

Endometriózisos betegek *in vitro* fertilizációval létrejött blasztocisztáinak vizsgálata *time-lapse* technika alkalmazásával

36. OTDK Biológia Szekció

Készítette:

Toldi Teodóra

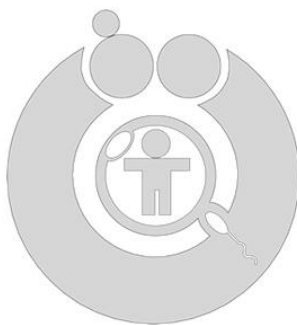
Biológus MSc., V. félév

Küldő intézmény: Eötvös Loránd Tudományegyetem – Természettudományi Kar

Témavezetők:

Dr. Fancsovits Péter, tudományos főmunkatárs, laborvezető, Semmelweis Egyetem, Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika, Baross utcai részleg, Asszisztált Reprodukciós Osztály

Nemes Annamária, klinikai embriólogus, Semmelweis Egyetem, Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika, Baross utcai részleg, Asszisztált Reprodukciós Osztály



Budapest, 2023

Tartalomjegyzék

Rövidítésjegyzék	3
1. Bevezetés	4
1.1. Az endometriózis	4
1.2. Az <i>in vitro</i> fertilizációs kezelés	5
1.2.1. Petefészek stimuláció és petesejtnyerés	5
1.2.2. Az ondóminta előkészítése	6
1.2.3. Az <i>in vitro</i> megtermékenyítés módszerei	6
1.2.4. Embriótenyésztés, korai embriófejlődés folyamata	7
1.2.5. Az embrióbeültetés és a mélyfagyasztás	9
1.3. A <i>time-lapse</i> technika előnyei	9
2. Célkitűzések	10
3. Anyag és módszer	10
3.1. A vizsgált csoportok definiálása	10
3.2. A <i>time-lapse</i> technika alkalmazása az embrióbírálat során	11
3.3. A vizsgált paraméterek	11
3.4. Embrióbírálati szempontok	11
3.5. Statisztikai számítások	14
4. Eredmények	14
5. Megbeszélés	17
6. Összefoglalás	19
7. Köszönetnyilvánítás	20
8. Irodalomjegyzék	21

Rövidítésjegyzék

BMI – testtömeg-index, *Body Mass Index*

CLI – sárgatest elégtelenség, *Corpus Luteum Insufficiency*

EUG – méhen kívüli terhesség, extrauterin graviditás

FSH - follikulus stimuláló hormon

hCG - humán korion-gonadotropin hormon

ICM – embriócsómó, *Inner Cell Mass*

ICSI – intracitoplazmatikus spermium injektálás, *Intracytoplasmic Sperm Injection*

IVF – *in vitro* fertilizáció

TE – trofektoderma, *Trophectoderm*

TLT – *time-lapse* technika

WHO – Egészségügyi Világszervezet, *World Health Organization*

1. Bevezetés

Az első sikeres, állatokon végzett szervezeten kívüli megtermékenyítés Schenk nevéhez fűződik. 1880-ban sikerült nyúl és tengerimalac petesejteket *in vitro* fertilizációval (IVF) megtermékenyítenie, valamint a létrejött embriók osztódását megfigyelnie [1, 2].

Csaknem 100 évvel később, 1978 nyarán, Angliában született meg az első szervezeten kívüli megtermékenyítés útján fogant gyermek. Az első szüléssel végződő humán IVF kezelést végző szakemberek - Christopher Steptoe és Robert Geoffrey Edwards – eredményeikről 1978-ban számoltak be a Nature című folyóiratban [3].

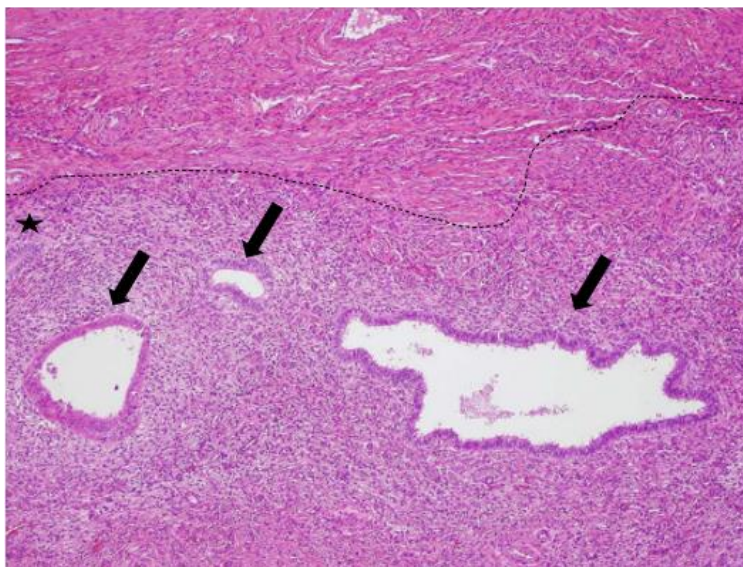
Az elmúlt közel 45 év alatt, a meddőség eredményes kezeléseként számon tartott IVF révén megközelítőleg 8 millió gyermek jött világra [4].

1.1. Az endometriózis

A vizsgálat során az endometriózis korai embriófejlődésre gyakorolt hatását tanulmányoztam.

Endometriózis esetén a méhnyálkahártyát alkotó endometrium a méh üregén kívül is megtalálható [5], a szövet kiterjedhet akár a petefészkekre (1. ábra), a hashártyára, a húgyhólyagra vagy a végbélre is [6]. A betegség hivatalos diagnosztizálása laparoszkópiás eljárással történik, a gyanús elváltozásokon szövettani vizsgálatot végeznek [7]. Az endometriózis egy gyulladásos, ösztrogén függő betegség, mely számos módon ronthat a beteg életminőségén, mivel a kórkép jellemzően fájdalmas menstruációval, kóros kismencedei fájdalommal és akár meddőséggel is társulhat [5, 6].

Az endometriózis a reprodukzív korban lévő nők kb. 10%-át érintő betegség [8-10], emellett a meddőséggel küzdő nők több mint 50%-nál akadályozza meg a spontán teherbeesést [8, 9]. Egyelőre még nem teljesen tisztázott, hogy az endometriózis milyen módon okoz meddőséget az érintett nők esetében, mindenesetre gyakrabban fordulnak elő körükben anatómiai, endokrin vagy immunrendszeri rendellenességek, gyulladásos folyamatok [11]. Számos tanulmány ír arról, hogy az endometriózisos nők esetében alacsonyabb az embriók beágyazódásának esélye. Ennek hátterében állhatnak a betegséggel járó krónikus gyulladásos folyamatok, endokrinológiai rendellenességek [12]. Más forrásokban arról olvashatunk, hogy a csökkent beágyazódási arány mellett az endometriózisos nők szerényebb petefészektartalékkal, illetve rosszabb minőségű petesejtekkel és embriókkal rendelkeznek [13, 14]. Utóbbiak hátterében többek között a gyulladásos folyamatokban részt vevő citokinek és kemokinek petesejtekkel és embriókkal való interakciója állhat [15].



1. ábra. Kiterjedt endometriózis szövettani képe a petefészek alapállományában. Az endometrium alapszövetében (*) változatos méretű és alakú, endometriális hámmal bélelt mirigyek (→) láthatók [16] – a kép a szerző által módosítva.

1.2. Az *in vitro* fertilizációs kezelés

In vitro fertilizáció során a megtermékenyítés a szervezeten kívül, laboratóriumi körülmények között történik. Az IVF kezelés egy többlépcsős folyamat, melynek részleteit az alábbi fejezetben röviden ismertetem.

1.2.1. Petefészek stimuláció és petesejtnyerés

A szervezeten kívüli megtermékenyítést minden esetben megelőzi egy személyre szabott módon, hormoninjekciókkal kiváltott **petefészek stimuláció**. Az eljárás célja, hogy az adott női ciklus során egynél több tüsző induljon fejlődésnek [17].

A stimuláció végén humán korion-gonadotropin hormon (hCG) kerül beadásra. Az **ovuláció indukciójára** akkor kerülhet sor, ha az ultrahangvizsgálat során legalább egy 16-18 mm átmérőjű, ill. további két-három 15-16 mm átmérőjű tüsző látható, valamint, ha a szérum ösztrogén-szintje elérte a tüszőnkénti 200-300 pg/ml-es értéket [17].

Az ovuláció indukcióját követő 36 órán belül **tüszőpunkcióra** kerül sor, ami a hüvelyen keresztül, ultrahang-ellenőrzés mellett végzett tüszőfolyadék-leszívást jelenti [17].

A petesejtnyerés során leszívott tüszőfolyadék az embriológiai laboratóriumba kerül, ahol a kezelést végző szakemberek megkezdik a petesejtek keresését. A nyert petesejteket tiszta tápoldatba helyezik, így kerülnek az inkubátorba, ahol 4-6 órán át tartó előérlelésük következik [2].

1.2.2. Az ondóminta előkészítése

A petesejtnyeréssel párhuzamosan a pár férfi tagja által adott ondóminta feldolgozásra kerül. Az előkészítés típusa a minta minőségétől függ.

Amennyiben a minta a WHO (World Health Organization) ajánlásainak megfelelő (spermiumkoncentrációra, motilitásra és morfológiára vonatkozó) értékekkel rendelkezik, ún. felúsztatásos technika (*swim up*) alkalmazható [18, 19]. Rosszabb minőségű minta esetén a sűrűség grádiens (alapú) centrifugálás technikáját alkalmazzák [18, 19].

Extrém esetekben azoospermia (az ondómintában nincs jelen spermium) ill. necrozoospermia (az ondómintában jelen levő valamennyi spermium elhalt) figyelhető meg. Mivel az ondóminta egyik esetben sem tartalmaz életképes hímivarsejtet, ezért a pár férfi tagján herebiopsziát végeznek. Az így kapott hereszövet egyik része kivizsgálásra, míg másik része mélyfagyasztásra kerül. A fenn említett esetekben a megtermékenyítés a hereszövetmintából nyert spermiummal történik [20].

1.2.3. Az *in vitro* megtermékenyítés módszerei

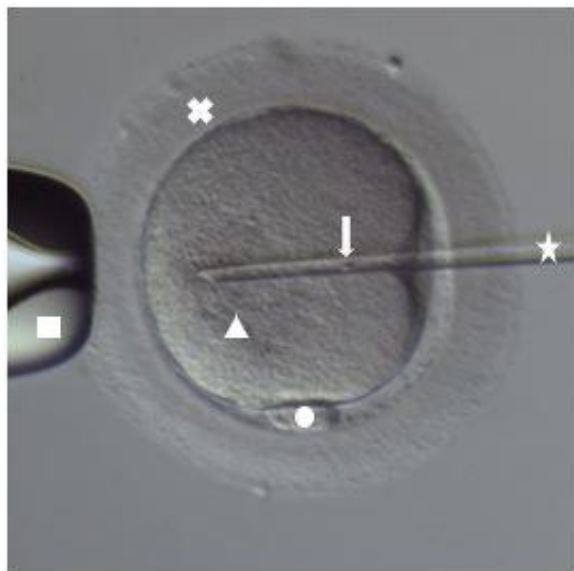
In vitro fertilizáció során a megtermékenyítés a szervezeten kívül, laboratóriumi körülmények között történik.

Amennyiben az ondóminta több mint egymillió progresszíven mozgó hímivarsejtet tartalmaz, illetve a feldolgozott spermaminta motilitása legalább 75-80%, hagyományos *in vitro* fertilizációs kezelés végezhető. Ebben az esetben a petesejtek megtermékenyítése a hímivarsejtek morfológiájától, valamint a nő életkorától függően 100 000 - 500 000 db/ml spermiumkoncentrációjú fertilizációs médiummal kerül elvégzésre. A petesejtek és hímivarsejtek együtt inkubálása a petesejtnyerés után 6 órával veszi kezdetét, és kb. 16-18 órán át tart. [20].

Amennyiben az ondóminta feldolgozása után kevés számú, nem megfelelő mozgású spermium áll rendelkezésre, a megtermékenyítés során intracitoplazmatikus spermiuminjektálást (*Intracytoplasmic Sperm Injection*, ICSI) alkalmaznak ([videó a folyamatról](#)). Az eljárást a 2. ábra mutatja be.

Számos tanulmány számolt be arról, hogy az endometriózis alacsonyabb petesejtszámmal társulhat [21, 22], így ezekben az esetekben is javasolt lehet az ICSI eljárás alkalmazása, azonban az utóbbi néhány évben több irodalmi adat is megjelent azzal kapcsolatban, hogy az endometriózisos esetekben az ICSI eljárás nem nyújt kedvező eredményességet a megtermékenyítés tekintetében. Vannak betegségek (ilyen

az endometriózis is), melyek csökkentik a petesejtek életképességét, így azok az ICSI eljárással járó mechanikai (szűrő) hatást nem viselik jól, esetükben az ICSI eljárás hatékonysága rosszabb, mint a hagyományos IVF eljárásé [23].



2. ábra. Az intracitoplazmatikus spermiuminjektálás. A képen a *zona pellucida* (x) által körülvevett petesejt és annak citoplazmája látható (▲), melybe üvegpipetta (*) segítségével előzőleg mozgásképtelenné tett spermiumot (→) injektálnak. A petesejt alatt jelen van egy sarki test is (●). A balról benyúló tű (■) a petesejtet rögzíti [20]. (A kép az SE Asszisztált Reprodukciós Osztályának embriológiai laboratóriumában készült.)

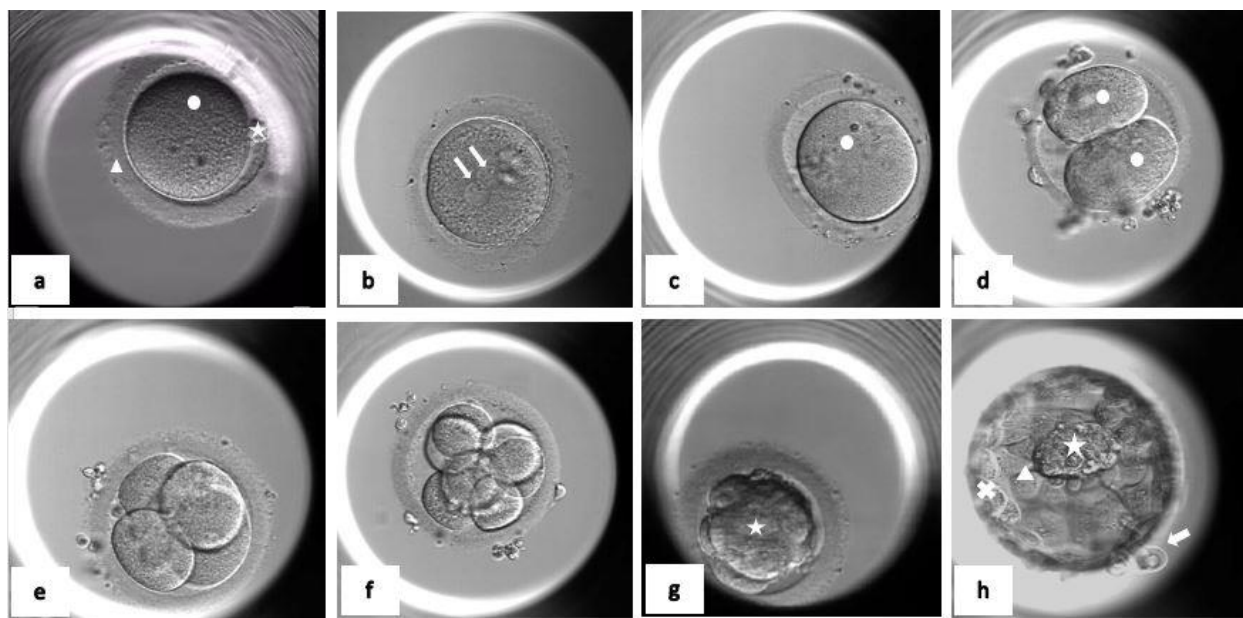
1.2.4. Embriótenyésztés, korai embriófejlődés folyamata

Az embriók tenyésztése inkubátorban valósul meg. (A vizsgálatban használt inkubátorról bővebben a *A time-lapse technika előnyei* című fejezetben írok.)

A megtermékenyítés utáni 7. óra környékére a normál megtermékenyülésű embriók esetében két előmag (anyai és apai *pronucleus*) jelenik meg. Ezek a fertilizációt követő 25-26 órán belül eltűnnek. Az előmagok megjelenése jelzi a sikeres megtermékenyülést. Mindezek után, az embriófejlődés második napjának elején, a 24-27. óra környékén kezdetét veszi az első [24, 25], majd a 37-38. óra környékén a második sejtosztódás [24].

A második és harmadik napon az embrió eléri a 4 majd 8 sejtjes állapotát. A már meglévő sejtek osztódása tovább folytatódik, mely révén az embriót alkotó blasztomérák száma folyamatosan gyarapodik. A sejtek egy idő után tömörülni, kompaktálódni kezdenek, majd a 4. nap elején az embrió szedercsíra (*morula*) állapotba kerül [26].

Az 5. napra a *morula* közepén barázdálódási üreg (blastocoel) alakul ki, ami az embrió méretének növekedésével jár, ezáltal az azt körülvevő peteburkot megfeszíti, elvékonyítja. Az így létrejött blasztocisztán belül kialakul két jellegzetes sejtvonal, az embriócsomó sejtei (ICM) és a trofektoderma (TE) sejtek, melyeket citoplazmahidak köthetnek össze. Blasztociszta állapotban az embrió növekedni kezd, ennek következtében az elvékonyodó peteburok (*zona pellucida*) átszakad. Nem sokkal ezután a barázdálódási üreg mérete lecsökken, az expandált blasztociszta elkezd kibújni az átszakított peteburokból (3. ábra). A folyamat az embrió további növekedését és a méh endometriumába való beágyazódását teszi lehetővé [24].



3. ábra. A korai embriófejlődés folyamata. a) Érett (a meiózis második fázisában lévő) petesejt (●). Emellett jól látható egy sarkitest (*) a perivitellinális térben, ill. a petesejtet körülvevő peteburok. b) A megtermékenyülést jelző két előmag megjelenése (→). c) Zigóta (●) az előmagok eltűnése után. d) Az embrió az első sejtosztódás után, kétsejtjes (●) állapotban. e) Az embrió 4 sejtjes állapota. f) Az embrió 8 sejtjes állapota. g) Morula (*) állapot. h) A peteburkot elhagyó, „kikelő” blasztociszta (→). Elkülönült embriócsomó (*) és trofektoderma (x) sejtcsoportokkal rendelkezik, melyek citoplazmahidakkal (▲) kapcsolódhatnak egymáshoz. (A képek az SE Asszisztált Reprodukciós Osztályának embriológiai laboratóriumában készültek.)

1.2.5. Az embrióbeültetés és a mélyfagyasztás

Az embriók beültetése a megtermékenyülés utáni 2-5. napon történik. [27].

Az IVF kezelésben résztvevő párok életképes, beültetésre nem került embrióit mélyfagyasztás (vitifikáció) révén meg lehet őrizni. A módszer előnye, hogy a biológiai minta olyan gyorsan hűl le, hogy az abban jelen levő víznek nincs ideje jégkristályokat képezni, így az nem okozhat kárt a minta - esetünkben az embrió – struktúrájában [28].

1.3. A *time-lapse* technika előnyei

Az IVF kezelések során azok az embriók kerülnek beültetésre, melyeket fejlődési és morfológiai tulajdonságaik alapján a kezelést végző szakemberek a legéletképesebbnek ítélik meg. Az embriók minősítését hagyományosan, napi egy alkalommal történő mikroszkópos vizsgálattal végzik, ami csak részleges információt ad az embrió fejlődéséről.

Újabban egyre több embriológiai laboratóriumban nyílik lehetőség az embriók fejlődésének megfigyelésére *time-lapse* felvételek értékelésével. A *time-lapse* technikát (TLT-t) alkalmazó rendszerekben az embrió tenyésztését lehetővé tevő inkubátor beépített mikroszkóppal és kamerával rendelkezik, melyek kapcsolatban állnak egy külső számítógéppel [29].

A TLT mellett, hogy állandó tenyésztési körülményeket teremt, az embriók folyamatos megfigyelésére és dokumentációjára is lehetőséget kínál, azaz a *time-lapse* megfigyelés során a biológiai minta tenyésztése egy olyan készülékben valósul meg, ami adott időközönként képi felvételeket készít a mintáról. A képek alapján összeálló filmfelvétel utólag bármikor visszanezhető és elemezhető (TLT-vel készült [videó az embriófejlődésről](#)). Emellett a TLT képelemző software-rel is társítható, amely képes az elkészült felvételek alapján becslést adni pl. az embriófejlődés bizonyos mozzanataira, az embriók morfológiai paramétereire [30].

Számos közlemény beszámolt arról, hogy a TLT alkalmazása növelheti az IVF kezelések eredményességét, azaz hatékonyabb embrió-szelekciót tesz lehetővé, mivel általa az embriófejlődés dinamikus paramétereiről (pl. két sejtosztódás között eltelt idő) is információkat gyűjthetünk [31, 32]. A sejtosztódások időbeli mintázata és más morfológiai jellemzők (pl. sejtméret) meghatározhatják az embrió beágyazódási esélyeit, így azért fontos mindezekről adatot gyűjtenünk, hogy a kezelések során a lehető legéletképesebb embriók kerüljenek beültetésre [33, 34].

2. Célkitűzések

Célunk volt, hogy megvizsgáljuk, az endometriózis hatással van-e:

- a megtermékenyülés sikerességére;
- az embriók fejlődésének ütemére;
- az embriók morfológiai jellemzőire;
- a hólyagcsíra stádium elérésének valószínűségére;
- a hólyagcsírák minőségére;
- a beágyazódás sikerességére.

3. Anyag és módszer

3.1. A vizsgált csoportok definiálása

Egy IVF kezelésnek egyszerre több javallata is lehet. A vizsgálatban szereplő egyik csoport (Endo+) kezeléseinek indikációi között minden esetben jelen volt az endometriózis, de emellett más meddőséget okozó betegséggel is érintettek lehettek a csoportba tartozó párok. A tanulmány másik (Endo-) csoportjába kizárólag olyan párok kerülhettek, melyek esetében - az endometriózis kivételével - bármely más javallat (akár több indikáció csoportos előfordulása) miatt történt szervezeten kívüli megtermékenyítés.

A vizsgálatban az endometriózis mellett megjelenő IVF-javallatok a következők voltak: sárgatestelégtelenség, anovuláció (peteérés elmaradása), prolaktin-túlermelődés, emelkedett FSH-érték, andrológiai faktor, ismeretlen eredetű meddőség.

A vizsgálat során párosított statisztikai próbákat végeztem. Minden, Endo+ csoportba bevásztott IVF kezelés mellé egy olyan nem endometriózisos (Endo-) betegnél végzett IVF kezelést választottam párként, ahol a nőbeteg testtömeg-indexe (BMI)*, a nyert petesejtek száma és a beültetett embriók száma megegyezett, továbbá a női életkor is hasonló volt, legfeljebb 5 év lehetett az eltérés.

* BMI-kategóriák: $<18,8 \text{ kg/m}^2$ – sovány; $18,5\text{-}24,9 \text{ kg/m}^2$ – normál testsúly; $25\text{-}29,9 \text{ kg/m}^2$ – túlsúly; $>30 \text{ kg/m}^2$ – elhízott.

A vizsgálatban szereplő *in vitro* fertilizációs kezeléseket a Semmelweis Egyetem Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika Baross utcai részlegének Asszisztált Reprodukciós Osztályán végezték 2020 decembere és 2022 júniusa között. Mindkét csoportba 75, a fenti feltételeknek megfelelő IVF ciklust választottam be.

3.2. A time-lapse technika alkalmazása az embrióbírálat során

A megtermékenyítés után az embriókat TLT-t alkalmazó embrió-inkubátorba helyezték (Vitrolife EmbryoScope® Time-lapse System, Göteborg, Svédország). A tenyésztés ideje alatt (2-5 nap) a készülék meghatározott időnként (10 percenként) felvételt készített az embriókról. Az így kapott képek alapján az EmbryoViewer software (Vitrolife, Göteborg, Svédország) egy becslést adott az embriófejlődés jellegzetes lépéseire vonatkozóan, melyek az embriófejlődés fontosabb morfokinetikai paramétereireit alkotják.

Ezekre az adatokra és a saját megítélésemre hagyatkozva értékeltem a tanulmányba bevont valamennyi IVF kezelés során létrejött embrió fejlődését és morfológiáját (a vizsgált paramétereket l. az 1. táblázatban).

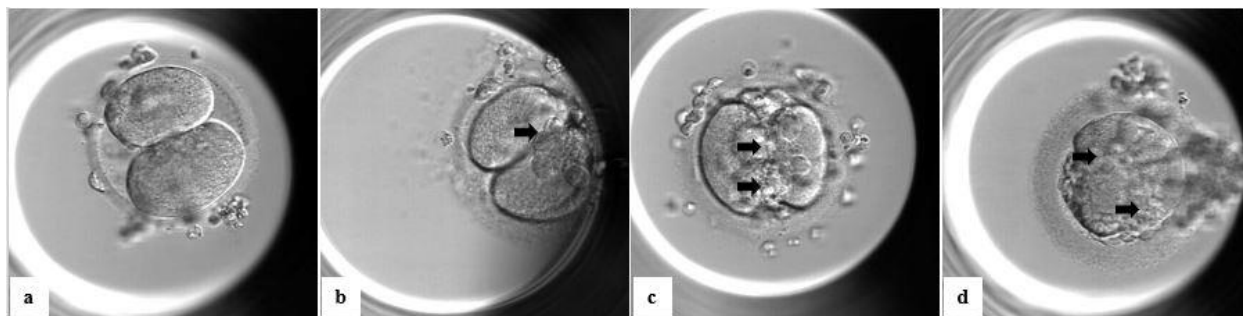
3.3. A vizsgált paraméterek

A tanulmányban szereplő vizsgálati paramétereket az 1. táblázatban tüntettem fel.

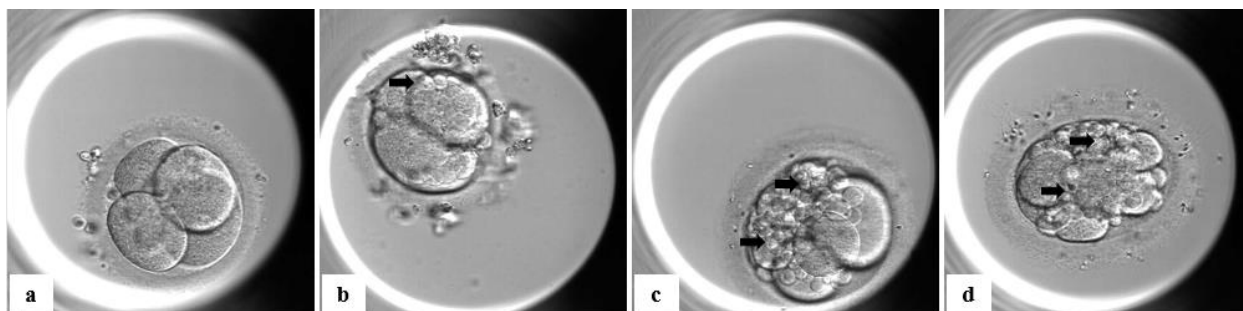
3.4. Embrióbírálati szempontok

Fragmentáció becslése

Fragmentumnak nevezzük a sejtmembránnal határolt, de sejtmagot általában nem tartalmazó citoplazma részleteket, melyek legtöbbször a sejtosztódás során keletkeznek. A fragmentációt a teljes citoplazma-térfogat százalékos arányában fejezzük ki [35]. Az embriók fragmentáltságának mértékét az alábbi kategorizálás szerint bíráltam: 0-10%; 10-20%; 20-50% ill. 50-100% (l. 4. és 5. ábra).



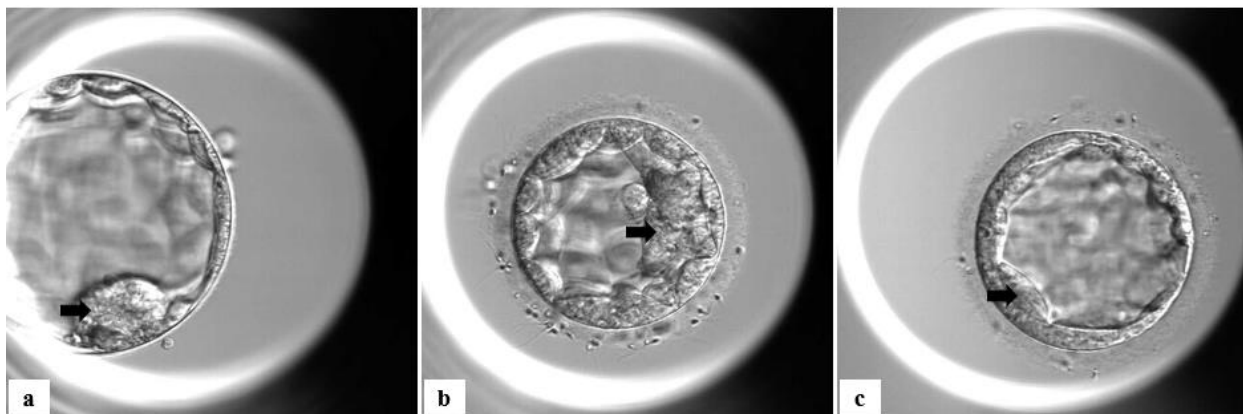
4. ábra. A kétsejtes embrió fragmentáltsági kategóriái. A fragmentumokra nyilak mutatnak. a) A fragmentáció mértéke 0-10% közötti, fragmentum nem látható a képen. b) A fragmentáció mértéke 10-20% közötti, láthatunk néhány fragmentumot. c) A fragmentáció mértéke 20-50% közötti, az előző képhez képest jóval több fragmentum látható. d) A fragmentáció mértéke 50-100% közötti, a majdnem a teljes embrió-térfogat fragmentált. (A képek az SE Asszisztált Reprodukciós Osztályának embriológiai laboratóriumában készültek.)



5. ábra. A négysejtes embrió fragmentáltsági kategóriái. A fragmentumokra nyilak mutatnak. a) A fragmentáció mértéke 0-10% közötti, fragmentum nem látható a képen. b) A fragmentáció mértéke 10-20% közötti, láthatunk néhány fragmentumot. c) A fragmentáció mértéke 20-50% közötti, az előző képhez képest jóval több fragmentum látható. d) A fragmentáció mértéke 50-100% közötti, majdnem a teljes embrió-térfogat fragmentált. (A képek az SE Asszisztált Reprodukciós Osztályának embriológiai laboratóriumában készültek.)

A belső sejtsomó minősítése:

Az embriót alkotó struktúrák az embriócsomó sejtjeinek osztódása révén jönnek létre [26] Minősége az azt alkotó sejtek száma és kompaktáltsága alapján kerül becslésre [36] (6. ábra).



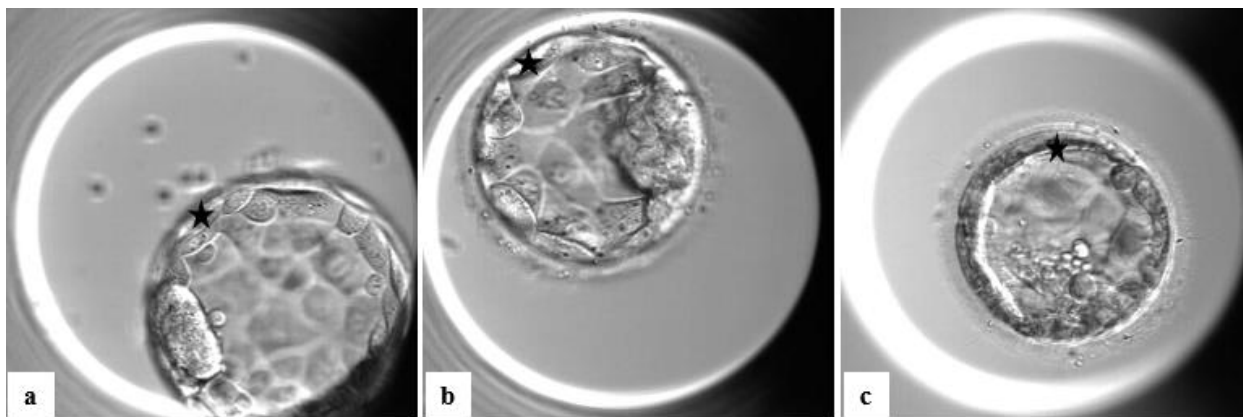
6. ábra. A belső sejtsomó (embriócsomó) minőségének kategorizálása. Az embriócsomóra nyilak mutatnak. a) „A” minőségű embriócsomó. b) „B” minőségű embriócsomó. c) „C” minőségű embriócsomó. (A képek az SE Asszisztált Reprodukciós Osztályának embriológiai laboratóriumában készültek.)

1. táblázat: A vizsgált morfokinetikai paraméterek és azok értelmezése. (A *-gal jelölt fogalmakat lásd az Embrióbírálati szempontok fejezetben)

Morfokinetikai paraméter	Definíció
tPNf	a pronukleusz eltűnéséig eltelt idő
t2	2 sejtes állapot eléréséhez szükséges idő
t4	4 sejtes állapot eléréséhez szükséges idő
t8	8 sejtes állapot eléréséhez szükséges idő
tB	hólyagcsíra állapot eléréséhez szükséges idő
<20%fragm-2C	a kétsejtes állapotban becsült fragmentáció mértéke 20%-nál alacsonyabb*
<20%fragm-4C	a négysejtes állapotban becsült fragmentáció mértéke 20%-nál alacsonyabb*
ICM (A)	„A” minősítésű belső sejtsomó*
TE (A)	„A” minősítésű trofektoderma*
Hólyagcsíra fejlődési arány	azon embriók aránya, melyek a normál megtermékenyülésű embriók közül hólyagcsírákká fejlődtek
Hólyagcsíra minőség	azon embriók aránya a csoporton belül, melyek legalább a hólyagcsíra állapotot elérték, emellett A vagy B minősítést kaptak a belső sejtsomójuk és a trofektoderma minőségük értékelésekor
Beágyazódási arány	azon embriók aránya, melyek a beültetés után sikeresen beágyazódtak
Klinikai terhesség aránya	a klinikai terhességek és az embrióbeültetéssel végződött kezelések számának hányadosa; klinikai terhesség abban az esetben áll fenn, ha ultrahang vizsgálat során petezsák látható; klinikai terhességgént tekintetem az egyes, kettes és hármas fogamzásra (egy, kettő vagy három embrió beágyazódása) és a méhen kívüli terhességre (EUG).

A trofektoderma minősítése

A trofektoderma sejtek nem vesznek részt az embrionális struktúrák létrejöttében, a méhlepény embrionális szöveteit hozzák létre, ill. fontos szerepük van az embrió beágyazódása során [26]. A trofektoderma sejtréteget az azt alkotó sejtek száma, ill. a citoplazmájuk heterogenitása alapján kategorizálják [36] (7. ábra).



7. ábra. A trofektoderma minőségének kategorizálása. A trofektoderma sejtréteget csillag jelöli. a) „A” minőségű trofektoderma. b) „B” minőségű trofektoderma. c) „C” minőségű trofektoderma. (A képek az SE Asszisztált Reprodukciós Osztályának embriológiai laboratóriumában készültek.)

3.5. Statisztikai számítások

A statisztikai analízist Statistica programmal és VassarStats (<http://vassarstats.net/>) online statisztikai modullal végeztem. A normál eloszlású, folytonos változók esetében t-próbát, míg a nem folytonos változók esetében Chi-négyzet próbát alkalmaztam. A tesztek p=0,05 szignifikancia szint mellett végeztem. Az adatok átlag±standard szórás formában kerültek kifejezésre.

4. Eredmények

A vizsgálatba összesen 150 *in vitro* fertilizációs kezelést vontunk be, melyek közül 75 az Endo+, 75 pedig az Endo– csoportba tartozott. Az Endo+ csoport 243 normál megtermékenyüléssel bíró (két előmaggal rendelkező) embriójának fejlődését vetettem össze az Endo– csoport ciklusaiból származó 204 embrió fejlődésével.

Az átlagéletkor ($35,5 \pm 3,6$ év vs. $35,8 \pm 3,6$ év; $p=0,576$) és a BMI-átlag ($22,8 \pm 3,8$ kg/m² vs. $22,2 \pm 6,6$ kg/m²; $p=0,549$) hasonló volt az Endo+ és az Endo– csoportok esetében. Nem találtam szignifikáns különbséget sem a stimuláció átlagos hosszában ($11,6 \pm 1,9$ vs. $11,3 \pm 1,6$; $p=0,298$), sem az átlagos tüsző- ($7,6 \pm 3,6$ vs. $7,2 \pm 3,6$; $p=0,480$), és petesejtszámban ($4,6 \pm 2,4$ vs. $4,6 \pm 2,4$; $p=1,000$) sem pedig az érett (a meiózis második fázisában lévő) petesejtek ($3,9 \pm 2,8$ vs. $3,9 \pm 2,1$; $p=0,996$) vagy a normál megtermékenyülésű embriók ($3,2 \pm 1,9$ vs. $2,7 \pm 1,6$; $p=0,070$) számában (2. táblázat).

Amíg az ICSI eljárás hatékonysága ($66,7\%$ vs. $67,1\%$; $p=1,000$) a vizsgált csoportok esetében hasonló volt, addig a hagyományos IVF eljárásé ($76,0\%$ vs. $63,3\%$; $p=0,009$) az Endo+ csoportban jelentősen

magasabbnak bizonyult. Az IVF eljárás szerényebb sikerességéből adódóan a megtermékenyülési arány (73% vs. 65,4%; $p=0,037$) az Endo– csoportban szignifikánsan alacsonyabb volt.

2. táblázat: Az IVF kezelések összevetése a vizsgált csoportokban.

Paraméterek	Endo+ (N=75)	Endo– (N=75)	p
<i>Átlagéletkor (év)*</i>	35,5±3,6	35,8±3,6	0,576
<i>BMI-átlag (kg/m²) *</i>	22,8±3,8	22,2±6,6	0,549
<i>Stimuláció hossza (nap)*</i>	11,6±1,9	11,3±1,6	0,298
<i>Tüszószám (db)*</i>	7,6±3,6	7,2±3,6	0,480
<i>Petesejtszám (db)*</i>	4,6±2,4	4,6±2,4	1,000
<i>MII petesejtszám (db)*</i>	3,9±2,8	3,9±2,1	0,996
<i>Normál megtermékenyülésű embrió (db)*</i>	3,2±1,9	2,7±1,6	0,070
<i>ICSI eljárás hatékonysága (%)</i>	66,7	67,1	1,000
<i>IVF eljárás hatékonysága (%)</i>	76,0	63,3	0,009
<i>Megtermékenyülési arány (%)</i>	73	65,4	0,037
<i>Klinikai terhesség aránya (%)**</i>	40,0	28,6	0,154

*átlag±szórás

A kapott adatok alapján elmondható, hogy az embriófejlődés két- ill. négysejtes stádiumában becsült fragmentáltsági érték tekintetében az Endo– csoport embriói között szignifikánsan nagyobb arányban fordult elő kevésbé fragmentált (20% alatti fragmentáltsági értékkel rendelkező) embrió. Az adatokat a 3. táblázatban tüntettem fel (<20% fragm-2C; <20% fragm-4C).

3. táblázat: Morfometriai paraméterek összevetése a vizsgált csoportokban.

Morfometriai paraméterek	Endo+ (N=75)	Endo– (N=75)	p
<i>tPNf (óra)*</i>	24,2±3,5	25,0±6,5	0,141
<i>t2 (óra)*</i>	27,1±4,1	27,9±7,1	0,141
<i>t4 (óra)*</i>	38,3±6,6	39,3±8,6	0,196
<i>t8 (óra)*</i>	60,8±13,2	59,2±12,1	0,221
<i>tB (óra)*</i>	107,7±9,8	106,0±10,2	0,194
<20% fragm-2C (%)	81,3	89,8	0,013
<20% fragm-4C (%)	76,1	84,7	0,027
<i>ICM (A) (%)</i>	38,9	45,7	0,269
<i>TE (A) (%)</i>	27,8	40,0	0,036
Blasztociszta fejlődési arány (%)	74,6	57,5	<0,0001
<i>Blasztociszta minőség (%)</i>	67,1	73,3	0,271
Vitrifikált embriók aránya (%)	35,4	22,1	0,002
<i>Beágyazódási arány (%)</i>	34,5	23,8	0,127

*átlag±szórás

Az embriófejlődés üteme hasonló volt az Endo+ és az Endo– csoportok esetében (l. 8. ábra). Az egyes fejlődési stádiumok eléréséhez szükséges idők átlagát a 3. táblázatban tüntettem fel.

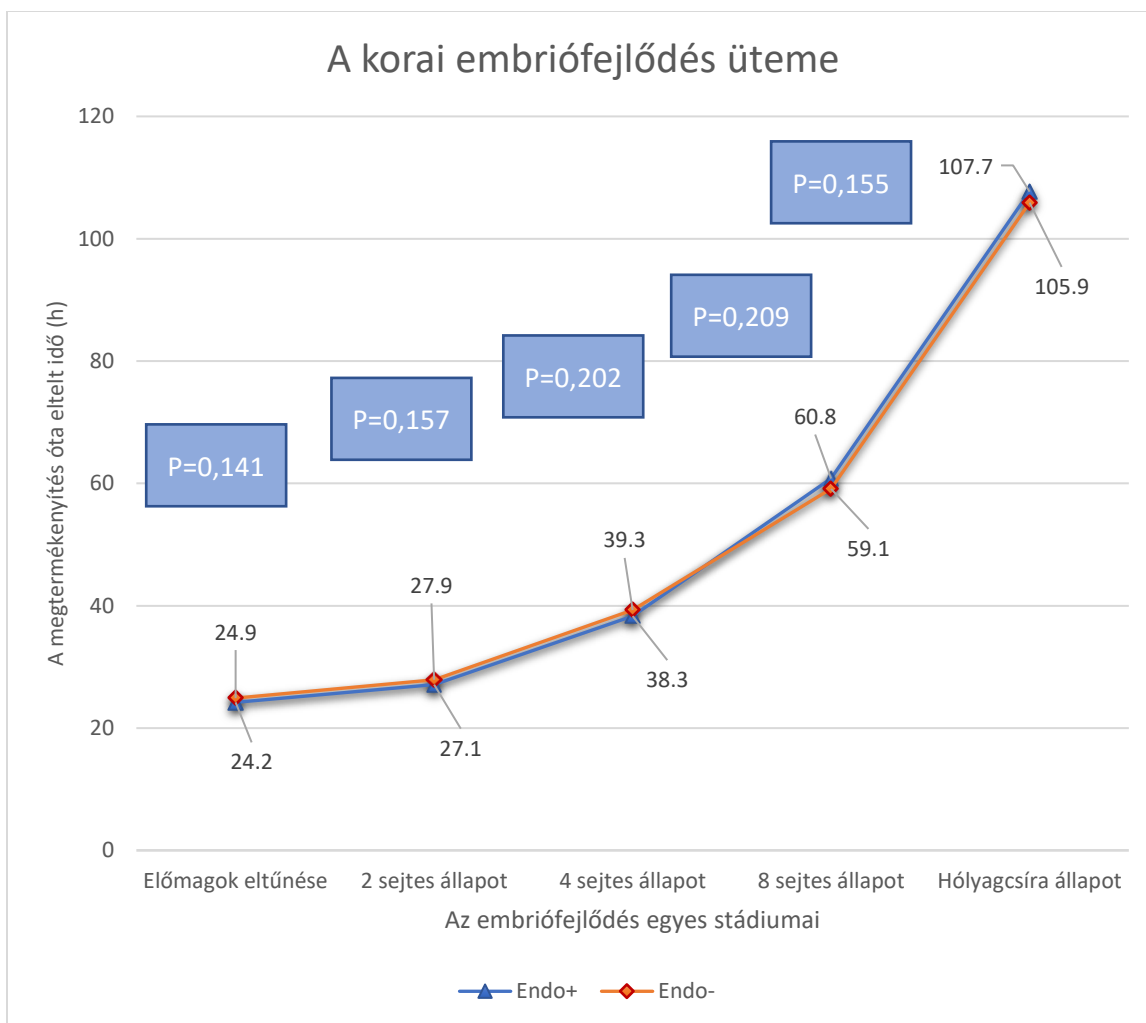
Az Endo– csoport embriói között jelentősen magasabb arányban fordult elő „A” minőségű trofektodermával rendelkező embrió (27,8% vs. 40,0%; p=0,036). Bár nem szignifikáns mértékben, de ugyanezen csoport esetében az „A” minősítésű belső sejtsomóval rendelkező embriók aránya (38,9% vs. 45,7%; p=0,269) is magasabbnak bizonyult.

Az Endo+ csoport embriói magasabb arányban érték el a hólyagsíra fejlődési stádiumot (74,6% vs. 57,5%; p<0,001), azonban az Endo– csoportba tartozók bár nem szignifikánsan, de valamivel nagyobb eséllyel (67,1% vs. 73,3%; p=0,271) fejlődtek jó minőségű embriókká.

Az Endo+ csoport embrióinak magasabb hányada (35,4% vs. 22,1%; p=0,002) került vitrifikálásra az Endo– csoporthoz képest.

A beágyazódás (34,5% vs. 23,8%; p=0,127) és a klinikai terhesség arányában (40,0% vs. 28,6%; p=0,154) nem találtunk szignifikáns különbséget a vizsgált csoportok esetében.

A kapott eredményeket a 2. és a 3. táblázatban tüntettem fel.



8. ábra. Az embriófejlődés üteme a vizsgált csoportokban. Az embriófejlődés egyes stádiumainak ismertetését l. *Embriótenyésztés, korai embriófejlődés* fejezetben)

5. Megbeszélés

A tanulmány során azt vizsgáltam, hogy az endometriózis milyen hatással lehet a korai embriófejlődésre. A kapott eredmények, és az azok értékelésével nyert következtetések hasznosak lehetnek a jövőben az IVF kezelések eredményességének növelésében.

A normál megtermékenyülésű embriók aránya az Endo+ csoportban szignifikánsan magasabb volt, ami ellentmond néhány korábbi tanulmány eredményeivel [37, 38]. A vizsgálatunkban megjelenő szignifikáns különbség hátterében az Endo- csoport esetében tapasztalt szerényebb IVF eljárás-hatékonyság állhat, mivel az ICSI eljárás hatékonysága közel azonos volt a vizsgált csoportok esetében.

Az embriófejlődés ütemében nem mutatkozott szignifikáns különbség, mely megerősíti néhány korábbi közlemény eredményét is [39, 40], azonban vannak tanulmányok, melyek ellentmondanak ezzel a megfigyeléssel [41, 42].

A kapott morfológiai adatok arra utalnak, hogy az Endo– csoport embriói kevésbé voltak fragmentáltak, illetve jobb minőségű belső sejtsomóval és trofektodermával rendelkeztek. Ezek alapján megállapítható, hogy az Endo– csoportban morfológiai tekintetben jobb minőségű embriók fejlődtek az endometriózisos csoporthoz képest.

Az Endo+ csoport embriói magasabb arányban érték el a blasztocisza fejlődési stádiumot, mellyel szemben találni ellentmondó eredményre jutó tanulmányt is [42]. A létrejött blasztociszták minőségében nem mutatkozott szignifikáns különbség a két csoport között, azonban az Endo– csoportban valamivel magasabb arányban jöttek létre „jó minőségű” embriók, ami viszont megerősíti néhány korábbi vizsgálat eredményét [6, 43]. A vitrifikált embriók aránya magasabb volt az Endo+ csoport esetében, melynek hátterében a csoportra jellemző magasabb blasztocisza fejlődési arány állhat.

A beágyazódási arány a vizsgált csoportok esetében hasonló volt, ami alátámaszthat néhány korábbi tanulmányt [6, 38], azonban szintén találni olyan beszámolót, ami ettől eltérő eredményt közöl [43, 44]. A két vizsgálati csoport a klinikai terhesség arányát tekintve is hasonló értékeket mutatott, ami megerősíti számos korábbi tanulmány eredményeit [38, 45].

Megfigyeléseimet összegezve elmondható, hogy az endometriózisos betegek embriói hasonló ütemben, azonban valamivel gyengébb minőségben fejlődtek az Endo– csoport embrióihoz képest. A megjelenő különbségek ellenére, az IVF kezelés sikeressége hasonló volt a vizsgált csoportok esetében, mivel a beágyazódási és a klinikai terhesség arányában nem mutatkozott szignifikáns különbség.

A morfokinetikai paraméterek részletes vizsgálatát lehetővé tevő *time-lapse* technika újszerűsége miatt jelenleg még kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre a témával kapcsolatban. A meglévő tanulmányokban az embrióbírálati szempontok konzekvensnek tekinthetők, azonban az egyes vizsgálatok többnyire egy bizonyos betegséggel érintett csoport embrióival vetik össze a vizsgált csoport embrióinak fejlődését (pl. endometriózisos betegek embriói vs. ismeretlen eredetű meddőségben szenvedők embriói).

A tanulmányban alkalmazott párosított próba hátránya, hogy az endometriózis nyert petesejtszámra gyakorolt hatását (l. Az *endometriózis* című fejezetben) nem tudtuk vizsgálni, hiszen ez az érték az általunk felállított párosítási szempontrendszer elemei között szerepelt. A továbbiakban érdemes lenne olyan tanulmányt végezni, melyben utánajárhatnánk annak, milyen hatással van az endometriózis a petesejtek

számára és minőségére (igazolható-e az irodalomban gyakran előforduló negatív hatás), egyúttal tanulmányozhatnánk a petesejtek és embriók minősége közti összefüggéseket.

6. Összefoglalás

Endometriózis esetén a méhnyálkahártyát alkotó endometrium a méh üregén kívül is megjelenik. A kórkép jellemzően fájdalmas menstruációval, kóros kismencedei fájdalommal és akár meddőséggel is társulhat.

Tanulmányunk során a betegség embriófejlődésre gyakorolt hatását vizsgáltuk in vitro fertilizációs kezelések során. Endometriózisos betegek (Endo+) embrióinak fejlődését vetettük össze egyéb okból meddő párok (Endo-) embriófejlődésével, time-lapse technika (TLT) segítségével. A TLT állandó tenyésztési feltételeket biztosít, az embriófejlődésről folyamatos megfigyelést és dokumentációt tesz lehetővé.

A 150 vizsgált ciklus 75 Endo+, 75 Endo- arányban oszlott el. A csoportok átlagéletkora, BMI átlaga, átlagos petesejt- és beültetett embrióinak száma hasonló volt. Az ICSI eljárás előfordulása (30,7% vs. 57,3%, $p < 0,01$) az Endo-, a megtermékenyülési arány (73% vs. 65,4%, $p = 0,037$) az Endo+ csoportban volt magasabb.

A két csoport embriói hasonló ütemben fejlődtek, ám az Endo- csoportban magasabb volt a kevésbé fragmentált (39,8% vs. 50,3%, $p = 0,03$) és jobb trofektodermával rendelkező (27,8% vs. 40%, $p = 0,04$) embriók aránya. Az Endo+ csoport embriói nagyobb eséllyel fejlődtek blasztocisztákká (74,6% vs. 57,5%, $p < 0,01$), azonban azok minőségében, ill. a klinikai terhesség arányában jelentős különbség nem mutatkozott.

A kapott adatok arra utalnak, hogy az endometriózisos betegek embriói hasonló ütemben, de valamivel gyengébb minőségben fejlődtek az egyéb okból meddő párok embrióihoz képest.

7. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőimnek, Dr. Fancsovits Péternek és Nemes Annamáriának, hogy lehetőséget adtak és szakmai tudásukkal támogatták dolgozatom létrejöttét. Köszönettel tartozom még emellett a Semmelweis Egyetem Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika Baross utcai részlegének Asszisztált Reprodukciós Osztályán dolgozóknak, hogy munkájukkal hozzájárultak a dolgozatom megvalósításához, illetve köszönöm a családomnak és a barátaimnak az általuk nyújtott támogatást.

8. Irodalomjegyzék

- [1] S.L. Schenk, Das Saugethierei kunstlick befruchtet ausserhalb des Mutterthieres, Mitt. Embr. Inst. KK Univ. Wien. 1 (1880) 107-118.
- [2] Z. Papp, A nőgyógyászat kézikönyve, első ed., Medicina Kiadó, Budapest, 2016.
- [3] P.C. Steptoe, R.G. Edwards, Birth after the reimplantation of a human embryo, The Lancet 312(8085) (1978) 366.
- [4] B.C. Fauser, Towards the global coverage of a unified registry of IVF outcomes, Reproductive biomedicine online 38(2) (2019) 133-137.
- [5] R.O. Burney, L.C. Giudice, Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis, Fertility and sterility 98(3) (2012) 511-519.
- [6] L. Boucret, P.-E. Bouet, J. Riou, G. Legendre, L. Delbos, H.E. Hachem, P. Descamps, P. Reynier, P. May-Panloup, Endometriosis lowers the cumulative live birth rates in IVF by decreasing the number of embryos but not their quality, Journal of Clinical Medicine 9(8) (2020) 2478.
- [7] T. Tanbo, P. Fedorcsak, Endometriosis-associated infertility: aspects of pathophysiological mechanisms and treatment options, Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica 96(6) (2017) 659-667.
- [8] Y.-H. Lin, Y.-H. Chen, H.-Y. Chang, H.-K. Au, C.-R. Tzeng, Y.-H. Huang, Chronic niche inflammation in endometriosis-associated infertility: current understanding and future therapeutic strategies, International journal of molecular sciences 19(8) (2018) 2385.
- [9] J.E. Miller, S.H. Ahn, S.P. Monsanto, K. Khalaj, M. Koti, C. Tayade, Implications of immune dysfunction on endometriosis associated infertility, Oncotarget 8(4) (2017) 7138.
- [10] A.L. Shafrir, L. Farland, D. Shah, H. Harris, M. Kvaskoff, K. Zondervan, S. Missmer, Risk for and consequences of endometriosis: a critical epidemiologic review, Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology 51 (2018) 1-15.
- [11] A.M. Sanchez, V.S. Vanni, L. Bartiromo, E. Papaleo, E. Zilberberg, M. Candiani, R. Orvieto, P. Viganò, Is the oocyte quality affected by endometriosis? A review of the literature, Journal of ovarian research 10(1) (2017) 1-11.
- [12] B.A. Lessey, J.J. Kim, Endometrial receptivity in the eutopic endometrium of women with endometriosis: it is affected, and let me show you why, Fertility and sterility 108(1) (2017) 19-27.
- [13] N. Garrido, J. Navarro, J. Remohí, C. Simón, A. Pellicer, Follicular hormonal environment and embryo quality in women with endometriosis, Human reproduction update 6(1) (2000) 67-74.
- [14] M. Kuroda, K. Kuroda, A. Arakawa, Y. Fukumura, M. Kitade, I. Kikuchi, J. Kumakiri, S. Matsuoka, I.A. Brosens, J.J. Brosens, Histological assessment of impact of ovarian endometrioma and laparoscopic cystectomy on ovarian reserve, Journal of Obstetrics and Gynaecology Research 38(9) (2012) 1187-1193.
- [15] A.K. Singh, M. Dutta, R. Chattopadhyay, B. Chakravarty, K. Chaudhury, Intrafollicular interleukin-8, interleukin-12, and adrenomedullin are the promising prognostic markers of oocyte and embryo quality in women with endometriosis, Journal of assisted reproduction and genetics 33(10) (2016) 1363-1372.
- [16] S.F.D. Kelemen Dóra Dr., Magyar Éva Dr., Kiterjedt petefészek endometriosis és változatos megjelenésű, különböző dignitású komplex endometrioid tumor, Nőgyógyászati Onkológia (2012) 11-14.
- [17] P. Fancsovits, A. Lehner, A. Murber, Z. Kaszas, J. Rigo, J. Urbancsek, Effect of hyaluronan-enriched embryo transfer medium on IVF outcome: a prospective randomized clinical trial, Archives of gynecology and obstetrics 291(5) (2015) 1173-1179.
- [18] D. Sakkas, G.C. Manicardi, M. Tomlinson, M. Mandrioli, D. Bizzaro, P. Bianchi, U. Bianchi, The use of two density gradient centrifugation techniques and the swim-up method to separate spermatozoa with chromatin and nuclear DNA anomalies, Human Reproduction 15(5) (2000) 1112-1116.

- [19] J. Urbancsek, Z. Papp, *Nőgyógyászati endokrinológia*, Springer Hungarica, Budapest, 1997.
- [20] P. Fancsovits, Petesejtek, zygoták és praeembryók morphologiai vizsgálata in vitro fertilisatiós kezelések során (2006).
- [21] E. Giacomini, A.M. Sanchez, V. Sarais, S. Al Beitawi, M. Candiani, P. Viganò, Characteristics of follicular fluid in ovaries with endometriomas, *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 209 (2017) 34-38.
- [22] A.C. Rossi, F. Prefumo, The effects of surgery for endometriosis on pregnancy outcomes following in vitro fertilization and embryo transfer: a systematic review and meta-analysis, *Archives of gynecology and obstetrics* 294(3) (2016) 647-655.
- [23] P. Fancsovits, Z. Kaszas, A. Nemes, K. Szedlak, A. Murber, D. Pocsi, A. Arokszállasi, J. Urbancsek, Intracytoplasmic sperm injection versus conventional in vitro fertilization in non-male factor infertility. Interim analysis of a prospective randomized study, *HUMAN REPRODUCTION*, OXFORD UNIV PRESS GREAT CLARENDON ST, OXFORD OX2 6DP, ENGLAND, 2020, pp. 1244-1245.
- [24] Y. Mio, K. Maeda, Time-lapse cinematography of dynamic changes occurring during in vitro development of human embryos, *American journal of obstetrics and gynecology* 199(6) (2008) 660. e1-660. e5.
- [25] C.C. Wong, K.E. Loewke, N.L. Bossert, B. Behr, C.J. De Jonge, T.M. Baer, R.A.R. Pera, Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage, *Nature biotechnology* 28(10) (2010) 1115-1121.
- [26] K. Coward, D. Wells, *Textbook of clinical embryology*, Cambridge University Press 2013.
- [27] B. Balaban, D. Brison, G. Calderon, J. Catt, J. Conaghan, L. Cowan, T. Ebner, D. Gardner, T. Hardarson, K. Lundin, Alpha scientists in reproductive medicine and ESHRE special interest group of embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting, *Hum Reprod* 26(6) (2011) 1270-1283.
- [28] L.L. Kuleshova, A. Lopata, Vitrification can be more favorable than slow cooling, *Fertility and sterility* 78(3) (2002) 449-454.
- [29] M.G. Minasi, P. Greco, M.T. Varricchio, P. Barillari, E. Greco, The clinical use of time-lapse in human-assisted reproduction, *Therapeutic Advances in Reproductive Health* 14 (2020) 2633494120976921.
- [30] C. Wong, A. Chen, B. Behr, S. Shen, Time-lapse microscopy and image analysis in basic and clinical embryo development research, *Reproductive BioMedicine Online* 26(2) (2013) 120-129.
- [31] N. Basile, M. Meseguer, Time-lapse technology: evaluation of embryo quality and new markers for embryo selection, *Expert Review of Obstetrics & Gynecology* 7(2) (2012) 175-190.
- [32] K. Kirkegaard, I.E. Agerholm, H.J. Ingerslev, Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment, *Human reproduction* 27(5) (2012) 1277-1285.
- [33] M. Cruz, B. Gadea, N. Garrido, K.S. Pedersen, M. Martínez, I. Pérez-Cano, M. Muñoz, M. Meseguer, Embryo quality, blastocyst and ongoing pregnancy rates in oocyte donation patients whose embryos were monitored by time-lapse imaging, *Journal of assisted reproduction and genetics* 28(7) (2011) 569-573.
- [34] M. Meseguer, J. Herrero, A. Tejera, K.M. Hilligsøe, N.B. Ramsing, J. Remohí, The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation, *Human reproduction* 26(10) (2011) 2658-2671.
- [35] M.D. Keltz, J.C. Skorupski, K. Bradley, D. Stein, Predictors of embryo fragmentation and outcome after fragment removal in in vitro fertilization, *Fertility and sterility* 86(2) (2006) 321-324.
- [36] T. Hardarson, L. Van Landuyt, G. Jones, The blastocyst, *Human reproduction* 27(suppl_1) (2012) i72-i91.
- [37] E. Borges Jr, D. Braga, A.S. Setti, L.S. Vingris, R. Figueira, A. Iaconelli Jr, Endometriosis affects oocyte morphology in intracytoplasmic sperm injection cycles, *JBRA Assist Reprod* 19(4) (2015) 235-240.
- [38] N.C. Llaraena, T. Falcone, N. Desai, THE IMPACT OF ENDOMETRIOSIS ON EMBRYO MORPHOKINETICS, *Fertility and Sterility* 114(3) (2020) e215.

- [39] F.K. Boynukalin, M. Serdarogullari, M. Gultomruk, O. Coban, N. Findikli, M. Bahceci, The impact of endometriosis on early embryo morphokinetics: a case-control study, *Systems biology in reproductive medicine* 65(3) (2019) 250-257.
- [40] C. Demirel, E. Bastu, S. Aydogdu, E. Donmez, H. Benli, G. Tuysuz, G. Keskin, F. Buyru, The presence of endometrioma does not impair time-lapse morphokinetic parameters and quality of embryos: a study on sibling oocytes, *Reproductive Sciences* 23(8) (2016) 1053-1057.
- [41] H.N. Ciray, A. Campbell, I.E. Agerholm, J. Aguilar, S. Chamayou, M. Esbert, S. Sayed, Proposed guidelines on the nomenclature and annotation of dynamic human embryo monitoring by a time-lapse user group, *Human reproduction* 29(12) (2014) 2650-2660.
- [42] N.C. Llarena, C.E. Hur, M. Yao, K. Schwartz, T. Falcone, N. Desai, The impact of endometriosis on embryo morphokinetics: embryos from endometriosis patients exhibit delayed cell cycle milestones and decreased blastulation rates, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 39(3) (2022) 619-628.
- [43] V.Y. Radzinsky, M.R. Orazov, I.I. Ivanov, M.B. Khamoshina, I.N. Kostin, E.V. Kavteladze, V.B. Shustova, Implantation failures in women with infertility associated endometriosis, *Gynecological Endocrinology* 35(sup1) (2019) 27-30.
- [44] A. Freis, J.E. Dietrich, M. Binder, V. Holschbach, T. Strowitzki, A. Germeyer, Relative morphokinetics assessed by time-lapse imaging are altered in embryos from patients with endometriosis, *Reproductive Sciences* 25(8) (2018) 1279-1285.
- [45] X. Dong, X. Liao, R. Wang, H. Zhang, The impact of endometriosis on IVF/ICSI outcomes, *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 6(9) (2013) 1911.