Z, Urbancsek J. Factors affecting multinucleation in human embryos. Human Reproduction 2006; (közlésre elfogadva)

IF: 3,365

10.3. A doktori értekezés témájával kapcsolatos egyéb idézhető absztraktok

19. Fancsovits P, Báráncsi Zs†, Tóthné GZs, Hauzman E, Papp Z, Urbancsek J. In vitro fertilisációs kezelések során beültetett praembriók minőségének hatása a többes terhességek gyakoriságára. Program és absztraktok a MART III. Kongresszusáról. 2001;P-9.
20. Fancsovits P. A petefészekszövet és az ivarsejtek cryopreservációja és in vitro érlelése. Az ivarsejt és praembrió bírálati rendszerek szerepe a kezelés kimenetelének előrejelzésében. Nőgyógyászati és Szülészeti Továbbképző Szemle, 2002;4 (S1):32-33.
21. Fancsovits P, Bán Z, Tóthné GZs, Urbancsek J, Papp Z. Blastomera-biopszia, mint a praeimplantációs genetikai diagnosztika első lépése. Nőgyógyászati és Szülészeti Továbbképző Szemle, 2002;4(S1):27.
22. Fancsovits P, Tothne GZs, Papp Z, Urbancsek J. Is there a relationship between cytoplasmic granularity of oocytes and fertilization rate, cleavage rate and embryo morphology? Program and symposium syllabus of ESHRE Campus Symposium, Mammalian oogenesis and folliculogenesis: in vivo and in vitro approaches 2003; P4.
23. Fancsovits P, Tóthné GZs, Takács FZ, Papp Z, Urbancsek J. A petesejt citoplazmájában megfigyelhető szemcsészettség hatása a megtermékenyülési és osztódási arányra valamint a praembrió minőségére. Programok és összefoglalók a MART IV. Kongresszusáról. 2003;51- 53.
24. Fancsovits P, Tothne GZs, Takacs FZ, Papp Z, Urbancsek J. Does the type of culture media used effect the results of a cryopreservation program? A preliminary study. Program and symposium syllabus of ESHRE Campus Symposium, Cryobiology and cryopreservation of human gametes and embryos. 2004;100-101.
25. Fancsovits P, Tóth L, Ruzs A, Romics I, Papp Z, Urbancsek J. Cryopreservált hereszövetből származó hímvarsejtek morfológiai eltéréseinek hatása az in vitro fertilisációs kezelések eredményességére. Program és absztraktok a Magyar Urológusok Társasága, Andrológiai Szekció 29. Tudományos Üléséről. 2005;27.
26. Fancsovits P, Tóthné GZs, Takács FZ, Murber Á, Papp Z, Urbancsek J. Éretlen (MI) petesejtek megtermékenyítésének lehetősége ICSI kezelések során. Program és absztraktok a MART V. kongresszusáról 2005;17-18.
27. Fancsovits P, Takacs FZ, Tothne GZs, Papp Z, Urbancsek J. Correlation between first polar body morphology and embryo quality. Final program and abstracts of Serono Symposia International: How to improve ART outcome by gamete selection. 2005; P3.

10.4. A tudományos munkásságot megalapozó egyéb közlemények

28. Kissné DDX, Hargitai Cs, Fancsovits P, Péczely P. Seasonal pattern of reproduction of domestic gander (*Anser anser*). Bulletin Univ. Agric. Sci. 75th Anniversary. Ed II. 1995;95-96.
29. Urbancsek J, Vass Z, Fancsovits P, Hauzman E, Dévényi N, Tóthné GZs, Pohola E. Kezdeti tapasztalataink a GnRH-antagonista cetorelix in vitro fertilizációs kezelésben való alkalmazása során. Magyar Nőorvosok Lapja 2000;63:357-362.
30. Fancsovits P. Kommentár az „Alkalmazható-e az emberi klónozás a meddőség kezelésére” című cikkhez. Nőgyógyászati és Szülészeti Továbbképző Szemle. 2001;3:283-289.
31. Bán Z, Fancsovits P, Nagy B, Kamaszné HM, Urbancsek J, Papp Z. Első lépéseink a praeimplantációs genetikai diagnosztikában: Genetikai vizsgálatok. Orvosi Hetilap 2001;142:2487-2492.
32. Urbancsek J, Hauzman E, Fancsovits P, Murber Á, Pappné RJ, Tóthné GZs, Papp Z. A GnRH-antagonista cetorelix egyszeri és többszöri adagolási séma szerinti alkalmazásával szerzett tapasztalatok összehasonlítása in vitro fertilizációs kezelések során. Magyar Nőorvosok Lapja 2002;65:147-153.
33. Fancsovits P. Kommentár az „Ivarsejtfagyasztás és petefészekszövet-transzplantáció” című cikkhez. Nőgyógyászati és Szülészeti Továbbképző Szemle. 2004;6:271-277.
34. Hauzman E, Lagarde AR, Nagy K, Fancsovits P, Murber Á, Jánoki Gy, Papp Z, Urbancsek J. Prognostic value of serum CA-125 measurements on stimulation day 1 and on the day of oocyte pickup in the prediction of IVF treatment outcome. Journal of Assisted Reproduction and Genetics 2005;22: 265-268.

IF: 0,963

35. Murber Á, Fancsovits P, Urbancsek J. In vitro fertilizációs kezelés késői szövődményeként létrejött adnextorsio a terhesség első trimeszterében. Magyar Nőorvosok Lapja 2005;68:271-274.
36. Murber Á, Fancsovits P, Szendei Gy, Urbancsek J. Intrauterin inszeminációs kezelések eredményessége az I. Számú Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika Asszisztált Reprodukciós Osztályának 10 éves működése során. Magyar Nőorvosok Lapja 2005;68:245-249.

10.5. A tudományos munkásságot megalapozó egyéb absztraktok

37. Fancsovits P, Bodó Sz, Baranyai B, Dinnyés A, Dohy J. Comparison of defined embryo culture systems in cattle. Theriogenology 1998;49:199.

IF: 1,760

38. Fancsovits P, LeBourhis D, Heyman Y. Comparison of INRA–B2 and Tissue Culture Medium–199 for *in vitro* production of bovine embryos. Proceedings of the 14th meeting of the European Embryo Transfer Association, 1998;154.
39. Bán Z, Nagy B, Fancsovits P, Urbancsek J, Papp Z. Sex determination and detection of delta F508 mutation in human blastomeres by F-PCR. *European Journal of Human Genetics* 2001;9(S1):102.
IF: 3,173
40. Bán Z, Fancsovits P, Nagy B, Kamaszné HM, Urbancsek J, Papp Z. Sex determination and detection of Δ F-508 mutation in human blastomeres using fluorescent-PCR. *Reprod. Toxicol.* 2001;15:451.
IF: 1,697
41. Murber Á, Fancsovits P, Tóthné GZs, Hauzman E, Papp Z, Urbancsek J. Effect of catheter type on the outcome of intrauterin insemination cycles. A prospective randomized study. *Human Reproduction* 2002;17(S1):118.
IF: 3,253
42. Bán Z, Fancsovits P, Nagy B, Kamaszné HM, Urbancsek J, Papp Z. First attempts in Hungary in sex determination and in detection of delta-F 508 mutation in human blastomeres for preimplantation genetic diagnosis. *Fetal Diagnosis and Therapy* 2002;17(S1):31.
IF: 1,053
43. Murber Á, Fancsovits P, Tóthné GZs, Hauzman E, Urbancsek J. Progressive motile sperm count is predictive for treatment outcome in intrauterine insemination cycles. *Fetal Diagnosis and Therapy* 2002;17(S1):32.
IF: 1,053
44. Bán Z, Fancsovits P, Nagy B, Kamaszné HM, Urbancsek J, Papp Z. A nemi chromosomák és a cysticus fibrosis delta-F 508 mutáció vizsgálata blastomera-sejtekben. *Nőgyógyászati és Szülészeti Továbbképző Szemle*, 2002;4(S1):24-25.
45. Murber Á, Fancsovits P, Tóthné GZs, Hauzman E, Urbancsek J. A progresszíven mozgó spermiumok száma meghatározó a kezelés eredményessége szempontjából intrauterin inseminációs kezeléseknél. *Nőgyógyászati és Szülészeti Továbbképző Szemle*, 2002;4(S1):40-41.
46. Bán Z, Fancsovits P, Gilán Zs, Urbancsek J, Papp Z. First attempts in Hungary at sex determination and detection of Δ F508 mutation in human blastomeres for PGD. *Reproductive Biomedicine Online*, 2003;7(S1):45.

47. Murber Á, Fancsovits P, Hauzman E, Papp Z, Urbancsek J. IVF-kezelések során alkalmazott kombinált GnRH-agonista+hMG és GnRH-antagonista+hMG stimulációk összehasonlítása: eset-kontroll tanulmány. Program és absztraktok a MART V. kongresszusáról 2005;29-30.

Tudományos közlemények:

Nemzetközi folyóiratban:	4 (IF: 7,728)
Magyar nyelvű folyóiratban:	15 (IF: 0,073)
Idézhető absztraktok:	19 (IF: 29,121)
Előadáskivonatok	
kongresszusi kiadványokban:	9

11. Köszönetnyilvánítás

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

Hálásan köszönöm *dr. Papp Zoltán* Professzor Úrnak mindazt a segítséget, amivel hozzájárult, hogy dolgozatom elkészülhessen. Köszönöm, hogy megadott minden lehetőséget szaktudásom állandó fejlesztésére, hogy biztosította a legmagasabb szintű, tudományos igényességű klinikai embriológiai munka feltételeit. Köszönöm mindazt a bizalmat, emberi és szakmai támogatást, amelyet kezdettől fogva segítette munkámat.

Hálásan köszönöm témavezetőmnek, *dr. Urbancsek János* egyetemi docensnek a bizalmát, hogy – mint pályakezdő embriológust – alkalmasnak talált arra, hogy a Semmelweis Egyetem I. Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika Assisztált Reprodukciós Osztályának Embriológiai Laboratóriumában dolgozhassak. Köszönöm a bátorítást, amellyel átsegített a nehézségeken, a türelmet, amellyel átolvasta és kijavította kézírataimat. Köszönök minden biztatást, tanácsot, szakmai és emberi segítséget, amelyet a több éves kutatómunkához, és ezen doktori értekezés elkészítéséhez megkaptam.

Doktori értekezésem elkészülése nem csupán az elmúlt néhány év tudományos kutatómunkájának az eredménye, hanem egy hosszú folyamat része. Szeretnék mindazoknak köszönetet mondani, akik mellettem álltak és segítettek ezen az úton.

Hálával tartozom *dr. Rékási Józsefnek*, a Pannonhalmi Bencés Gimnázium biológiatanárának, akinek oktató és nevelő munkája nagymértékben hozzájárult ahhoz, hogy megismertem, és megszerettem a biológiát. Szakmai tudása, a tudomány iránti elkötelezettsége, szigorú következetessége és embersége példaképpé emelte őt számomra.

Köszönöm *prof. dr. Péczely Péternek* és *dr. Forgó Viktóriának*, a Gödöllői Agrártudományi Egyetem Szaporodásbiológiai Tanszéke munkatársainak, hogy – egyetemi hallgatóként – felkeltették szakmai érdeklődésemet az endokrinológia és szaporodásbiológia iránt, és első tudományos munkáimat irányították.

Köszönöm prof. *dr. Székely Csabának*, hogy a Gödöllői Agrártudományi Egyetem dékánjaként lehetővé tette számomra, hogy megismerkedhessek az in vitro fertilisatio technológiájával az Amerikai Egyesült Államokban.

Hálával gondolok prof. *dr. Dohy János* akadémikusra (†2002), az MTA-GATE Állatnemesítési Kutatócsoport alapítójára és volt vezetőjére, aki egyetemi éveimet követően irányította tudományos tevékenységemet.

Köszönettel tartozom *dr. Dinnyés Andrásnak* és a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont Embriológiai Laboratóriuma dolgozóinak, akik segítségével elsajátítottam az in vitro fertilisatio laboratóriumi módszereit. A kutató laboratóriumban szerzett tapasztalatok képezték alapját a későbbi klinikai embriológiai pályafutásomnak.

Tisztelettel gondolok *dr. Báráncsi Zsoltra* (†1999), az Embriológiai Laboratórium alapítójára, akinek súlyos betegsége majd halála csak rövid időre engedte, hogy munkatársa lehessen. Munkássága meghatározó volt az Embriológiai Laboratóriumban, amely a mai napig is az általa bevezetett irányelvek szerint működik.

Köszönet illeti az Asszisztált Reprodukciós Osztály valamennyi korábbi és jelenlegi munkatársát mindazért a segítségért, amellyel támogatták tudományos törekvéseimet. Külön köszönöm *Tóth Lászlóné* vezető embriológiai szakasszisztensnek mindazt az önzetlen segítséget és támogatást, amit az embriológiai munka során nyújtott számomra. Kitartása és precizitása nagymértékben hozzájárult a dolgozatom alapját képező tudományos adatok gyűjtéséhez.

Köszönöm *dr. Rusz Andrásnak* és a Semmelweis Egyetem Urológiai Klinika munkatársainak, hogy az IVF kezelések során szükséges andrológiai vizsgálatok, valamint herebiopsziák elvégzésével segítséget nyújtottak munkámhoz.

Végül, de természetesen nem utolsósorban szeretném hálámat és köszönetemet kifejezni családomnak mindazért a támogatásért és biztatásért, amellyel segítették munkámat.