

**Pécsi Tudományegyetem Egészségtudományi Kar
Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Bódis József az MTA doktora,
egyetemi tanár**

**Non-invazív vizsgálati lehetőségek az asszisztált
reprodukciónak a sikerességének emelésében**

Dr. Várnagy Ákos, PhD

Pécs, 2017. május 10.

Föld népessége – IVF fejlődése

1978 : 4,5 milliárd

2013: 7,2 milliárd

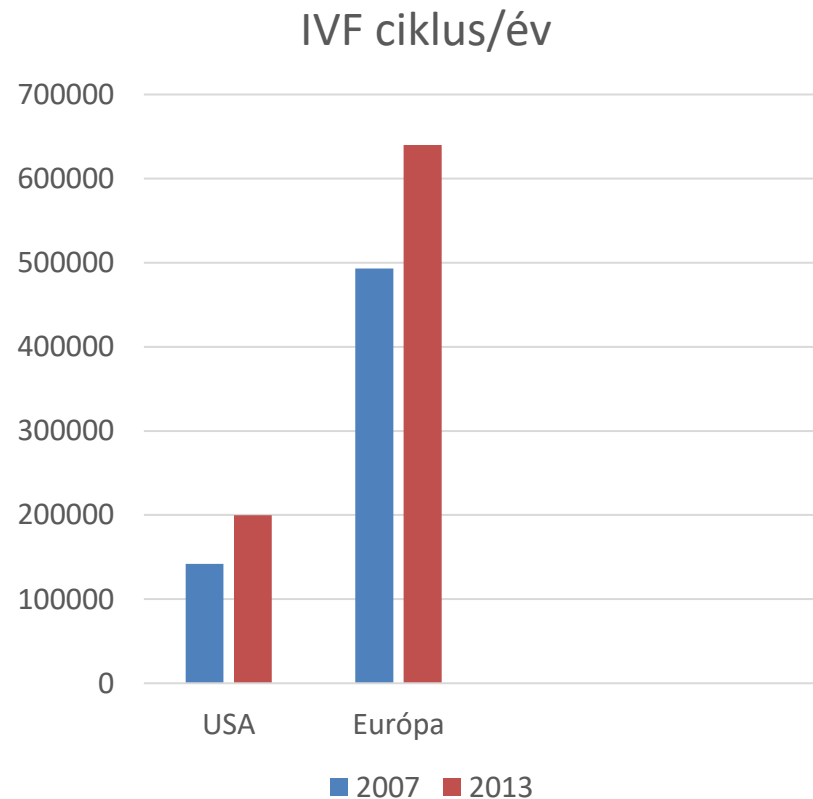
Luise Brown (első „lombik bébi”)

5.000.000 lombik bébi

USA : 6,8% évi emelkedés.

Európa: 5,9% évi emelkedés.

Magyarország: évente 6.000 ciklus
(2000 gyermek)



Terhességi ráta I.

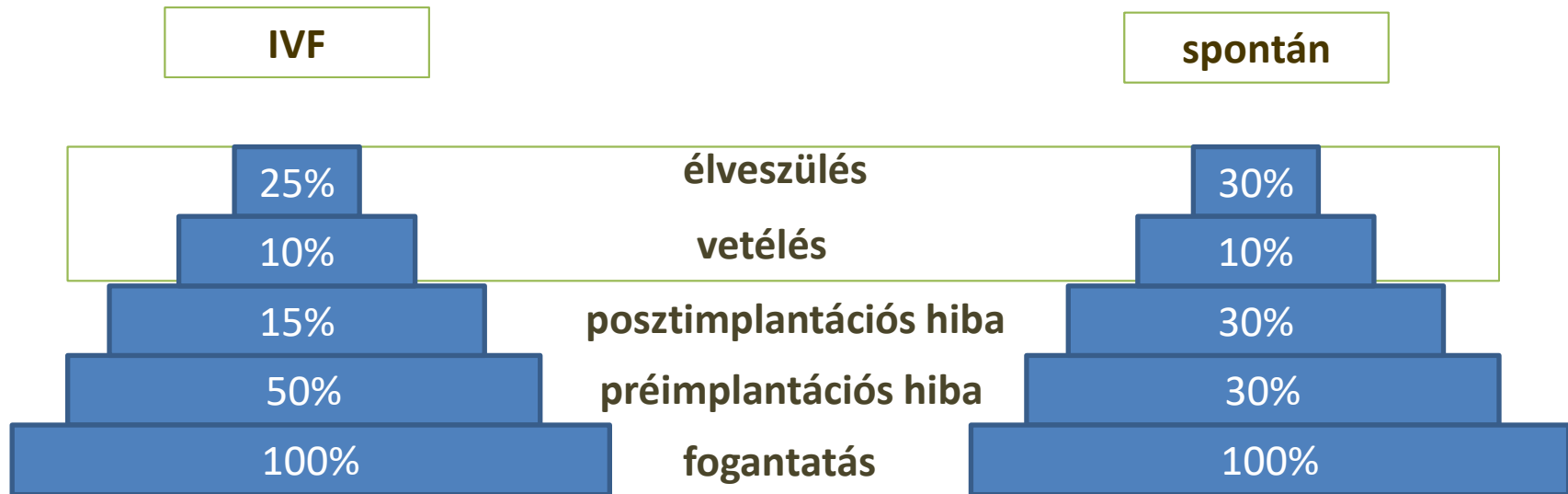
Minden mikromanipulációs, mikrosebészeti és embrió tenyésztési technika ellenére, a terhességi és születési ráta messze elmarad a várttól.

Az európai IVF regiszter adatai szerint (2016):

- Terhességi ráta: 27,8%-33,8%.
- /Embrió 90% felett!/



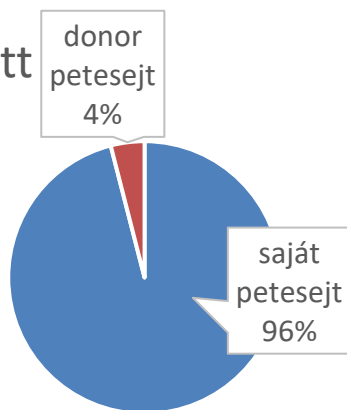
Terhességi ráta II.



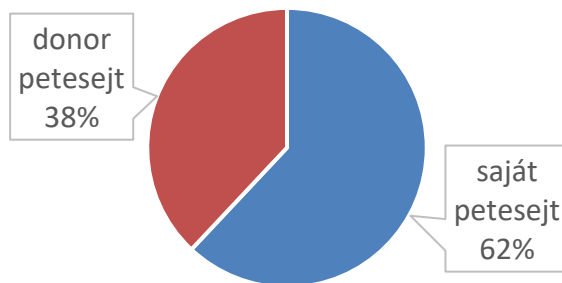
Macklon et al 2002.

Terhességi ráta III.

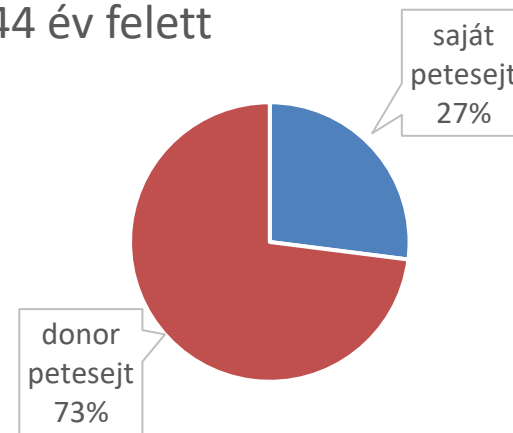
35 év alatt



43-44 év



44 év felett



Kutatási terület

- 1. IVF mellékhatásainak csökkentése**
 - hiperstimuláció profilaxis
- 2. Hatékonyság fokozása**
 - Tüszőfolyadék vizsgálatok
 - Embrionális tápoldat vizsgálatok

Ovariális hiperstimulációs szindróma

Patomechanizmus:

1. Ovariális stimuláció
2. Vazoaktív anyagok, citokinek felszaporodása
3. Megnövekedett kapilláris permeabilitás
4. Folyadékkiáramlás a harmadik folyadéktérbe (ascites, hydrothorax)
5. Intravaszkuláris dehidráció
6. Hemokoncentráció
7. Trombózis, oligúria
8. ARDS



Ovariális hiperstimulációs szindróma

Teória:

Ovuláció: trombocita aktivációval járó gyulladásos folyamat

Abisogun et al., 1989



Szuperovulációs kezelés: trombocita „hiperstimuláció”

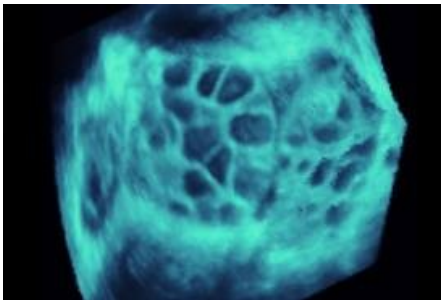


Aszpirin (acetilszalicilsav): gátolja a trombocita „hiperstimulációt”

(VEGF ↓)



OHSS prevenció ?



Ovariális hiperstimulációs szindróma

Csoportok:

1. Aszpirin kezelésben részesülők:

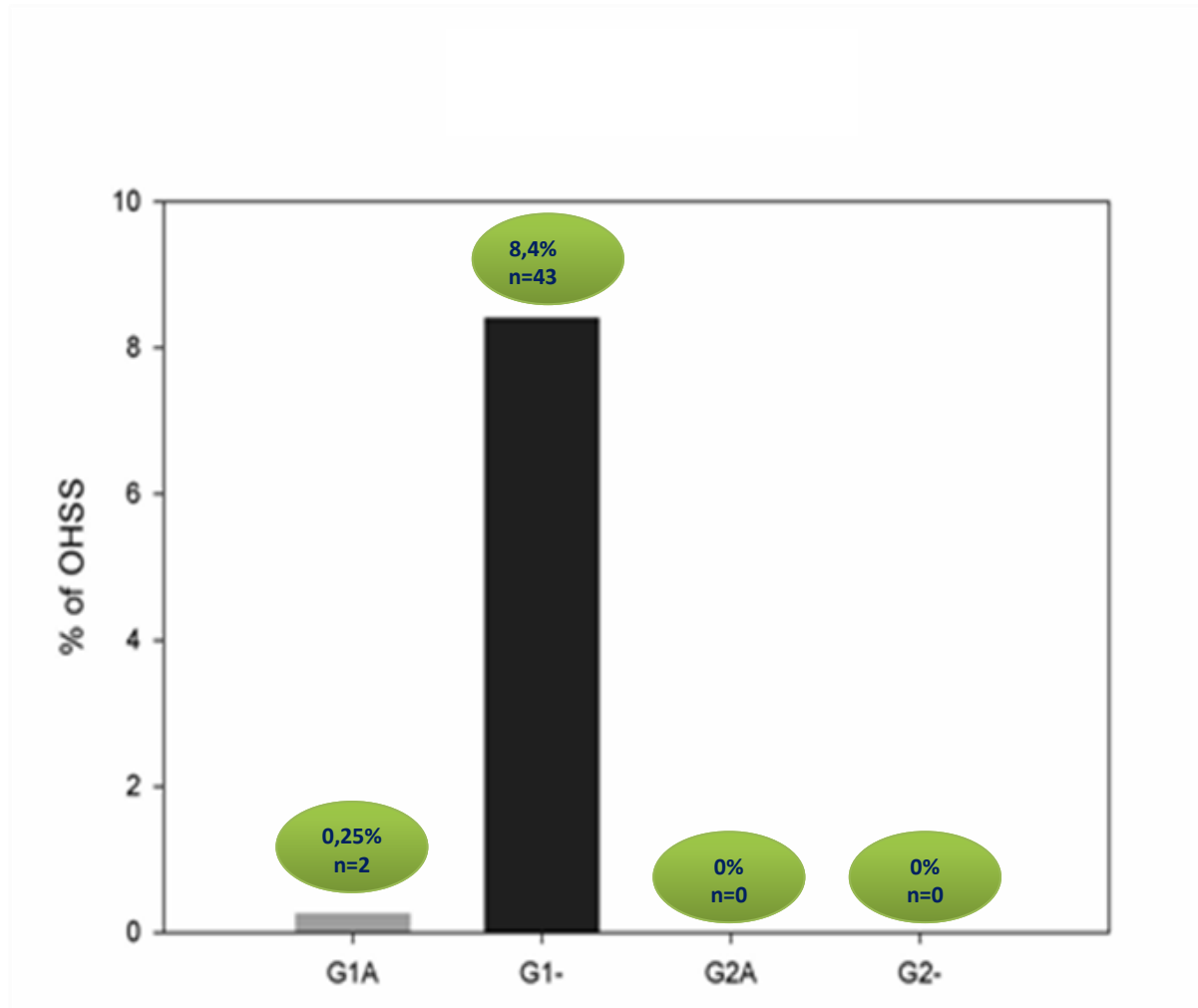
- a) 52%-a (n=780) magas rizikójú
- b) 48%-a (n=723) alacsony rizikójú

2. Aszpirin kezelésben nem részesülők:

- a) 45%-a (n=412) magas rizikójú
- b) 55%-a (n=510) alacsony rizikójú

Összesen 1,8% (n=45) OHSS (súlyos, vagy kritikus)

Ovariális hiperstimulációs szindróma



Varnagy A., Bodis J., Wilhelm F., Manfai Z., Koppán M. Low-dose aspirin therapy to prevent ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertility and Sterility* 2010;93(7):2281-2284.

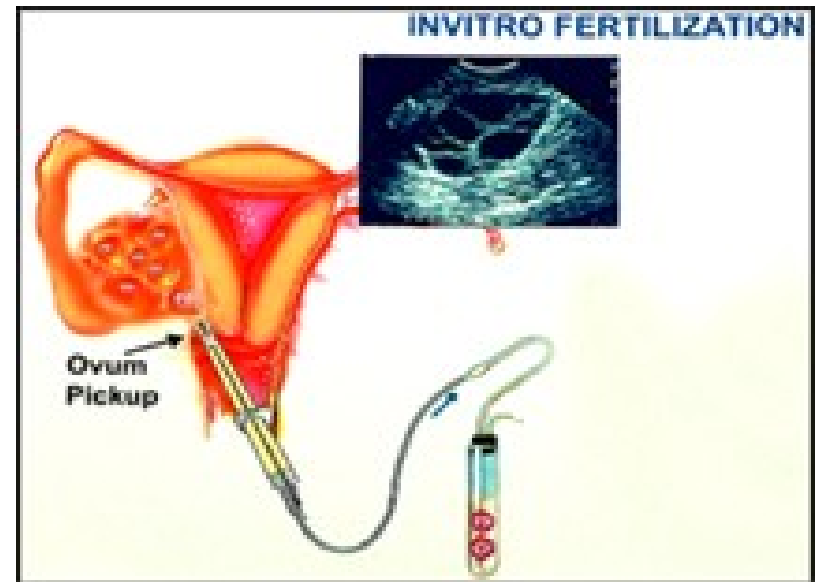
Tüszőfolyadék vizsgálatok I.

Cél:

1. Adott anyag jelenlétének igazolása tüszőfolyadékban.
2. Mennyiségi meghatározása.
3. Összefüggés vizsgálata a mennyiség és az ovariális válasz között.

Módszer:

1. IVF-es betegek tüszőfolyadéka
2. Tömegspektrométer (MALDI)
3. Radioimmunoassay (RIA)
4. ELISA



Tüszőfolyadék vizsgálatok II.

Biomarkerek vizsgálata tüszőfolyadékban

- neuropeptidek
 - PACAP
 - **metabolikus hormonok**
 - inzulin, rezisztin, ghrelin
- aminosavak:
 - arginin származékok
 - **karnitin származékok**
- hő sokk proteinek:
 - fetuin
- „anti-aging” faktorok:
 - klotho

Metabolikus hormonok és az IVF kimenetelének kapcsolata

A normál petesejt érés és az embrió fejlődés szorosan kötődik a sejtek energiatermeléséhez és az energia metabolizmusához.

Klinikai jelentőség: a beteganyagban sokan érintettek PCO, inzulin rezisztencia, 2.típusú DM-ben.

A keringő metabolikus hormonok közül a leptin, ghrelin és az adiponektin és a receptoraik működéséről már korábban bebizonyosodott, hogy az intraovariális szabályozásban is szerepet játszanak.

Ebben a tanulmányban a tüszőfolyadékban vizsgáltuk az érintett hormonok (különösen az inzulin, rezisztin) és az asszisztált reprodukció kapcsolatát.

Tüszőfolyadék leptin, ghrelin, inzulin, adiponektin és rezisztin szintjei a petesejt és embriószám függvényében in vitro fertilizáció során

petesejt szám (db)		leptin (ng/ml)	ghrelin (ng/ml)	inzulin (ng/ml)	adiponektin (µg/ml)	rezisztin (ng/ml)
=< 9	átlag	23.65	0.72	3.88	2.31	7.04
	N	66	66	66	66	66
	SD	15.57	0.20	2.12	1.20	4.00
> 9	átlag	18.81	0.65	3.04	2.40	11.60
	N	41	41	41	41	41
	SD	16.73	0.17	1.90	1.33	16.94
	F	1.99	3.20	4.28	0.27	4.41
	P	0.16	0.76	0.041	0.72	0.038
embrió szám (db)						
=< 6	átlag	22.69	0.67	2.94	2.14	12.51
	N	29	29	29	29	29
	SD	17.69	0.17	1.71	1.16	20.08
> 6	átlag	9.55	0.65	3.82	1.86	9.12
	N	11	11	11	11	11
	SD	5.80	0.17	1.50	0.78	4.58
	F	5.75	0.143	2.23	0.53	0.301
	P	0.021	0.707	0.143	0.470	0.586

Varnagy A, Bodis J, Kovacs GL, Sulyok E, Rauh M, Rascher W. Metabolic hormones in follicular fluid in women undergoing in vitro fertilization. *JOURNAL OF REPRODUCTIVE MEDICINE* 58:(7-8) pp. 305-311. (2013)

Tüszőfolyadék leptin, ghrelin, inzulin, adiponektin és rezisztin szintjei a petesejt és embriószám függvényében in vitro fertilizáció során (Spearman korrelációs koefficiensek)

	petesejt szám	embrió szám	leptin	ghrelin	inzulin	adiponektin	rezisztin
petesejt szám	-	0.474 ^{xx}	-0.190^x	-0.073	-0.209^x	-0.095	0.236^x
embrió szám	0.474 ^{xx}	-	-0.366^x	-0.050	0.265	-0.002	0.228
leptin	-0.190^x	-0.366^x	-	0.064	0.358^{xx}	-0.051	0.028
ghrelin	-0.073	-0.050	0.064	-	0.009	0.153	-0.032
inzulin	-0.209^x	0.265	0.358^{xx}	0.009	-	-0.193^x	-0.147
adiponektin	-0.095	-0.002	-0.051	0.153	-0.193^x	-	0.093
rezisztin	0.236^x	0.228	0.028	-0.032	-0.147	0.093	-
x	p < 0.05						
xx	p < 0.01						

Varnagy A, Bodis J, Kovacs GL, Sulyok E, Rauh M, Rascher W. Metabolic hormones in follicular fluid in women undergoing in vitro fertilization. *JOURNAL OF REPRODUCTIVE MEDICINE* 58:(7-8) pp. 305-311. (2013)

Konklúzió

Igazoltuk, hogy a fő metabolikus hormonok, (leptin, inzulin, adiponektin, rezisztin, ghrelin) **jelen vannak a tüszőfolyadékban** és szerves részei az intraovariális regulációnak.

Akár önmagukban, akár egymással interakcióban **hatással vannak a reprodukzív kimenetelre.**

A **rezisztin előnyös, míg a leptin, inzulin, adiponektin, és ghrelin kedvezőtlenül**, vagy nem szignifikánsan hat az IVF-re (természetesen ezek pontosításához további vizsgálatok szükségesek).

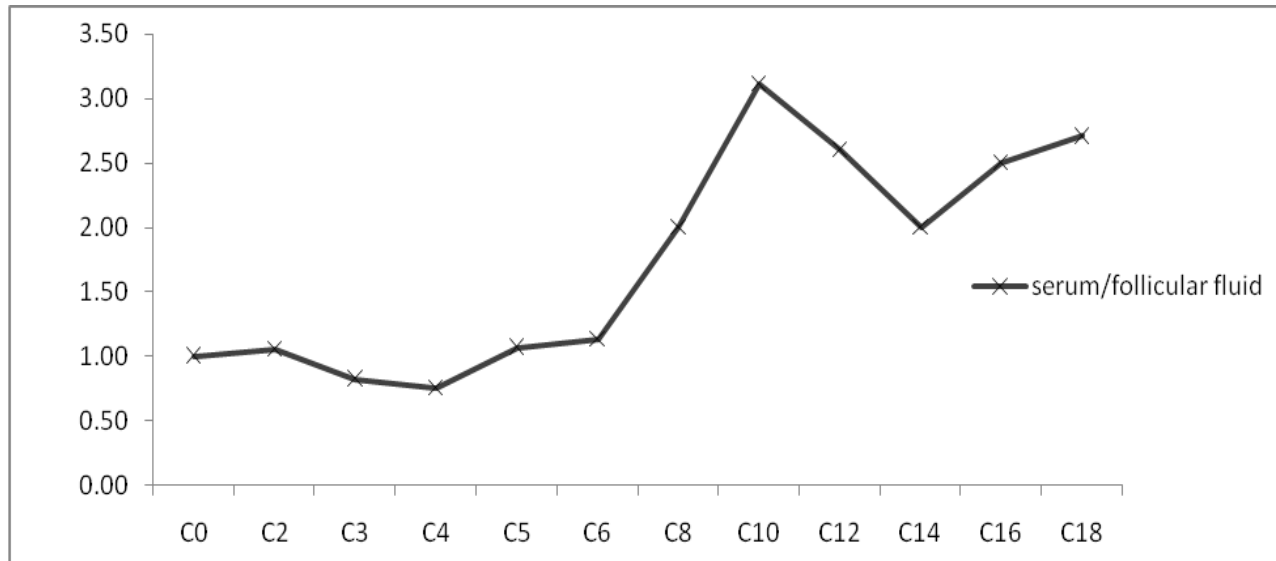
Karnitin származások és az IVF kimenetelének kapcsolata

A szabad zsírsavak a béta oxidáció során metabolizálódnak, ezt pedig az L-karnitin mediálja.

Ez utóbbi szabad és észterifikált formában van jelen a sejtekben és testvázadékokban (hosszú láncú zsírsavak szállítása a mitokondriumba, rövid és közepes láncú zsírsavak szállítása a peroxiszómából a mitokondriumba, és a mitokondriumból a toxikus acil reziduumok eltávolítása). Ebből következik, hogy következtetni lehet a mitokondriális diszfunkciókra, így a kóros petesejt és embrió fejlődésre.

Ebben a tanulmányban a szabad karnitin, és az acil-karnitin észterek és az asszisztált reprodukció kimenetele közötti összefüggést vizsgáltuk.

Szérum/tüszőfolyadék egyes acilkarnitin koncentrációjának aránya



Várnagy Á, Bene J, Sulyok E, Kovács GL, Bódis J, Melegh B. Acylcarnitine esters profiling of serum and follicular fluid in patients undergoing in vitro fertilization. *REPRODUCTIVE BIOLOGY AND ENDOCRINOLOGY* 11:(1) Paper 67. 9 p. (2013)

	Szérum/ Petesejt szám		Tüszőfolyadék/ Petesejt szám	
	≤ 9 N=29	>9 N=13	≤ 9 N=29	>9 N=13
	Medián (IQR)	Medián (IQR)	Medián (IQR)	Medián (IQR)
Szabad karnitin	28.667 (6.090)	24.897 (4.137)*	28.768 (4.408)	25.515 (4.307)#
Totál acylkarnitin	9.147 (2.268)	8.767 (0.960)	7.997 (1.825)	6.810 (1.908) #
Totál karnitin	36.940 (6.965)	32.869 (4.616)*	37.098 (5.845)	31.622 (6.026) #
AC/FC arány	0.316 (0.075)	0.345 (0.073)	0.280 (0.0499)	0.278 (0.053)
Totál rövid-láncú acylkarnitin	7.860 (1.492)	7.787 (1.172)	7.373 (1.8459)	6.343 (1.802) #
Totál közepes-láncú acylkarnitin	0.715 (0.257)	0.648 (0.275)	0.313 (0.1209)	0.277 (0.065)
Totál hosszú-láncú acylkarnitin	0.347 (0.060)	0.312 (0.072)*	0.140 (0.027)	0.127 (0.040)
Rövid-láncú acylkarnitin				
C2-carnitine	7.393 (1.445)	7.470 (1.123)	6.833 (1.622)	5.880 (1.800) #
C3-carnitine	0.185 (0.075)	0.180 (0.063)	0.210 (0.070)	0.177 (0.053) #
C4-carnitine	0.143 (0.058)	0.140 (0.058)	0.170 (0.081)	0.153 (0.033)
C5-carnitine	0.058 (0.025)	0.050 (0.020)	0.053 (0.013)	0.050 (0.010)
C5-OH carnitine	0.023 (0.010)	0.030 (0.010)	0.020 (0.007)	0.020 (0.003)
Közepes-láncú acylkarnitin				
C6-carnitine	0.027 (0.013)	0.027 (0.007)	0.020 (0.013)	0.020 (0.003)
C8-carnitine	0.100 (0.037)	0.093 (0.040)	0.060 (0.023)	0.053 (0.027)
C8:1-carnitine	0.035 (0.018)	0.040 (0.028)	0.030 (0.018)	0.030 (0.027)
C10-carnitine	0.215 (0.130)	0.215 (0.098)	0.070 (0.030)	0.055 (0.030) #
C10:1-carnitine	0.160 (0.063)	0.140 (0.033)	0.073 (0.030)	0.070 (0.023)
C12-carnitine	0.060 (0.023)	0.055 (0.018)	0.020 (0.007)	0.020 (0.003)
C12:1-carnitine	0.070 (0.023)	0.057 (0.020)	0.020 (0.012)	0.020 (0.010)
Hosszú-láncú acylkarnitin				
C14-carnitine	0.023 (0.010)	0.020 (0.007)	0.010 (0.003)	0.010 (0.003)
C14:1-carnitine	0.057 (0.023)	0.040 (0.030)*	0.020 (0.010)	0.017 (0.007)
C16-carnitine	0.090 (0.027)	0.080 (0.037)	0.040 (0.007)	0.040 (0.013)
C18-carnitine	0.033 (0.010)	0.027 (0.013)	0.013 (0.007)	0.013 (0.010)
C18:1-carnitine	0.093 (0.032)	0.080 (0.037)	0.037 (0.010)	0.030 (0.010)
C18:2-carnitine	0.057 (0.013)	0.043 (0.020)	0.020 (0.007)	0.020 (0.013)
Dicarboxyl acylkarnitin				
C4DC-carnitine	0.030 (0.017)	0.030 (0.010)	0.023 (0.010)	0.027 (0.007) #
C5DC-carnitine	0.090 (0.037)	0.075 (0.023)	0.053 (0.022)	0.050 (0.010)

Várnagy Á, Bene J, Sulyok E, Kovács GL, Bódis J, Melegh B. Acylcarnitine esters profiling of serum and follicular fluid in patients undergoing in vitro fertilization. *REPRODUCTIVE BIOLOGY AND ENDOCRINOLOGY* 11:(1) Paper 67. 9 p. (2013)

	Szérum embrió szám		Tüszőfolyadék embrió szám	
	≤ 6 N=28	>6 N=14	≤ 6 N=28	>6 N=14
	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)
Szadad karnitin	28.623 (6.217)	24.955 (4.592)*	28.698 (4.914)	25.887 (5.559)#
Totál acyl-karnitin	9.148 (2.2399)	8.605 (1.500)	7.905 (1.713)	6.938 (1.972)
Totál karnitin	37.100 (6.500)	32.739 (4.708)*	36.912 (5.838)	32.956 (6.978)
AC/FC arány	0.317 (0.0749)	0.333 (0.072)	0.279 (0.047)	0.281 (0.065)
Totál rövid-láncú acylkarnitin	7.893 (1.4489)	7.598 (1.676)	7.316 (1.633)	6.482 (1.900)
Totál közepes-láncú acylkarnitin	0.722 (0.2669)	0.619 (0.242)	0.318 (0.121)	0.276 (0.073)
Totál hosszú-láncú acylkarnitin	0.346 (0.051)	0.313 (0.093)	0.140 (0.024)	0.127 (0.042)
Rövid-láncú acylkarnitin				
C2-carnitine	7.393 (1.445)	7.470 (1.123)	6.805 (1.525)	6.053 (1.844)
C3-carnitine	0.183 (0.083)	0.183 (0.058)	0.218 (0.071)	0.178 (0.048)
C4-carnitine	0.143 (0.063)	0.135 (0.052)	0.177 (0.085)	0.150 (0.032)
C5-carnitine	0.060 (0.023)	0.048 (0.019)	0.053 (0.013)	0.048 (0.012)
C5-OH carnitine	0.023 (0.010)	0.030 (0.010)	0.020 (0.007)	0.018 (0.003)
Közepes-láncú acylkarnitin				
C6-carnitine	0.028 (0.013)	0.025 (0.008)	0.020 (0.013)	0.020 (0.003)
C8-carnitine	0.102 (0.036)	0.087 (0.046)	0.060 (0.023)	0.050 (0.025) #
C8:1-carnitine	0.037 (0.018)	0.035 (0.025)	0.030 (0.018)	0.030 (0.026)
C10-carnitine	0.220 (0.138)	0.206 (0.095)	0.073 (0.026)	0.055 (0.027) #
C10:1-carnitine	0.163 (0.067)	0.140 (0.030)	0.073 (0.028)	0.070 (0.020)
C12-carnitine	0.058 (0.022)	0.056 (0.020)	0.020 (0.004)	0.020 (0.006)
C12:1-carnitine	0.068 (0.025)	0.058 (0.019)	0.022 (0.013)	0.020 (0.010)
Hosszú-láncú acylkarnitin				
C14-carnitine	0.023 (0.010)	0.022 (0.009)	0.010 (0.004)	0.010 (0.003)
C14:1-carnitine	0.056 (0.023)	0.042 (0.030)*	0.020 (0.011)	0.017 (0.007)
C16-carnitine	0.088 (0.026)	0.080 (0.0239)	0.038 (0.008)	0.040 (0.012)
C18-carnitine	0.033 (0.010)	0.028 (0.016)	0.013 (0.007)	0.013 (0.009)
C18:1-carnitine	0.093 (0.029)	0.085 (0.040)	0.035 (0.011)	0.030 (0.013)
C18:2-carnitine	0.055 (0.015)	0.047 (0.020)	0.020 (0.007)	0.020 (0.012)
Dicarboxyl acylkarnitin				
C4DC-carnitine	0.028 (0.017)	0.030 (0.008)	0.023 (0.010)	0.027 (0.007) #
C5DC-carnitine	0.092 (0.040)	0.078 (0.024)	0.055 (0.021)	0.050 (0.013)

Várnagy Á, Bene J, Sulyok E, Kovács GL, Bódis J, Melegh B. Acylcarnitine esters profiling of serum and follicular fluid in patients undergoing in vitro fertilization. *REPRODUCTIVE BIOLOGY AND ENDOCRINOLOGY* 11:(1) Paper 67. 9 p. (2013)

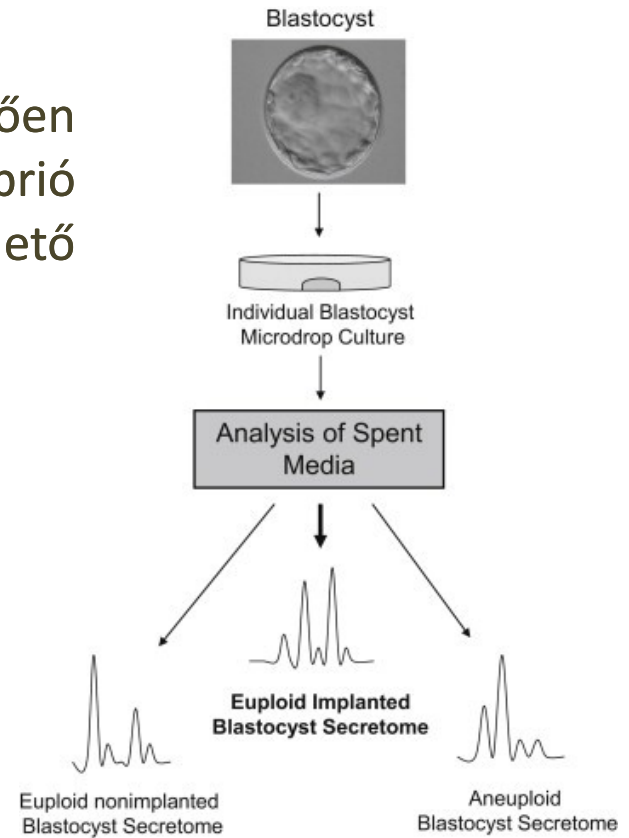
Konklúzió

Vizsgálataink során kimutattuk, hogy a **jobb reprodukciós képességgel rendelkező, IVF-ben részt vevő egyéneknél** a karnitin szintek, mind a szérumban, mind a tüszőfolyadékban szignifikánsan alacsonyabbak, mely arra utal, hogy a **karnitin fogyasztás magasabb**, így a β -oxidáció folyamata fokozott, ami hozzájárul ahhoz, hogy ezen egyéneknél a jobb fejlődési potenciál létrejöjjön, mind a petesejtekben, mind az embrióban.

A karnitin profil analízise arra enged következtetni, hogy a **kellő számú petesejt és embrió fejlődését L-karnitin adásával** segíteni lehet.

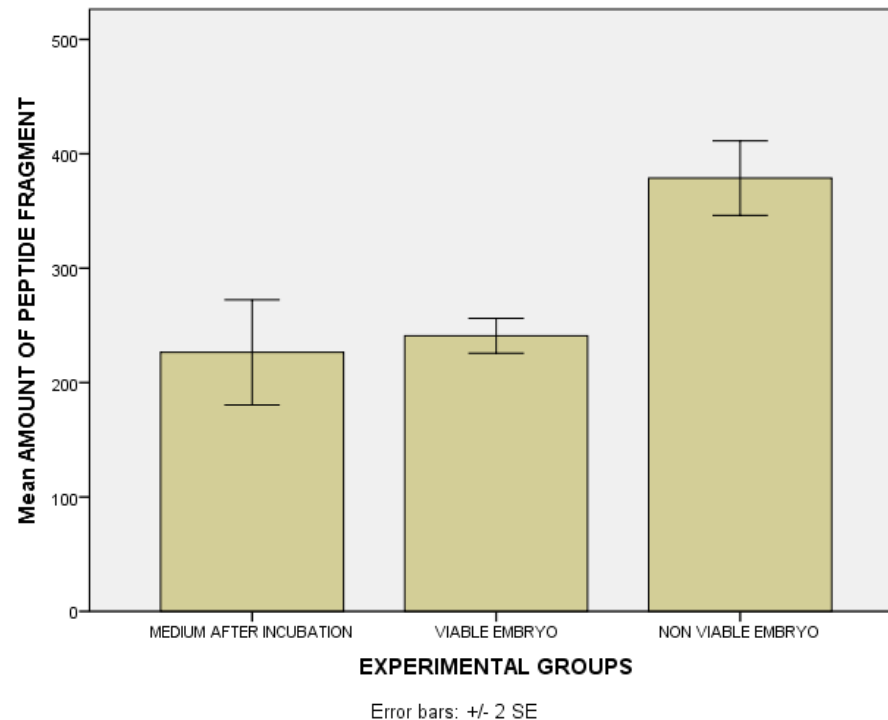
Táplódat markerek

Az embrió metabolizmusa alapvetően meghatározza a viabilitást, az életképes embrió **biológiai ujjlenyomattal** rendelkezik ami felismerhető a táplódatában is.



Katz-Jaffe MG, McReynolds S. Embryology in the era of proteomics. *FERTILITY AND STERILITY* 99(4):1073-7. (2013).

Alfa-1 haptoglobin fragmens

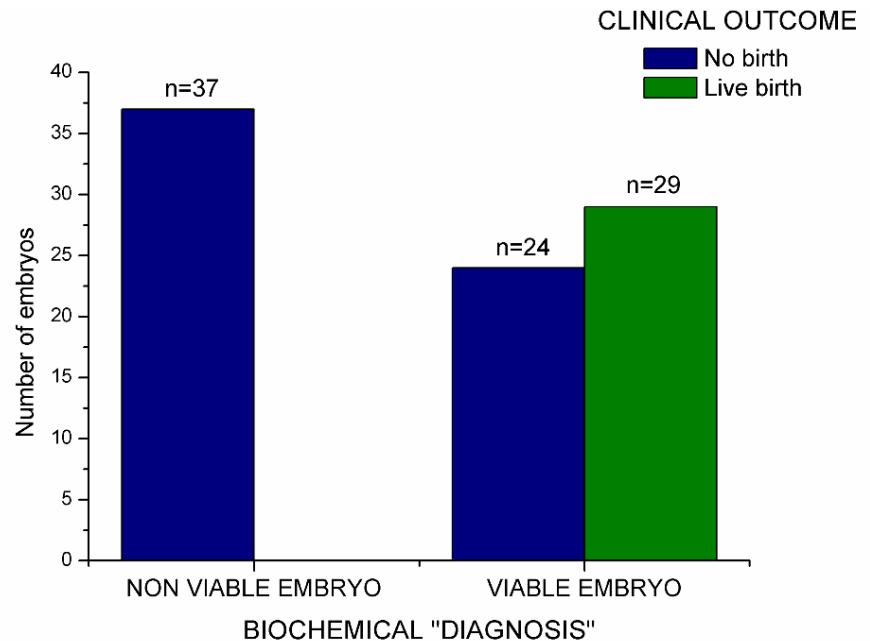


- A protein fragmens mennyiségében szignifikáns különbség látszik a „viábilis” és a „nem-viábilis” embriók mintái között

Montskó G, Zrínyi Z, Janáky T, Szabó Z, Várnagy Á, Kovács GL, Bódis J. Noninvasive embryo viability assessment by quantitation of human haptoglobin alpha-1 fragment in the in vitro fertilization culture medium: an additional tool to increase success rate *FERTILITY AND STERILITY* 103:(3) pp. 687-693. (2015)

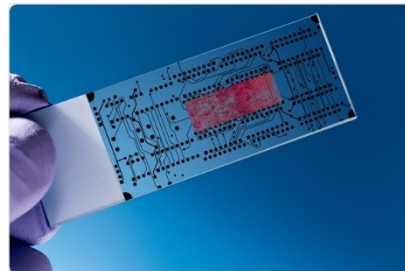
Eredmények (vak vizsgálatok)

- A mikroszkópos értékelés alapján valamennyi embrió „beültethető” minősítést kapott (n=90)
- A biokémiai vizsgálat alapján 37 embrió bizonyult nem-életképesnek és 53 életképesnek
- Egy esetben sem vezetett élve születéshez biokémiailag életképtelennek diagnosztizált embriók beültetése
- A kontraszelekció sikeressége 100%

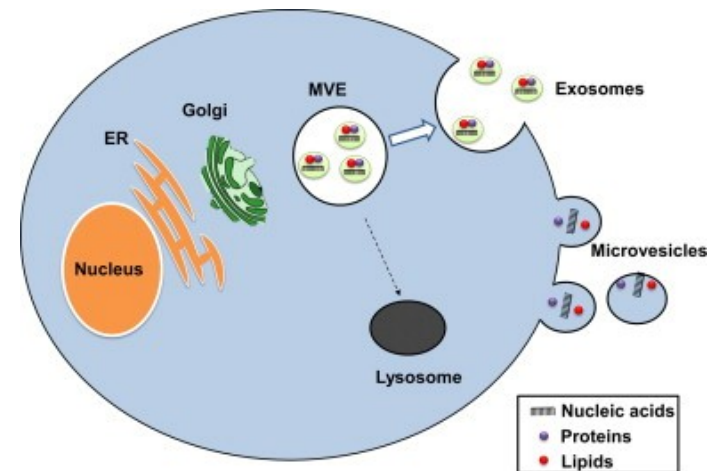


Lab on a chip

European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM)
2015: "EFLM-Abbott Diagnostics Award for Excellence in Outcomes Research in Laboratory
Medicine"



Extracelluláris vesikulumok embrionális tápoldatban

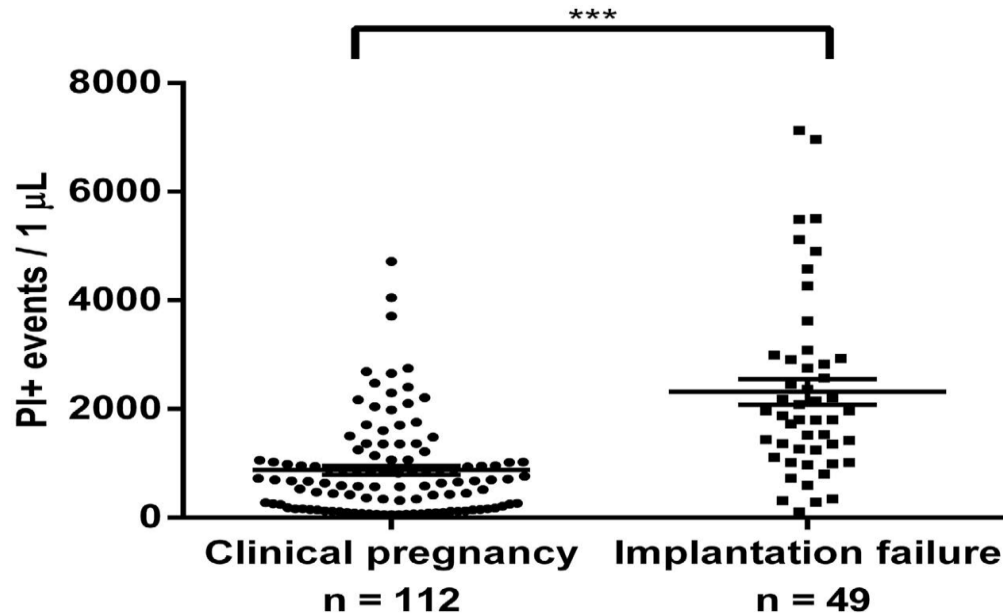


Extracelluláris vesiculumok embrionális tápoldatban

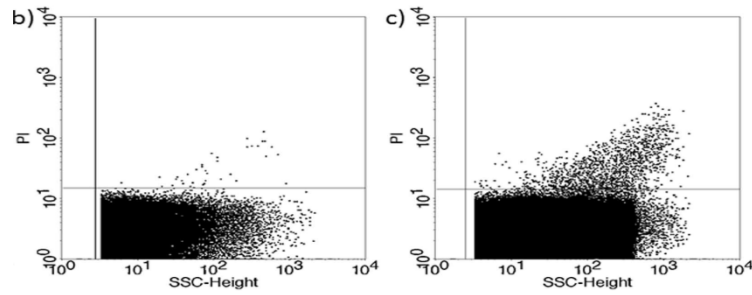
Cél:

- igazolni a tápoldatban a vesicula jelenlétét
 - membránspecifikus (Annexin kötődés)
 - az „üres” tápoldatban nem kimutatható (HSA!)
- a nukleinsavat tartalmazó vezikulák jelölése (propidium-jodid)
- összefüggés felállítása az EV-k és az IVF kimenetele között

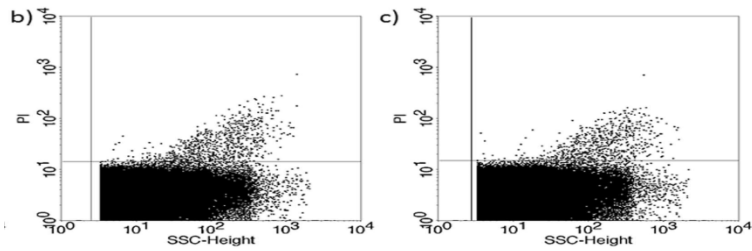
Extracelluláris vesikulumok embrionális tápoldatban



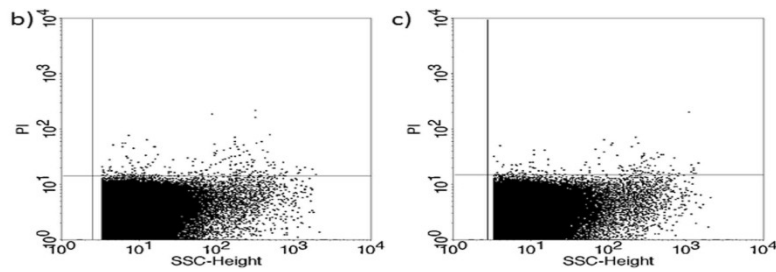
Pallinger E, Bognar Z, Bodis J, Csabai T, Farkas N, Godony K, Varnagy A, Buzas E, Szekeres-Bartho J. A simple and rapid flow cytometry-based assay to identify a competent embryo prior to embryo transfer. *SCIENTIFIC REPORTS* 7: Paper 39927. 8 p. (2017)



két beültetett embrió - egyes klinikai terhesség

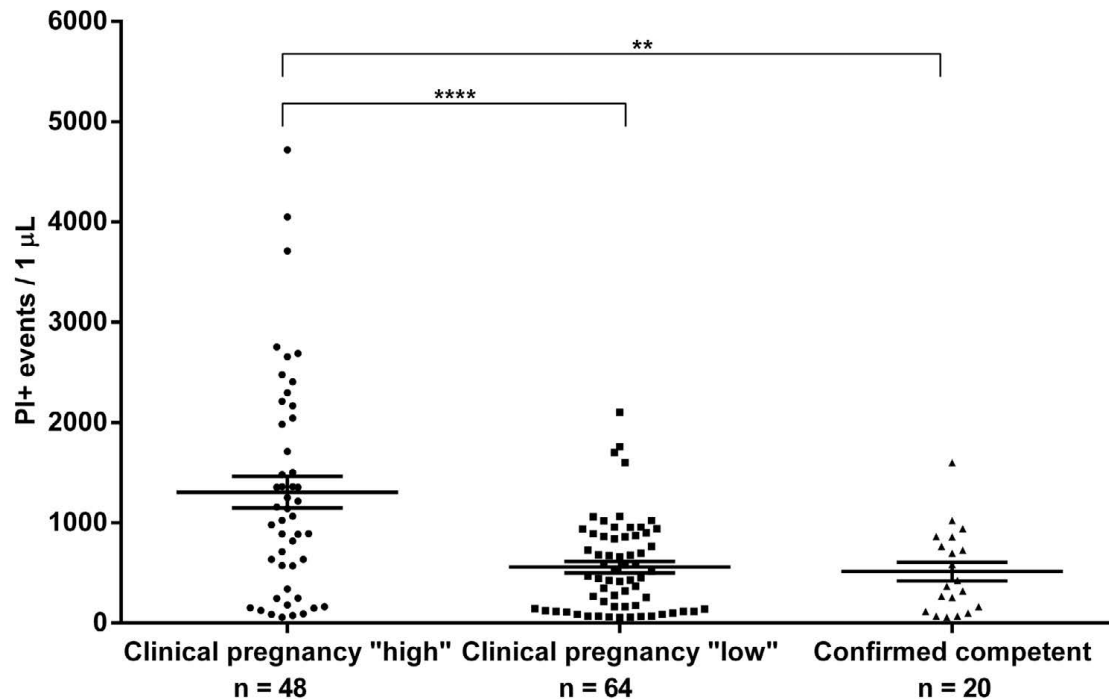


két beültetett embrió - sikertelen terhesség



két beültetett embrió – kettes klinikai terhesség

Extracelluláris vesikulumok embrionális tápoldatban



Pallinger E, Bognar Z, Bodis J, Csabai T, Farkas N, Godony K, Varnagy A, Buzas E, Szekeres-Bartho J. A simple and rapid flow cytometry-based assay to identify a competent embryo prior to embryo transfer. *SCIENTIFIC REPORTS* 7: Paper 39927. 8 p. (2017)

Konklúzió

- hátrány: a flow cytométer **költsége**
- előny: **kevesebb mint egy óra** elég 15 embrió vizsgálatához a „friss” transzfer előtt
- a vezikulák nukleinsav tartalmának eredetét nem vizsgáltuk, de feltételezhető, hogy ez **sejtkárosodás következménye**
- a nukleinsavat tartalmazó EV-k emelkedett száma az embrió elégtelen működésére utal

Új eredmények összefoglalása

- 1. Randomizált tanulmánnyal igazoltuk, hogy az alacsony dózisú aszpirin adása hatásos a súlyos hiperstimulációs szindróma megelőzésében, illetve a tünetek enyhítésében.**
- 2. Tüszőfolyadék vizsgálatok jó alapot szolgáltatottak, számos alap kutatás jellegű eredményhez jutottunk és általános, de értékes klinikai következtetéseket tudunk levonni az eredményekből.**
- 3. Az embrionális tápoldat vizsgálatával non-invazív, a határfokot markánsan javító eredményeket találtunk, melyek gyakorlati felhasználása, klinikai keretek közé ágyazása folyamatban van.**

Köszönetnyilvánítás

Prof. Dr. Bódis József
Prof. Dr. Koppán Miklós
Prof. Dr. Sulyok Endre
Prof. Dr. Kovács L. Gábor
Prof. Dr. Szekeres Júlia
Prof. Dr. Melegh Béla
Prof. Dr. Vermes István
Prof. Dr. Reglődi Dóra
Prof. Dr. Ertl Tibor
Prof. Dr. Kőszegi Tamás
Dr. Márk László
Dr. Montskó Gergely
Dr. Bognár Zoltán
Dr. Lányi Éva
Dr. Peti M. Attila
Dr. Berenténé Dr. Bene Judit
Dr. Brubel Réka
Dr. Mánfai Zoltán
Dr. Wilhelm Ferenc

Dr. Kovács Kálmán
Gödöny Krisztina
Grimné Locskai Elvira
Laki Krisztina
Balázsné Vass Ildikó
Boronkai Henriett
Szedlák Jánosné
Wágner Emese
Magyar Éva

Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika dolgozói

Prof. Dr. Szabó István
Dr. Drozgyik István
Dr. Veszprémi Béla

Prémusz Viktória
Bencsik-Péter Ildikó
Walczné Gróf Judit

Dr. Till Ágnes, Márton, Nóra, András