

# A tüszőfolyadék biomarkereinek vizsgálata *in vitro* fertilizációs kezelésben részesült betegekben

Bódis József dr.<sup>1</sup> ■ Sulyok Endre dr.<sup>2</sup> ■ Várnagy Ákos dr.<sup>1</sup>  
Koppán Miklós dr.<sup>1</sup> ■ Kovács L. Gábor dr.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika, Humán Reprodukciós Kutatócsoport, Pécs

<sup>2</sup>Pécsi Tudományegyetem, Egészségtudományi Kar, Egészségtudományi Doktori Iskola, Pécs

<sup>3</sup>Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Szentágotthai János Kutatóközpont, Humán Reprodukciós Kutatócsoport, Pécs

A szerzők ismertetik vizsgálataik eredményeit, melyeket a közelmúltban az *in vitro* fertilizációs kezelésben részesült betegekben a tüszőfolyadék biomarkereinek analizésével értek el. A vizsgálatok célja annak feltárása volt, hogy az *in vitro* fertilizációs eljárás során a petesejtek aspirációjakor nyert tüszőfolyadék-biomarkerek lokális/ovariális vagy szisztémás eredetűek, és milyen összefüggést mutatnak az *in vitro* fertilizáció eredményességét jelző paraméterekkel. Megerősítettük, hogy az autokrin/parakrin szerotoninrendszer már a fejlődés legkorábbi időszakában is működőképes, és mind az anyai szérumban, mind a tüszőfolyadék szerotoninszintje szignifikáns pozitív összefüggést mutatott az érett petesejtek számával és a klinikai terhességgel ( $\beta = 0,447$ ,  $p = 0,015$ , illetve  $\beta = 0,443$ ,  $p = 0,016$ ). Az agyi eredetű neurotrofikus faktor (BDNF) esetében ilyen kapcsolat nem volt igazolható, de a tüszőfolyadék BDNF- és szerotoninszintjei közötti pozitív korreláció ( $r = 0,377$ ,  $p = 0,040$ ) azt mutatja, hogy a két neurohormon 'feed-forward' (előrecsatoló) szabályozása ovarialis szinten is működik. A hypothalamicus kisspeptin esetében csupán a posztstimulációs anyai szérumban hormon szint befolyásolta az érett petesejtek számát ( $\beta = 0,398$ ,  $p = 0,029$ ). A triptofán-kinurenin-szerotonin rendszer elemzése azt mutatta, hogy kedvezőbb *in vitro* fertilizációs kimenetel várható, ha a szerotonin-kinurenin egyensúly a szerotonin javára tolódik el. Az oxidatívstressz-markerek közül vizsgálták a DNS-károsodás biomarkert, a 8-hidroxi-2'-deoxiguanozin és a totális antioxidáns-kapacitás szérumban és tüszőfolyadékszintjeit, és megállapították, hogy mindkét marker kedvezőtlenül befolyásolja az életképes embriók számát ( $r = 0,302$ ,  $p = 0,027$  és  $r = 0,268$ ,  $p = 0,039$ ). A protektív hatású szirtuinok – nikotinamid-adenin-dinukleotid-függő hiszton-deacetiláz fehérjék – közül a vizsgált szirtuin-1 és szirtuin-6 a szérumszintektől függetlenül kimutatható a tüszőfolyadékban. Szignifikáns pozitív korreláció van a tüszőfolyadék-szirtuin-6 és az érettpetesejt-szám ( $F = 6,609$ ,  $p = 0,016$ ), valamint a szérumban-szirtuin-1 ( $F = 10,008$ ,  $p = 0,005$ ) és a szérumban-szirtuin-6 ( $F = 5,268$ ,  $p = 0,031$ ) és a klinikai terhesség gyakorisága között. Eredményeink alapján megállapítható, hogy a tüszőfolyadék biomarkereinek vizsgálata javíthatja az *in vitro* fertilizáció kimenetelének megítélését.

Orv Hetil. 2021; 162(14): 523–529.

**Kulcsszavak:** *in vitro* fertilizáció, tüszőfolyadék, biomarkerek

## Investigations of follicular fluid biomarkers in patients undergoing *in vitro* fertilization

This article outlines the result of recent studies on several follicular fluid biomarkers in patients undergoing *in vitro* fertilization. The aim of these studies was to investigate whether 1) the follicular fluid biomarkers in question are produced locally by the ovaries or they originate from the circulating plasma, 2) and to establish their association with parameters of *in vitro* fertilization outcome. It was confirmed that the autocrine/paracrine serotonin system is functional already at the earliest stage of development and both maternal serum and follicular fluid serotonin levels were positively related to the number of mature oocytes ( $\beta = 0.447$ ,  $p = 0.015$  and  $\beta = 0.443$ ,  $p = 0.016$ , respectively) and clinical pregnancy ( $\beta = 1.028$ ,  $p = 0.047$ ). Such associations for brain-derived neurotrophic factor (BDNF) could not be found, but BDNF and serotonin in the follicular fluid were closely related ( $r = 0.377$ ,  $p < 0.040$ ) suggesting that the feed-forward regulation of these neurohormones is activated at ovarian level. The hypothalamic kisspeptin in the

post-stimulation maternal serum also increased the number of mature oocytes ( $\beta = 0.398$ ,  $p = 0.029$ ). Analysis of the tryptophan–kynurenine–serotonin system showed a more favourable *in vitro* fertilization outcome when the serotonin–kynurenine balance was shifted and serotonin predominated over kynurenine. The oxidative stress markers, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, an indicator of DNA damage and the total antioxidant capacity in follicular fluid and maternal serum had negative impact on the number of viable embryos ( $r = 0.302$ ,  $p = 0.027$  and  $r = 0.268$ ,  $p = 0.039$ ), respectively. The protective sirtuins – the nicotinamide adenine dinucleotide-dependent histone deacetylase proteins – could be detected in follicular fluid irrespective of their maternal serum levels. Significant positive relationship was demonstrated between follicular fluid sirtuin 6 and mature oocytes ( $F = 6.609$ ,  $p = 0.016$ ) as well as between serum sirtuin 1 ( $F = 10.008$ ,  $p = 0.005$ ) and serum sirtuin 6 ( $F = 5.268$ ,  $p = 0.031$ ) and the rate of clinical pregnancy, respectively. On the basis of these results, it can be concluded that measuring several follicular fluid biomarkers may improve the prediction of the outcome of *in vitro* fertilization.

**Keywords:** *in vitro* fertilization, follicular fluid, biomarkers

Bódis J, Sulyok E, Várnagy Á, Koppán M, Kovács LG. [Investigations of follicular fluid biomarkers in patients undergoing *in vitro* fertilization]. *Orv Hetil.* 2021; 162(14): 523–529.

(Beérkezett: 2020. szeptember 21.; elfogadva: 2020. október 16.)

### Rövidítések

5-HT = 5-hidroxitriptamin; 8-OHdG = 8-hidroxi-2'-deoxyguanozin; BDNF = (brain-derived neurotrophic factor) agyi eredetű neurotrofikus faktor; DNS = dezoxiribonukleinsav; EFOP = Emberi Erőforrás Fejlesztési Operatív Program; ELISA = (enzyme-linked immunosorbent assay) enzimhez kapcsolt immunsorbens-vizsgálat; FSH = folliculusstimuláló hormon; GnRH = (gonadotropin-releasing hormone) gonadotropin felszabadító hormon; hCG = humán choriogonadotropin; HPLC–MS–MS = (high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry) nagy hatékonyságú folyadékkromatográfia–tandem tömegspektrometria; IDO = indolamin-2-3-dioxigenáz; IVF = *in vitro* fertilizáció; LH = luteinizáló hormon; NAD = nikotinamid-adenin-dinukleotid; ROS = (reactive oxygen species) reaktívoxigén-származék; SIRT = szirtuin; SSRI = (selective serotonin reuptake inhibitor) szelektív szerotonin visszavétel-gátló; TAC = totális antioxidáns-kapacitás; TDO = triptofán-2-3-dioxigenáz; TrkB = tirozin-kináz-B; VEKOP = Versenyképes Közép-Magyarország Operatív Program

Az *in vitro* fertilizációs (IVF-) eljárás az elmúlt négy évtizedben az orvostudomány, a nőgyógyászat rutineljárássá vált. 1978-ban megszületett az első „lombikbébi”, akit azóta már több mint 5 millió követett, és az asszisztált reprodukciós módszerek új távlatokat nyitottak azon gyermektelen párok számára, akik kezelésére korábban nem volt lehetőség. Magyarországon az összes, meddőségi problémával küzdő házaspár száma eléri a populáció 15%-át. Közülük természetesen nem mindenki számára indokolt az IVF-kezelés, azonban a megszületett csecsemők 1,5–2%-a ilyen kezelést követően fogan hazánkban, és ez a szám folyamatosan emelkedik. Ez a körülmény az infertilitás és az IVF-eljárás kutatásának népegészségügyi jelentőségére hívja fel a figyelmet. Hazai szerzők a közelmúltban is közöltek fontos ismereteket a fertilizáció im-

munológiai és inflammatorikus vonatkozásairól [1], valamint a fertilitást befolyásoló egyes tényezőkről [2].

A tüszőfolyadék (follicularis folyadék) a petesejtek közvetlen környezetét képezi, melynek összetétele messzemenően befolyásolja a folliculusok fejlődését és a petesejtek érését. Részben az ovarialis granulosa- és theca-sejtek, részben a petesejtek termelik, részben pedig a vér–follicularis barrieren átjutó transsudatum terméke. Olyan speciális közeget képez, mely biztosítja a petesejtek és a follicularis sejtek közötti kommunikációt, és hozzájárul a jó minőségű petesejt/embrió fejlődéséhez. Az IVF-eljárás során a petesejtek aspirációjakor rutinszerűen nyerhető, így alapul szolgálhat a fertilizáció sikerét és az IVF eredményességét jelző biomarkerek noninvasív vizsgálatához.

A klinikai gyakorlatban az egyes biomarkerek meghatározása mellett egyre inkább elterjedt a nagyszámú marker egyidejű vizsgálata. Ezek közül kiemelkedők a fehérje (proteom)- és metabolit (metabolom)-profilok, valamint a génexpressziós mintázatok diagnosztikus és prediktív értékeinek meghatározására tett próbálkozások.

Munkacsoportunk az elmúlt években a tüszőfolyadék neurohormon- (szerotonin, 5-HT; kinurenin, kisspeptin, agyi eredetű neurotrofikus faktor [BDNF]) tartalmának, oxidatívstressz-markereinek (8-hidroxi-2'-deoxyguanozin, 8-OHdG; totális antioxidáns-kapacitás, TAC) és egyes protektív faktorainak (szirtuin-1, szirtuin-6, rezveratrol) jelentőségét kívánta megismerni.

Vizsgálatainkat a már korábban is alkalmazott protokoll szerint végeztük: a kérdéses biomarkert az ovarium-hiperstimuláció előtt, majd a tüszőfolyadék- és petesejt-aspirációval egy időben nyert anyai szérummintákban, valamint a tüszőfolyadékban határoztuk meg [3]. Ily módon lehetővé vált a hiperstimuláció hatásának és az egyes markerek szisztémás vagy lokális/ovarialis eredetének megítélése, valamint az IVF eredményességét jelző

paraméterekkel (az érett petesejtek és életképes embriók száma, kémiai és klinikai terhesség) külön-külön történő összevetése. Bár a tüszőfolyadék könnyen hozzáférhető az IVF-eljárás során, vizsgálatainknál a mintagyűjtés technikai és etikai okok miatt nem tüszőnként, illetve petesejtenként, hanem betegenként történt. A minta szelektív gyűjtése megoldható, de miután ez már eltér a rutin klinikai gyakorlattól, az ilyen mintavételt csupán kellő számú és eredményű hasonló vizsgálatból nyert kedvező tapasztalat után indokolt alkalmazni.

## A neurohormonok szerepének vizsgálata IVF-kezelt betegeknél

### Szerotonin (5-HT)

Az 5-HT neurotranszmitter, mely fontos szerepet játszik a hypothalamus–hypophysis–gonad tengely működésének szabályozásában és a női reprodukcióban: 5-HT-axon-végződéseket mutattak ki a hypothalamicus gonadotropinfelzabadító hormon (GnRH) neuronjaiban, és igazolták szabályozó szerepét a *GnRH*-gén expressziójában és a hormon szekréciójában, közvetve a hypophysialis FSH és LH szintézisében és szekréciójában; ezeken keresztül meghatározó tényezője az ovariumban zajló steroidogenesis, folliculogenesis és oogenesis centrális szabályozásának [4].

A központi szabályozás mellett kiemelt jelentőségű az 5-HT intraovariális hatása. Ezt látszik alátámasztani, hogy 5-HT-t mutattak ki a tüszőfolyadékban, és az ovarialis granulosa-sejtekben az 5-HT közvetlenül is fokozta a progeszteron szekrécióját [5]. További jelentős felismerés, hogy az 5-HT-rendszer egyes elemeit (triptofán-hidroxiáz, 5-HT, 5-HT-receptorok, 5-HT-transzporterek) mutatták ki petesejtekben és preimplantációs embriókban. Ezek a megfigyelések egyértelműen arra utalnak, hogy az autokrin/parakrin 5-HT-rendszer már a fejlődés legkorábbi időszakában is működőképes [6, 7]. Az 5-HT jelentőségének vizsgálatát az is indokolta, hogy az IVF-kezelésben részesülő nők körében egyre gyakoribb a szelektív szerotoninviszavétel-gátlók (SSRI-k) alkalmazása, melyek rontják az eljárás eredményességét, magzati károsodást, terhességi komplikációkat és az újszülöttek adaptációs zavarait okozhatják.

Vizsgálatainkat a Pécsi Tudományegyetem Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján működő Asszisztált Reprodukciós Központban 30 betegnél végeztük. A szuperovulációs kezelés, a fertilizáció módja és az embrióselektió az eddigi gyakorlatnak megfelelően történt. A szuperovulációs kezelés szuppressziós részét a GnRH-agonista triptorelin adásával végeztük rövid, illetve hosszú protokoll alkalmazásával. A stimuláció a betegre egyénileg szabott dózisu rekombináns FSH és LH adásával történt, a dózis 100 és 225 egység napi adása között mozgott a tüszőérésről függően. A kezdő adagot a testtömegindex és a kor határozta meg.

Azon betegeknél, akik korábban kedvezőtlenül reagáltak a stimulációs kezelésre, a napi dózist maximum 300–350 egységgel kezdtük, szükség esetén LH adásával kiegészítve. A tüszőérést a menstruációs ciklus 6. napjától másnaponta ultrahangvizsgálattal ellenőriztük. A tüszők méretétől függően az alkalmazott gonodotropin mennyiségét egyénileg változtattuk. Amennyiben legalább két tüsző mérete elérte a 17 mm-t, 250 µg hCG adásával ovulációindukciót végeztünk.

A hCG-adás után 36 órával rutin intravénás narkózisban ultrahangvezérelt transvaginalis folliculuspunkciót végeztünk; az embrió(k) beültetése 3–5 nappal a folliculuspunkció után történt. A petesejtek fertilizációja, majd a preembriók tenyésztése szekvenciális tápoldatban történt (Vitrolife, Göteborg, Svédország; G széria).

Az 5-HT-meghatározásokat ELISA-módszerrel (IBL International GmbH, Hamburg, Németország) végeztük.

Megállapítottuk, hogy az anyai szérumban 5-HT az ovarium-hiperstimuláció hatására szignifikánsan emelkedett ( $173,6 \pm 64,7$  vs.  $238,0 \pm 107,1$  ng/ml,  $p < 0,01$ ), és a terhes csoportban jelentősen magasabb értékeket mérünk, mint a nem terhes csoportban ( $p < 0,01$ ) mind a hiperstimuláció előtt, mind azt követően. A tüszőfolyadékban az 5-HT alacsony koncentrációban volt jelen ( $13,1 \pm 9,8$  ng/ml), és értéke függetlennek bizonyult mind az anyai szérumszintektől, mind az IVF kimenetelétől. Eredményeink többváltozós lineáris regressziós analízisével (Modell 1,  $R^2 = 0,336$ ) kimutattuk, hogy az érett petesejtek száma mint függő változó szignifikáns összefüggést mutatott a posztstimulációs anyai szérumban ( $\beta = 0,447$ ,  $p = 0,015$ ) és a tüszőfolyadék-5-HT-szintekkel ( $\beta = 0,443$ ,  $p = 0,016$ ). Többváltozós logisztikus regressziós modell (Modell 3,  $R^2 = 0,595$ ) alkalmazásával a klinikai terhesség mint függő változó ugyancsak szignifikáns kapcsolatban volt az anyai szérumban 5-HT koncentrációjával ( $\beta = 1,028$ ,  $p = 0,047$ ).

Vizsgálataink megerősítették, hogy mind a keringő, mind a lokálisan képződő ovarialis 5-HT fontos tényező a női reprodukció fenntartásában és az IVF eredményességének biztosításában [8].

### Agyi eredetű neurotrofikus faktor

Mivel szoros kölcsönhatást írtak le az 5-HT és több hypothalamicus neuropeptid között, vizsgálatainkat kiterjesztettük a BDNF és a kisspeptin szerepének tisztázására. A BDNF elsődleges forrása a központi idegrendszer, de termelését perifériás szövetekben, köztük a vascularis endotheliumban, simaizomsejtekben és aktivált mononukleáris fehérvérsejtekben is kimutatták. Transzportjárt a trombocyták felelősek, melyek aktiválásakor az 5-HT-vel együtt a plazmába kerül. A BDNF és receptora (TrkB) az ovariumban is megtalálható, autokrin/parakrin működésük alapvető feltétele a zavartalan folliculusképződésnek, a petesejt érésének, az implantációnak és a korai embrió és placenta fejlődésének [9].

IVF-kezelésben részesülő betegekben, cumulus- és granulosa-sejt-preparátumokban a BDNF-szekréciónak fokozását figyelték meg ösztradiol, hCG, LH és FSH hatására [10, 11].

Érdekes közlés, hogy az IVF-kezelés előtt nyert szérumban BDNF szignifikánsan alacsonyabb volt azokban az esetekben, melyekben a kezelés eredményes volt, és klinikai terhesség alakult ki, mint azokban az esetekben, melyekben a kezelés sikertelennek bizonyult [12].

Saját vizsgálatainkban, melyeket az 5-HT-vel együtt ELISA-módszerrel végeztünk (RayBiotech, Peachtree Corners, GA, USA), az ovarium-hiperstimuláció nem okozott változást a BDNF szintjeiben, és nem találtunk különbséget a terhes és a nem terhes csoport értékei között. Ugyanakkor a terhes csoport BDNF-tüszőfolyadék-koncentrációja szignifikánsan alacsonyabb volt, mint amit a nem terhes csoportban mértünk ( $21,9 \pm 12,7$  vs.  $47,6 \pm 5,9$ ,  $p < 0,026$ ). Ennek megfelelően szignifikáns negatív korrelációt igazoltunk a BDNF-szintek, valamint a petesejt- és embriószám, továbbá a kémiai és klinikai terhesség gyakorisága között. Alapvetően új megfigyelés, hogy szignifikáns pozitív korrelációt igazoltunk a tüszőfolyadék-BDNF és 5-HT között, ami arra utal, hogy a két hormon pozitív 'feed-back' (visszacsatoló) szabályozása ovarialis szinten is működik, tehát a BDNF indirekt módon, az 5-HT-termelés stimulálása útján hozzájárulhat a reprodukív potenciál megőrzéséhez vagy javításához [8].

### Kisszeptin

A hypothalamicus peptidhormon, a kisszeptin a reprodukció egyik fontos pozitív szabályozója [13]. A hormont és receptorát az ovariumban is kimutatták, és meggyőző adatok bizonyítják, hogy fontos szerepet játszik a tüsző- és petesejtérésben, az embrió implantációjában és a placentációban [14]. Feltételezik, hogy az ovariumeredetű kisszeptin és a BDNF együttes hatásként növelik a petesejt érést, működő receptoraik hiányában a jelátviteli rendszer sérül, és korai petefészek-elégtelenség alakul ki [15]. Klinikai szempontból is jelentős felismerés, hogy az ovarium-hiperstimulációs szindróma miatt veszélyeztetett nőkben a kisszeptin-54 egyszeri vagy ismételt dózisban történő adásával kontrollált LH-kiáramlást és a petesejt éréseinek javulását lehetett elérni [16].

Saját IVF-kezelt beteganyagunkban az ELISA-val mért kisszeptin (Peninsula Laboratories International, San Carlos, CA, USA) szérumkoncentrációját a hiperstimuláció szignifikánsan növelte ( $0,50 \pm 0,18$  vs.  $0,79 \pm 0,21$  ng/ml,  $p < 0,01$ ) de nem találtunk különbséget a terhes és a nem terhes csoport értékei között. A tüszőfolyadék kisszeptin-koncentrációja a többi vizsgált neurohormonhoz hasonlóan a szérumszintektől függetlennek bizonyult, alátámasztva annak ovarialis eredetét. Többváltozós lineáris regressziós modellt alkalmazva igazoltuk, hogy a posztstimulációs szérumkisszeptin az érett petesejt számát pozitívan befolyásolta

( $R^2 = 0,150$ ,  $\beta = 0,398$ ,  $p = 0,29$ ). Eredményeink és az irodalmi adatok alapján a megfelelően alkalmazott kisszeptinkezelés javíthatja az IVF eredményességét [8].

### Triptofán-kinurenin-szerotonin (5-HT)

A triptofán esszenciális aminosav, melynek döntő többsége a fehérjeszintézisben hasznosul, a fennmaradó rész ~95%-a a kinureninúton katabolizálódik, és csupán <5% szolgál 5-HT-prekursorként. Az 5-HT és az IVF kapcsolatát az előző részben tekintettük át, az alábbiakban a kinurenin lehetséges szerepét elemezzük.

A triptofán-kinurenin konverziót két enzim mediálja: a májeredetű triptofán-2-3-dioxigenáz (TDO), melynek aktivitását a glükokortikoidok fokozzák, a progeszteron és az ösztrogének pedig gátolják. A másik enzim az indolamin-2-3-dioxigenáz, melyet citokinek és gyulladáscsökkentő mediátorok aktiválnak, számos sejttípusban, köztük a monocytákban és makrofágokban is megtalálható [17]. A triptofánszint csökkenését a kinurenin és metabolitjainak növekedése és az 5-HT-szintézis csökkenése kíséri [18]. Mivel az 5-HT protektív reprodukív hatását egyértelműen igazolták, a triptofán-kinurenin út aktiválása az 5-HT következményes csökkenésével ronthatja a reprodukív teljesítményt. Ennek ellentmondani látszik, hogy a TDO-t, IDO-t és a kinureninkatabolizmus további enzimjeit kimutatták a placentában, a deciduában és a korai embrióban, ahol immunológiai védelmet biztosít a sikeres implantációhoz és a zavartalan embrionális/fetális fejlődéshez [19]. Ezen túlmenően számos vizsgálat arra is felhívta a figyelmet, hogy a triptofán-kinurenin rendszer egyes elemei az immuntolerancia kialakítása mellett fontos tényezők az oxidatív stressz elleni védelemben [20, 21]. A kinureninek pozitív szerepét egyértelműen az is bizonyítja, hogy az IDO enzim gátlása vagy a gén deletiója magzati veszteségeket és terhességi szövődményeket okozott [18].

Tekintettel arra, hogy mind a triptofán-kinurenin, mind a triptofán-5-HT rendszer protektív hatású, és mindkét metabolikus út verseng a szubsztrát triptofánért, optimálisnak az látszik, hogy egyik vonal sem dominál, hanem egyensúlyi helyzet alakul ki. Ennek ellenőrzésére a korábbi vizsgálati protokollt alkalmazva HPLC-MS-MS módszer felhasználásával 64 beteg azonos mintáiban meghatároztuk a triptofán, a kinurenin és az 5-HT szérum- és tüszőfolyadék-szintjeit. Megállapítottuk, hogy az ovarium-hiperstimuláció hatására mindhárom metabolit koncentrációja csökkent, jelezvén, hogy kevesebb triptofán áll a két katabolikus út rendelkezésére. Az érett petesejt számát a tüszőfolyadék-5-HT-vel pozitív, míg a tüszőfolyadék-triptofán/5-HT és kinurenin/5-HT arányokkal negatív korrelációt mutattunk. Ennek megfelelően a terhes csoportban szignifikánsan magasabb szérum- ( $p = 0,045$ ) és tüszőfolyadék-5-HT ( $p = 0,020$ ), valamint alacsonyabb kinurenin/5-HT arányt ( $p = 0,024$ ) tudtunk igazolni. Többváltozós logisztikus regressziós analízissel az érett petesejt számát

mint függő változót csupán a tüszőfolyadék-5-HT befolyásolta szignifikánsan ( $\beta = 0,473$ ,  $p = 0,001$ ). Eredményeink azt igazolják, hogy kedvezőbb IVF-kimenetel várható, amennyiben az 5-HT-kinurenin egyensúly az 5-HT javára tolódik el [22].

## Oxidatívstressz-markerek és antioxidánsok vizsgálata IVF-kezelt betegekben

### 8-hidroxi-2'-deoxiguanozin (8-OHdG) és totális antioxidáns-kapacitás (TAC)

A reaktívoxigén-molekulák (reaktívoxigén-származék, ROS; szuperoxid-anion, hidrogén-peroxid, hidroxilani-on) a normális sejtanyagcsere termékei, és fontos szerepet játszanak a celluláris folyamatok szabályozásában. Abban az esetben azonban, ha túlzott termelésük meghaladja a sejtek antioxidáns-kapacitását, a ROS-ok reakcióba lépnek a sejtek fehérje-, lipid- és DNS-elemeivel, és celluláris diszfunkciót, morfológiai károsodást és apoptózist okozhatnak. IVF-kezelt betegekben fiziológiás ROS-képződés szükséges a petesejt egészséges éréséhez, a sikeres fertilizációhoz és az embrió zavartalan fejlődéséhez [23]. A tüszőfolyadék optimális ROS-szintje azonban nincs definiálva, és mind a túlzott, mind az elégtelen ROS-generálás kedvezőtlenül befolyásolja az IVF kimenetelét [24]. Ez a megfigyelés összhangban áll a „quiet metabolism” koncepciójával, mely szerint a normális metabolikus aktivitás felső vagy alsó határán túl az embrió életképessége csökken [25].

A közelmúlt kutatásai hívták fel a figyelmet az oxidatív DNS-károsodás részleges korrekciójának jelentőségére a női reprodukcióban. Megállapították, hogy a 8-OHdG mint az oxidatív DNS-károsodás biomarkere IVF-kezelt betegek granulosa-sejtjeiben és tüszőfolyadékjában negatívan korrelál a petesejtek és az embriók minőségével [26, 27].

A kérdés további tisztázására munkacsoportunk 61, IVF-kezelésben részesült beteg esetében meghatározta az anyai szérumban és a tüszőfolyadékban 8-OHdG-szintjét (ELISA; IBL International GmbH) és totális nem enzimikus antioxidáns-kapacitását (Trolox-kalibrált kemilumineszcenciás módszer). Megállapítottuk, hogy ovarium-hiperstimuláció hatására a szérumban TAC jelentősen növekedett ( $95,4 \pm 17,8$  vs.  $104,8 \pm 17,4$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $p = 0,02$ ), míg a 8-OHdG szignifikánsan csökkent ( $17,6 \pm 5,1$  vs.  $15,6 \pm 5,3$   $\text{ng/ml}$ ,  $p < 0,001$ ). Mindkét biomarker kimutatható volt a tüszőfolyadékban, de lényegesen alacsonyabb koncentrációban, mint az anyai szérumban, és azzal nem mutatott összefüggést. A TAC és a 8-OHdG kapcsolatát vizsgálva azok tüszőfolyadék-értékei egymástól függetlennek bizonyultak, míg szérumban közöttük szignifikáns negatív korrelációt észleltünk ( $r = -0,241$ ,  $p = 0,009$ ), jelezvén, hogy a magasabb TAC csökkenti a DNS-károsodást. További fontos megfigyelés, hogy mind a TAC ( $r = -0,302$ ,  $p = 0,027$ ), mind a

8-OHdG ( $r = -0,268$ ,  $p = 0,039$ ) kedvezőtlenül befolyásolja az embriók életképességét.

Eredményeink megerősítik azon törekvések szükségességét, melyek az IVF-eljárás során az oxidatív stressz csökkentésére irányulnak [28].

### Szirtuinok (SIRT1, SIRT6) és rezveratrol

A SIRT-ek NAD-függő hiszton-deacetyláz enzim fehérjék, melyek bizonyos védelmet jelentenek az öregedéssel és az öregedéssel kapcsolatos kóros állapotokkal szemben. A proteincsalád 7 tagja ismert (SIRT1–7), melyek szövetspecifitása, szubcelluláris lokalizációja és aktivitása különböző. Általános jellemzőjük, hogy alapvető sejt-funkciók szabályozásában vesznek részt (energiaforgalom, redoxstatus, jelátvitel, sejtciklus, genomstabilitás) [29]. Az életkor előrehaladtával az ovariumfunkció is beszűkül, a tüsző- és petesejtképzés csökken, a petesejtek minősége romlik. Az ovarium öregedésére jellemző változások szoros összefüggést mutatnak a nukleáris SIRT1 és SIRT6 szintjeivel [30]. SIRT1-hiányos egértörzsekben ovarium-diszfunkció alakul ki, és a petesejtek fejlődési potenciálja beszűkül [31]. A közelmúltban végzett humánvizsgálatok is igazolták, hogy a SIRT1–7 tagjai a germinális vesiculumban és az érett petesejtekben jelen vannak, az érés folyamán up-regulációjuk következik be [32]. A SIRT-ek fertilitást javító hatásának közvetítésében az antioxidáns rezveratrol és a telomeráz aktivitásának növelése, a telomer integritásának védelme is szerepet játszik [33, 34].

Ezen irodalmi adatok alapján a korábban is alkalmazott vizsgálati protokoll szerint 30, IVF-kezelt betegnél az anyai szérumban és a tüszőfolyadék-mintákban ELISA-módszerrel meghatároztuk a SIRT1- és SIRT6-, valamint a rezveratrolszinteket (Cloude-Clone Corporation, Houston, TX, USA). Megállapítottuk, hogy az ovarium-hiperstimuláció hatására a szérumban SIRT1 a terhes csoportban szignifikánsan növekedett ( $6,0 \pm 5,6$  vs.  $7,9 \pm 3,4$   $\text{ng/ml}$ ,  $p < 0,05$ ), és jelentősen meghaladta a nem terhes csoport értékeit ( $4,7 \pm 2,7$   $\text{ng/ml}$ ,  $p < 0,05$ ). A SIRT6 esetében ilyen változás nem következett be, de ezek értéke a terhes csoportban csökkent mind a hiperstimuláció előtt ( $0,31 \pm 0,19$  vs.  $0,14 \pm 0,07$   $\text{ng/ml}$ ,  $p < 0,05$ ), mind azt követően. Mindkét szirtuint (SIRT1, SIRT6) kimutattuk a tüszőfolyadékban, de a szérumszintektől függetlennek bizonyultak, ami lokális, ovarialis termelésükre utal. Egyéb, ható tényezőkre történő korrekció után szignifikáns pozitív korrelációt találtunk a tüszőfolyadék-SIRT6 és az érettpetesejt-szám ( $F = 6,609$ ), valamint a szérumban SIRT1 ( $F = 10,008$ ,  $p = 0,005$ ), szérumban SIRT6 ( $F = 5,268$ ,  $p = 0,03$ ) és a klinikai terhesség gyakorisága között. A rezveratrol sem a SIRT-ekkel, sem az IVF kimenetelét jelző markerekkel nem mutatott összefüggést.

Eredményeink megerősítették a SIRT-ek lehetséges szerepét a reprodukció sikerében, de további molekuláris

biológiai vizsgálatok szükségesek a SIRT-enzimek aktivitásának meghatározására és esetleges epigenetikai változásainak feltárására [35].

## Következtetés

Munkacsoportunk kiterjedten vizsgálta a tüszőfolyadék biomarkereit, és kísérletet tett az intraovariálisan képződő neurohormonok, oxidatívstressz-markerek és antioxidáns molekulák prediktív értékének meghatározására. Az intrafollicularis mikrokörnyezet ugyanis messzemenően befolyásolja a petesejtek érését, minőségét és a megtermékenyítésre való alkalmasságát. Optimális összetételének fenntartása feltétele a természetes és mesterséges megtermékenyítés sikerének, ezért minden genetikai vagy környezeti tényező, amely a granulosa-sejt–tüszőfolyadék egység funkcionális integritását és a tüszőfolyadék összetételét károsan befolyásolja, csökkenti a fertilizáció eredményességét. A biztató kezdeti eredmények ellenére szükségesnek tartjuk a vizsgálatok nagyobb beteganyagra történő kiterjesztését, diagnosztikus csoportok képzését, valamint a potenciális markerek génextpressziós mintázatának és esetleges poszttranszkripció módosulásának meghatározását.

**Anyagi támogatás:** A munka a „Nemzeti laboratóriumok létrehozása 2020” program keretében készült a Humán Reprodukciós Nemzeti Laboratórium Projekt és az „EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009: Az orvos-, egészségügyi és gyógyszerészképzés tudományos műhelyeinek fejlesztése” projekt támogatásával.

**Szerzői munkamegosztás:** B. J., S. E.: A program megtervezése és a kézirat összeállítása. V. Á., K. M.: Adatelemzés és irodalomkutatás. K. L. G.: A kézirat kritikus értékelése és véglegesítése. A cikk végleges változatát valamennyi szerző elolvasta és jóváhagyta.

**Érdekltségek:** A szerzőknek nincsenek érdekltségeik.

## Irodalom

- [1] Fülöp V, Vermes G, Demeter J. The relationship between inflammatory and immunological processes during pregnancy. Practical aspects. [A gyulladáshoz és immunológiai folyamatok kapcsolata a várandósság alatt. Gyakorlati vonatkozások.] *Orv Hetil.* 2019; 160: 1247–1259. [Hungarian]
- [2] Brubel R, Dobó N, Csibi N, et al. The effect of surgical treatment of bowel endometriosis on fertility. [A bélendometriosis miatt végzett műtétek hatása a fertilitásra.] *Orv Hetil.* 2019; 160: 1633–1638. [Hungarian]
- [3] Várnagy A, Bódis J, Kovács GL, et al. Metabolic hormones in follicular fluid in women undergoing *in vitro* fertilization. *J Reprod Med.* 2013; 58: 305–311.
- [4] Wada K, Hu L, Mores N, et al. Serotonin (5-HT) receptor subtypes mediate specific modes of 5-HT-induced signaling and regulation of neurosecretion in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Mol Endocrinol.* 2006; 20: 125–135.
- [5] Bódis J, Török A, Tinneberg HR, et al. Serotonin induces progesterone release from human granulosa cells in a superfused granulosa cell system. *Arch Gynecol Obstet.* 1993; 253: 59–64.
- [6] Il'ková G, Rehák P, Veselá J, et al. Serotonin localization and its functional significance during mouse preimplantation embryo development. *Zygote* 2004; 12: 205–213.
- [7] Veselá J, Rehák P, Mihalik J, et al. Expression of serotonin receptors in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Physiol Res.* 2003; 52: 223–228.
- [8] Bódis J, Sulyok E, Kószegi T, et al. Serum and follicular fluid levels of serotonin, kisspeptin and brain-derived neurotrophic factor in patients undergoing *in vitro* fertilization: an observational study. *Neurohormones in patients receiving IVF. J Int Med Res.* 2020; 48(4) Doi: 10.1177/0300060519879330. [Epub 2019 Dec 23]
- [9] Kawamura K, Kawamura N, Mulders SM, et al. Ovarian brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes the development of oocytes into preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 9206–9211.
- [10] Feng B, Chen S, Shelden RM, et al. Effect of gonadotropins on brain-derived neurotrophic factor secretion by human follicular cumulus cells. *Fertil Steril.* 2003; 80: 658–659.
- [11] Zhao P, Qiao J, Huang S, et al. Gonadotrophin-induced paracrine regulation of human oocyte maturation by BDNF and GDNF secreted by granulosa cells. *Hum Reprod.* 2011; 26: 695–702.
- [12] Ramer I, Kanninen TT, Sisti G, et al. The serum brain-derived neurotrophic factor concentration prior to initiation of an *in vitro* fertilization cycle predicts outcome. *J Reprod Immunol.* 2016; 116: 46–49.
- [13] de Roux N, Genin E, Carel JC, et al. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the Kiss1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 10972–10976.
- [14] Bhattacharya M, Babwah AV. Kisspeptin: beyond the brain. *Endocrinology* 2015; 156: 1218–1227.
- [15] Dorfman MD, Garcia-Rudaz C, Alderman Z, et al. Loss of *Ntrk2/Kiss1r* signaling in oocytes causes premature ovarian failure. *Endocrinology* 2014; 155: 3098–3111.
- [16] Abbata A, Jayasena CN, Christopoulos G, et al. Efficacy of kisspeptin-54 to trigger oocyte maturation in women at high risk of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) during *in vitro* fertilization (IVF) therapy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015; 100: 3322–3331.
- [17] Badaway AA. Tryptophan metabolism, disposition and utilization in pregnancy. *Biosci Rep.* 2015; 35: e00261.
- [18] Munn DH, Zhou M, Attwood JT, et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 1998; 281: 1191–1193.
- [19] Groebner AE, Schulke K, Schefold JC, et al. Immunological mechanisms to establish embryo tolerance in early bovine pregnancy. *Reprod Fertil Dev.* 2011; 23: 619–632.
- [20] Christen S, Peterhans E, Stocker R. Antioxidant activities of some tryptophan metabolites: possible implication for inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 2506–2510.
- [21] Weiss G, Diez-Ruiz A, Murr C, et al. Tryptophan metabolites as scavengers of reactive oxygen and chlorine species. *Pteridines* 2002; 13: 140–145.
- [22] Bódis J, Sulyok E, Koppán M, et al. Tryptophan catabolism to serotonin and kynurenine in women undergoing *in vitro* fertilization. *Physiol Res.* 2020; 69: 1113–1124.
- [23] Agarwal A, Gupta S, Sekhon L, et al. Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signaling* 2008; 10: 1375–1403.
- [24] Attaran M, Pasqualotto E, Falcone T, et al. The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of *in vitro* fertilization. *Int J Fertil Womens Med.* 2000; 45: 314–320.

- [25] Gardner DK, Wale PL. Analysis of metabolism to select viable human embryos for transfer. *Fertil Steril.* 2013; 99: 1062–1072.
- [26] Seino T, Saito H, Kaneko T, et al. Eight-hydroxy-2'-deoxyguanosine in granulosa cells is correlated with the quality of oocytes and embryos in an *in vitro* fertilization–embryo transfer program. *Fertil Steril.* 2002; 77: 1184–1190.
- [27] Tamura H, Takasaki A, Miwa I, et al. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *J Pineal Res.* 2008; 44: 280–287.
- [28] Várnagy Á, Kószegi T, Györgyi E, et al. Levels of total antioxidant capacity and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine of serum and follicular fluid in women undergoing *in vitro* fertilization: focusing on endometriosis. *Human Fertil.* 2020; 23: 200–208.
- [29] Finkel T, Deng CX, Mostoslavsky R. Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature* 2009; 460: 587–591.
- [30] Zhang J, Fang L, Lu Z, et al. Are sirtuins markers of ovarian aging? *Gene* 2016; 575: 680–686.
- [31] Bordone L, Cohen D, Robinson A, et al. SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction. *Aging Cell* 2007; 6: 759–767.
- [32] Zhao HC, Ding T, Ren Y, et al. Role of *Sirt3* in mitochondrial biogenesis and developmental competence of human *in vitro* matured oocytes. *Hum Reprod.* 2016; 31: 607–622.
- [33] Palacios JA, Herranz D, De Bonis MI, et al. SIRT1 contributes to telomere maintenance and augments global homologous recombination. *J Cell* 2010; 191: 1299–1313.
- [34] Liu M, Yin Y, Ye X, et al. Resveratrol protects against age-associated infertility in mice. *Hum Reprod.* 2013; 28: 707–717.
- [35] Bódis J, Sulyok E, Kószegi T, et al. Serum and follicular fluid levels of sirtuin 1, sirtuin 6, and resveratrol in women undergoing *in vitro* fertilization: an observational, clinical study. *J Int Med Res.* 2019; 47: 772–782.

(Sulyok Endre dr.,  
Pécs, Vörösmarty u. 4., 7621  
e-mail: esulyok@t-online.hu)

„*Ab ovo.*” (Horatius)  
(A tojástól. – A kezdettől.)

A cikk a Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) feltételei szerint publikált Open Access közlemény, melynek szellemében a cikk bármilyen médiumban szabadon felhasználható, megosztható és újraközölhető, feltéve, hogy az eredeti szerző és a közlés helye, illetve a CC License linkje és az esetlegesen végrehajtott módosítások feltüntetésre kerülnek. (SID\_1)