https://doi.org/10.56385/magyallorv.2025.05.283-294

SZÜLÉSZET

The role of veterinarians and biologists in the development of assisted reproductive techniques used in humans

B. Somoskői[1]
L. Giovanni[2]
K. Kanyó[3]
J. Zeke[3]
D. Török[1]
L. Bordás[1]
M. Bacsa[1]
B. Vincze[1]
A. Csepreghy[1]
S. Cseh[1*]

1. Állatorvostudományi Egyetem, Szülészeti Tanszék és Haszonállat-gyógyászati Klinika, H-1078 Budapest, István u. 2.

2. Faculty of Veterinary Medicine, University of Bari Aldo Moro, Bari, Olaszország

3. Dunamenti Reprodukciós Központ, Kútvölgyi Intézet, Budapest

**e-mail: cseh.sandor@univet.hu*

Az állatorvosok és a biológusok szerepe az emberben használt asszisztált reprodukciós technikák fejlesztésében

Somoskői Bence[1], Lacalandra Giovanni[2], Kanyó Katalin[3], Zeke József[3], Török Dóra[1], Bordás Lilla[1], Bacsa Mónika[1], Vincze Boglárka[1], Csepreghy Anna[1], Cseh Sándor[1*]

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők közleményükben bemutatják, hogy az állatokkal és azok ivarsejtjeivel/embrióival végzett laboratóriumi/klinikai reprodukciós kísérletek nagyon hasznosak a humán asszisztált reprodukcióban (AR) alkalmazott eljárások fejlesztése szempontjából. A humán és az állat AR-ban használt technikák nagyon hasonlóak, vagy azonosak. A szakemberek véleménye szerint az ivarsejtek/beültetett embriók nagy száma miatt az egér és a szarvasmarha fajok a legalkalmasabbak a humán AR-ban közvetlenül hasznosítható tapasztalatok szerzésére. A szarvasmarhában már régóta alkalmazzák/fejlesztik az AR technikákat, így ideális „terep" adaptálható adatok gyűjtésére. A szerzők tapasztalatai szerint az állatokkal folytatott AR-es beavatkozások kevésbé szigorú feltételek között végezhetők, így felgyorsítható az előrehaladás a humán AR-ban.

SUMMARY

Laboratory/clinical reproduction experiments with animals and their gametes/embryos are very useful for the development of procedures used in human assisted reproduction (AR). The techniques used in human and animal AR are very similar or identical. The purpose of the application of assisted reproductive techniques (ART) is the same in human and veterinary medicine, i.e. to promote and support reproduction. However, there is a marked difference between them in terms of indication. In human reproductive medicine, these procedures are used to treat individuals and couples with fertility problems, so that they can have children. In veterinary medicine, however, ARTs are used on animals that are completely healthy from a reproductive biological point of view (fertile), however, they carry some advantageous genetic trait(s) (e.g. high milk production, high/low milk fat content/milk protein content, rapid weight gain, efficient feed utilization, production of good quality fine (thin) wool, etc.). In this case, the purpose of the application of the procedures is to have as many offspring as possible born during their lifetime from individuals with otherwise healthy and desirable traits, more than what could be born naturally. Due to the large number of gametes/embryos transferred, the mouse and bovine species are the most suitable for gaining experience that can be directly applied in human AR. Assisted reproductive techniques have been used/developed in cattle for a long time, making them an ideal "field" for collecting adaptable data. Assisted reproductive interventions in animals can be performed under less stringent conditions, thus accelerating progress in human AR. Assisted reproductive techniques are already routinely used in clinical human AR or will be applied hopefully soon, and during the development of them the experiences obtained in animal experiments or in the animal (mouse/cattle) breeding were very important: cryopreservation of gametes and embryos, spindle view technique, laser assisted hatching, cryopreservation and in vitro culture of preantral follicles.

AZ ÁLLATORVOSOK ÉS A BIOLÓGUSOK SZEREPE AZ EMBERBEN HASZNÁLT ASSZISZTÁLT REPRODUKCIÓS TECHNIKÁK FEJLESZTÉSÉBEN

Az asszisztált reprodukció (AR) intenzíven kutatott és fejlődő területnek számít a humán és az állatorvosi reprodukciós medicinában egyaránt. Egymáshoz nagyon közel álló területekről van szó, gyakran azonos vagy nagyon hasonló technikákat alkalmaznak és az eljárások, valamint a szakemberek „átjárása" is megszokott a két szakterület között. Az asszisztált reprodukciós technikák (ART) alkalmazásának célja a humán- és az állatorvoslás esetében megegyezik, azaz a szaporodás elősegítése, támogatása. Azonban az indikáció tekintetében markáns különbség van közöttük. A humán reprodukciós medicinában ezeket az eljárásokat fertilitási gondokkal küzdő egyének és párok gyógykezelésére használják, azért, hogy gyermekáldásban részesülhessenek. Az állatorvoslás területén viszont az ART-ket szaporodásbiológiai szempontból teljesen egészséges állatokon alkalmazzák, olyan egyedeken, amelyek valamilyen szempontból előnyös genetikai tulajdonságot(gokat) hordoznak (pl. nagy tejtermelés, nagy/kicsi tejzsírtartalom/tejfehérjetartalom, gyors testtömeg-gyarapodás, hatékony takarmányhasznosítás, jó minőségű finom (vékony) gyapjú termelése stb.). Ebben az esetben az eljárások alkalmazásának célja, hogy az egyébként egészséges és kívánatos tulajdonságokkal rendelkező egyedektől életteljesítményük alatt minél több utód szülessen, több mint ami természetes úton a világra jöhetne.

A humán- és állatorvoslásban alkalmazott asszisztált reprodukciós technikák kifejezetten hasonlítanak

Használatuk indikációja viszont eltér

Az elmúlt 10–15 évben azonban egyre erősebben körvonalazódott az a tény is, miszerint az ART-k alkalmazására már nem csak a haszonállattartóknál (elsősorban a szarvasmarha-tenyésztőknél) mutatkozik igény, hanem a kedvtelésből tartott állatok, ill. az állatkertekben tartott állatok esetében is (nehezen szaporodó egyedek, kevés egyeddel rendelkező fajok, kihalással fenyegetett, védett fajok). Különösen kutyatulajdonosok részéről fogalmazódik meg gyakran az a kérés az állatorvos felé, hogy szeretné, ha idős, betegséggel terhelt kedvencétől még utódok születnének. Ezekben az esetekben az állatorvos – a humán gyakorlathoz hasonlóan – az ART-k használatától remélhet sikert.

A humán adatok azt mutatják, hogy a termékenységi arányszám (TA), amit a termékeny időszak alatt (15 és 49 éves életkor között) a nők által világra hozott gyermekek száma határoz meg, azaz az egy nőre vetített szülések átlagos száma, nagyon sok országban drámai módon folyamatosan csökken, most már hosszú ideje [1]. Várhatóan kb. 50 éven belül a TA az országok többségében a népességszám fenntartásához szükséges szám alá csökken (2,1 gyermek/nő). A TA csökkenése világszerte egyre nagyobb aggodalmat okoz a szakemberek körében, káros következményei egyre több országban és területen (oktatás, ipar, egészségügy, foglalkoztatás) jelentkeznek már napjainkban is.

Az emberek 16%-a meddőségi problémával érintett

A *meddőség* (infertilitás) a női és férfi reprodukciós szervek betegsége, amikor védekezés nélkül, egy éven keresztül folytatott rendszeres házasélet ellenére nem sikerül terhességet elérni. Egy ilyen helyzet a konkrét probléma mellett az érintettek életminőségére is negatívan hat, valamint mentális gondokat is okozhat. A WHO és más szervezetek által publikált adatok szerint 6 emberből egy ember küzd meddőségi problémával (16%), ami jól jelzi a helyzet komolyságát [1]. Párokkal készített adatgyűjtések eredményei arra utalnak, hogy 16%-uk érintett meddőségi problémával [2]. Becslések szerint az egész világon kb. 50 millió párnak jelent komoly gondot a teherbeesés és 186 millió egyén él meddőségi problémával [2]. Dél- és Kelet-Európában a legkisebb a termékenységi ráta az egész világon, ahol egy nőnek átlagosan 1,5 gyermeke van. Sajnos hazánkban is az 1990-es évek elején még 1,8 volt a TA, mára azonban 1,5-re csökkent. Európában Svédországban a legjobb a termékenységi ráta: átlagosan 1,9 gyermeke van egy nőnek. Fejlődő országokban 4 párból egy párnak fertilitási problémája van (25%) [1]. A legújabb felmérések szerint a meddőségi esetek 30%-a női partner, 30%-a férfi partner eredetű és 30%-nál mindkét fél érintett. A meddőségi esetek 10%-nál az ok ismeretlen [3].

A felmérések adatai azt mutatják, hogy nők esetében a fertilitás 20 és 30 éves kor között optimális, majd 35 éves kor után gyorsan elkezd hanyatlani [1]. A 43. életév után a teherbe esés esélye rendkívül kicsi. Ugyanakkor világtendencia, hogy a nők az optimálisnál lényegesen később vállalkoznak a terhességre, ill. kerülnek olyan élethelyzetbe, hogy felmerülhet a gyermekvállalás kérdése/tervezése. A hazai adatok azt mutatják, hogy amíg az anyai életkor az első gyermek születésekor 1980-ban 23 év volt, addig mára már 29 év [14]. Az egyik hazai meddőségi centrum munkatársai közel 4000 páciens adatainak értékelésével arra a következtetésre jutottak, hogy 2004 és 2014 között, 10 év alatt a fagyasztott IVF (*in vitro* fertilizáció) ciklusban részt vevő nők átlagos életkora 31,8 évről 35,4-ra emelkedett. A fagyasztott ciklusok 70%-ában a páciens életkora 31 és 40 év között volt, míg a ciklusok 7,5%-ában 41 évnél idősebb volt [14].

A különböző szervezetek által az ART-k humán reprodukciós medicinában történő alkalmazásával kapcsolatban publikált néhány adat (Center for Disease Control and Prevention, CDC, 2017; World Health Organization, WHO, 2024; Human Fertilisation and Embryology Authority, HFEA, 2022/23):

- Az élve születések 2%-a ART alkalmazásának az eredménye [1, 6]
- Az átlagos terhességi arány a 18–34 éves korosztályban a friss embriók beültetésénél 44% volt (beültetett embriónként) 2022-ben az Egyesült Királyságban. A 43–50 éves korcsoportnál ez a szám 9% volt, amikor saját embrió került visszahelyezésre [4, 5]
- Az AR-es ciklusok (donor inszeminációk, petesejt- és embriófagyasztás, petesejt- és embriódonáció, friss ICSI- és IVF-ciklusok) összes száma 1991 és 2022 között közel 2 millió volt az Egyesült Királyságban. Ugyanebben az időszakban a páciensek összes száma közel 700 000 volt [5, 6]
- A beültetett embrióra vetített átlagos születési arány 28% volt 2022-ben. 1991 és 2022 között a születési arány 7%-ról emelkedett 28%-ra [5]
- A beültetett embrióra vetített terhességi arány 36% volt 2022-ben. 1991 és 2022 között a terhességi arány 9%-ról 36%-ra emelkedett [4, 5]

A meddőségi esetek száma folyamatosan emelkedik, az ART-t igénybe vevő meddő párok aránya évente 5–10%-kal nő

A meddőségi esetek száma folyamatosan emelkedik, az ART-t igénybe vevő meddő párok aránya évente 5–10%-kal nő, különösen azért, mert nagyon sok pár későbbre halasztja a gyermekvállalást, amikor a fertilitásuk már csökkenő fázisba került (35 éves kor felett). Ennek következtében az AR-os (meddőségi) kezelések jelentősége évről évre nő és egyre gyakrabban alkalmazzák őket, hogy a párok családot alapíthassanak. Hazánkban 45 éves korig vehetik igénybe a páciensek a lombikbébi-kezelést (*1. táblázat*).

A szakemberek véleménye szerint több oka is van annak, hogy a fiatal párok csak később vállalkoznak családalapításra: hosszabb időt töltenek az oktatásban tanulóként, amelyet hosszú karrierépítés követ, később házasodnak (amely

1. TÁBLÁZAT. *Magyarországon 2017 és 2021 között a lombikbébi programokból megszületett gyermekek száma (https://24.hu/kozelet/2023/02/24/lombik-adatok-retvari-bence/dat)*

TABLE 1. *Total number of children born from IVF/ICSI + ET in Hungary between 2017 and 2021*

Év	Beültetések száma	Megszületett gyermekek száma	%
2017	7473	1470	19,6
2018	9005	1726	19,1
2019	10 170	1948	19,1
2020	9573	1719	17,9
2021	12 237	2035	16,6

kapcsolatban áll az előbbi okokkal), könnyen hozzá lehet jutni a fogamzásgátlókhoz, a családok mérete csökkent. Mindezek következtében (ahogyan azt fentebb is említettük) a párok kb. 16%-nál egy évi próbálkozás után sem jön létre terhesség.

A humán reprodukciós medicinában leggyakrabban alkalmazott AR-os eljárások a következők: mesterséges termékenyítés (MT), *in vitro* fertilizáció (IVF), intracitoplazmatikus spermiuminjektálás (ICSI), embriótranszfer (ET), embrió- és petesejtfagyasztás, spermamélyhűtés, ultrahangos ellenőrzés mellett végzet folliculusfolyadék leszívásával történő petesejtgyűjtés (Ovum Pick Up, OPU), preimplantációs genetikai szűrés/diagnózis (PGD).

Az állatorvosi AR területén a leggyakrabban alkalmazott ART-k a következők:

1.) Mesterséges termékenyítés (MT). A tejelő tehenek 100%-át inszeminálják.

2.) A ciklus hormonális manipulálása/módosítása – ivarzásszinkronizálás/-indukálás. A hormonális kezelés segítségével a tenyésztők megtervezhetik a termelési ciklust, időzíteni tudják mesterséges termékenyítést és ennek következtében az újszülöttek világra jövetelének idejét is meghatározhatják egy olyan időpontra (programozni lehet), amikor drágábban tudják őket értékesíteni (pl. húsvéti bárány).

Állatorvosi területen leggyakrabban használt ART-k:
- Mesterséges termékenyítés
- Ivarzásszinkronizálás
- Embriótranszfer

3.) Embriótranszfer (ET). Az első embriótranszfer-borjú, amit akkor még sebészi úton hajtottak végre, 1951-ben született. Az embrióátültetés gyakorlatban történő alkalmazását és terjedését nagyban elősegítette, hogy az 1970-es évek elején megnőtt az érdeklődés Észak-Amerikában az európai ún. kontinentális szarvasmarhafajták iránt. Az élőállatimportot közvetlenül Európából nagyon megnehezítették a jelentős költségek és a szigorú állategészségügyi előírások. Ebben a helyzetben az ET kiváló lehetőséget biztosított arra, hogy az Észak-Amerikába már bevitt egyedekből embriókat nyerjenek és az ET segítségével rövid idő alatt lényeges emelkedést érjenek el a kontinentális fajták létszámában. A gyorsan megnőtt igényt kielégítendő az ET-t szolgáltatásképpen cégek és magánállatorvosok nyújtották a tenyésztők számára, így a technológia rövid időn belül kikerült a laboratóriumi környezetből a gyakorlatba.

A legtöbb embriót szarvasmarhába ültetik be. A szarvasmarha-embriókat *in vivo* és *in vitro* (lombikbébi) technológiával „termelik". Az első esetben az embriódonor egyedet (amelyből kinyerik az embriót) szuperovuláltatják, rendszerint FSH-hormonnal. A szuperovulációs hormonkezelés alatt a donort 2–3 alkalommal termékenyítik, így a termékenyülés *in vivo*, a petevezetőben következik be. Az embriókat a termékenyítés utáni 7. napon (az első termékenyítés a 0. nap) nem sebészi úton, speciális katéterek alkalmazásával, a méhszarvak tápfolyadékkal való átöblítésével nyerik (*in vivo* előállított embriók, *in vivo* derived embryos, IVD). *In vitro* embriótermelésnél (*in vitro* embryo production, IVP), az első lépés a petesejtek kinyerése a fejlődő folliculusokból. A beavatkozást ultrahangos ellenőrzés mellett speciális aspirációs tűvel, a tüszőfolyadék leszívásával végzik. Ez az ún. Ovum Pick Up (OPU) technika, ami megegyezik az emberben alkalmazott technikával. A módszert először nőben alkalmazták, majd néhány évvel később adaptálták állatgyógyászati használatra, először szarvasmarhában, majd lóban. Meg kell említeni, hogy a humán- és az állatgyógyászatban alkalmazott laboratóriumi *in vitro* embriótermelési technológiákban megmutatkozó nagy hasonlóság mellett van közöttük több fontos/markáns különbség is. Az egyik a gyűjtött petesejtek érettségi állapotában van, a másik az OPU + IVP technológia alkalmazásának indikációjában tapasztalható. Az állatorvosi gyakorlatban éretlen petesejtek gyűjtésére kerül sor, mivel nem érett, hanem csak fejlődő folliculusokból történik a petesejtek gyűjtése. Ezeket az éretlen petesejteket először *in vitro* érlelni (*in vitro* maturáció) kell, hogy érett állapotba kerüljenek és termékenyíteni lehessen őket.

Állatokból leggyakrabban éretlen, míg emberekből érett petesejteket gyűjtenek

Emberben már érett petesejteket gyűjtenek, mert a páciensek 35–36 órával a petesejtgyűjtés előtt hCG-kezelésben részesülnek. A hCG-kezelés LH-hatással rendelkezik, ezért beindítja a petesejtek érését, így a petesejtek a folliculusfolya-

dék- és petesejtaspiráció idején már érettek és az OPU után azonnal termékenyíthetők (*in vitro* fertilizáció, IVF). Így emberben az *in vitro* érlelési (*in vitro* maturáció, IVM) fázis elhagyható. A szarvasmarha esetében azonban (és más állatfajoknál is) kettő helyett három lépésből áll az IVP-technológia: *in vitro* maturáció, *in vitro* fertilizáció/termékenyítés és *in vitro* tenyésztés.

Asszisztált reprodukciós technikáknak háziállatokban történő alkalmazásával kapcsolatban az IETS által a közel múltban publikált statisztikai adatok (International Embryo Technology Society, IETS; Data Retrieval Committee, 2022) (*2. és 3. táblázatok*):

TÁBLÁZAT 2. *Összesen megtermelt átültethető minőségű embriók száma a különböző háziállatfajokban (IVD + IVP)*

TABLE 2. *Total number of transferable quality embryos in the different farm animal species (IVD + IVP)*

Faj	*In vivo* előállított (IVD)	*In vitro* előállított (IVP)
Szarvasmarha	386 000	1 500 000
Ló	25 000	11 000
Juh	41 000	600
Kecske	11 000	6000

TÁBLÁZAT 3. *Összesen beültetett embriók száma a különböző háziállatfajokban (IVD + IVP)*

TABLE 3. *Total number of transferred embryos in the different farm animal species (IVD + IVP)*

Faj	*In vivo* előállított (IVD)	*In vitro* előállított (IVP)
Szarvasmarha	313 000	1 200 000
Ló	26 000	6000
Juh	67 000	400
Kecske	10 000	5600

2022-ben több, mint 1,5 millió IVP-szarvasmarha-embriót termeltek a világon

Az adatok azt mutatják, hogy 2022-ben több, mint 1,5 millió IVP-szarvasmarha-embriót termeltek a világon, ami 2020-hoz képest 31,5%-os emelkedést jelent (1 521 018 vs. 1 156 422). A gyűjtött és beültetett IVD-embriók száma szintén emelkedett 2022-ben, 2020-hoz képest (+6,8% és +6,5%). Összevonva az IVD és IVP adatait a világon előállított összes szarvasmarha embriószámban tapasztalható emelkedés mértéke 25,6% volt 2022-ben. Az összes megtermelt átültethető minőségű szarvasmarha-embrió közel 80%-a IVP előállított embrió volt a világon (lombikbébi technika) 2022-ben. Az adatok szerint Észak- és Dél-Amerikában végezték a szarvasmarhaembrió-beültetések közel 90%-át 2022-ben.

A fagyasztott IVP-embriók száma csak kis mértékben emelkedett 2022-ben 2020-hoz képest (41,3% vs. 39,5%). Az összes ET-t figyelembe véve a beültetések 32,6%-ban fagyasztott IVP-embriót és csak 12,8%-ban ültettek mélyhűtött IVD-embriót 2022-ben.

Összefoglalva megállapítható, hogy a COVID-járvány után ismét megélénkült az érdeklődés az ART-k iránt, különösen a szarvasmarha fajban. A megtermelt és

beültetett szarvasmarhaembriók száma ismét rekordmagasságba emelkedett és elérte a 2003-ban tapasztalt nagy, rekord számokat. Az ET-k száma szarvasmarhában és az amerikai kontinensen volt a legnagyobb 2022-ben.

A humán- és állatgyógyászatban egyaránt igaz, hogy az ART-k folyamatosan fejlődnek. Javul a hatékonyságuk és új eljárások kerülnek kifejlesztésre. A humán területen alkalmazásuknak köszönhetően ma már sok olyan házaspárnak lehet gyermeke, akiknek korábban nem. Az innovációban több terület szakemberei vettek és vesznek részt, elsősorban orvosok, biológusok és állatorvosok. Az állatorvosok és biológusok szerepe nagyon fontos az innovációs és az adaptációs folyamatban. Az állat-biotechnológiai/asszisztált reprodukciós módszereket először állatokon alkalmazzák, a laboratóriumi technológiákat állatembriók, -ivarsejtek felhasználásával fejlesztik ki, majd a kedvező tapasztalatok hatására megkezdődhet az eljárások adaptálása a humán reprodukciós gyógyászatban. Nagyon sok biológus és állatorvos, akik „állatos oldalon" kezdtek ma már humán embriológusként dolgoznak IVF-centrumokban.

A humán módszerek fejlesztése az állatokban végzett ART-kutatások tapasztalatain alapul

A haszonállatokban, elsősorban szarvasmarhában és a laboratóriumi állatokban az ART-k alkalmazásával szerzett tapasztalatok nagyon hasznosak és fontosak a humán reprodukciós medicina számára. Jogi és etikai okokból a humán sejtek, szövetek, tesztanyagok kísérleti/innovációs célból történő felhasználása nagyon nehéz folyamat eredményeként kaphat csak zöld utat. Ennek következtében az ART-k fejlesztésével, hatékonyságuk javításával vagy új eljárások kialakításával kapcsolatos innovációs munkában az említett anyagoknak a használata nagyon nehéz, ill. reménytelen. Ennek a hiányát jól pótolja és megoldást jelent, ha az állatkísérletekben és/vagy a háziállatokkal folytatott gyakorlati munka során gyűjtött tapasztalatokat hasznosítjuk a humán AR-ben. Ezt a lehetőséget erősíti, hogy az AR esetében az emberben és a háziállatokban alkalmazott technikák nagyon hasonlítanak egymásra, gyakran megegyeznek egymással. Nagyon jó példák az utóbbira: a gaméták és az embriók mélyhűtése, az embriók *in vitro* tenyésztése, a spermiuminjektálásnál használt alaptechnika kidolgozása, osztódási orsó kimutatása, a zona pellucida lézeres kezeléssel (lézer asszisztált hatching) történő megnyitása a blastocysta stádiumú embriónak a zona pellucidából történő kibújásának elősegítése stb. A humán embriók tenyésztésére használt tápfolyadékok kereskedelmi forgalomba helyezése előtt ún. minőségi ellenőrzésen mennek keresztül, amelynek során egérembriókat tenyésztenek az oldatokban. A forgalomba a felsorolt esetekben és másoknál is az eljárások kidolgozásánál, az első sikerek elérésénél állatembriókat használtak a kutatók. Ezt követte a kialakított technika/technológia adaptálása a humán területen. Napjainkban is több olyan területe van a humán AR-nek, ahol a továbblépést a technológia fejlesztése terén az állatkísérletek révén nyert tapasztalatoktól várjuk: a preantralis tüszők életképességének és tovább fejlődési erélyének nem invazív vizsgálata és értékelése, petefészekszövet, preantralis tüszők és folliculusok fagyasztása, mélyhűtött és felolvasztott petefészek szövet transzplantációja, preantralis és antralis folliculusok *in vitro* tenyésztése fagyasztás előtt és után.

A továbbiakban néhány olyan technikát ismertetünk, amelyeket ma már rutinszerűen alkalmaznak a klinikai humán AR-ban, vagy várhatóan a közeljövőben alkalmazni fognak és amelyek kifejlesztésében az állatkísérletekben/szarvasmarhában a gyakorlati alkalmazás során szerzett tapasztalatok meghatározó jelentőséggel bírtak.

IVARSEJTEK ÉS AZ EMBRIÓ MÉLYHŰTÉSE

A spermiumok sikeres hűtéséről az első beszámoló 1949-ben jelent meg, amikor egy Cambridge-i kutatócsoport felfedezte, hogy a glicerin hatékony védelmet nyújt a spermiumok számára alacsony hőmérsékleten [7]. Napjainkban is a gyakorlatban mindegyik munkacsoport glicerint használ védőanyagként a spermafagyasztás-

nál. Az embrió- és a petesejtfagyasztásnál a glicerin mellett más krioprotektív anyagokat is használnak, mint pl. az etilén-glikol, propilén-glikol, DMSO stb. Az első sikeres embriómélyhűtésről és a felolvasztott embriók eredményes beültetéséről egérben, egymástól függetlenül, két munkacsoport is beszámolt 1972-ben [8–10]. Az első fagyasztott embrióból megszületett borjúról egy évvel később jelent meg közlemény [11]. A fagyasztott petesejtből származó első utódok is egérben születtek meg [12]. Ebben az esetben ugyanazt a mélyhűtési technológiát használták, amivel az embriókat fagyasztották. Az első siker óta eltelt 50 év alatt az innovációnak köszönhetően több változtatás is történt az embrió- és petesejtfagyasztási technológiában. A fagyasztógéppel történő fagyasztás (ún. lassú mélyhűtés) időtartama 3–4 óráról (kezdetben ezt alkalmazták) kb. 1 órára csökkent (1980-as évek közepétől már ezt alkalmazzák), ami nagyon kedvezően hatott az eljárás gyakorlatban való elterjedésének. Az ún. lassú fagyasztási technika mellett napjainkban már egy másik eljárás is a szakemberek rendelkezésére áll, amit vitrifikációnak nevezünk. Ennél a módszernél nem kell sejtfagyasztó berendezést használni, ami csökkenti a költségeket és a hűtés időtartamát. Az embriók/petesejtek vitrifikációja csak néhány percet vesz igénybe, így a sejtek mélyhűtése gyakorlati körülmények között is egyszerűen kivitelezhető. A módszer alkalmazása azonban nagy gyakorlatot kíván meg az embriológustól.

Emberekben IVF-program eredményeként megszületett összes csecsemőnek kb. a 10%-a származik mélyhűtött embrióból

Az első fagyasztott humán embrió visszahelyezésével elért terhességről az egérben elért siker után 10 évvel jelent meg cikk [13]. A humán embriók mélyhűtésénél ugyanazt a technológiát alkalmazták, mint amivel az egér- és nyúlembriókat fagyasztották, valamint az egérpetesejteket mélyhűtötték. Az elért innovációs eredményeknek köszönhetően napjainkban már az embrió és az ivarsejtek (petesejt, spermium) fagyasztása naponta alkalmazott klinikai rutin eljárássá vált az ember és az állat, elsősorban haszonállatok és a laboratóriumi állatok AR-jében. Amig a humán embriológusok közül a legtöbben a vitrifikációs technikát alkalmazzák az embriók és petesejtek mélyhűtésére, addig a szarvasmarha-embriók fagyasztására, a gyakorlati alkalmazás igényeihez igazodva még ma is elsősorban a programozott, sejtfagyasztó berendezést igénylő lassú mélyhűtési eljárást alkalmazzák.

A humán AR-ben a szakemberek által általánosan elfogadott adat, hogy az IVF-program eredményeként megszületett összes csecsemőnek kb. a 10%-a származik mélyhűtött embrióból. Ugyanakkor, a páciensek ún. többletembrióit (amelyek nem kerülnek visszahelyezésre friss embrióként az OPU + IVF/ICSI ciklusban) mélyhűtve és egy későbbi ET-ciklusban felolvasztás után ezeket visszaültetve további kb. 10%-kal megemelkedik a születések száma a pácienseknél.

A petesejtek fagyasztása az embriómélyhűtéshez képest további előnyökkel jár: 1. jó eséllyel megtartható azoknak a női pácienseknek a fertilitása, akik onkológiai kezelésre (kemoterápia, sugárterápia) várnak, 2. az embriómélyhűtéssel és fagyasztva tárolással szemben etikai, vallási, vagy morális okokból idegenkedő hölgyek esetében megoldást jelenthet, 3. ha nem áll rendelkezésre megfelelő minőségű sperma a program megmenthető a petesejtek fagyasztásával későbbi felhasználásra, 4. a hölgyek számára lehetőséget nyújt a terhesség/gyermek vállalás későbbre halasztására, amire különböző, nem egészségügyi okokból egyre nagyobb igény mutatkozik (pl. megnőtt a tanulással töltött évek száma, karrier építés). A szakirodalomban az utóbbi jelenséget „social freezing”-nek („társadalmi fagyasztás”) nevezik, aminek az a célja, hogy megakadályozza az életkor emelkedésével kapcsolatba hozható csökkenést a termékenységben/fertilitásban.

Haszonállatok közül szarvasmarhában végzik a legtöbb fagyasztott embriótranszfert

A haszonállatok közül a szarvasmarha fajban végzik a legtöbb fagyasztott embriótranszfert (FET) összesen 489 239 fagyasztott IVP-embriót ültettek be (friss IVP-embriók száma 684290 volt) 2022-ben a világon. Juhban csak 6068 fagyasztott IVD-embriót transzferáltak (friss IVD-embriók száma 60 772 volt). A beültetett összes IVP-embrió száma nagyon kevés volt. Érdekes, hogy a másik

kiskérődzőben, a kecskében 9675 friss IVD-(fagyasztott nem került lejelentésre), ill. 4113 friss és 1489 fagyasztott IVP-embrió beültetésére került sor. Lóban 26 179 friss IVD-embriót ültettek be (mélyhűtött embriók száma elhanyagolható) és a beültetett friss IVP-embriók száma 3313 volt, míg a fagyasztott IVP-embriókból 2724 db (IETS, 2022).

A ZONA PELLUCIDA MEGNYITÁSA LÉZERES KEZELÉSSEL A BLASTOCYSTA KIBÚJÁSÁNAK ELŐSEGÍTÉSE CÉLJÁBÓL (LASER ASSISTED HATCHING)

A zona pellucida (ZP) az embrió belső állományát határolja kívülről és borítja be egy borítékhoz hasonlóan. A ZP fajspecifikus receptorokat tartalmaz, amelyek a termékenyülés folyamata során lehetővé teszik a spermiumnak a felkapcsolódását a ZP-ra, ami elindítja egyrészt az akroszóma-reakciót és ezáltal segíti a spermiumnak a petesejtbe történő bejutását, másrészt az un. zona blokkot, ami megakadályozza további spermiumok átjutását a ZP-án [15]. A blastocysta stádiumban a ZP felreped (hatching, kibújás), aminek köszönhetően az embrió belső állománya elhagyhatja a ZP-át. A blastocystának a ZP-ból történő kibújása az embrió implantációja (a trophobalst-sejtek és az endometrium közötti fizikai kapcsolat kialakulása) szempontjából meghatározó jelentőségű esemény. A ZP felrepedésében/megnyílásában több tényező is szerepet játszik: folyadékfelhalmozódás a blastocysta üregében, ami miatt jelentősen megnő az embriónak a mérete és emelkedik a belső nyomás, az embrió méretének növekedése és enzimes emésztési folyamatok eredményeként elvékonyodik a ZP, gyakran zsugorodik – visszatágul az embrió (gyakori kontrakciók). Humán megfigyelések szerint nőben az életkor emelkedésével a ZP felrepedésének folyamata zavart szenved, a ZP megkeményedik, elveszíti rugalmasságát, jelentősen csökken az elvékonyodás mértéke. Az említettek mellett hozzá járulhat a ZP megkeményedéséhez az *in vitro* tenyésztési környezet és a mélyhűtés is [17]. A blastocysta kibújásának zavara okolható a gyngébb terhességi eredményekért előrehaladottabb életkorban lévő nők esetében (37 éves életkor felett), továbbá a mélyhűtött embrió transzfer ciklusokban.

A blastocysta kibújásának zavara okolható az idősödő nők termékenységének romlásáért

A ZP felrepedésének zavarára visszavezethető infertilitás gyógykezelése céljából több technikát is kifejlesztettek (ZP mechanikus nyitása, savi karakterű folyadéknak a ZP-re eresztése, lézersugár használata; mindhárom eljáráshoz mikromanipulátort használnak), amelyekkel segíteni lehet az embriót abban, hogy elhagyhassa a ZP-t. A lézer alkalmazására az 1980-as évek végétől került sor először hörcsög és egér petesejtek, majd egér embriók felhasználásával [16, 17, 18]. A kedvező tapasztalatok hatására kezdték el a technika adaptálását a humán AR-ban humán embriókra.

Lézer használatával elvékonyítják a ZP-t, hogy megkönnyítsék a blastocysta kibújását

A lézerasszisztált hatching/kibújás (LAH) alkalmazásakor lézersugárral elvékonyítják és/vagy megnyitják a ZP-t (kis krátert alakítanak ki a ZP-ban; *1.ábra*), hogy segítsék a blastocysta kibújását a ZP-ból és ennek köszönhetően a beágyazódását az endometriumba. Kanyó és mtsai (2016) eredményei azt mutatják, hogy 37 évesnél idősebb nők esetében a terhességi eredményekben egyértelműen kimutatható a LAH-technika alkalmazásának pozitív hatása a fagyasztott ET ciklusban [19, 20]. Ugyanakkor, 37 évesnél fiatalabb páciensenél a terhességi eredményekben csak az emelkedés tendenciáját tudták kimutatni. A vizsgálatok eredményei azt mutatják, hogy a LAH-technika használata erősen ajánlott fagyasztott ET-ciklusokban, különösen idősebb, 37 év feletti páciensek esetében.

AZ OSZTÓDÁSI ORSÓ KIMUTATÁSA A PETESEJTBEN (AZ UN. SPINDLE VIEW TECHNIKA)

A metafázis 2-es stádiumú (MII) petesejt különleges tulajdonságokkal bír: nagy méretű, nagy víztartalmú sejt, ami, nagyon érzékeny az alacsony hőmérséklettel szemben, törékeny és könnyen szenved el különböző sérüléseket, nagyon kicsi a térfogat felület aránya, tartalmazza az osztódási orsót (spindle-t), a permeábilitási viszonyok nem ideálisak a víz és a krioprotektív anyagok számára. Mindezek azt

1. ÁBRA. *Az LAH-kezelés után jól látható 11 óránál a lézersugárnyaláb hatására a ZP-ban kialakult „kráter” (nyíl), ami majd segíti a blastocysta stádiumban az embrió kibújását a ZP-ból*

FIGURE 1. *Laser assisted hatching treatment using laser beam created a crater (arrow) at 11 o'clock in the ZP which will support the hatching of the blastocyst*

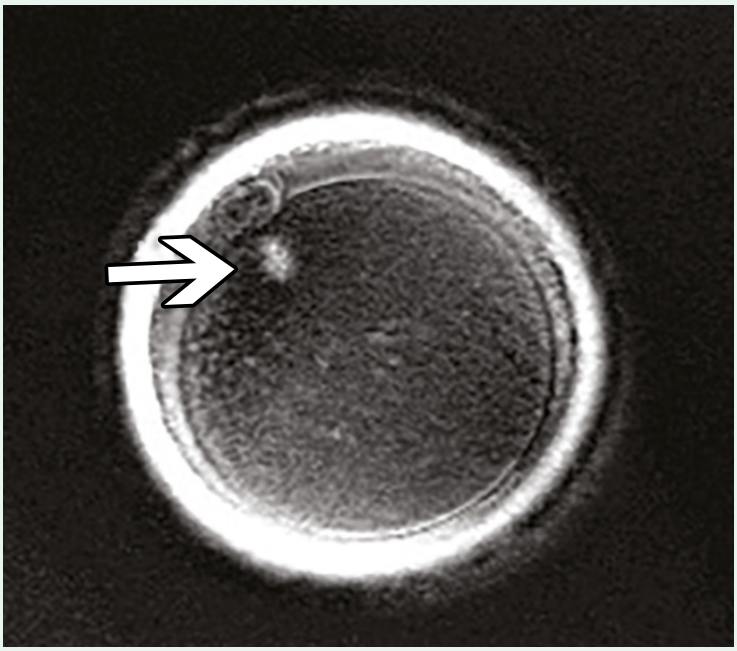
eredményezik, hogy fokozottan érzékeny a környezetével (pl. pH, ozmotikus nyomás), az alacsony hőmérséklettel és a fagyasztással szemben. Az osztódási orsó (spindle) egy nagyon törékeny, könnyen széteső mikrotubulusokból álló struktúra. Ugyanakkor nagyon fontos feladatokat tölt be a termékenyülési folyamat során (a meiozis befejezése, 2. sarki test kialakulása és kilőkődése, a női és a hím előmagok és a kromoszómák mozgatása). Az osztódási orsó sérülése (depolimerizáció) megzavarja a szabályos termékenyülési folyamat eseményeinek lejátszódását és a beágyazódás előtt a korai stádiumú embrió fejlődését. Az aneuploidia (amikor nem megfelelő számú kromoszómakészlettel rendelkezik a sejt) hátterében is az osztódási orsó sérülése, nem megfelelő működése húzódhat meg. Az aneuploidia az egyik leggyakoribb oka a termékenyülési folyamat zavarának és az embrió korai halálának, valamint a spontán vetélésnek.

Polarizációs mikroszkóppal vizsgálható a petesejt osztódási orsója

A polarizációs mikroszkópos (polscopos) technika kifejlesztésének köszönhetően ma már nem invazív eljárással tudjuk vizsgálni a petesejten belül az osztódási orsót, annak állapotát és a női ivarsejten belüli elhelyezkedését. Az osztódási orsó makromolekulákat tartalmazó mikrotubulushálózata és szerkezete kettős fénytörést idéz elő, ami polarizációs mikroszkóppal kimutatható [21]. Az orsó kimutatására a polscopos technikát először hörcsög- és egérpetesejteken alkalmazták és ellenőrizték az esetleges ártalmasságát is. A kísérletek során semmilyen káros hatást nem tapasztaltak, így megkezdődhettek a humán petesejtekkel kapcsolatos tanulmányok [21]. Ezekben megállapították, hogy a „spindle view” technika hasznos az IVF-re alkalmas, jó minőségű petesejtek kiválogatására. Továbbá a módszer segítségével tájékozódhatunk a spermiuminjektálás előtt (ICSI technika) az orsó petesejten belüli elhelyezkedésével kapcsolatban, ami segít megakadályozni, hogy az injektáló pipetta petesejtbe történő bevezetésekor véletlenül megsértsük az orsót (*2. ábra*) [19, 20].

A PRE-ANTRALIS TÜSZŐK *IN VITRO* TENYÉSZTÉSE ÉS MÉLYHŰTÉSE

A petefeszek kéregállományában több százezer éretlen petesejtet tartalmazó tüsző található, ezek gyűjtése, *in vitro* tenyésztése, IVF-ja és/vagy fagyasztása lehetővé teszi nemcsak a fajták örökítő anyagának hosszú távú mélyhűtve tárolását génbankokban, hanem a váratlanul elhullott, nagy értékű nőstény egyedtől utódokat is létre tudunk hozni [23, 26]. A humán AR-ban a módszernek a fertilitás



2. ÁBRA. *A polarizációs mikroszkópos technikával jól detektálható az osztódási orsó a petesejtben (fehér képletként, a sarki test közelében, az alatt helyezkedik el, nyíllal jelölve)*

FIGURE 2. *Spindle can be detected with the polscope technique in the oocyte (white spot, close to the polar body, arrow)*

elvesztésének veszélye esetén annak megőrzésében, ill. későbbi időpontra történő átmentésében lehet szerepe a jövőben.

A petefészekszövet mélyhűtését, valamint a felolvasztott minta autotranszplantációját leginkább daganatos betegekben alkalmazzák

A petefészekszövet fagyasztását sikeresen alkalmazták már néhány állatfajban (pl. juh, szarvasmarha, kecske, sertés). Az állatkísérletekben gyűjtött kedvező tapasztalatok alapján megkezdődött a módszer adaptálása a humán AR-ben is. A humán AR-ben a petefészekszövet mélyhűtése, valamint a felolvasztott minta autotranszplantációja bővítette a daganatos betegek, továbbá a petefészekműködés zavarának, ill. teljes leállásának veszélye esetén a termékenység átmentésében/megőrzésében igénybe vehető technikák tárházát. A módszernek köszönhetően az első gyermek 2004-ben született és azóta több mint 150 gyermek született világszerte [22, 24, 25]. A módszerben azonban van bizonytalansági faktor is, különösen az onkológiai betegeknél, mivel a kortikális régió visszaültetése révén esetleg kiújulhat a daganat és ennek kockázatát jelenleg nem lehet megbecsülni. Ezért a rosszindulatú szisztémás daganatos megbetegedésben szenvedők petefészekszövetének autotranszplantációja nem javasolt [26]. További hátrány a krioprezerváció miatt bekövetkező tüszőveszteség, ill. a tüszők petefészekszeleteken belüli egyenlőtlen eloszlása. Emiatt az elmúlt néhány évben egyre nagyobb az érdeklődés a preantralis tüszők felhasználása iránt. A felolvasztott preantralis tüszők *in vitro* tenyésztése ellenőrzött körülmények között történik, melynek köszönhetően csökken a betegségek átvitelének veszélye. A preantralis tüszőkben található petesejtek mérete nem éri el az érett petesejtekét, csak néhány granulosasejt-réteg veszi őket körül, kicsi a metabolikus aktivitásuk, valamint citoplazmájuk kevés lipidet tartalmaz. A preantralis tüszők a térfogatukhoz képést nagy felülettel is rendelkeznek (a felület térfogat arány kimondottan kedvező), ami kiváló diffúziót, anyagáramlást (permeabilitási viszonyokat) biztosít a mélyhűtésnél használt védőanyagok számára, ezért ezeknek a tüszőknek a fagyasztása jó hatékonysággal kivitelezhető [27].

MEGVITATÁS

A leírtakat összefoglalva megállapítható, hogy a szakemberek egybehangzó véleménye szerint az alkalmazott laboratóriumi és klinikai technikák hasonlósága, vagy éppen azonossága, valamint a megtermelt és beültetett embriók nagy

száma miatt az egér- és a szarvasmarha-embriókkal nyert tapasztalatok és eredmények – kis módosítással – közvetlenül hasznosíthatóak a humán AR-es kezelésekben. A szarvasmarha szaporításában régóta jelen vannak a reprodukciós technikák, folyamatosan fejlesztik azokat. Kiválóan alkalmas „terep" adatok gyűjtésére, mivel a beavatkozások gyakorlati és nem laboratóriumi körülmények között történnek nagy számú egyed bevonásával. A haszonállatokkal és laboratóriumi állatokkal végzett AR-beavatkozások és kísérletek a humán klinikumhoz képest kevésbé szigorú feltételek mellett zajlanak, így alkalmasak és hasznosak a humán alkalmazást megelőző tapasztalatszerzésre és adatgyűjtésre. Általános vélemény, hogy általuk felgyorsítható az előrehaladás a humán AR és a meddőségi kezelések területein is.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A TKP2020-NKA-01 számú projekt a Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból biztosított támogatással, a Tématerületi Kiválósági Program 2020 (2020-4.1.1-TKP2020) pályázati program finanszírozásában valósult meg. A tanulmányt az Állatorvostudományi Egyetem tudományos kutatási alapja támogatta (SRF-002 számú pályázat). A kutatást támogatta az Állatorvostudományi Egyetem Stratégiai Kutatási Alapja (SRF-001 számú pályázat). Az FK_134887 számú projekt a Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alapból biztosított támogatással, a „Fiatal kutatói kiválósági program (FK_20)" pályázati program finanszírozásában valósult meg.

IRODALOM

1. Infertility. World Health Organization Report, WHO 2024 https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infertility

2. UCLA Health. Infertility statistics 2024 https://www.singlecare.com/blog/news/infertility-statistics/

3. Infertility Stats You Should Know. Fertility Answers, 2023 https://www.fertilityanswers.com/13-stats-know-infertility/

4. Human Fertilisation and Embryology Authority, HFEA, 2022/23 https://assets.publishing.service.gov.uk/media/64c37ac67aea5b00126a8dbe/hfea-ara-2022-to-2023-web-accessible.pdf

5. Center for Disease Control and Prevention, FastStats, Infertility, CDC 2017 https://www.cdc.gov/nchs/fastats/infertility.htm

6. Center for Disease Control and Prevention, Assisted Reproductive Technology. Fertility Clinic Success Rates Report. 2017 https://ftp.cdc.gov/pub/publications/art/ART-2017-Clinic-Report-Full.pdf

7. Polge C, Smith U, Parkes AS (1949) Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures. Nature 164:666–670. https://doi.org/10.1038/164666a0

8. Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P (1972) Survival of mouse embryos frozen to -196 °C and -269 °C. Science 178:411–414.

9. Wilmut I (1972) The low temperature preservation of mammalian embryos. J Reprod Fertil 31:513–514.

10. Wilmut I (1972) The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development of survival of mouse embryos during freezing and thawing. Life Sci II 11:1071–1079. https://doi.org/10.1016/0024-3205(72)90215-9

11. Wilmut I, Rowson LEA (1973) Experiments on the low temperature preservation of cow embryos. Vet Rec 92:686–690.

12. Whittingham DG (1977) Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at -196°C degrees C. J Reprod Fertil 49:89–94. https://doi.org/10.1530/jrf.0.0490089

13. Trounson A, Mohr L (1983) Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. Nature 305:707–709. https://doi.org/10.1038/305707a0

14. Konc J, Kanyó K, Kriston R, Somoskyi B, Cseh, S (2014) Cryopreservation of Embryos and Oocytes in Human Assisted Reproduction. Biomed Res Int 2014:307268 https://doi.org/10.1155/2014/307268

15. Cohen J, Lindheim S, Sauer M (1999) Assisted hatching causes beneficial effects on the outcome of subsequent frozen embryos transfers of donor oocyte cycle. Fertil Steril 72 (Suppl. 1):S5

16. Cohen J (2007) Manipulating embryo development. In: Human Preimplantation Embryo Selection (eds Elder K, Cohen J) Abingdon UK: Informa Healthcare, Informa UK Ltd.

17. Gordon JW, Talansky BE (1986) Assisted fertilization by zona drilling: a mouse model for correction of oligospermia. J Exp Zool 239:347–357. https://doi.org/10.1002/jez.1402390306

18. Tadir Y, Wright WH, Vafa O, Liaw LH, Asch R, Berns MW (1991) Micromanipulation of gametes using laser microbeams. Hum Reprod 6:1011–1016. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137451

19. Kanyo K, Zeke J, Kriston R, Szücs Z, Cseh S, Somoskoi B, Konc J (2016) The impact of laser-assisted hatching on the outcome of frozen human embryo transfer cycles. Zygote 24:742–747. https://doi.org/10.1017/s0967199416000058

20. Waterman-Storer CM (1998) Microtubules and Microscopes: How the Development of Light Microscopic Imaging Technologies Has Contributed to Discoveries about Microtubule Dynamics in Living Cells. Mol Biol Cell 9:3263–3271. https://doi.org/10.1091/mbc.9.12.3263

21. Liu L, Oldenbourg R, Trimarchi JR, Keefe DL (2000) A reliable, noninvasive technique for spindle imaging and enucleation of mammalian oocytes. Nat Biotechnol 18:223–225. https://doi.org/10.1038/72692

22. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, Martinez-Madrid B, van Langendonckt A (2004) Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. Lancet 364:1405–1410. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(04)17222-x

23. Pieterse MC, Kappen RA, Kruip AM, Taverne MAM (1988) Aspiration of bovine oocyte,during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. Theriogenology 30:751–762. https://doi.org/10.1016/0093-691x(88)90310-x

24. Takae S, Suzuki N (2019) Current state and future possibilities of ovarian tissue transplantation. Reprod Med Biol 18:217–224. https://doi.org/10.1002/rmb2.12268

25. Grynberg M, Poulain M, Sebag-Peyrelevade S, le Parco S, Fanchin R, Frydman N (2012) Ovarian tissue and follicle transplantation as an option for fertility preservation. Fertil Steril 97:1260–1268. https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.04.042

26. Bordás L, Török D, Cseh S, Somoskői B (2025) Lehetőségek az izolált preantralis tüszők mélyhűtésében és tenyésztésében – tapasztalatok három fajból. Magy Állatorvosok Lapja 147:43–64. https://doi.org/10.56385/magyallorv.2025.1.43-64

27. Somoskői B, Bordás L, Uno F, Kispál D, Müller L, Tőrők D, Cseh S (2023) Effects of different cryopreservation methods on canine isolated preantral follicles. Anim Reprod Sci 258:107361. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2023.107361

Közlésre érk.: 2025. jan. 28.