



**UNIWERSYTET MEDYCZNY**  
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCŁAWIU

**Natalia Cybulska**

TYTUŁ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

*Ocena technik wspomagających oraz czynników prognostycznych dla rozwoju zarodka do stadium blastocysty oraz dla skuteczności procesu implantacji w procedurach zapłodnienia pozaustrojowego.*

PROMOTOR:  
*prof. dr hab. n. med. Robert Śmigiel*

RECENZENCI:  
*prof. nadzw. dr hab. n. med. Michał Radwan*  
*dr hab. n. med. Tomasz Fuchs*

WROCŁAW 2019

## ŻYCIORYS

Natalia Cybulska, urodzona 26 października 1981 roku w Opolu.

### WYKSZTAŁCENIE I DOŚWIADCZENIE ZAWODOWE:

- od 2005 do chwili obecnej – embriolog podmiotu GMW – Embrio Spółki z o. o. w Opolu, (ośrodek medycznie wspomaganej prokreacji oraz banku komórek rozrodczych i zarodków) obecnie na stanowisku: Kierownik Pracowni Andrologicznej i Pracowni Embriologicznej, Senior Embriolog Kliniczny
- 2016 – tytuł Embriologa Klinicznego – certyfikat nadany przez Polskie Towarzystwo Medycyny Rozrodu i Embriologii (PTMRiE)
- 2011 – tytuł Starszego Embriologa Klinicznego – certyfikat nadany przez Europejskie Towarzystwo Rozrodu Człowieka i Embriologii (ESHRE)
- 2010 – tytuł Embriologa Klinicznego – certyfikat nadany przez Europejskie Towarzystwo Rozrodu Człowieka i Embriologii (ESHRE)
- 2007 – certyfikat potwierdzający kompetencję w wykonywaniu procedur biopsji blastometów i PGD (nadany przez Sanatorium REPRODIMA DIN EN ISO 9001 – 2000 Certified Center of Reproductive Medicine and Genetics)
- 2005 – tytuł magistra biologii – Uniwersytet Opolski Wydział Przyrodniczo – Techniczny, kierunek: biologia. Temat pracy magisterskiej: „Terapia nowotworów z zastosowaniem interleukiny 12 skojarzonej z cyklofosfamidem”.
- 2003 – tytuł licencjata biologii; Uniwersytet Opolski Wydział Przyrodniczo – Techniczny, kierunek: biologia. Temat pracy licencjackiej: „Genetyczne podłoże procesów nowotworowych u człowieka”.

### CZŁONKOSTWA:

- European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) – status aktywnego embriologa
- Polskie Towarzystwo Medycyny Rozrodu i Embriologii (PTMRiE)
- American Society for Reproductive Medicine (ASRM).

### WYBRANE PUBLIKACJE:

1. Boniewska-Bernacka E, Pańczyszyn A, Cybulska N. Telomeres as a molecular marker of male infertility. Hum Fertil (Camb), 2018.
2. Cybulska N, Tomala M, Niemczyk W, Głab G. Współczesna diagnostyka i leczenie niepłodności. W: pod red. Lichtenberg – Kokoszka E, Janiuk E, Dzierżanowski J. Niepłodność – zagadnienie interdyscyplinarne. Impuls, Kraków 2009.
3. Mitrus J, Delič K, Wróbel N, Missol-Kolka E, Szala S. Combination of IL-12 gene therapy and CTX chemotherapy inhibits growth of primary B16(F10) melanoma tumors in mice. Acta Biochimica Polonica; Vol. 53, No. 2/2006.

## STRESZCZENIE PRACY

### WSTĘP

Procedura zapłodnienia pozaustrojowego (ang. *In Vitro Fertilization* – IVF) jest obecnie najskuteczniejszą i zarazem najbardziej skomplikowaną metodą medycznie wspomaganego rozrodu, która polega na pobraniu komórek jajowych i zapłodnieniu ich poza organizmem kobiety. Oczekiwany efektem leczenia jest uzyskanie ciąży klinicznej w wyniku implantacji wprowadzonego do jamy macicy zarodka, rozwijającego się w efekcie zapłodnienia pobranych oocytów. Niepłodność jest chorobą, której podłoże może być wieloczynnikowe, związane z organizmem kobiety lub mężczyzny albo w większym lub mniejszym stopniu może dotyczyć jednocześnie każdego z partnerów. U części pacjentów nie umiemy jednak jasno określić przyczyny problemu, a wyniki badań przedstawiają prawidłowe wartości. Z punktu widzenia embriologa złożoność leczenia niepłodności utrudnia fakt, iż wiele czynników może mieć wpływ w pierwszej kolejności na liczbę i jakość komórek rozrodczych, a w efekcie na rozwój samego zarodka lub bezpośrednio na jego zdolność do implantacji.

### CEL PRACY

Celem prowadzonych badań było wyznaczenie czynników prognostycznych, mających zmienny wpływ na rozwój zarodka do stadium blastocysty i na jego zdolność do implantacji oraz sprawdzenie wpływu wybranych technik wspomagających na skuteczność procedur zapłodnienia pozaustrojowego.

### MATERIAŁ I METODY

Praca doktorska została wykonana w oparciu o analizę materiału biologicznego oraz przy wykorzystaniu sprzętu i metodyki podmiotu GMW – Embrio Sp. z o. o., będącego ośrodkiem medycznie wspomaganą prokreacji oraz bankiem komórek rozrodczych i zarodków w Opolu. Analizie retrospektywnej poddano 211 procedur zapłodnienia pozaustrojowego metodą IVF-ICSI (co stanowiło 2197 komórek jajowych i 525 zarodków) oraz 234 zabiegi transferu kriokonserwowanych metodą witrifikacji zarodków (ang. *Vitrification Embryo Transfer* – VET) (co stanowiło 258 zarodków). Łącznie w pracy przeanalizowano 445 przypadków procedur, przeprowadzonych wśród par opolskiego ośrodka w latach styczeń 2016 – styczeń 2019, zgodnie z obowiązującymi standardowymi protokołami operacyjnymi.

Projekt badawczy został oparty na: 1. Selekcji i ocenie materiału biologicznego uwzględnionej w protokołach laboratoryjnych. 2. Analizie dokumentacji i historii medycznej. 3. Analizie mikroskopowej dokumentacji zdjęciowej (komórki jajowe, zarodki). Podczas klasyfikacji danych kryterium włączenia było uzyskanie minimum jednej blastocysty w procedurach zapłodnienia pozaustrojowego metodą docytoplazmatycznej mikroiniekcji plemnika do komórki jajowej (IVF-ICSI).

W I części badawczej zakwalifikowano 17 czynników prognostycznych (wzięto pod uwagę: wiek kobiety, wiek mężczyzny, przyczynę leczenia niepłodności, wagę pacjentki, BMI, koncentrację plemników, ruchliwość nasienia, rodzaj selekcji plemników podczas procedury IVF, cechy morfologiczne komórek jajowych oraz zarodków w 3 dobie hodowli) celem sprawdzenia ich wpływu na rozwój zarodka do stadium blastocysty. Do II części badawczej włączono 14 czynników

prognostycznych (wzięto pod uwagę: wiek kobiety, przyczyny leczenia niepłodności, wagę, BMI, rodzaj zastosowanej procedury lub techniki wspomagającej procedurę IVF, cechy morfologiczne komórek jajowych oraz blastocyst) celem sprawdzenia ich wpływu na skuteczność procesu implantacji zarodka.

Analiza statystyczna została przeprowadzona przy użyciu programu R, wersja 3.5.3.. Wyniki wyrażone jako średnia, odchylenie standardowe oraz ilorazy szans podano z 95% przedziałem ufności. Jako krytyczny poziom istotności przyjęto próg  $p < 0,05$ . Z uwagi na cechy rozpatrywanych liczb, przyjmujących w wielu przypadkach charakter zliczeń, analizę badanych zjawisk klinicznych oparto na własnościach rozkładu Poissona. Ewentualny wpływ badanych czynników ryzyka na częstość ich występowania szacowano na podstawie założeń regresji poissonowskiej. Metodę wyjaśniającą, z jakim efektem statystycznym badany czynnik ryzyka może przyczynić się do wystąpienia lub braku zdarzenia klinicznego, oparto na założeniach regresji logistycznej.

Projekt badawczy został pozytywnie zaopiniowany i zatwierdzony przez Komisję Bioetyczną przy PMWSZ w Opolu (numer zgody: 7/PO/2018).

#### WYNIKI

Na podstawie przeprowadzonej analizy statystycznej oraz uzyskanych wyników wyłoniono grupę statystycznie zmiennych czynników ryzyka ( $p < 0,05$ ), mających wpływ na rozwój zarodka do stadium blastocysty oraz na stopień jego implantacji.

#### CZYNNIKI PROGNOSTYCZNE DLA ROZWOJU ZARODKA

1. Wiek kobiet przystępujących do procedury zapłodnienia *in vitro* jest istotnym wyznacznikiem liczby pobranych komórek jajowych. Postępujący o rok wiek pacjentki generuje spadek liczb pobranych oocytów o 3%. Przy 10-cio letniej różnicy wieku spadek liczby pobranych komórek jajowych można szacować o ponad 1/4.
2. Liczba pobranych dojrzałych komórek jajowych (MII) jest istotnym predyktorem, od którego bezpośrednio zależy liczba zarodków uzyskanych w hodowli – z każdą większą różnicą pobrań 6 dojrzałych komórek, wzrost liczby zarodków TQ w 3 i 5 dobie hodowli można szacować aż o średnio 43,5%.
3. Statystycznie istotnym predyktorem wpływającym na liczbę oraz morfologiczną jakość komórek jajowych jest współczynnik BMI. Wzrost o 10  $\text{kg}/\text{m}^2$  jest przyczyną ponad 26% redukcji liczby wszystkich pobranych dojrzałych komórek jajowych oraz 17,5% spadku pod względem ich jakości morfologicznej. Również ze wzrostem o 10  $\text{kg}/\text{m}^2$  wartości wskaźnika BMI, o 20,8% maleje liczba prawidłowo zapłodnionych komórek jajowych (ZPN) oraz o 14% liczba zarodków w 3 dobie hodowli. Współczynnik BMI okazał się również istotnym statystycznie predyktorem wpływającym na liczbę blastocyst o najwyższej jakości morfologicznej (TQ) uzyskanych w 5 – 7 dobie hodowli, gdzie wzrost o 10  $\text{kg}/\text{m}^2$  jest przyczyną 40% redukcji liczby omawianych zarodków.
4. Wśród analizowanych przyczyn leczenia niepłodności najbardziej istotnym statystycznie czynnikiem jest endometrioza, której obecność redukuje o 25% liczbę wszystkich pobranych komórek MII, natomiast o 34,3% liczbę dobrej jakości komórek jajowych. Jej wpływ okazał się bardzo istotny w stosunku do liczby uzyskanych w 5 dobie hodowli blastocyst TQ gdzie poziom redukcji sięga 42,6%. Drugim istotnym predyktorem jest męski czynnik niepłodności, przy którym o 13% spada liczba zarodków uzyskanych w 3 dobie hodowli, nie wykazuje jednak podobnego

oraz wskaźnik cięż klinicznych (OR 1,05; 95% CI 0,99;1,1), potwierdzając bezpieczeństwo stosowanej metody kriokonserwacji i rozmrażania zarodków w stosunku do analizowanych wielkości.

4. Sprawdzono wpływ techniki wspomaganego wyklucia zarodka (AH) na skuteczność jego implantacji w porównaniu z grupą, gdzie proces wylęgania zaszędł samoczynnie. Nie stwierdzono istotności statystycznej ( $p > 0,05$ ) wpływu zastosowanej metody na uzyskanie ciąży, a wynikiilorazów szans wskazują na podobny stopień implantacji zarodka oraz wskaźnik cięż klinicznych. Wyniki pokazały natomiast znamiennej zależności między jakością blastocysty, a stopniem i czasem jej wyklucia.

#### WNIOSKI

1. Zwiększający się wiek kobiet przystępujących do procedury zapłodnienia *in vitro* jest istotnym statystycznie wyznacznikiem spadku liczby pobranych komórek jajowych.
2. Rosnąca liczba pobranych dojrzałych komórek jajowych (MII) jest silnym predyktorem, od którego bezpośrednio zależy wzrost liczby zarodków uzyskanych w hodowli.
3. Wraz ze wzrostem wartości BMI u kobiety obserwuje się redukcję liczby pobranych dojrzałych komórek jajowych oraz spadek ich jakości morfologicznej, spadek liczby prawidłowo zapłodnionych oocytów (ZPN), liczby zarodków w 3 dobie hodowli oraz liczby blastocyst o najwyższej jakości morfologicznej (TQ) uzyskanych w 5 – 7 dobie hodowli.
4. Wśród analizowanych przyczyn leczenia niepłodności najbardziej istotnym statystycznie czynnikiem jest endometrioza. Drugim w kolejności predyktorem jest męski czynnik niepłodności. Największe szanse na uzyskanie najwyższej liczby zarodków w 3 dobie hodowli oraz zarodków o najwyższej jakości morfologicznej wykazano przy czynniku idiopatycznym.
5. Rodzaj metody selekcji plemników zastosowanej podczas procedury ICSI należy do statystycznie istotnych czynników mających wpływ na liczbę oraz jakość zarodków uzyskanych w 3 dobie hodowli.
6. Klasa jakościowa zarodka w 3 dobie hodowli jest statystycznie istotnym predyktorem wpływającym na jakość zarówno węża zarodowego (ICM) jak i trofektodermi (TE).
7. Tempo podziałów zarodka w 3 dniu hodowli jest istotnym czynnikiem przekładającym się na efekt kliniczny. Opóźniony postęp rozwojowy powoduje redukcję szans na uzyskanie ogólnej liczby blastocyst TQ.
8. Silnym reduktorem szansy uzyskania w hodowli blastocysty o ICM A lub o TE A jest wystąpienie niesymetrycznych blastomerów w zarodku w 3 dobie hodowli.
9. Procedura mikroobjętościowej witrifikacji i rozmrażania zarodka nie wykazuje negatywnego wpływu na stopień implantacji oraz odsetek cięż klinicznych.
10. Bezpośrednim, istotnym statystycznie predyktorem, wpływającym na wzrost stopnia implantacji zarodka oraz podniesienie częstości uzyskanych cięż klinicznych jest wzrost liczby blastocyst o najwyższej ocenie jakościowej (TQ).
11. Wzrost jakości trofektodermi (TE A) oraz stopnia ekspansji blastocysty przenoszonej do jamy macicy podczas świeżego transferu, stanowią silne, istotne statystycznie czynniki wpływające na wzrost stopnia implantacji zarodka oraz wskaźnika cięż klinicznych.