

Pécsi Tudományegyetem Egészségtudományi Kar

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Bódis József

## **Az in vitro fertilizáció kimenetelét és lehetséges szövődményeit meghatározó faktorok vizsgálata**

Doktori (Ph.D.) értekezés

**Dr. Várnagy Ákos**

Programvezető: Prof. Dr. Bódis József

Témavezető: Dr. Koppán Miklós

Pécs, 2011.

## ***Tartalomjegyzék***

<b><i>Rövidítések</i></b> .....	4.
<b><i>1. Bevezetés</i></b> .....	5.
<b><i>2. Ovariális hiperstimulációs szindróma</i></b> .....	7.
2.1. Patofiziológia .....	8.
2.2. Rizikó faktorok.....	9.
2.3. Klinikai tünetek, osztályozás.....	10.
2.4. Megelőzés.....	12.
2.5. Terápia.....	14.
<b><i>3. Hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP)</i></b> .....	17.
3.1. A PACAP előfordulása a szervezetben .....	18.
3.2. A PACAP idegrendszeri hatásai .....	19.
3.3. A PACAP nem idegrendszeri hatásai.....	20.
3.4. A PACAP hatásának molekuláris mechanizmusa.....	22.
<b><i>4. A nitrogén monoxid (NO) rendszer intraovariális hatása</i></b> .....	24.
<b><i>5. Célkitűzések</i></b> .....	26.
5.1. Ovariális hiperstimulációs szindróma profilaxisának vizsgálati lehetőségei.....	26.
5.2. PACAP38 jelenlétének vizsgálata tüszőfolyadékban .....	26.
5.3. Arginin származékok jelenlétének vizsgálata az IVF sikerességének függvényében..	27.

<b>6. Anyag és módszer</b> .....	28.
6.1. Ovariális hiperstimulációs szindróma profilaxisának vizsgálata .....	28.
6.2. PACAP38 jelenlétének vizsgálata tüszőfolyadékban .....	30.
6.3. Arginin származékok jelenlétének vizsgálata az IVF sikerességének függvényében..	32.
<b>7. Eredmények</b> .....	36.
7.1. Ovariális hiperstimulációs szindróma profilaxisának lehetősége .....	36.
7.2. PACAP38 jelenléte a tüszőfolyadékban .....	38.
7.3. Arginin származékok és az IVF kimenetelének összefüggése .....	45.
<b>8. Megbeszélés</b> .....	49.
8.1. Ovariális hiperstimulációs szindróma profilaxisa aszpirinnel.....	49.
8.2. PACAP38 jelenléte a tüszőfolyadékban .....	50.
8.3. Az NO rendszer kapcsolata az IVF kimenetelével.....	53.
<b>9. Új eredmények összefoglalása</b> .....	56.
<b>10. Köszönetnyilvánítás</b> .....	57.
<b>11. Tudományos közlemények, előadások listája</b> .....	58.
<b>12. Irodalomjegyzék</b> .....	62.

***Rövidítések***

ADMA – aszimmetrikus dimetilarginin

Arg-MI – arginin metilációs index

BMI – Body Mass Index

DDAH – dimetilarginin dimetilaminohidroláz

E2- ösztradiol

FSH – follikulus stimuláló hormon

GnRH – gonadotrop releasing hormon

hCG – humán choriális gonadotropin

IGF - insulin-like growth factor

Interleukin-6 – Il-6

Interleukin-8 – Il-8

IVF- in vitro fertilizáció

LH – luteinizáló hormon

LPA - lysophosphatidic acid

MMA – monometil arginin

NO – nitrogén-oxid

NOS – nitrogén-oxid szintetáz

OHSS – ovariális hiperstimulációs szindróma

PACAP - pituitary adenylate cyclase activating polypeptide

PCO – policisztás petefészek szindróma

SDMA – szimmetrikus dimetilarginin

TNF- $\alpha$  – tumor nekrozis faktor alfa

VEGF - vascular endothelial growth factor

VIP- vazoaktív intesztinális peptid

## ***1. Bevezetés***

Világszerte növekszik a meddőségi kezelésekre jelentkezők, és így az asszisztált reprodukciós kezelések száma is. Jelenleg közel 3-4% az így született gyermekek aránya az összes születéshez képest, és ez az érték tovább emelkedik (Nyboe et al., 2005; Patchava et al., 2009). Az asszisztált reprodukciós eljárások, elsősorban az in vitro fertilizáció (IVF) elterjedésével számolnunk kell ezen kezelések mellékhatásainak gyakoribb előfordulásával is. Komoly erőfeszítések zajlanak a sikerességi ráta további emelése és a mellékhatások egyidejű minimalizálása érdekében (Gera et al., 2009).

Ennek okán az intraovariális reguláció fontosságát az utóbbi években számos tanulmány elemezte. Több fehérje szerepét vizsgálták a patogenezisben, újabb adatok azonban olyan anyagok szerepét hangsúlyozzák, mint az aktivin, inhibin, insulin-like growth factor (IGF) I és II, epidermal growth factor, IGF-binding protein, intraovariális renin-angiotenzin rendszer, oxytocin, opiátok. Mostanra ezek az adatok kiegészültek a citokinek és interleukinek, valamint számos (neuro)parakrin faktor intraovariális szerepével.

Keveset tudunk azonban ezen anyagoknak a petefészek működés szabályozásának zavarával járó kórfolyamatokban, mint például a policisztás petefészek szindrómában, vagy az ovariális hiperstimulációs szindrómában (OHSS) betöltött szerepéről. Bár a hiperstimuláció pontos mechanizmusa ismeretlen, annyi bizonyos, hogy perifériás arteriolás értágulattal, fokozott ér permeabilitással és trombocita aktivációval jár. A folyamatban részt vesz a renin-angiotenzin rendszer, citokinek, mint az interleukin-8 (IL-8), tumor nekrosis faktor alfa (TNF- $\alpha$ ), endothelin-1, és vascular endothelial growth factor (VEGF). Az aktivált trombocitákból további anyagok szabadulnak fel, melyek az OHSS tüneteiért felelősek (hisztamin, szerotonin, platelet derived growth factor és lysophosphatidic acid (LPA)).

Nincs egyelőre végleges elképzelésünk a tüszőfolyadékban található faktorok (acetilkolin, szerotonin, hisztamin) szerepéről az intraovariális regulációban és azok lehetséges kapcsolatáról az LPA receptorokkal, de munkacsoportunk korábbi eredményeiből jól ismert, hogy a granulóza sejt funkciót jelentősen módosító hatásuk van (Kornya et al., 2001; Bódis et al., 2002; Koppán et al., 2004). Ugyanakkor régóta ismert, hogy az ovuláció gyulladásszerű jellegű élettani folyamatában jelentős szerepet töltenek be a trombociták (Abisogun et al., 1989). Másrészt bizonyítást nyert a pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gyulladásszerű folyamatokban játszott élettani szerepe (Delgado et al., 2003) a tumor nekrosis faktor alfa (TNF- $\alpha$ ) szint csökkentésén keresztül, mely az endokrin rendszerrel szoros összefüggésben van. Ez alapján logikusnak tűnik a feltételezés, hogy ezen utóbbi funkció szaporodásbiológiai vetülettel is bír.

Korábbi tanulmányok már rámutattak arra, hogy VEGF mRNS expressziója összefüggésben van a petefészkek vazoproliferációjával, valamint számos adat utal arra, hogy a nitrogén oxid szintetáz endogén inhibitora az asszimetrikus dimetilarginin (ADMA) módosítja az endotel sejtek VEGF szintjét.

Az intraovariális szabályozó mechanizmusok vizsgálatára rendelkezésre álló eszközeink behatároltak. Lehetőség van in vitro szuperfúziós rendszerekben, például granulóza sejtekben mérni az érintett peptidek mennyiségét, vagy humán váladékból, például in vitro fertilizációs kezelés során „melléktermékként” nyert tüszőfolyadékból meghatározni ezen anyagok koncentrációját.

Másik lehetőség, hogy ismert hatásmechanizmusú vegyület (pl. aszpirin) hatását elemezzük randomizált vizsgálatok során, melyek eredménye alapján indirekt következtetést tudunk levonni a petefészkekben zajló folyamatokra.

Vizsgálatainkban az ovarialis hiperstimulációs szindróma és ebben kulcsszerepet játszó VEGF, illetve ennek működésére ható aszpirin hatását elemeztük in vitro fertilizációs

kezelés során. Tanulmányoztuk a pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) jelenlétét és koncentrációját a follikuláris folyadékban és azt, hogy a különböző arginin származékoknak milyen szerepe van az in vitro fertilizáció kimenetelére.

## ***2. Ovariális hiperstimulációs szindróma***

Az asszisztált reprodukciós kezelések egyik legsúlyosabb, potenciálisan életveszélyes szövődménye, az ovariális hiperstimulációs szindróma (OHSS). AZ OHSS egy az egész szervezetet érintő betegség, melynek kialakulásáért a túlstimulált petefészkekből kiáramló vazóaktív anyagok, citokinek felelősek.

A szindróma fő jellemzője a megnövekedett kapilláris permeabilitás, mely folyadékkiáramlást okoz az intravaszkuláris térből a harmadik folyadéktérbe, következményes intravaszkuláris dehidrációt okozva. A kórkép gyakrabban fordul elő fiatal nőkben, policisztás petefészek szindrómában és abban az esetben, ha terhesség, különös tekintettel többes terhesség létrejön. Aktiválódik a renin-angiotenzin rendszer, a szimpatikus idegrendszer, az antidiuretikus hormon elválasztás, melyek összességében emelkedett szívfrekvenciához, fokozott „cardiac output”-hoz vezetnek. Súlyos esetben a klinikai képet masszív ascites, hydrothorax, hemokoncentráció, oliguria, trombózis, akut respiratórikus distressz szindróma (ARDS) uralja.

Irodalmi adatok alapján az OHSS enyhe formája gyakori, az IVF ciklusok akár 33%-ában előfordulhat, míg a súlyos forma 0,1-2%-ban alakul ki (Delvigne et al., 2002). A súlyos esetek többsége jellemzően IVF kezelés után jön létre, de a kórkép egyéb ovuláció indukcióval társuló asszisztált reprodukciós kezelést követően is előfordulhat (clomifen citrát, gonadotropin). Ezért minden klinikusnak, aki bármilyen ovuláció indukciós kezelést folytat, felkészültnek kell lennie az OHSS tüneteinek felismerésére és kezelésére.

A még nem teljesen tisztázott patomechanizmus és a kezelés tüneti jellege miatt a legnagyobb kihívást a megelőzés jelenti.

### ***2.1. Patofiziológia***

Bár a hiperstimuláció pontos mechanizmusa ismeretlen, annyi bizonyos, hogy perifériás arteriolás értágulattal, fokozott érpermeabilitással és trombocita aktivációval jár. A folyamatban részt vesz a renin-angiotenzin rendszer, citokinek, mint az IL-8, a tumor nekrosis faktor alfa, az endothelin-1 és a VEGF, melyek triggerelik a megnövekedett kapilláris permeabilitást. A legtöbb adat a VEGF szerepét hangsúlyozza az OHSS kialakulásában (Geva et al., 2000; McClure et al., 1994; Choudhury et al., 2007). A VEGF egy angiogenetikus citokin, mely a vaszkuláris endotel erős stimulátora és úgy tűnik, szerepe van a tüszőérésben és a petefészek angiogenezisében. Korábbi tanulmányok rámutattak, hogy a VEGF mRNS expressziója a petefészek vazoproliferációjával összefüggésben van (Soares et al., 2008). VEGF gátlók majmokban késleltetett tüszőérést okoznak, rácsálókban és főemlősökben blokkolják a luteális angiogenezist. Ezek az adatok a VEGF kulcsszerepére utalnak az ovariális angiogenezisben (Fraser et al., 2000; Rowe et al., 2002). Szintén ismert, hogy a VEGF szintek egyenes arányban állnak az OHSS súlyosságával.

Újabb irodalmi adatok alapján a megnövekedett trombocita aktiváció és a VEGF szintek között erős korreláció feltételezhető. Az aktivált trombocitákból további anyagok szabadulnak fel, melyek az OHSS tüneteire felelősek (hisztamin, szerotonin, platelet derived growth factor és lysophosphatidic acid (LPA) (Bódis et al., 1992; Siess 2002). Az LPA egy biológiailag aktív foszfolipid, mely a tüszőfolyadékban megtalálható, és feltehetően felelős a preovulatórikus tüszőben végbemenő angiogenetikus folyamatokért, melyek később a corpus luteum kialakulásához vezetnek. Az LPA-ról bizonyítást nyert, hogy képes excesszív



Interleukin-6 (IL-6) és IL-8 szint fokozódást kiváltani túlstimulált petefészekben, azonban a pontos mechanizmus, mely az OHSS-hez vezet, nem ismert (Chen et al., 2008).

## 2.2. Rizikó faktorok

Az OHSS megelőzése és felismerése szempontjából a magas rizikójú betegek kiszűrése és fokozott követése indokolt. Az OHSS létrejöttének rizikófaktorait az 1. táblázatban tüntettük fel.

*1. táblázat: Az OHSS létrejöttének rizikó faktorai*

Fiatal életkor
Alacsony testsúly
Policisztás petefészek szindróma
Nagy dózisú exogén gonadotropin
Magas abszolút, vagy gyorsan emelkedő ösztradiol szint
Korábban lezajlott OHSS
Luteinizáló hormon (LH) > Follikulus stimuláló hormon (FSH)
Magas bazális LH
Policisztás petefészek (szindróma nélkül)
Hyperandrogenaemia
Oligo/ anovuláció
Allergia a kórtörténetben

A felsorolt tényezők egymástól függetlenül is növelik az OHSS kialakulásának valószínűségét. A fentiekén túlmenően a kockázat emelkedik a magas, vagy ismételt dózisú, például sárgatest-fázis támogatás céljából adott humán choriogonadotropin (hCG) adását követően is.

Az OHSS fenyegető tüneteként kell értékelni a stimuláció alatti magas follikulus számot (>20), a magas petesejt számot (>30), a gyorsan emelkedő, vagy magas abszolút szérum ösztradiol (E2) szintet, illetve a beteg szubjektív panaszait, úgymint alhasi diszkomfort, hányinger, hányás, hasmenés. A terhesség nemcsak a betegség kialakulásának

valószínűségét növeli, hanem annak időtartamát és a tünetek súlyosságát is fokozza (Busznyák et al., 2009).

### 2.3. Klinikai tünetek, osztályozás

Az OHSS-t a klinikai tünetek súlyossága és a társuló laboratóriumi paraméterek alapján osztályozzuk. A 2. táblázatban *Mathur és mtsai* által 2005-ben javasolt és általunk is alkalmazott beosztást mutatjuk be (Mathur et al., 2005).

2. táblázat: Az OHSS tüneteinek osztályozása súlyosság szerint

Stádium	Tünetek
Enyhe OHSS	Hasi puffadás
	Enyhe hasi fájdalom
	Petefészkek mérete <8 cm*
Középsúlyos OHSS	Mérsékelt hasi fájdalom
	Hányinger + hányás
	Ultrahanggal igazolt ascites Petefészkek mérete 8-12 cm*
Súlyos OHSS	Ascites klinikai tünetei (esetleg hydrothorax)
	Oliguria
	Hemokonzentráció hematokrit >45 %
	Hipoproteinémia Petefészkek mérete >12 cm*
Igen súlyos (kritikus) OHSS	Feszülő ascites vagy nagyfokú hydrothorax
	Hematokrit >55%
	Fehérvérsejt szám > 25000/ml
	Oligo/anuria
	Tromboembólia Akut respiratorikus distressz szindróma

\* A petefészkek mérete az asszisztált reprodukció során nem feltétlenül korrelál az OHSS súlyosságával, és tekintettel kell lenni a korábbi folliculus aspirációra is.

A betegség enyhe manifesztációja az ovuláció indukciós terápián átesett betegek csaknem harmadában kialakul. A hasi fájdalom, hányinger perzisztálása, rosszabbodása, ascites megjelenése jelzi a betegség progresszióját. Ha a fájdalom mellett feszülő ascites, hemodinamikai instabilitás, légzési nehezítettség, progresszív oliguria és/vagy laboratóriumi eltérések is jelentkeznek, a betegség súlyos formájával állunk szemben.

Az igen súlyos OHSS stádiumba sorolható betegek intenzív osztályon történő ellátása indokolt. A prognózis szempontjából az OHSS korai és késői formára történő felosztása prediktív értékű. Az ovulatorikus dóziszú hCG adását követő 9 napon belül jelentkező OHSS feltehetően a túlzott mértékű ovariális reakció, valamint a végső follikulus érés érdekében adott exogén hCG együttes következménye. Az ezen periódust követően jelentkező OHSS-t pedig egy korai terhesség endogén hCG stimulusa hozza létre. A késői kezdetű OHSS általában súlyosabb és elhúzódóbb, mint a korai kezdetű (Mathur et al., 2000) .

## **2.4. Megelőzés**

Tekintettel a kezelés tüneti jellegére a kórkép szempontjából a megelőzés döntő jelentőségű. Ebben fontos szerep jut az ovuláció indukció megfelelő alkalmazásának és a rizikófaktorok felismerésének.

Az ovuláció indukció mindig egyénre szabott, szorosan ellenőrzött kell, hogy legyen, a terápiás cél, a terhesség eléréséhez szükséges minimális dózisú gonadotropin megfelelő protokollban (pl.: low-dose step up, step down, gonadotrop releasing hormon (GnRh) antagonist, antagonist reindukció) történő alkalmazásával. Policisztás petefészek szindróma esetén a stimuláció alatt alkalmazott metformin kezelés csökkenti az OHSS rizikóját (Tso et al., 2009). Az OHSS alarmírozó tüneteinek megjelenésétől az E2 szint csökkenéséig leállított stimuláció szignifikánsan csökkenti az OHSS előfordulását. Ez az angol nyelvű irodalomban „coasting”-nak nevezett eljárás elhúzódó esetben (> 3 nap) azonban csökkenti a terhességi rátát. Súlyos esetben sor kerülhet a ciklus megszakítására, ha a tünetek még jóval a hCG adás előtt jelentkeznek (Mathur et al., 2007). Magas rizikójú esetekben a petesejtek korai punkciója, majd in vitro maturációja teljesen kivédheti az OHSS kialakulását (Son et al., 2007).

Kedvező irodalmi adatok utalnak a dopamin agonisták (cabergoline) jótékony hatására is a vaszkuláris permeabilitás csökkentésében, enyhítve ezáltal az OHSS tüneteit (Garcia-Velasco et al., 2009).

Profilaktikus albumin adásával kapcsolatban eltérő irodalmi adatok állnak rendelkezésre, valószínű, hogy az albumin adása csökkenti az OHSS előfordulását, de a súlyos OHSS kialakulását nem védi ki teljesen (Ben-Chetrit et al., 2002; Aboulghar et al., 2002).

A tünetek késleltetett embrió beültetéssel (blasztociszta transzfer) valamelyest enyhíthetők, de lényegesebb, hogy ez a páciens megfigyelésére több időt ad, lehetőséget adva az elektív embriófagyasztásra, mely megvédi a beteget a súlyos szövődményektől.

A hCG kulcsszerepének bizonyítása az OHSS kialakulásában lehetővé tette a következő megelőzési stratégiákat:

- a hCG dózis csökkentése,
- GnRh agonista alkalmazása az endogén LH csúcs kiváltására (GnRh antagonisták down reguláció után),
- luteális támogatás hCG helyett progeszteronnal,
- a rekombináns LH kifejlesztésével lehetőség nyílt a hCG helyettesítésére (jelenleg nincs megfelelő dózisú készítmény forgalomban) (Nargund et al., 2007; European Recombinant LH Study Group 2001).

A betegség patofiziológiájának pontosabb megismerése lehetővé teszi újabb preventív eljárások bevezetését. A megnövekedett kapillaris permeabilitásért felelős VEGF szinttel szoros korrelációt mutató trombocita-aktiváció aspirin adásával gátolható (Rubinstein et al., 1999; Khiary et al., 2007).

## 2.5. Terápia

A diagnózis felállítása általában nem ütközik nehézségekbe: korábbi ovuláció indukciós kezelést követően jelentkező hasi diszkomfort, fájdalom, hányinger, hányás mind a kórismézést segítő tünetek. Ezután a kórkép megerősítése ultrahang és laboratóriumi vizsgálatokkal történik.

Differenciál diagnózis szempontjából az ovariális ciszta torziója, bevérzése, kismedencei gyulladás, hasúri vérzés, méhen kívüli terhesség, és appendicitis jöhetnek szóba.

A tünetek súlyossága alapján történő stádium beosztás a beteg kezelését is meghatározza. A betegség lefolyása során a tünetek időről-időre változhatnak, a terápiás stratégiát ennek megfelelően kell módosítani (Royal College of Obstetricians and Gynecologist 2006; Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine 2008). Az OHSS kezelése a kórkép spontán gyógyulásáig elsősorban szupportív. Enyhe és közepes súlyos tüneteket mutató betegek járóbeteg szakrendelésen elláthatók: fájdalom- és hányáscsillapítók alkalmazásával, erős fizikai aktivitás és a szexuális együttlét kerülésének javaslatával.

A betegek szoros nyomon követése minden esetben, terhesség esetén pedig különösen indokolt. A súlyos fokozatba sorolható páciensek mindenképpen kórházi felvételt igényelnek.

A terápia irányelvei a megfelelő haemorheológiai, légzési és keringési paraméterek biztosítása:

- folyadékpótlás,
- paracentézis,
- tromboprofilaxis.

*Folyadékterápia:* Az intravénás folyadékterápia célja a volumen expanzió, amit a betegség alaptermészetéből adódó megnövekedett permeabilitás miatt nehezen fenntartható intravazális térfogat tesz szükségessé. A páciensek ugyanis összességében nem hipovolaemiások, csak a folyadék az intravaszkuláris tér helyett extravaszkulárisan van. Az intravaszkuláris hipovolémia és a hipotenzió korrigálásának célja a minimálisan szükséges vesefunkció és a kielégítő keringés fenntartása akkor is, ha a folyadékkezelés az ascites mennyiségét növeli.

A hemodinamikai stabilitás, normál vizelet kiválasztás elérése érdekében szükség lehet bólus folyadék (500-1000 ml fiziológiás só) és albumin 25% (50-100 g) adására is a fenntartó folyadékterápia mellett. A tünetek javulásáig a bevitt folyadékmennyiség és az ürített vizelet szoros monitorizálása szükséges. Az állapot javulásával törekedni kell a mielőbbi per os folyadékbevitelre, hiszen a jelentős intravénás folyadékbevitel tüdőödémát okozhat.

Amennyiben folyadékbevitellel és plazmaexpanderekkel sem sikerül biztosítani a megfelelő vizelet kiválasztást alacsony dózisu dopamin (1-3  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{perc}$ ) kezelés szükséges, mely a vese vérátáramlásának javításával segít megelőzni a veseelégtelenséget (Ferraretti et al., 1992).

*Paracentézis:* A fájdalmat okozó, feszülő ascites, a légzési nehezítettség és a súlyos oliguria, vagy-anuria indokolja a hasüri folyadék lebocsátását.

Az óvatos ultrahang vezérelt punkció történhet transzvaginális vagy transzabdominális behatolásból, de hatásosságát tekintve általában a transzvaginális behatolást részesítik előnyben. Az egyszerre lebocsátható folyadék mennyiségére vonatkozóan nincs ajánlás az irodalomban, az esetleges ismételt paracentézisek között eltelt időt a beteg általános állapota és a folyadék újratermelődésének mértéke együttesen határozzák meg. A leginkább jobb oldalon jelentkező hydrothoraxot a paracentézis általában enyhíti, azonban súlyos fokú, vagy kétoldali hydrothorax esetén thoracocentézis indokolt.

*Tromboprofilaxis:* A tromboembolia kialakulása az OHSS életet veszélyeztető komplikációja. A trombózis előfordulása OHSS-ban szenvedő betegekben 0,7-10% (Delvigne et al., Stewart et al., 1997). Kialakulásához vezető tényezők: hemokoncentráció, megváltozott alvadási rendszer, csökkent vénás visszaáramlás a megnövekedett ováriumok miatt, ascites, immobilitás.

OHSS-ban a trombózis preferáltan a felső testfélen jelentkezik, megfigyelhető továbbá az artériás rendszer gyakori érintettsége is.

A fentiek miatt súlyos OHSS-ben szenvedő betegek profilaktikus antikoaguláns kezelése javasolt alacsony molekulásúlyú heparin adásával. Terhesség esetén a profilaxist az első trimeszter végéig, terhesség hiányában az OHSS gyógyulásáig fent kell tartani. Tromboembolia gyanúja esetén azonnali terápiás antikoagulálás és kiegészítő diagnosztikus vizsgálatok javasoltak.



### ***3. Hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid (PACAP)***

A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptidet, vagy angol neve alapján mozaikszóval PACAP-ot (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide), 1989-ben izolálták birka hypothalamusból, patkány hipofízisben kifejtett adenilát cikláz aktiváló hatása alapján. A PACAP-ot tartalmazó hypothalamicus neuronok az eminentia mediana területére vetülnek, ahol elérik a hypothalamo-hypophysealis portalis rendszer kapillárisait (Miyata et al., 1989). A PACAP a szekretin/glukagon/vazoaktív intestinális polipeptid (VIP) peptidcsalád tagja (1. ábra), melynek N-terminális szakasza (1-28) 68 %-ban megegyezik a VIP struktúrájával (Miyata et al., 1989), de adenilát-cikláz aktiváló hatása 1000-10000-szer nagyobb a VIP hatásánál. A PACAP génje a 18. kromoszómán helyezkedik el és 2681 nukleotidból áll. A neuropeptid >27 aminosavból felépülő, rövidebb fragmensét, a PACAP27-et 1990-ben azonosították (Miyata et al., 1990). A szervezetben két biológiailag aktív amidált forma kb. 90%-át a 38 aminosavból álló PACAP38, a kisebb részét a PACAP27 teszi ki. A peptidek szekvenciája emlősökben azonos, békában is csak egy aminosav eltérést mutat (Köves et al., 2001). A 38 aminosavból álló primér molekula megtalálható az előgerinchúros állatokban is, a struktúrája csak 1-4 aminosavban tér el a humán PACAP38-tól (Arimura, 1998). Ezen adatok azt sugallják, hogy a filogenetikai fejlődés során szinte változatlanul konzerválódott molekula alapvető élettani funkciókkal rendelkezik.

### ***3.1. A PACAP előfordulása a szervezetben***

#### Idegrendszer

A peptid izolálása óta számos kísérletet végeztek előfordulásának feltérképezésére. A PACAP a központi idegrendszerben legnagyobb mennyiségben a hypothalamusban mutatható ki, ahol főleg a nucleus supraopticus és paraventricularis magno- és parvocelluláris rendszerhez tartozó neuronjaiban detektálható (Köves et al., 1991; Kivipelto et al., 1992; Ando et al., 1994; Kimura et al., 1994; Hannibal et al., 1995a,b; Piggins et al., 1996). Más struktúrákban, így az agykéregben (Köves et al., 1991; Kivipelto et al., 1992, Hannibal et al., 2002), a középagyban, a nyúltvelőben, a bazális ganglionokban, a thalamusban, a hipofízisben, a szeptumban, a hippocampusz CA1-3 zónáiban (Köves et al., 1994), az amigdala centrális magjában, a cerebellumban és a retina különböző rétegeiben (Seki et al., 2000; Hannibal et al., 1997) is vannak PACAP tartalmú sejtek és rostok. A perifériás idegrendszerben a spinális ganglionok kis érzőideg sejtjei, valamint a vegetatív prae- és postganglionáris neuronok tartalmazzák PACAP-ot (Köves et al., 1990; Sundler et al., 1996; Hannibal et al., 2002; Seki et al., 2000).

#### Nem-neuronális szövetek

Nemcsak a központi és perifériás idegrendszerben található meg, hanem más szövetekben is. Többek között az endokrin szervekben és a gasztrointesztinális traktus teljes hosszában (Arimura et al., 1991; Ghatei et al., 1993). A peptidet kimutatták többek között az adenohipofízisben (Vigh et al., 1993; Kimura et al., 1994; Mikkelsen et al., 1995; Köves et al., 1998), a mellékvesében, az endokrin pancreasban (Hannibal és Fahrenkrug, 2000) és a mellékpajzsmirigyben (Luts és Sundler, 1994). Ezen kívül megtalálható a kiválasztó

rendszerben (Fahrenkrug és Hannibal, 1998; Moller et al., 1993) és a légzőrendszerben (Moller et al., 1993).

### ***3.2. A PACAP idegrendszeri hatásai***

A PACAP számos élettani hatással rendelkezik a szervezetben. Mivel a PACAP-ot először a hypothalamusból mutatták ki, a hipofízis elülső és hátsó lebeny hormonok termelésére kifejtett hatásai váltak legkorábban ismertté. Számos egyéb endokrin hatása is ismert: befolyásolja a pajzsmirigyműködést (Okada et al., 2007), a gonádok szteroid termelését (El-Gehani et al., 2000), a spermiogenezist és az ovariális follikuláris fejlődést (Apa et al., 2002; Barberi et al., 2007; Csaba et al., 1997; Gras et al., 2005; Li et al., 2004), stimulálja a mellékvese katekolamin szintézisét (Isobe et al., 2003), valamint a pancreas inzulintermelését (Winzell és Ahren, 2007).

A PACAP a glutamát mellett a retinohypothalamicus pálya másik fő transzmittere, és számos folyamatot befolyásol a nucleus suprachiasmaticusban és a corpus pinealéban (Rékási és Czömpöly, 2002). Kimutatták, hogy a PACAP fokozza a melatonin termelést a tobozmirigyben, mely már korai embrionális korban is megfigyelhető, azonban a melatonin cirkadián ritmusát nem befolyásolja (Csernus et al., 2004; Faluhelyi et al., 2004; Nagy és Csernus, 2007).

Emellett a PACAP-ról kimutatták, hogy részt vesz az alvásszabályozásban (Murck et al., 2007), a centrális szimpatikus neuronális aktivitás szabályozásában (Farnham et al., 2008), a hőszabályozásban (Pataki et al., 2002) és befolyásolja a kemorecepciót a glomus caroticumban (Xu et al., 2008). A PACAP serkenti a memóriafolyamatokat, amit a PACAP és a PACAP receptor KO egerek memóriazavara is mutat (Matsuyama et al., 2003; Otto et al., 2001; Roberto és Brunelli, 2000). A PACAP számos viselkedésre gyakorolt hatását is leírták.

Befolyásolja többek között a szteroid-indukálta reprodukciós viselkedést patkányban és egérben (Apostolakis et al., 2004), növeli a lokomotoros aktivitást patkányban és egérben (Adamik és Telegdy, 2004; Masuo et al., 1995), részt vesz a stressz adaptációs magatartás szabályozásában (Agarwal et al., 2005; Légrádi et al., 2007) és antidepresszáns hatásai is vannak (Reichenstein et al., 2008).

### ***3.3. A PACAP nem idegrendszeri hatásai***

A későbbi kutatások során vált ismertté, hogy a neuropeptidnek nemcsak az idegrendszeren belül, hanem számos egyéb szervrendszerben is fontos élettani hatása van.

#### *3.3.1. A PACAP gonadális funkciókra kifejtett hatásai*

A PACAP-nak a hipofízis hormonok szekréciójára kifejtett hatását már röviddel a felfedezését követően kimutatták. A peptid a GnRH-val interakcióban a gonadális funkciók központi szabályozásában vesz részt (Counis et al., 2007). Későbbi vizsgálatok kimutatták, hogy a PACAP közvetlenül a gonadális sejtekre kifejtett hatással is rendelkezik, és fontos szerepet tölt be a genitális rendszerben. Immunhisztokémiai módszerekkel kimutatták a PACAP-ot és receptorait az ováriumban (Kotani et al., 1997; Vaccari et al., 2006; Barberi et al., 2007), ahol a PACAP fontos szerepet játszik a ovarialis szteroidszintézisben, a tüszőérés szabályozásában és a granulóza sejtek proliferációjában (Park et al., 2000; Usuki et al., 2001). Ezen kívül a PACAP kimutatható a vaginában és az uterusban is (Steenstrup et al., 1995). Valószínűleg az uteroplacentáris egység működésének szabályozásában is fontos szerepe van, mivel relaxációt okoz a bolyhok és a myometrium ereiben. A PACAP terhességben betöltött fontos szerepét támasztja alá az a megfigyelés is, hogy a PACAP-knockout egerek fertilitása csökken

(Steenstrup et al., 1996). Az endometriumban a PACAP expresszió a decidualizáció és a terhesség során változik (Spencer et al., 2001). Radioimmunoassay módszerrel igazolták a PACAP27 és a PACAP38 jelenlétét a humán terhes uterusban és a placentában (Steenstrup et al., 1996), valamint vannak adataink a PACAP szintjének terhességi korrall történő változásáról és a placenta különböző területei között (anyai vagy magzati oldal, centrális vagy perifériás rész) fennálló esetleges különbségekről (Reglódi et al., 2010).

### *3.3.2. További hatások*

Egyéb perifériás hatásokkal is rendelkezik a peptid: befolyásolja a gasztrointesztinális és légúti motilitást és szekréciót (Barthó et al., 2000), a szív ingerelhetőségét és a natriuretikus peptid szekrécióját (Hardwick et al., 2006), a húgyúti szervekben hatással van a vizeletürítési reflexre és az érzőbeidegzésre (Braas et al., 2006), valamint simaizom relaxáns hatása van az erekben (Lenti et al., 2007). Ezenkívül hat a fájdalomérzés központi és perifériás szabályozására (Helyes et al., 2007).

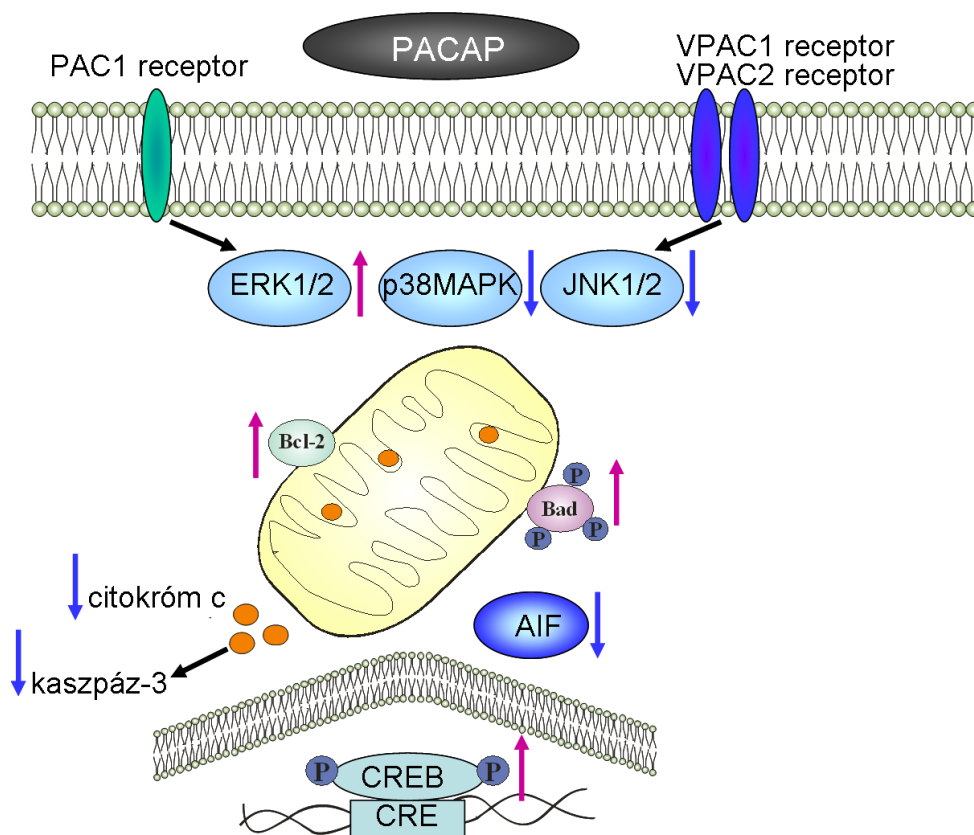
### *3.3.3. Immunrendszerre gyakorolt hatások*

A PACAP gyulladáshoz kapcsolódó folyamatokra gyakorolt gátló hatása már a 90-es évek óta kiterjedt kutatásoknak képezi tárgyát (Delgado et al., 2003; Ganea et al., 2001; Ganea et al., 2002; Gomiraz et al., 2006) és számos klinikai alkalmazás lehetőségét veti fel, például neuroinflammatorikus folyamatokban játszott protektív szerepe alapján (Bourgault et al., 2011). Ugyanakkor az is ismert, hogy a PACAP a gyulladásban szerepet játszó hízósejtek intracelluláris folyamataira is hatással van és azok degranulációját is kiváltja (Schmidt-Choudhury et al., 1999; Seebeck et al., 1998; Seebeck et al., 1998). A hízósejtek számos,

angiogenezistől függő élettani helyzetben felszaporodnak, így például daganatok növekedésekor, rheumatoid arthritisben vagy éppen az ovuláció alkalmával (Hiromatsu et al., 2003). Pont ezen utóbbi élettani tények figyelembe vételével válik izgalmassá a kérdés: vajon megtalálható-e a PACAP a petefészekben, és ha igen, betölt-e valamilyen szerepet az ovariális működés szabályozásában.

### ***3.4. A PACAP hatásának molekuláris mechanizmusa***

A PACAP komplex jelátviteli útvonalakon keresztül valósítja meg védő hatásait. A citoprotektív hatásokért csaknem minden esetben a PAC1 receptor felelős. A PACAP a PAC1 receptorokon keresztül aktiválja az adenilát cikláz és a foszfolipáz C-t, melyek hatására cAMP- függő és attól független útvonalak aktiválódnak. A PKA aktiváció hatására általában a védő hatású MAPK, az ERK foszforiláció megemelkedik, a sejtpusztulást elősegítő JNK és p38MAPK foszforiláció pedig gátlódik. A PKA downstream útvonalában a Rap1 és Ras aktiváción keresztül is aktiválja az ERK-et, valamint a CREB foszforilációt. Az apoptózis mitokondriális útvonalát is befolyásolja: a Bcl család antiapoptotikus tagjait aktiválja (Bcl-2, Bcl-xL), míg proapoptotikus tagjait inaktíválja (Bad, Bax). A PACAP erőteljesen gátolja a kaspáz aktivitást, de a kaspáz független apoptotikus folyamatokat is gátolja (Somogyvári-Vigh és Reglödi 2004) (1. ábra). Az apoptózis szabályozásában szerepet játszó jelátviteli útvonalak között az egyik fontos, túlélést biztosító utat a lipid-kinázok alkotják, melyeket a növekedési faktorok receptoraikon keresztül aktiválhatnak. Az út egyik kulcseleme a PI3K mely központi szerepet játszik például olyan jelátvivő foszforilációjában, mint az Akt. Az Akt-ből legalább hét jelátviteli útvonal indul ki, melyek mindegyike végső soron az apoptózis létrejöttét akadályozza.



*1. ábra: PACAP hatásának molekuláris mechanizmusa.*

#### ***4. A nitrogén monoxid (NO) rendszer intraovariális hatása***

A tüszőfolyadék fontos mikrokozmoszt jelent a petesejt fejlődése szempontjából. Számos biológiailag aktív anyagot tartalmaz, például növekedési faktorokat, citokineket, neurotranszmittereket, vazoregulátorokat, enzimeket, apoptotikus faktorokat és reaktív oxigén gyököket. Ezek az összetevők önmagukban vagy egymással kölcsönhatásban egy helyi intraovariális regulációs rendszert alkotnak, melynek úgy tűnik, befolyása van a potenciális petesejt/embrió komplexre (Driancourt and Thuel, 1998; Baka and Malamitsi-Puchner, 2006)

Bizonyítást nyert, hogy ezen anyagok egyike, a nitrogén monoxid (NO) szorosan érintett a petefészek funkciók kontrollálásában, fontos szerepet játszik a tüszőérésben, az ovulációban, a petesejt-embrió fejlődésben, az implantációban, és a terhességi kimenetelben (Roselli et al., 1998).

Az NO az l-arginin aminosavból szintetizálódik az NO szintetáz (NOS) izoformjainak hatására (Förstermann et al., 1994). Ezeket az enzimeket az aszimmetrikus dimetilarginin (ADMA) és a monometilarginin (MMA) kompetitív módon gátolják. Ezek az anyagok egy metionin függő transzmetilációs reakcióban képződnek metilált arginin reziduum fehérjékből.

Ezzel a folyamattal párhuzamosan egy biológiailag inaktív sztereo izomer, a szimmetrikus dimetilarginin (SDMA) is képződik. A metilált arginin tartalmú fehérjék fokozódó lebontása, mely a proteolízis akcelerációjakor jön létre, illetve metilált arginin reziduumok eliminációjának csökkenése metilargininek akkumulációjához vezet (Vallance et al., 1992; Böger et al., 2000; Stuhlinger et al., 2001).

Az SDMA a keringésből kizárólag a vesén keresztül kerül kiválasztásra, azonban az ADMA-t és az MMA-t többségében dimetilarginin dimetilaminohidroláz (DDAH) enzimek bontják le dimetilammira és citrullinra.



A DDAH csökkent expressziója vagy aktivitása ezért hatással van az NO képződésre a szöveti ADMA és MMA szintekre gyakorolt hatásán keresztül (MacAllister et al., 1996; Ito et al., 1999).

Miután az l-arginin-NO rendszer számos tagját identifikálták már terhességi szövetekben és stabil NO metabolitokat detektáltak a tüszőfolyadékban, biztosra vehető, hogy az NO közreműködik a petesejt érésében, az implantációban és a korai embrionális fejlődésben a spontán fogantató és az in vitro fertilizációban (IVF) részt vevő nőkben egyaránt (Chwalisz and Garfield, 2000; Kuo et al., 2000; Hefler and Gregg, 2002).

## **5. Célkitűzések**

### **5.1. Ovariális hiperstimulációs szindróma profilaxisának vizsgálati lehetőségei**

Elméleti megfontolásunk alapján, miszerint az ovuláció egy jelentős trombocita aktivációval járó gyulladós folyamat, az *aszpirin* (acetilszalicilsav) adása hatásos profilaxis lehet OHSS veszélye esetén. Korábbi tanulmányok az aszpirinnal kapcsolatban számos pozitív hatást ismertettek IVF kezelések során (Rubinstein et al., 1999). Ezek alapján a legtöbb IVF centrum elsősorban a terhességi ráta emelése céljából alkalmazta az aszpirint. Teóriánk szerint a szuperovulációs kezelés trombocita hiperstimulációhoz és ehhez köthető OHSS-hez vezet, és mivel az aszpirin ezt a folyamatot gátolja, profilaktikus célból való alkalmazása megfontolandó. Ezért Klinikánk IVF Centrumában a szuperovulációs kezelésben részesülő páciensek kezelési protokolljának részévé tettük a profilaktikus aszpirin terápiát. Célunk volt a trombocita funkció gátlásának OHSS prevencióban kifejtett eredményességét meghatározni retrospektív és prospektív vizsgálattal.

### **5.2. PACAP 38 jelenlétének vizsgálata tüszőfolyadékban**

A felfedezése óta eltelt két évtizedben nyilvánvalóvá vált, hogy a PACAP nemcsak egy hypothalamo-hypophiseális peptid, de az endokrin rendszerben játszott szerepén túl még számos szervrendszerre hatással van.

Az ovariális tüszőfolyadékot a granulóza és theca sejtek termelik plazma filtrátumként a növekvő tüsző falán keresztül. Ez azután tápoldatként szolgál a fejlődő petesejt számára. Miután korábban bizonyítást nyert, hogy a PACAP-nak jelentős szerepe van a tüszőérésben és az angiogenezissel járó életfolyamatokban, vizsgáltuk, vajon kimutatható-e a PACAP humán folliculáris folyadék mintákban, illetve bizonyított jelenléte esetén fellelhető-e a mért

koncentráció és az ovarialis működés, azaz a szuperovulációs kezelésre adott válasz, azaz a folliculus fejlődés között bárminemű összefüggés.

### ***5.3. Arginin származékok jelenlétének vizsgálata az IVF sikerességének függvényében***

Célunk az in vitro fertilizációban részt vevő nők tüszőfolyadékának l-arginin és metilarginin származékainak (ADMA, SDMA és MMA) meghatározása volt. A vizsgálatnak további célja az volt, hogy klinikai korrelációkat találjunk ezen biokémiai markerek jelenléte és az IVF kimenetele között.

Ezen felül az l-arginin/ADMA arányt, mint az NO termelődés, bioaktivitás jellemzőjét, valamint a nemrégiben bevezetett arginine-methylation indexet (Arg-MI) (Wang et al., 2004) vizsgáltuk releváns klinikai információk nyerésének céljából a tüszőfolyadék és a petesejt/embrió interakciójával kapcsolatban.

## **6. Anyag és módszer**

### **6.1 Ovariális hiperstimulációs szindróma profilaxisának vizsgálata**

A betegek IVF programba történő beválasztása két egymástól független szakorvos döntése alapján történt. 2000. január 1. és 2006. december 31. között 3154 IVF ciklust indítottunk, melyek során 2425 esetben GnRh agonista, 729 esetben GnRh antagonistát készítményt alkalmaztunk. A vizsgálatba a GnRh antagonistával szuprimált betegeket nem vontuk be, ők ugyanis az OHSS szempontjából jelentősen csökkent rizikóval rendelkeznek, hiszen az esetükben az ovulációt megelőzően hCG adás nem történik.

A következő vizsgálatok elvégzése után indítottunk szuperovulációs kezelést: cervikális kenetvizsgálat, szérum hormon vizsgálatok (follikulus stimuláló hormon, luteinizáló hormon /FSH, LH/, prolaktin, ösztadiol, progeszteron, tesztoszteron, thyroidea-stimuláló hormon) a spontán ciklus 3-5. és 21. napján, human immun-deficiencia vírus and hepatitis-B felületi antigén szűrés, andrológiai vizsgálat, illetve a méhür alkalmasságát igazoló hiszteroszkópos vizsgálat.

A GnRh agonistával kezelt ciklusok 62%-ában (n=1503) alacsony dózisu (100 mg/nap) aspirin kezelést folytattunk, 38 %-ban (n=922) aspirin kezelés nem történt. Az aspirin adása randomizációt követően történt, és annak a menstruációs ciklusnak az első napján indult, amelyikben az IVF kezelés történt.

A szuperovulációs kezelés szupressziós részét a GnRh agonista triptorelin (Decapeptyl; Ferring®) adásával végeztük „rövid” (a menzesz első napjától), illetve hosszú (a stimulációt előtti menzesz 21. napjától) protokoll alkalmazásával. A stimuláció a betegre egyénileg szabott dózisu rekombináns FSH (Gonal-F; Serono® vagy Puregon; Organon®), adással történt, a dózis 100 és 225 egység napi adása között mozgott a tüszőéréstől függően. A kezdő adagot a Body Mass Index (BMI) és a kor határozta meg.

Azon betegeknél, akik korábban kedvezőtlenül reagáltak a stimulációs kezelésre, a napi dózist maximum 300–350 egységgel kezdtük. A tüszőérést a menstruációs ciklus 6. napjától másnaponta ultrahang vizsgálattal ellenőriztük. A tüszők méretétől függően az alkalmazott gonodotropin mennyiségét egyénileg változtattuk. Amennyiben legalább két tüsző mérete elérte a 17 mm-t 250 µg hCG (Ovitrelle; Serono®) adásával ovuláció indukciót végeztünk.

A hCG adás után 36 órával rutin intravénás narkózisban ultrahang vezérelt transzvaginális follikulus punkciót végeztünk, az embrió(k) beültetése 3-5 nappal a follikulus punkció után történt.

A megkezdett aspirin kezelést addig folytattuk, amíg vagy a menzesz jelentkezett, vagy negatív terhességi teszt történt, vagy ultrahang vizsgálat igazolta a magzati szívműködést. A betegeket az OHSS rizikójának előfordulása alapján két csoportra osztottuk (1. csoport a magas, 2. csoport az alacsony rizikójúak). A magas rizikójú csoportba azok a betegek tartoztak, akik anamnézisében már előfordult OHSS, akik policisztás petefészek szindrómások voltak, illetve a 30 év alattiak.

Az aspirint 100 mg napi adagban adtuk, összesen 1503 ciklus során, a 2425 GnRh agonistával kezelt esetből.

## **6.2. PACAP 38 jelenlétének vizsgálata tüszőfolyadékban**

A PACAP38 tüszőfolyadékból való kimutatásához tömegspektrometriát, koncentrációjának méréséhez pedig radioimmunoassay-t alkalmaztunk. A tömegspektrometriai kísérletekhez a tüszőfolyadék mintákat önkéntes nőbetegektől nyertük (20-35 év között, n=40), akiknél kontrollált petefészek hiperstimulálás után mesterséges in vitro fertilizációs kezelés során folliculus punkciót végeztünk. A mintákhoz minden esetben peptidázgátlót (aprotinin) adtunk (30µl/ml), majd a mintához (100 µl) hozzáadtunk 10 µl 72%-os triklórecetsavat és 100 µl desztillált vizet, majd lecentrifugáltunk (13000 rpm, 10 min).

A natív mintáinkat, illetve a PACAP-38 vizes oldatú standardjának (Sigma-Aldrich) 1–1 µl-ét felvittük a Bruker rozsdamentes acél mintatartó tálcára (MTP 384 massive target T, Bruker Daltonics). Vizsgálataink során mátrixként  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-fahéjsav (CHCA) telített 0,1 %-os trifluor-ecetsav (TFA) – acetonitril (2/1 V/V) oldatát alkalmaztuk, melyből mintáinkhoz 1-1 µl-t csepegtettünk. Kalibráló oldatként minden esetben a Bruker Peptidkalibráló Standardot alkalmaztuk (#206195 Peptide Calibration Standard; Bruker Daltonics). A minták beszáradását követően az elemzéseket a már fent említett Bruker Daltonics Autoflex II típusú tömegspektrométerrel (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-light (MALDI TOF/TOF)) reflektor detektálási módban végeztük el. Az ionizáláshoz 337 nm-es nitrogén lézert alkalmaztunk (MNL-205MC model; LBT- Lasertechnik Berlin GmbH), ennek frekvenciája 50 Hz, a gyorsító feszültség 20 kV és a késleltetési idő pedig 120 ns volt. A tömegspektrumokat pozitív ionizációs módban 1000 és 10000 m/z tartomány között regisztráltuk. Minden minta esetében a peptidkeverékre jellemző tömegspektrumokat (1000 lövés/minta) összesítettük. A műszer ellenőrzését Bruker FlexControl 2.4 szoftverrel, az értékelést pedig Bruker FlexAnalysis 2.4 szoftverrel végeztük (Börzsei et al., 2009).

A PACAP mennyiségi meghatározását célzó vizsgálatnál a fentiekhez hasonlóan a tüszőfolyadék mintákat önkéntes nőbetegektől nyertük (20-35 év között, n=132), akiken kontrollált petefészek hiperstimulálás után mesterséges in vitro fertilizációs kezelés során folliculus punkciót végeztünk.

A minták centrifugálása után (13000 rpm, 10 min) a felülúszón végeztünk RIA analízist a korábban ismertetett módszerek szerint (Börzsei et al., 2009), az alábbi reagenseket használva: antiszérum: PACAP38 '88 111-3' (hígítás:1:10.000), tracer: laboratóriumunkban előállított mono-125I jelölt juh PACAP24-38 (5000cpm/cső), juh PACAP38-ot használtunk RIA standardnak 0-1000 fmol/ml koncentráció között, puffer: 1ml foszfát puffer (0,05mol/l, pH:7,4) 0,1 mol/l natrium chlorid, 0,25% (w/v) BSA és 0,05% (w/v) natrium-azid tartalommal. Az inkubációs idő 48-72 óra között volt 4<sup>0</sup>C-on.

### **6.3. Arginin származékok jelenlétének vizsgálata az IVF sikerességének függvényében**

Ezen vizsgálatokat 2008. október 1. és 2008. december 31. között végeztük. Ebben az időszakban 125 IVF ciklust indítottunk, ebből 108 esetben került sor transzvaginális ultrahang vezérelt tüszőfolyadék aspirációra. A fennmaradó 17 esetben a stimuláció sikertelen volt. A vizsgálat során elemeztük a betegek az IVF programban eltöltött idejét, életkorukat, BMI-jüket, illetve az IVF program indikációit.

A betegek korlátozás nélküli étrend mellett, a menstruációs ciklus első napjától napi 0,8 mg folsav szupplementációban részesültek és nem dohányoztak.

Összesen 480 frakció tüszőfolyadékot nyertünk, ebből 98 (20,4%) volt vérrel kontaminált, és ezért a vizsgálatból kizárt.

#### **6.3.1. Tüszőfolyadék gyűjtés**

A petesejtnyerést Sonoace 6000C márkájú 2 dimenziós „real time” ultrahang készülék segítségével végeztük, 4-8 MHz endovaginális transzducerrel.

A transzducert steril géllal és barrierrel fedtük be és gyári tűvezető szettet applikáltunk rá.

A hüvely dezinficiálása után (Octanisept /Schülke & Mayr GmbH) és a stimulált petefészkek vizualizálása a transzducer hátsó hüvelyfalba történő vezetésével történt. Ezt követően egy 35 cm hosszú, 1,4 mm átmérőjű aspirációs tűt vezetünk a tűvezetőbe. A tüszőket ezután megpungáltuk, és a tüszőfolyadékot minden egyes tüszőből steril, lezárt kémcsőbe szívtuk. A petesejtek gyűjtése G-MOPS<sup>TM</sup> médiumban (Vitrolife<sup>®</sup>) történt.

Miután a leszívott tüszőfolyadékból a petesejteket izoláltuk, a maradék folyadékot 10 percig 1500 rpm fordulaton centrifugáltuk, majd a felülúszót -70 °C-on tároltuk, a későbbi analízis céljából. A makroszkóposan vért tartalmazó mintákat a vizsgálatból kizártuk.



### 6.3.2. Fertilizációs módszerek

A petesejteket a későbbi megtermékenyítési módszerek megfelelően szelektáltuk.

Intracitoplazmatikus spermium injekcióra (ICSI) az andrológiai lelet (20M/ml-nél alacsonyabb spermaszám), az anyai életkor (> 35) és a korábbi IVF ciklusok száma (>2) függvényében került sor az összes eset 68%-ában. Az ICSI beavatkozásra szelektált petesejteket hialuronidáz enzim segítségével megtisztítottuk és így érettségük vizsgálhatóvá vált. Csak a metafázis II érettségű (első poláris test jelenléte) petesejteket választottuk ki a fertilizációhoz. Az ICSI 3–6 órával a petesejtnyerés után történt G-MOPS<sup>TM</sup> tápoldatban (Vitrolife<sup>®</sup>). A fennmaradó petesejtek fertilizációja a konvencionális IVF technikával történt bikarbonát puffer tápoldatban (G-IVF<sup>TM</sup>, Vitrolife<sup>®</sup>). A fertilizációt 24 óra elteltével G-1<sup>TM</sup>v5 tápoldatban ellenőriztük (Vitrolife<sup>®</sup>). Az embriók beültetése 3-5 nappal a petesejtnyerés után történt. A 3. naptól a blastociszta stádiumig az embriókat G-2<sup>TM</sup>v5 tápoldatban (Vitrolife<sup>®</sup>) tenyésztettük. A használt tápoldatok egyike sem tartalmazott folsavat, a G-IVF<sup>TM</sup> nem tartalmazott metionint, ugyanakkor a többi médium igen (G-MOPS<sup>TM</sup>, G-1<sup>TM</sup>v5, G-2<sup>TM</sup>v5).

A páciens kérésének és a törvényi szabályozásnak megfelelően egy, kettő, vagy három embrió transzferje történt, a beültetésre nem kerülő számfeletti embriókat krioprezervációjára a Magyarországi jogszabályoknak megfelelően került sor. A luteális fázis progeszteron szupplementációját 300 mg progeszteron napi háromszori adásával végeztük (Utrogestan; Lab.Besins International S.A.<sup>®</sup>).

A folyamat sikerességét a beültetés után 21. napon hüvelyi ultrahang vizsgálattal ellenőriztük a petezsák kimutatásával.

### 6.3.3. Laboratóriumi vizsgálatok

A tüszőfolyadék l-arginin, ADMA, SDMA és MMA koncentrációjának meghatározása az irodalomban közölt „liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) módszerrel történt (Martens-Lobenhoffer and Bode-Böger, 2006).

A napi pontossági érték l-arginin esetében 4,5%, ADMA-nál 5,5%, SDMA-nál 3,9% és MMA-ra nézve 4,0% volt. A napok közti megfelelő precíziós értékek: 4,7%, 7,7%, 4,9% és 9,6% voltak. A rutin biokémiai paraméterek meghatározása a standard laboratóriumi paraméterekkel történt. Az arginin metilációs indexet az alábbi képlet szerint számoltuk:

$$\text{Arg-MI} = (\text{ADMA} + \text{SDMA}) / \text{MMA} \text{ (Wang et al., 2004).}$$

### 6.3.4. Statisztikai analízis

Minden statisztikai analízist az SPSS 17.0 (SPSS Inc. Chicago, Ill. USA) verziójú jogtisza program segítségével végeztük.

Az OHSS profilaxis klinikai vizsgálata során nyert eredmények feldolgozásakor  $\chi^2$  próbát végeztünk. Az 1. csoporton belüli kezelt és nem kezelt alcsoport összehasonlításakor Yates korrekciót alkalmaztunk a  $\chi^2$  próba kiegészítésére.

A PACAP38 follikuláris folyadékban való jelenlétének vizsgálata során nyert eredményeink értékelése során a nyert petesejtek és a tüszőfolyadék PACAP koncentrációjának átlagát és standard deviációját (SD) vizsgáltuk. A PACAP koncentrációját és a petesejt számot a medián értékük szerint kettéválasztottuk, ezáltal az alábbi három csoportot hoztuk létre: magas PACAP koncentráció (hP), magas petesejt szám (hO) és alacsony PACAP koncentráció-alacsony petesejt szám (IP-IO). A csoportok adatait ezt követően Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks-tesztel analizáltuk.

Statisztikai szignifikancia esetén az egyes csoport(ok) elkülönítésre az analízist Pairwise Multiple Comparison Procedure (Dunn's módszer) tesztel egészítettük ki. Az

eredményeket a medián értékkel valamint az első és harmadik kvartilisba tartozó adatok határértékeivel fejeztük ki (azaz ahol az adatok 25%-a illetve 75%-a esett a jelzett határérték alá).

Az arginin származékok kimutatására irányuló vizsgálataink eredményeinek kiértékelésekor az adatok szabályszerűségét Kolmogorov-Smirnov tesztel vizsgáltuk. A változók közötti összefüggéseket non-parametrikus Spearman's rank korrelációval elemeztük, szükség esetén ANOVA analízis is történt. A változók megjelenítése átlag $\pm$ SD szerint történt. A szignifikancia határ  $p < 0,05$  volt.

## **7. Eredmények**

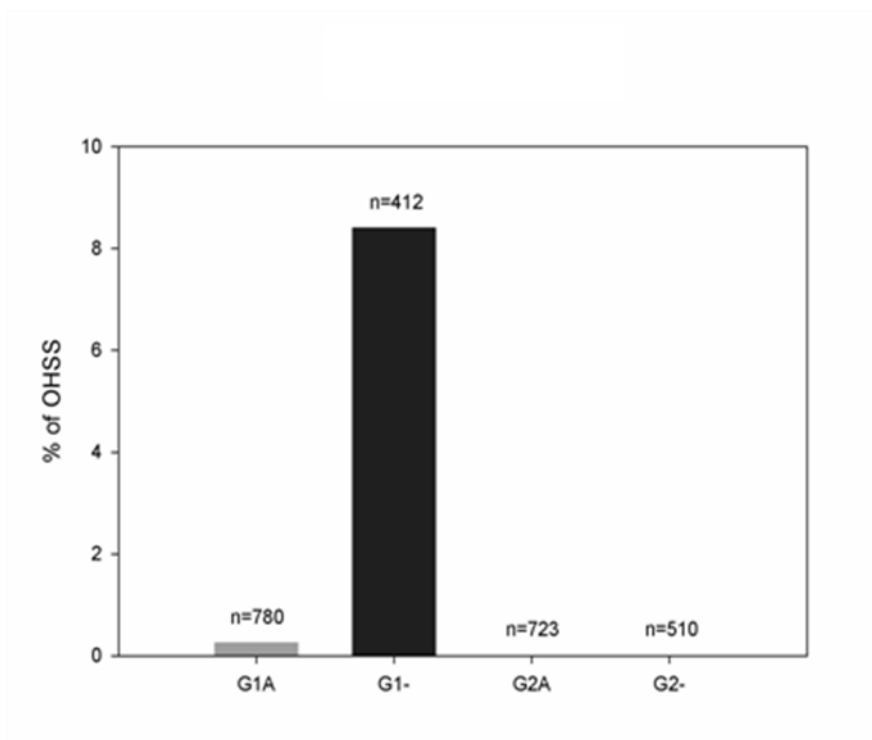
### **7.1. Ovariális hiperstimulációs szindróma profilaxisának lehetősége**

Az aszpirin kezelésben részesültek közül a betegek 52%-a (n=780) volt a magas rizikójú csoportban és 48%-a (n=723) az alacsony rizikójú csoportban. A 922 aszpirin kezelésben nem részesülő betegnél (ciklus) 45% (n=412) és 55% (n=510) volt a magas és az alacsony rizikójúak aránya.

A vizsgált 2425 ciklusban súlyos, illetve kritikus stádiumú OHSS-t összesen 1,8%-ban (n=45) észleltünk, ami megfelelt a nemzetközileg elfogadott előfordulási gyakoriságnak (Delvigne et al., 2002). Ezekben az esetekben klinikai felvételre, illetve intenzív ellátásra is szükség volt a dehidráció és a hemokoncentráció rendezése, valamint a hasúri, illetve mellkasi folyadék esetleges lebocsátása céljából. Ezekben a súlyos esetekben a korábban megkezdett aszpirin adását tovább folytattuk, ezzel párhuzamosan azonban kis molekulásúlyú heparin (LMWH) adását kezdtük tromboprofilaxisként.

A magas rizikójú, aszpirin kezelésben részesülő betegek között (G1A, n=780) csupán 2 páciensnél alakult ki súlyos vagy kritikus stádiumú OHSS (0,25%). A magas rizikójú, aszpirin kezelésben nem részesülő betegek között (G1-, n=412) ugyanakkor 43 esetben súlyos, vagy kritikus stádiumú OHSS fordult elő (8,4%,  $p < 0,001$ )

Az alacsony rizikójú, aszpirin kezelésben részesülő betegek között (G2A, n=723) nem fordult elő súlyos, vagy kritikus stádiumú OHSS (0%). Hasonlóképpen, az alacsony rizikójú, aszpirinnel nem kezelt csoportban (G2-, n=510) sem észleltünk a súlyos vagy kritikus stádiumú OHSS-t. Súlyos OHSS előfordulását a különbözően kezelt csoportok között a 2. ábra szemlélteti.



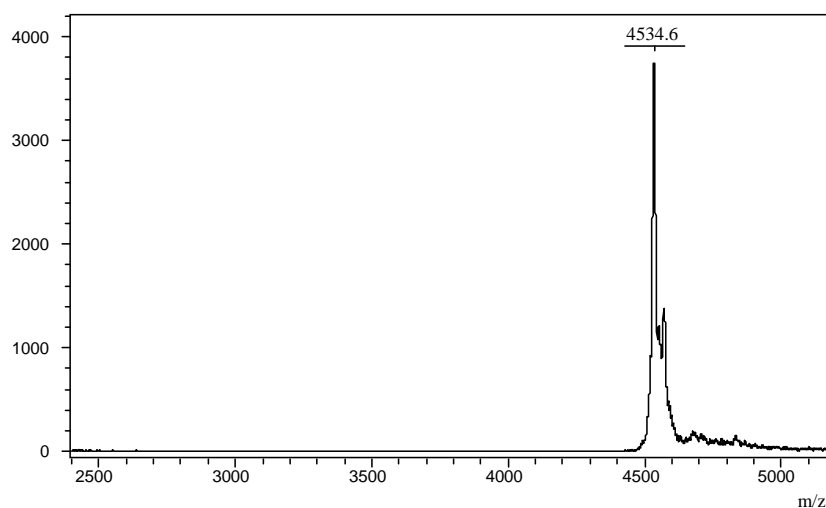
**2.ábra:** OHSS előfordulási gyakorisága.

*n*, az egyes alcsoportba tartozó esetszám; G1A, magas rizikójú csoport, aszpirinnel kezelt; G1-, magas rizikójú csoport, aszpirinnel nem kezelt; G2A, alacsony rizikójú csoport, aszpirinnel kezelt; G2-, alacsony rizikójú csoport, aszpirinnel nem kezelt.

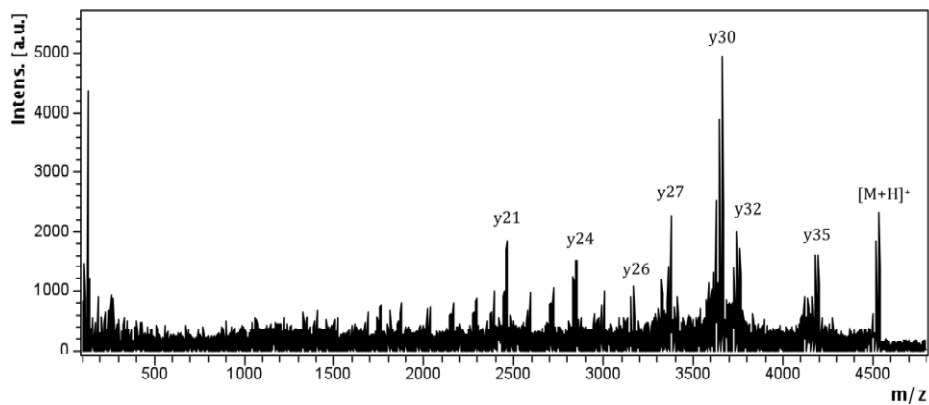
## 7.2. PACAP 38 jelenléte a tüszőfolyadékban

### 7.2.1. PACAP jelenlétének igazolása

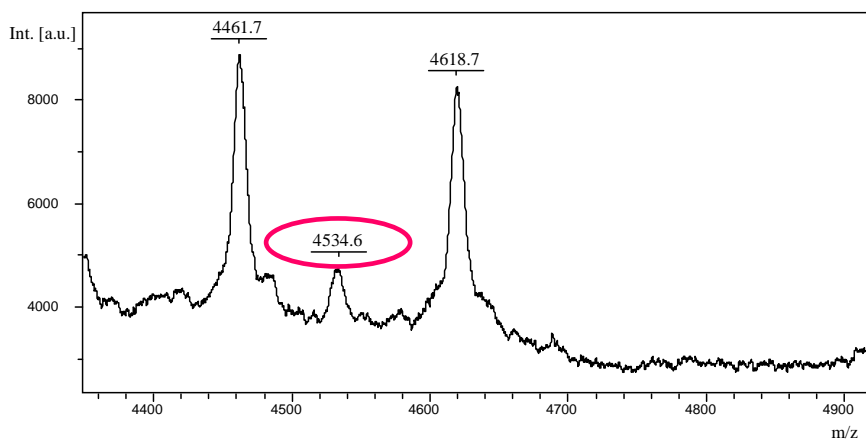
Kísérleteink során a humán tüszőfolyadék mintákat a PACAP standarddal együtt MALDI TOF tömegspektrométer segítségével vizsgáltuk. A PACAP-38 kvázi-molekula ionját (MW: 4534.6 Da) mind a standardban, mind pedig a 40 tüszőfolyadékban detektáltuk (3. és 4. ábrák). Ezt követően a tüszőfolyadékban elvégeztük a PACAP38 csúcs fragmentációját MALDI TOF/TOF alkalmazásával. A kísérlet eredményeként kapott y fragmensek egyezést mutattak a korábbi vizsgálatok alapján rendelkezésre álló PACAP38 szülő ion y fragmenseivel és aminosav szekvenciáival (5. és 6. ábra).



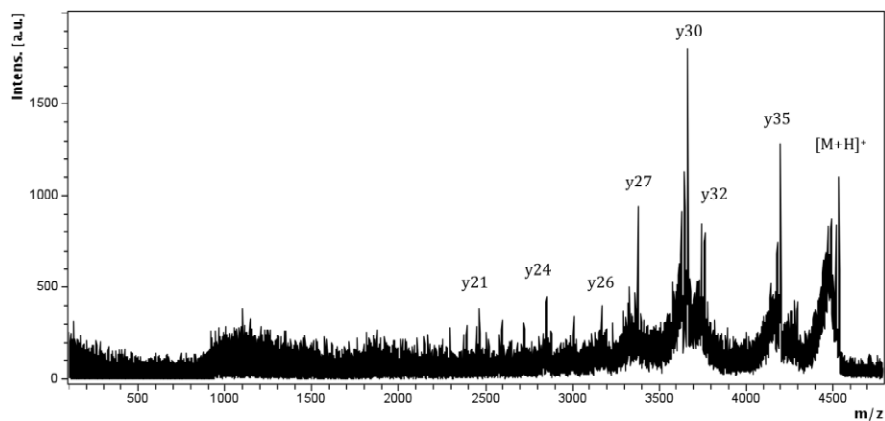
**3. ábra:** Tömegspektrum a PACAP38 protonált kvázi molekula ionjáról standardban.



**4. ábra:** PACAP38 standard tömegspektruma MALDI TOF/TOF mérést követően kapott y fragmensekkel.



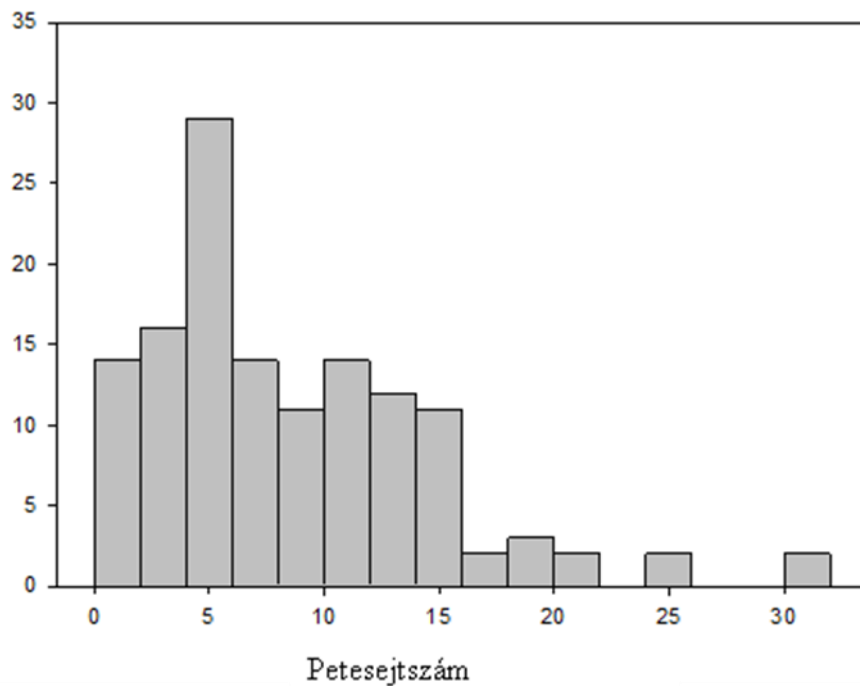
**5. ábra:** Humán tüsszöfolyadék tömegspektruma PACAP38-ra jellemző csúccsal.



**6. ábra:** Humán tüsszöfolyadék tömegspektruma MALDI TOF/TOF mérést követően kapott y fragmensekkel.

### 7.2.2. Szuperovulációs kezeléssel elért folliculus-számok

Vizsgálatainkban az átlagosan nyert petesejtszám 8,08 (+- 6,02) volt, 0 és 30 közötti darabszámmal, 6,5 medián értékkel (7. ábra).



**7. ábra:** . Az adatok megoszlása a nyert petesejtek számának függvényében. A függőleges tengely mutatja a betegenként nyert petesejtszám előfordulási gyakoriságát.



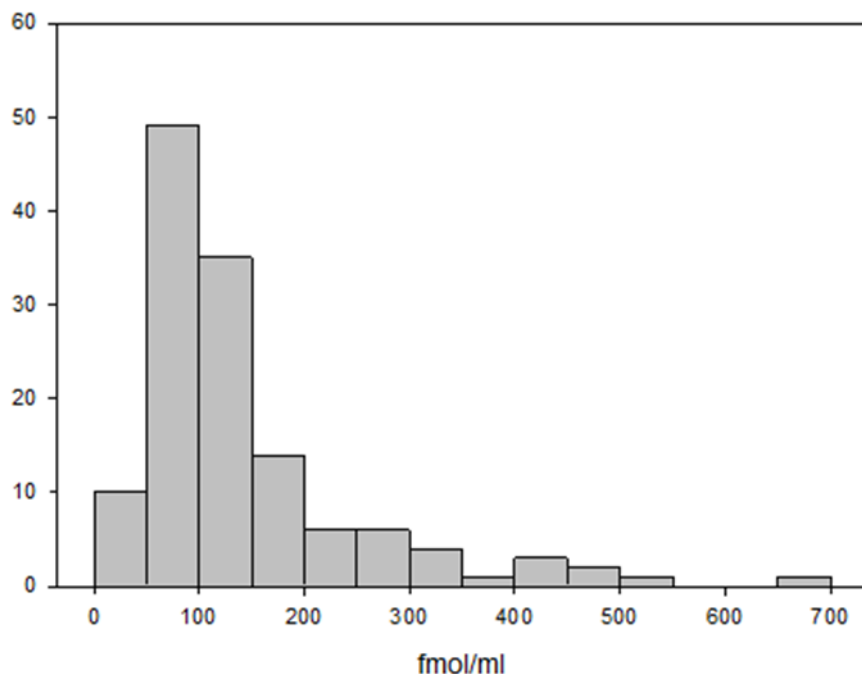
### 7.2.3. PACAP koncentráció meghatározása tüszőfolyadékban

A vizsgálataink során nyert PACAP koncentrációja átlagosan 143,58+-110,78 volt, 28,0 és 690,0 fmol/ml közötti értékekkel, 107,75 fmol/ml medián értékkel (8. ábra, 3. táblázat).

**3.táblázat** A tüszőfolyadék PACAP koncentrációja (PACAP) és a nyert petesejt szám összehasonlítása a teljes csoportban (összes), a magas PACAP koncentrációjú csoportban (hP), a magas petesejtszámú csoportban (hO), az alacsony PACAP koncentráció-alacsony petesejtszám csoportban (lP-lO) és az OHSS csoportban (OHSS).

Csoport	n	Átlag	SD	SE	CI (Átlag)
<b>PACAP összes</b>	132	143,588	110,780	9,642	19,074
<b>Petesejt összes</b>	132	8,083	6,027	0,525	1,038
<b>PACAP-hP</b>	12	425,917	116,358	33,590	73,930
<b>Petesejt-hP</b>	12	6,833	3,904	1,127	2,481
<b>PACAP-hO</b>	17	122,824	75,611	18,338	38,876
<b>Petesejt-hO</b>	17	19,353	5,024	1,219	2,583
<b>PACAP-IP-IO</b>	103	114,123	55,482	5,467	10,843
<b>Petesejt-IP-IO</b>	103	6,369	4,090	0,403	0,799
<b>PACAP-OHSS</b>	3	166,667	126,753	73,181	314,872
<b>Petesejt-OHSS</b>	3	11,333	7,572	4,372	18,810

Csoport	Range	Max	Min	Medián	25%	75%
<b>PACAP összes</b>	662,000	690,000	28,000	107,750	76,500	173,000
<b>Petesejt összes</b>	30,000	30,000	0,000	6,500	4,000	12,000
<b>PACAP-hP</b>	385,000	690,000	305,000	411,250	312,500	492,000
<b>Petesejt-hP</b>	12,000	14,000	2,000	5,500	4,000	10,000
<b>PACAP-hO</b>	251,000	287,500	36,500	106,500	61,000	180,500
<b>Petesejt-hO</b>	15,000	30,000	15,000	19,000	15,000	21,750
<b>PACAP-IP-IO</b>	247,000	275,000	28,000	101,000	72,750	139,000
<b>Petesejt-IP-IO</b>	14,000	14,000	0,000	5,000	3,000	10,000
<b>PACAP-OHSS</b>	233,000	312,000	79,000	109,000	86,500	261,250
<b>Petesejt-OHSS</b>	14,000	20,000	6,000	8,000	6,500	17,000

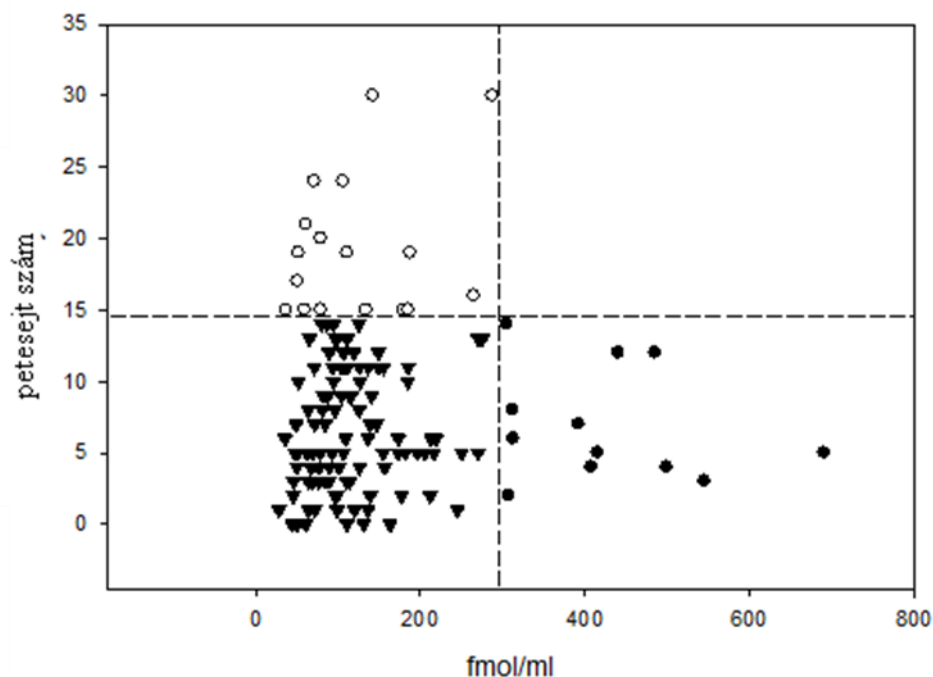


**8. ábra** Az adatok megoszlása a tüszőfolyadék PACAP koncentrációjának függvényében. A függőleges tengely mutatja az adott koncentráció előfordulási gyakoriságát.

#### 7.2.4. Follikulus folyadék PACAP koncentrációja és a nyert petesejtszám korrelációjának vizsgálata

A PACAP koncentrációra nézve 290 fmol/ml-es és a nyert petesejt számra vonatkozóan 14 petesejt/beteg cut-off értéket használva a következő csoportokat határoztuk meg: magas PACAP koncentráció csoport (hP); magas petesejtszám csoport; alacsony PACAP koncentráció-alacsony petesejt szám csoport (IP-IO).

A medián PACAP koncentráció értékek a hP (n=12), a hO (n=17) és az IP-IO (n=103) csoportokban 411,2 fmol/ml (312,5-492,0 fmol/ml), 106,5 fmol/ml (61,0-180,5 fmol/ml) és 101,0 fmol/ml (72,7-139,0 fmol/ml) voltak. Az egyes csoportok medián értékei közötti különbségek statisztikai szignifikanciát mutattak (9. ábra, 4. táblázat).



**9. ábra** A pontok eloszlása mutatja a nyert petesejtek számát az adott PACAP koncentrációval összefüggésben. A függőleges szaggatott vonal jelzi a PACAP koncentráció 290 fmol/ml-es cut-off értékét, a vízszintes vonal pedig a 14 petesejt/beteg cut off értéket a nyert petesejtekre nézve. ●: magas PACAP koncentráció csoport (hP); ○: magas petesejtszám csoport; ▼: alacsony PACAP koncentráció-alacsony petesejt szám csoport.

**4.táblázat:** Az adatok összehasonlítása Pairwise Multiple Comparison Procedure (Dunn's módszer) segítségével a magas PACAP koncentrációjú csoport (hP), a magas petesejtszám csoport (hO) és az alacsony PACAP koncentráció-alacsony petesejtszám csoport (lP-lO) között, NS:nem szignifikáns.

PACAP	Diff of Ranks	Q	P
PACAP-hP vs PACAP-lP-lO	66,024	5,659	<b>P&lt;0,05</b>
PACAP-hP vs PACAP-hO	65,853	4,566	<b>P&lt;0,05</b>
PACAP-hO vs PACAP-lP-lO	0,171	0,0171	NS

PACAP	Diff of Ranks	Q	P
ovum-hO vs ovum-lP-lO	66,447	6,636	<b>P&lt;0,05</b>
ovum-hO vs ovum-hP	62,167	4,311	<b>P&lt;0,05</b>
ovum-hP vs ovum-lP-lO	4,280	0,367	NS

A fentiekkel megegyező cut-off értéket és csoportokat használva a betegenként nyert petesejt számok medián értékei a hP (n=12), hO (n=17) és LP-IO (n=103) csoportokban 5,5 (4,0-10,0), 19,0 (15,0-21,7) és 5,0 (3,0-10,0) voltak. Az egyes csoportok medián értékei közötti különbségek statisztikai szignifikanciát mutattak (9. ábra, 4. táblázat).

#### *7.2.5. OHSS észlelése*

A vizsgálatban részt vett betegeknél 3 esetben észleltünk enyhe fokú OHSS-t. Ebben a három esetben a tüszőfolyadékban mért PACAP koncentrációk és a nyert petesejt számok a következők szerint alakultak: 1.: 109 fmol/ml, 6/beteg; 2.: 312 fmol/ml, 8/beteg; 3.: 79 fmol/ml, 20/beteg. Ennek a három betegnek az értékei a medián + első és harmadik kvartiljében 109,0 fmol/ml (86,5-261,25 fmol/ml) volt a PACAP-ra nézve és 8,0 (6,5-17,0) a petesejt szám tekintetében.

### **7.3. Arginin származékok és az IVF kimenetelének összefüggése**

Ebben a vizsgálatban részt vevő páciensek átlagosan 3-34 hónapja (átlag $\pm$ SD: 14,1 $\pm$ 5,6 hónap), vettek részt IVF programban, koruk 22-41 év között (átlag $\pm$ SD: 33,6 $\pm$ 5,5 év), BMI-jük 18,1-38,3 (átlag $\pm$ SD: 24,0 $\pm$ 4,6) között volt.

A programba kerülésük indikációját képező fő diagnózis az alábbi megosztást mutatta: andrológiai ok: 34 (31,5%), petevezeték eredetű ok (elzáródás, hiány, hydrosalpinx): 24 (21,4%), súlyos endometriózis 20 (18,5%) és ismeretlen eredetű meddőség: 30 (28,6%). Ez utóbbi betegeknél korábban 6 sikertelen inszemináció történt.

Az IVF során nyert klinikai paraméterek a 5. táblázatban, az l-arginin és metilarginin mérések, a belőlük képzett arginin metilációs index (arg-MI) és l-arginin/ADMA arány a releváns klinikai változókkal együtt a 6. táblázatban látható.

**5. táblázat:** *In vitro* fertilizációs paraméterek a nyert petesejtek száma szerint csoportosítva

Petesejt szám		Petesejt IVF-re	Petesejt ICSI-re	Érett petesejt ICSI-re	Embrió IVF-ből	Embrió ICSI-ből	Beültetett embrió	Terhesség	Iker
≤ 9	átlag	5,71	4,84	3,75	3,61	2,98	1,87	0,29	1,12
	n	14	56	56	13	54	61	61	16
	SD	2,64	2,40	1,97	2,14	1,74	0,59	0,53	0,34
> 10	átlag	10,82	10,46	8,91	5,30	6,06	2,00	0,52	1,31
	n	28	35	35	27	35	39	40	16
	SD	6,43	5,24	4,62	5,45	3,86	0,32	0,71	0,50
F =		8,05	48,31	54,43	8,49	26,21	1,61	3,45	1,63
P <		0,007	0,000	0,000	0,006	0,000	0,208	0,066	0,212

**6. táblázat:** *L-arginin és metilarginin szintek, valamint l-arginin/ADMA arány és arginin-metilációs index a nyert petesejtek száma szerint csoportosítva*

Petesejt szám		l-arginin (μM/l)	ADMA (μM/l)	SDMA (μM/l)	MMA (μM/l)	l-arginin/ADMA	arg-MI
≤ 9	átlag	52,67	0,89	0,446	0,094	108,74	10,29
	n	66	66	66	66	66	66
	SD	20,51	0,100	0,093	0,026	37,51	1,20
> 10	átlag	44,26	0,429	0,413	0,082	105,51	10,71
	n	41	41	41	41	41	41
	SD	20,14	0,096	0,098	0,021	42,91	2,39
F =		4,30	9,42	3,01	6,33	0,17	0,94
P <		0,041	0,003	0,086	0,013	0,68	0,33

Vizuális binning segítségével, az adatokat két csoportra osztottuk a nyert petesejtek száma alapján. A 9, vagy annál kevesebb petesejtet tartalmazó csoport, és a 10, vagy annál több petesejtet tartalmazó mintákat hasonlítottuk össze.

A változók ANOVA analízise során szignifikáns összefüggést találtunk, miszerint a több nyert petesejtet tartalmazó csoportban magasabb volt mind a konvencionális, mind az ICSI módszerrel megtermékenyített sejtek száma, több volt az érett petesejt szám ICSI esetében és több embriót nyertünk mind az IVF, mind az ICSI csoportban.

Amikor az l-arginin/NO rendszer elemein végeztük el hasonló módon a binnelést (össz petesejt szám:  $\leq 9$  és  $> 9$ ), a kevesebb petesejt számú csoporthoz emelkedett l-arginin, ADMA és MMA koncentrációk tartoztak. Az SDMA esetében ez az összefüggés elmaradt a szignifikancia küszöbötől, míg az l-arginin/ADMA arány és arginin metilációs index nem függött a petesejt számtól (6. táblázat).

Az adatainkat az embrió szám alapján binnelve ( $n \leq 6$  és  $n > 6$ ) olyan további eredményeket nyertünk, miszerint az l-arginin és metilált produktumai szintjének kedvező hatása van a fertilizáció sikerére. Konkrétan ez azt jelentette, hogy alacsonyabb embrió szám szignifikánsan magasabb l-arginin, ADMA, SDMA, MMA és arginin metilációs index-szel járt, ugyanakkor ez nem járt az l-arginin/ADMA arány (az NO termelés/biohasznosulás jellemzője) szignifikáns emelkedésével (7. táblázat).

**7. táblázat:** *L-arginin és metilarginin szintek, valamint l-arginin/ADMA arány és arginin-metilációs index a nyert embriók száma szerint csoportosítva*

Össz embrió szám		<b>l-arginin (<math>\mu\text{M/l}</math>)</b>	<b>ADMA (<math>\mu\text{M/l}</math>)</b>	<b>SDMA (<math>\mu\text{M/l}</math>)</b>	<b>MMA (<math>\mu\text{M/l}</math>)</b>	<b>l-arginin/ ADMA</b>	<b>arg-MI</b>
	<b>átlag</b>	<b>51,74</b>	<b>0,470</b>	<b>0,437</b>	<b>0,092</b>	<b>111,72</b>	<b>10,04</b>
<b><math>\leq 6</math></b>	<b>n</b>	<b>29</b>	<b>29</b>	<b>29</b>	<b>29</b>	<b>29</b>	<b>29</b>
	<b>SD</b>	<b>19,35</b>	<b>0,094</b>	<b>0,065</b>	<b>0,014</b>	<b>37,05</b>	<b>1,54</b>
	<b>átlag</b>	<b>33,57</b>	<b>0,368</b>	<b>0,357</b>	<b>0,066</b>	<b>102,10</b>	<b>12,04</b>
<b><math>&gt; 6</math></b>	<b>n</b>	<b>11</b>	<b>11</b>	<b>11</b>	<b>11</b>	<b>11</b>	<b>11</b>
	<b>SD</b>	<b>10,22</b>	<b>0,142</b>	<b>0,128</b>	<b>0,027</b>	<b>39,34</b>	<b>3,65</b>
<b>F =</b>		<b>8,58</b>	<b>6,88</b>	<b>6,66</b>	<b>11,89</b>	<b>0,52</b>	<b>6,09</b>
<b>P &lt;</b>		<b>0,005</b>	<b>0,012</b>	<b>0,014</b>	<b>0,001</b>	<b>0,475</b>	<b>0,018</b>

A Spearman's rank korreláció analízis szignifikánsan inverz korrelációt mutatott az IVF embrió szám és az l-arginin ( $r=-0,507$ ,  $p<0,001$ ), ADMA ( $r=-0,356$ ,  $p<0,024$ ), SDMA ( $r=-0,347$ ,  $p<0,028$ ), MMA ( $r=-0,449$ ,  $p<0,004$ ) és az l-arginin/ADMA arány ( $r=-0,328$ ,  $p<0,031$ ) tekintetében. Ezzel ellentétben az arginin metilációs index direkt összefüggést mutat az IVF embrió számmal ( $r=0,426$ ,  $p<0,006$ ). Az IVF embrió számon túl, az IVF petesejtek száma is ellentétes kapcsolatban van az ADMA ( $r=-0,202$ ,  $p<0,037$ ) és MMA ( $r=-0,384$ ,  $p<0,012$ ) szintekhez és pozitív az összefüggése az arginin metilációs indexszel ( $r=0,450$ ,  $p<0,003$ ).

Erős pozitív korrelációt észleltünk, a tüszőfolyadék l-arginin szintje és metilált produktumai között: az emelkedett l-arginin termelés fokozott ADMA ( $r=0,377$ ,  $p<0,000$ ), SDMA ( $r=0,526$ ,  $p<0,000$ ) és MMA ( $r=0,446$ ,  $p<0,000$ ) felhalmozódással járt. Továbbá a kalkulált l-arginin/ADMA arány pozitívan ( $r=0,803$ ,  $p<0,000$ ), az arginin metilációs index azonban negatívan kapcsolódott az l-arginin ( $r=0,246$ ,  $p<0,011$ ) szinthez.



## **8. Megbeszélés**

### **8.1. Ovariális hiperstimulációs szindróma profilaxisa aszpirinnel**

Az ovariális hiperstimulációs szindróma egy súlyos, potenciálisan életveszélyes, iatrogén állapot, melyet a túlstimulált petefészkekből kiáramló vazoaktív anyagok hoznak létre. Az asszisztált reprodukciós eljárások elterjedésével és az in vitro fertilizációs ciklusok emelkedésével számolnunk kell az OHSS számának növekedésével is.

A betegség fő ismérve a VEGF által kiváltott megnövekedett kapilláris permeabilitás, amely korrelál az emelkedett trombocita aktivációval. Az aktivált trombocitákból hisztamin, szerotonin, trombocita eredetű növekedési faktor (PDGF), illetve lizofoszfátid sav szabadul fel (Siess 2002; Chen et al., 2008). Ezek az anyagok további patofiziológiai folyamatot indíthatnak el, melyek OHSS-hez vezetnek. A pontos mechanizmus nem tisztázott, de számos faktornak van szerepe az OHSS kialakulásban közvetve, vagy közvetlenül a VEGF-re hatva. A hCG növeli a VEGF expresszióját humán granulóza sejtekben és a VEGF szérumban koncentrációját is emeli (Elchalal et al., 1997; Neuéén et al., 1995). A gyorsan emelkedő hCG az oka a terhesség esetén súlyosabb lefolyásnak is.

Az ovuláció indukció okozta trombocita aktivációnak is szerepe van az OHSS patomechanizmusában. OHSS gyakrabban alakul ki fiatal, vékony testalkatú, policisztás petefészek szindrómás nőkben és azokban, akik korábban már szenvedtek a betegségben.

Ezek alapján állítottuk fel azt a hipotézist, mely szerint az aszpirin kezelés önmagában is alkalmas az OHSS prevenciójára (Várnagy et al., 2008).

Ennek igazolására randomizáltan alkalmaztuk az aszpirint az OHSS szempontjából magas és alacsony rizikójú betegeknek in vitro fertilizációs kezelés során és meghatároztuk az egyes csoportokban előforduló OHSS gyakoriságát.

Vizsgálatunkban az aszpirinnel kezelt betegek között csupán 2 esetben (0,25%) észleltünk súlyos, vagy kritikus stádiumú OHSS-t, mindkét beteg a magas rizikójú csoportba tartozott.

Azok között a betegek között azonban, akik aszpirin terápiában nem részesültek 43 (8,4%) esetben alakult ki OHSS. Ezzel párhuzamosan nem észleltünk OHSS-t az alacsony rizikójú csoportban. Miután szignifikáns eltérés mutatkozott OHSS tekintetében az aszpirin kezelt és nem kezelt betegeknél a magas rizikójú csoportban, az aszpirinnek egy eddig nem leírt kedvező hatásáról vonhatunk le következtetést. Továbbá miután ugyancsak észleltünk enyhe fokú OHSS-t a magas rizikójú aszpirin kezelt csoportban, feltételezhető, hogy az aszpirin nemcsak a kórkép prevenciójára megfelelő, hanem a csökkenti a tünetek és ezáltal az OHSS stádiumának súlyosságát is.

A terhességi kimenetelt vizsgálva eredményeinkben nem észleltünk szignifikáns eltérést a vizsgált csoportok között, ez megfelel más szerző aszpirinnel kapcsolatos hasonló vizsgálati eredményeinek (Khiary et al., 2007). Ugyanakkor miután csupán két esetben észleltünk aszpirin kezelés mellett súlyos, vagy kritikus OHSS-t, minden esetben ajánljuk a profilaktikus, alacsony dózisu aszpirin adását azoknak a betegeknél, akik OHSS szempontjából magas rizikójúak a kórkép prevenciójára, illetve a tünetek enyhítése céljából (Várnagy et al., 2010).

## **8.2. PACAP 38 jelenléte tüszőfolyadékban**

Vizsgálataink alapján kimutattuk, hogy a PACAP38 megtalálható az általunk vizsgált összes humán tüszőfolyadékban. A tüszőfolyadék médiumként szolgál a fejlődő petesejt számára, illetve fontos szerepet tölt be a germinális sejtek morfológiai és funkcionális fejlődésében. A PACAP kimutatható fejlődési stádiumtól függően a nagy érett tüszők granulóza sejtjeiben peteérés előtt. Kisebb mennyiségben azonban éretlen antrális és preantrális tüszőkben is expresszálódik (Gras et al., 1996; 2005; Park et al., 2001). Ezen kívül kimutatták a PACAP receptort is a fejlődő tüszőkben (Barberi et al., 2007; Park et al., 2000; Vaccari et al., 2006). A sárgatestben mind a PACAP-ot, mind a PAC1 receptort kimutatták

(Kotani et al., 1997). Valószínű, hogy a peptid szerepet játszik a primordiális csírasejtek proliferációjában (Pesce et al., 1996), az éretlen tüszők ciklikus kiválasztódásában és a fejlődés elindításában (Gras et al., 2005), a petesejtek meiotikus fejlődésében (Apa et al., 1997a) és a petefészek hormon- illetve enzim termelésében (Apa et al., 1997b; 2002; Sayasith et al., 2007). Az általunk végzett vizsgálatban a PACAP-ot kimutattuk a tüszőfolyadékából. Ez alátámasztja azt a feltételezést, miszerint a PACAP fontos biológiai szerepet tölt be a tenyésztő folyadékként funkcionáló tüszőfolyadékban a fejlődő petesejtek számára. A finomabb élettani mechanizmusok pontos tisztázása azonban további vizsgálatokat igényel.

A PACAP koncentráció meghatározására irányuló vizsgálataink eredményei, mindazon túl, hogy megerősítették a humán follikuláris folyadék mintákban a PACAP jelenlétére vonatkozó korábbi eredményeinket, a PACAP koncentráció és a petefészek gonadotropinokra adott válasza közötti lehetséges élettani kapcsolatra vetített - tudomásunk szerint első alkalommal - fényt.

Ebben a vizsgálatban két cut-off értéket állapítottunk meg, egyiket a tüszőfolyadék PACAP koncentrációjára, a másikat a fejlődő tüszők számára vonatkozóan. Mindahányszor a nyert petesejtek száma a betegenkénti 14-et meghaladta, a PACAP koncentráció 290 fmol/ml alatt volt, 106,5 fmol/ml medián értékkel. Ezen túlmenően minden esetben, amikor a PACAP koncentráció 290 fmol/ml feletti volt, (411,2 fmol/ml medián értékkel) a betegenként nyert petesejtek száma 14 alatt volt. A különbség mind a két csoport PACAP koncentrációja, mind pedig a nyert petesejtek száma tekintetében statisztikailag szignifikáns volt.

Ezek az értékek ráirányítják a figyelmet az ovariális hiperstimulációs szindróma (OHSS) patomechanizmusára is. Az korábban is felismerést nyert, hogy az OHSS nagyobb valószínűséggel fejlődik ki azon szuperovulációs kezelésben részesülő betegeknél, akiknek szignifikánsan több tüszője van a hCG adás napján (Navot et al., 1992, Jayaprakasam et al., 2007).

Egy korábbi prospektív tanulmányban az OHSS kialakulása szempontjából a hCG adásakor kritikus tüszőszám 13 volt (Papanikolau et al., 2006). Ez a cut-off érték egybevág az általunk alkalmazottal is, ahol szignifikánsan alacsonyabb PACAP koncentrációt találtunk a tüsző folyadékban. Ez azt is jelentheti, hogy a magasabb PACAP koncentráció a tüszőfolyadékban indikátor szerepet tölthet be a tüszőfejlődés tekintetében, míg az alacsony PACAP szint az OHSS kialakulásának veszélyét jelezheti előre.

A közvetlen kapcsolat a tüszők száma és a PACAP koncentráció között ismeretlen, az adataink OHSS vonatkozásában korlátozottak (pl. enyhe stádium nem fordul orvoshoz), végső következtetéstől így tartózkodunk, de az mindenképpen figyelemre méltó, hogy az OHSS-ben szenvedő betegek közül kettőnek alacsony PACAP koncentrációja volt, a harmadik esetben pedig a koncentráció a csoport első kvartiljébe esett (312 fmol/ml).

Összegezve elmondhatjuk, hogy irodalmi ismereteink szerint ez az első tanulmány, ami kapcsolatot jelez a tüszőfolyadék PACAP koncentrációja és a nyert petesejtek száma között.

A PACAP-nak ebben a folyamatban játszott pontos élettani szerepe ismeretlen, azonban a korábban már megismert, hormontermelésre gyakorolt hatása alapján feltételezhető a peptid szerepe a petesejtérésben, a tüszőfejlődésben. Az összefüggések részletesebb feltárására vonatkozóan azonban még további vizsgálatok szükségesek.

### **8.3. Az NO rendszer kapcsolata az IVF kimenetelével**

Vizsgálatunkkal igazoltuk, hogy az IVF kezelésben részt vevő nők tüszőfolyadékba tartalmazza az l-arginin/NO rendszer legfontosabb elemeit, ide értve az l-arginin, ADMA, SDMA és MMA vegyületeket. Továbbá az l-arginin/NO rendszer fokozott aktivációjának kedvező hatása van a reprodukzív kimenetelre, amit a tüszőfolyadékban az emelkedett l-arginin és metilarginin szintek esetén észlelt csökkent petesejt szám és alacsonyabb embrió szám jelez - akár az ICSI, akár az IVF csoportban.

Azon tanulmányok, melyek megkísérelték definiálni a tüszőfolyadék NO tartalmának szerepét a petesejtérésben, a fertilizációban és az embrió fejlődésében, rámutattak az NO rendszer minden alkotóelemeinek expressziójára különböző petefészek eredetű sejtekben a tüszőérés során és a praeimplantált embrióban (Roselli et al., 1998; Gouge et al., 1998; Saxena et al., 2000; Tranguch et al., 1998). Ezzel együtt meg kell jegyezni, hogy olyan állatkísérletes modellben, ahol az NO rendszert kódoló génszakasz egyik allélját károsították, a beavatkozás nem járt reprodukzív eltéréssel, ugyanakkor mindkét allél károsítása (iNOS/eNOS, eNOS/nNOS, iNOS/nNOS) a korai embrionális fejlődés gátlásával jár (Tranguch et al., 1998; Sengoku et al., 2001; Huang, 2000; Drazen et al., 1999).

Amikor a kultúrához NO rendszer gátló L-NA-t és/vagy L-NAME-t adtak, az embrió fejlődésének gátlását észlelték. Ezek a gátló mechanizmusok ugyanakkor NO donor adásával, illetve másodlagos messenger cGMP analógok adásával visszafordíthatók (Gouge et al., 1998; Tranguch et al., 1998; Chen et al., 2001).

Jelen tanulmányunkban a tüszőfolyadék NO, illetve stabil metabolitjainak (nitrit, nitrát) szintjét nem mértük, ehelyett az l-arginin/ADMA aránnyal számoltunk, ami az NO termelés/biohasznosulás jellemző markere. Ennek használata behatárolt, úgy tűnik nem függ össze a *nyert*, illetve ezen belül az *érett* petesejtek számával, a különböző fertilizációs technikák során *nyert* embriók számával és a terhességi kimenetellel.

Az NO rendszer aktivitása azonban szubsztrát függő: az endogén arginin szintézis és a sejt által kation-aminosav transzporttal felvett arginin szabályozza az NO rendszer aktivitását (Bogle et al., 1992; Morris and Billiar, 1994; Nussler et al., 1994). *Per os* bevitt l-arginin szupplementáció kontrollált ovariális hiperstimuláción áteső IVF programban részt vevő nők esetében emelkedett  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  koncentrációkkal járt, hátrányos következményekkel mind az embrió minőségre, mind az implantációra, mind a terhességi rátára (Battaglia et al., 2002). Ezek az eredmények alátámasztják saját megfigyeléseinket, miszerint az emelkedett tüszőfolyadék l-arginin szint alacsonyabb petesejt és embriószámmal jár. Másrészt a kora terhességben étrendszerően alkalmazott arginin bevitel megnövelte az embrió túlélést és lecsökkentette a szérum l-arginin és NO metabolit szintjét patkányban (Zeng et al., 2008).

Az l-argininen túl, az intrafollikuláris metilargininek szintje is ellentétes korrelációt mutat a petesejt nyeres és a fertilizáció tekintetében. A reaktív oxigén gyökök és a gyulladáscitokinek közötti szinergizmus hozzájárul a különböző metilargininek akkumulációjához és elősegíti az l-arginin/NO rendszer integritását (Chun et al., 1995; Ueda et al., 2003). Az ADMA és az MMA gátolja a NO rendszer aktivitását és a celluláris l-arginin felvételt, ugyanakkor az SDMA is gyenge gátlója a celluláris l-arginin transzportnak. Azon enzimek, így például a protein metiltranszferáz (PRMT) és a DDAH aktivitása, melyek az ADMA és az MMA szintézisében és degradációjában játszanak szerepet, redox szenzitívek, vagyis az oxidatív stressz fokozza a PRMT, gátolja a DDAH aktivitását, ami emelkedett ADMA és MMA koncentrációkhoz vezet (Sydow and Münzel, 2003).

Ugyancsak meg kell jegyezni, hogy az l-arginin és metilargininek fokozódó fehérje szintéziskor és/vagy proteolízis során szimultán szabadulnak fel azon apoptotikus folyamatokban, amelyek a petesejtérést és a korai embrionális fejlődést kísérik (Baka et al., 1998). Ennek a folyamatnak azért van jelentősége, mert a tüszőfolyadékban lévő SDMA,

mely nem megy keresztül enzimatisz degradáción (Kielstein et al., 2006), ugyanolyan esszenciális, mint az ADMA és az MMA, amely a DDAH által metabolizálódik.

A szoros kapcsolat, ami az arginin metilációs index és az IVF petesejt és embrió szám között van, további magyarázatra szorul. A legújabban közölt arginin metilációs adatok szerint az arginin metilációs index egy független rizikó faktor a koronária artériás megbetegedések és a későbbi súlyos kardiális történések vonatkozásában (Wang et al., 2009). Az arginin metilációs index csupán a metiláció folyamatát számszerúsíti, magát a metil csoportot ehhez a folyamathoz a folát dependens homocisztein/metionin ciklus nyújtja (Lucock, 2000). Ennek következtében az arginin metilációs index csökkenése jó indikátora a metilációs folyamat defektusának. Az elégtelen metilációnak számos negatív hatása van, úgymint kóros gén expresszió, gátolt petesejtérés, rossz embrió minőség, és korai terhességi veszteség (Forges et al., 2007; Kim et al., 2009).

Mindent egybevetve, a túsözofolyadék l-arginin és metilált metabolitjainak meghatározása – ADMA, SDMA, MMA – in vitro fertilizációban részt vevő pácienseknél klinikai jelentőséggel bír, hiszen prediktív értéke van a petesejt minőségre, a maturációra, a korai embrionális fejlődésre, és a terhességi kimenetelre (Bódis et al., 2010). További tanulmányok szükségesek a metilarginin pontos hatásának feltérképezésére IVF során.

## ***9. Új eredmények összefoglalása***

9.1. A patofiziológiai ismeretek bővülésével egyre nő az ovariális hiperstimulációs szindróma megelőzési lehetőségeinek tárháza, fontos azonban, hogy csak a témában járatos szakemberek végezzenek ovuláció indukciós kezelést. A klinikánkon elvégzett randomizált tanulmánnyal igazoltuk, hogy az alacsony dózisú aszpirin adása hatásos a súlyos OHSS megelőzésében, illetve a tünetek enyhítésében.

9.2. A humán follikuláris folyadékban igazoltuk a PACAP jelenlétét. Ez alátámasztja azt a feltételezést, miszerint a PACAP fontos biológiai szerepet tölt be a tenyésztő folyadékként funkcionáló tüszőfolyadékban a fejlődő petesejtek számára.

9.3. Elsőként írtunk le összefüggést a PACAP koncentráció és a petefészek gonadotropinokra adott válasza között, mely a lehetséges élettani kapcsolatokra utal. Ezek az eredmények ráirányítják a figyelmet az ovariális hiperstimulációs szindróma (OHSS) patomechanizmusára is, hiszen a magasabb PACAP koncentráció a tüszőfolyadékban indikátor szerepet tölthet be a tüszőfejlődés tekintetében, míg az alacsony PACAP szint az OHSS kialakulásának veszélyét jelezheti előre.

9.4. Vizsgálatunkkal igazoltuk, hogy az IVF kezelésben részt vevő nők tüszőfolyadéka tartalmazza az l-arginin/NO rendszer legfontosabb elemeit, a rendszer fokozott aktivációjának kedvező hatása van a reprodukzív kimenetelre. Ez az összefüggés klinikai jelentőséggel is bír, hiszen, a tüszőfolyadékban az emelkedett l-arginin és metilarginin szintek alacsonyabb petesejt és embrió számot jeleznek, mely összefüggést korábban nem volt ismert.



## ***10. Köszönetnyilvánítás***

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Koppán Miklósnak, akitől minden segítséget megkaptam munkám véghezviteléhez.

Külön köszönettel tartozom Prof. Dr. Bódis Józsefnek, aki a téma beható ismerőjeként rendszeresen segített tudományos előrelépésemben, valamint Prof. Dr.Sulyok Endrének és Prof. Dr. Kovács L. Gábornak, akik támogatták tudományos tevékenységemet.

Továbbá köszönetet mondok a dr.Drozgyik István m.b. klinika igazgatónak és prof.dr.Szabó István korábbi klinika igazgatónak, valamint a Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika minden dolgozójának, különös tekintettel a Reprodukciós Központ munkatársainak. Köszönettel tartozom dr. Reglődi Dórának és dr. Brubel Rékának önzetlen segítségükért az Anatómia Intézetből.

Hálával tartozom továbbá családomnak a segítő támogatásért.

## 11. Tudományos közlemények, előadások listája

### 11.1. Az értekezés témakörében megjelent tudományos közlemények

Varnagy A., Koppán M., Manfai Z., Busznyak Cs., Bodis J. Low-dose aspirin for prophylaction of ovarian hyperstimulation syndrome. **Fertility and Sterility** 2008; 89(4):1035-1036.

IF:4,167

Várnagy Á., Wilhelm F., Mánfai Z., Koppán M., Bódís J. Ovariális hyperstimulációs szindróma. **Magyar Nőorvosok Lapja** 2010; 73: 175-180.

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.

IF:3,122

Bodis J., Varnagy A., Sulyok E., Kovács GL., Martens-Lobenhoffer J., Bode-Böger SM. Negative association of L-arginine methylation products with oocyte numbers. **Human Reproduction** 2010 Dec;25(12):3095-100.

IF:4,357

Brubel R., Reglodi D., Jambor E., Koppán M., Varnagy A., Biro Z., Kiss P., Gaal V., Matkovits A., Farkas J., Lubics A., Bodis J., Bay C., Veszpremi B., Tamas A., Nemeth J., Mark L. Investigation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in human gynecological and other biological fluids by using MALDI TOF mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry** 2011 Jan 24:189-194. doi: 10.1002/jms.1884. [Epub ahead of print]

IF:3,289 (2010)

Koppán M., Varnagy A., Reglodi D., Brubel R., Nemeth J., Tamas A., Mark L., Bodis J. Correlation between oocyte number and follicular fluid concentration of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in women after superovulation treatment. **Peptides** (submitted)

### 11.2. Az értekezés témakörében elhangzott előadások

Brubel R., Reglodi D., Tamas A., Lubics A., Matkovits A., Kiss P., Varnagy A., Koppán M., Bodis J., Biro Zs., Czeiter E., Bukovics P., Buki A., Komoly S., Mark L. Presence of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in human body fluids. *Pannonian symposium on CNS injury*, Pécs, 2010.05.

Lammel K., Brubel R., Reglodi D., Tamas A., Lubics A., Kiss P., Varnagy A., Koppán M., Bodis J., Biro Zs., Czeiter E., Bukovics P., Buki A., Komoly S., Mark L. Presence of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in human body fluids. *Neuropeptides Conference*, 2010.

Brubel R, Reglodi D, Tamas A, Lubics A, Kiss P, **Varnagy A.**, Koppan M, Bodis J, Biro Zs, Mark L. Presence of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in human body fluids. *Membrán Transzport Konferencia, Sümeg, 2011.05.*

**Varnagy A.**, Koppan M., Reglodi D., Brubel R., Nemeth J., Tamas A., Mark L., Kornya L., Bodis J. Correlation between oocyte number and follicular fluid concentration of PACAP in women after superovulation treatment. *The 10th International Symposium on VIP-PACAP and related peptides, Eilat, 2011.*

### **11.3. Nem az értekezés témakörében megjelent tudományos közlemények**

Halvax L., Szabo I., **Varnagy A.**, Csermely T., Ertl T. The combined use of fetal pulse oximetry and prophylactic amnioinfusion in cases complicated a by meconium stained amniotic fluid. (abstract) **Prenatal Neonatal Medicine** 2000; suppl 2. 23.

**Várnagy Á.**, Tamás P., Tóth T., Szabó I. Kombinált atosiban-magnézium szulfát és terbutalin tocolytikus hatásának összehasonlító vizsgálata. *Magyar Nőorvosok lapja* 2003; 66: 331-334.

Halvax L., Vizer M., Werling J., **Varnagy A.**, Szabo I. Fetal pulse oximetry in our clinical practice. (abstract) **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine** 2004; 16: suppl. 1. 37.

Tamas P., **Varnagy A.**, Toth T., Szabo I. Atosiban – Magnesium Sulphate Combination: A Suitable Option For Tocolysis? **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine** (abstract) 2004; 16: suppl. 1. 69.

Lanyi E., **Varnagy A.**, Kovacs KA., Csermely T., Szasz M., Szabo I. Ghrelin and acyl ghrelin in preterm infants and maternal blood: relationship with endocrine and anthropometric measures. **European Journal of Endocrinology** 2008;158(1):27-33

**IF:3.791**

Miko E., Manfai Z., Meggyes M., Barakonyi A., Wilhelm F., Varnagy A., Bodis J., Illes Z., Szekeres-Bartho J., Szereday L. Possible role of natural killer and natural killer T-like cells in implantation failure after IVF. **Reproductive Biomedicine Online** 2010 Dec;21(6):750-6.

**IF:2,285**

Szereday L., Miko E., Meggyes M., Barakonyi A., Farkas B., **Varnagy A.**, Bodis J., Lynch L., O'Farrelly C., Szekeres-Bartho J. Commitment of decidual haematopoietic progenitor cells in first trimester pregnancy. **American Journal of Reproductive Immunology** 2011 Jun 20. doi:10.1111/j.1600-0897.2011.01.029. (Epub ahead of print)

### **11.4. Nem az értekezés témakörében elhangzott előadások**

Halvax L, Szabó I, **Varnagy A.**, Csermely T., Ertl T. The combined use of fetal pulse oximerty and prophylactic amnioinfusion in cases comlicated by meconium stained amniotic fluid. *XVII European Congress Perinatal Medicine, Porto, 2000. 06. 25-28.*

**Várnagy Á.**, Drozgyik I., Szabó I. Nőgyógyászati laparoscopia szövődményei. *Magyar Nőorvos Társaság Dél-Nyugat Dunántúli Szekció*, Szekszárd, 2001. 05.

**Várnagy Á.**, Halvax L., Szabó I. Szülésindukció magas rizikójú terhességeknél. *EAGO Magyarországi Szekciója XII. kongresszusa*, Pécs, 2002.06.15.

**Várnagy Á.**, Halvax L., Szabó I. Szülésindukció magas rizikójú terhességeknél. *Magyar Perinatológiai Társaság Kongresszusa*, Lakitelek, 2002.05.

**Várnagy Á.**, Tamás P., Tóth T., Ifi Zs., Szabó I. Tokolysis atosiban és MgSO<sub>4</sub> együttes alkalmazásával. *Szülészeti-Perinatológiai Aneszteziológiai Társaság Kongresszusa*, Pécs, 2003.03.

Till Á., **Várnagy Á.**, Ertl T., Szabó I. A foeto-foetalis transzfúzió perinatológiai jelentősége. *Magyar Perinatológiai Társaság Kongresszusa*, Balatonfüred, 2003.08.

Halvax L., Vizer M., **Várnagy Á.**, Szabó I. Intrapartum magzati pulzoximetria. *A Magyar Nőorvos Társaság Dél-nyugat Magyarországi Szekciójának V. Kongresszusa*, Nagykanizsa-Zalakaros, 2003. 09. 26-27.

**Várnagy Á.**, Tamás P., Tóth T., Szabó I. Kombinált atosiban-magnézium szulfát és terbutalin tocolytikus hatásának összehasonlító vizsgálata. *A Magyar Nőorvos Társaság Dél-nyugat Magyarországi Szekciójának V. Kongresszusa*, Nagykanizsa-Zalakaros, 2003. 09. 26-27.

Halvax L., **Várnagy Á.**, Peitl Sz, Szabó I. Intrauterin diagnosztika – szülésindukció. *Magyar Perinatológiai Társaság III. Országos Kongresszusa*, Nyíregyháza, 2004. 09. 02-04.

Halvax L., Vizer M., Werling J., **Várnagy Á.**, Szabó I. Fetal Pulse Oximetry in Our Clinical Practice. *XIX European Congress of Perinatal Medicine*, Athen, 2004.10.13.

Tamas P., **Várnagy Á.**, Toth T., Szabo I. Atosiban – Magnesium Sulphate Combination: A Suitable Option For Tocolysis? *XIX European Congress of Perinatal Medicine*, Athen, 2004.10.13.

**Várnagy Á.**, Halvax L., Vizer M., Werling J., Szabó I. Magzati pulzoxymetria klinikánk gyakorlatában. *A Magyar Nőorvos Társaság Dél-nyugat Magyarországi Szekciójának VII. Kongresszusa*, Kaposvár, 2005.

**Várnagy Á.**, Tamás P., Tóth T., Szabó I. Kombinált atosiban-magnézium szulfát és terbutalin tocolytikus hatásának összehasonlító vizsgálata. *Fiatal Nőorvosok Társaságának II. Kongresszusa*, Pécs-Zalakaros, 2006.10. 26-27.

**Várnagy Á.**, Kovács K., Kosztolányi Gy., Melegh B., Bódis J. Genetikai eltérések azoospermias férfiaknál klinikánk meddőségi rendelésének beteganyagában. *Magyar Család és Nővédelmi Tudományos Társaság Kongresszusa*, Gyula, 2008.11.

Engels Géraldine L., Szereday L., Mikó É., Farkas B., **Várnagy Á.**, Szekeres-Barthó J., Barakonyi A. CD160 NK sejt receptor pozitív természetes immunsejtek vizsgálata terhességi toxémiában. *Magyar Immunológiai Társaság éves konferenciájára*, Kecskemét, 2011.10.12.

Varga A., Reglodi D., Tamás A., Koppan M., Lubics A., Kiss P., **Varnagy A.**, Bodis J., Mark L., Jambor E., Brubel R. Investigation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in human andrological fluid and its effect on sperm motility. *Magyar Farmakológiai Anatómus Mikrocirkulációs Élettani Társaságok kongresszusa*, 2011.06

**Közlemények összes impakt faktora: 21,011**

## ***12. Irodalomjegyzék***

Abisogun AO, Braquet P, Tsafiriri A. The involvement of platelet activating factor in ovulation. *Science*. Jan 20 1989; 243: 381-383.

Aboulghar M, Evers JH, Al-Inany H. Intravenous albumin for preventing severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*. 2002; 2: CD001302.

Adamik A, Telegdy G. Involvement of different receptors in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induced open field activity in rats. *Neuropeptides* 2004; 38: 16-20.

Agarwal A, Halvorson LM, Légrádi G. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) mimics neuroendocrine and behavioral manifestations of stress: evidence for PKA-mediated expression of the corticotropin-releasing hormone (CRH) gene. *Mol Brain Res* 2005; 138: 45-57.

Ando E, Nokihara K, and Naruse S. Development of pituitary adenylate cyclase activating polypeptides (PACAPs) specific radioimmunoassay systems and distribution of PACAP-like immunoreactivity in guinea pig tissues. *Biomed Pept Proteins Nucleic Acids* 1994; 1:45–50.

Apa R, Lanzone A, Mastrandrea M et al. Control of human luteal steroidogenesis: role of growth hormone-releasing hormone, vasoactive intestinal peptide, and pituitary adenylate cyclase activating peptide. *Fertil Steril* 1997b; 68: 1097-1102.

Apa R, Lanzone A, Mastrandrea M et al. Effect of pituitary adenylate cyclase activating peptide on meiotic maturation in follicle-enclosed, cumulus-enclosed, and denuded rat oocytes. *Biol Reprod* 1997a; 57: 1074-1079.

Apa R, Lanzone A, Miceli F, Vaccari S, Macchione E, Stefanini M, Canipari R. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide modulates plasminogen activator expression in rat granulosa cells. *Biol Reprod* 2002; 66: 830-835.

Apostolakis EM, Lanz R, O'Malley BW. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide: a pivotal modulator of steroid-induced reproductive behavior in female rodents. *Mol Endocrinol* 2004; 18: 173-183.

Arimura A. Perspectives on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the neuroendocrine, endocrine, and nervous systems. *Jpn J Physiol* 1998; 48: 301-331.

Baka S, Malamitsi-Puchner A. Novel follicular fluid factors influencing oocyte developmental potential in IVF: a review. *Reprod Bio Med* 2006;12:500-506.

Barberi M, Muciaccia B, Morelli MB, Stefanini M, Cecconi S, Canipari R. Expression, localization and functional activity of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide,

vasoactive intestinal polypeptide and their receptors in mouse ovary. *Reproduction* 2007; 134: 281-292.

Barthó L, Lázár Z, Lénárd L, Benkó R, Tóth G, Penke B, Szolcsányi J, Maggi CA. Evidence for the involvement of ATP, but not of VIP/PACAP or nitric oxide, in the excitatory effect of capsaicin in the small intestine. *Eur J Pharmacol* 2000; 392: 183-188.

Battaglia C, Regnani G, Marsella T, Facchinetti F, Volpe A, Venturoli S, Flamigni C. Adjuvant l-arginine treatment in controlled ovarian hyperstimulation: a double – blind, randomized study. *Human Reprod* 2002;17: 659-665.

Ben-Chetrit A, Eldar-Geva T, Gal M, Huerta M, Mimom T, Algur N, et al. The questionable use of albumin for the prevention of ovarian hyperstimulation syndrome in an IVF programme: a randomized placebocontrolled trial. *Hum Reprod.* 2001;16: 1880-1884.

Bodis J, Tinneberg H-R, Hanf V, Török A, Gross M. Prophylaxis of ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod.* 1992; 7(8): 1181-1182.

Bodis J, Koppan M, Kornya L, Tinneberg HR, Torok A. The effect of catecholamines, acetylcholine and histamine on progesterone release by human granulosa cells in a granulosa cell superfusion system. *Gynecol Endocrinol.* Aug 2002; 16 :259-264.

Bodis J, Varnagy A, Sulyok E, Kovács GL, Martens-Lobenhoffer J, Bode-Böger SM. Negative association of L-arginine methylation products with oocyte numbers. *Hum Reprod.* 2010; 25:3095-100.

Bogle RG, Baydoun AR, Pearson JD, Moncada S, Mann GE. L-arginine transport is increased in macrophages generating nitric oxide. *Biochem J* 1992;284:15-18.

Bourgault S, Chatenet D, Wurtz O, et al. Strategies to convert PACAP from a hypophysiotropic neurohormone into a neuroprotective drug. *Curr Pharm Des.* 2011; 17: 1002-1024.

Böger RH, Sydow K, Borlak J, Thum T, Lenzen H, Schubert B, Tsikas D, Bode-Böger M. LDL cholesteryl upregulates synthesis of asymmetric dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosyl methionine-dependent methyltransferases. *Circ Res* 2000;87:99-105.

Börzsei R, Márk L, Tamás A, Bagoly T, Bay C, Csanaky K, Bánki E, Kiss P, Váczy A, Horváth G, Németh J, Szauer E, Helyes Z, Reglődi D. Presence of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38 in human plasma and milk. *Eur J Endocrinol* 2009; 160: 561-565.

Braas KM, May V, Zwara P, Nausch B, Kliment J, Dunleavy JD, Nelson MT, Vizzard MA. Role for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in cystitis-induced plasticity of micturition reflexes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006; 290: 951-962.

Busznyák Cs, Várnagy Á, Bózsa Sz, Mánfai Z, Szabó I, Bódis J. Hiperstimuláció in vitro fertilizáció során. *Magy Nőorv Lap.* 2009; 72:179-183.

Chen HW, Jiang WS, Tzeng RC. Nitric oxide as a regulator in preimplantation embryo development and apoptosis. *Fertil Steril* 2001;75:1163-1171.

Chen SU, Chou CH, Lee H, Ho CH, Lin CW, Yang YS. Lysophosphatidic acid up-regulates expression of interleukin-8 and -6 in granulosa-lutein cells through its receptors and NF-(kappa)B-dependent pathways: implications for angiogenesis of corpus luteum and ovarian hyperstimulation syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008; 93(3): 935-943.

Choudhury A, Freestone B, Patel J, Lip GY. Relationship of soluble CD40 ligand to vascular endothelial growth factor, angiopoietins, and tissue factor in atrial fibrillation: A link among platelet activation, angiogenesis, and thrombosis? *Chest*. 2007; 132(6): 1913-1919.

Chun SY, Eisenhauer KM, Kubo M, Hsueh AJW. Interleukin beta suppresses apoptosis in rat ovarian follicles by nitric oxide production. *Endocrinology* 1995;136:3120-3127.

Chwalisz K, Garfield RE. Role of nitric oxide in implantation and menstruation. *Human Reprod* 2000;15:96-111.

Counis R, Laverrière JN, Garrel-Lazayres G, Cohen-Tannoudji J, Larivière S, Bleux C, Magre S. What is the role of PACAP in gonadotrope function? *Peptides* 2007; 28: 1797-1804.

Csaba Zs, Csernus V, Gerendai I. Local effect of PACAP and VIP on testicular function in immature and adult rats. *Peptides* 1997; 18: 1561-1567.

Csernus V, Józsa R, Reglódi D. The effect of PACAP on rhythmic melatonin release of avian pineals. *Gen Comp Endocrinol* 2004; 135: 62-69.

Delgado M, Abad C, Martinez C, et al. PACAP in immunity and inflammation. *Ann N Y Acad Sci*. May 2003; 992: 141-157.

Delvigne A, Rozenberg S. Epidemiology and prevention of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS): a review. *Human Reprod Update*. 2002; 8: 559-577.

Delvigne A. Review of clinical course and treatment of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS). *Hum Reprod Update*. 2003; 9: 77-96.

Drazen DL, Klein SL, Burnett AL, Wallach EE, Crone JK, Huang PL, Nelson RJ. Reproductive function in female mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nitric Oxide* 1999;3:366-374.

Driancourt MA, Thuel B. Control of oocyte growth and maturation by follicular cells and molecules present in follicular fluid. A review. *Reprod Nutr Develop* 1998;38:345-362.

Elchalal U, Schenker JG. The pathophysiology of ovarian hyperstimulation syndrome-views and ideas. *Hum Reprod*. 1997;12: 1129-1137.

El-Gehani F, Tena-Sempere M, Huhtaniemi I. Evidence that pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is a potent regulator of fetal rat testicular steroidogenesis. *Biol Reprod* 2000; 63:1482-1489.



European Recombinant LH Study Group. Recombinant human luteinizing hormone is as effective as, but safer than, urinary human chorionic gonadotropin in inducing final follicular maturation and ovulation in in vitro fertilization procedures: results of a multicenter double-blind study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86: 2607-2618.

Fahrenkrug J, Hannibal J. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide immunoreactivity in capsaicin-sensitive nerve fibres supplying the rat urinary tract. *Neuroscience* 1998; 83:1261-1272.

Faluhelyi N, Reglődi D, Lengvári I, Csernus V. Development of the circadian melatonin rhythm and the effect of PACAP on melatonin release in the embryonic chicken pineal gland. An in vitro study. *Regul Pep* 2004;123: 23-28.

Farnham MM, Li Q, Goodchild AK, Pilowsky PM. PACAP is expressed in sympathoexcitatory bulbospinal C1 neurons of the brain stem and increases sympathetic nerve activity in vivo. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008; 294: R1304-1311.

Ferraretti AP, Gianaroli L, Diotallevi L, Festi C, Trounson A. Dopamine treatment for severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod.* 1992; 7: 180-183.

Forges T, Monnier-Barbarino P, Alberto JM, Guéant-Rodriguez RM, Daval JL, Guéant JL. Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. *Hum Reprod* 2007;13:225-238.

Förstermann U, Closs E, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H. Nitric oxide synthase isoenzymes: characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 1994;23:1121-1131.

Fraser HM, Dickson SE, Lunn SF, Wulff C, Morris KD, Carroll VA, Bicknell R. Suppression of luteal angiogenesis in the primate after neutralization of vascular endothelial growth factor. *Endocrinology.* 2000; 141: 995–1000.

Ganea D, Delgado M. Neuropeptides as modulators of macrophage functions. Regulation of cytokine production and antigen presentation by VIP and PACAP. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2001; 49: 101-110.

Ganea D, Delgado M. Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as modulators of both innate and adaptive immunity. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002; 13: 229-237.

Garcia-Velasco JA. How to avoid ovarian hyperstimulation syndrome: a new indication for dopamine agonists. *Reprod Biomed Online.* 2009; 18: 71-75.

Gera PS, Tatpati LL, Allemand MC, Wentworth MA, Coddington CC. Ovarian hyperstimulation syndrome: steps to maximize success and minimize effect for assisted reproductive outcome. *Fertil Steril.* 2009 Apr 6.

Geva E, Jaffe RB. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology. *Fertil Steril.* 2000; 74: 429-438.

Gomariz RP, Juarranz Y, Abad C, Arranz A, Leceta J, Martinez C. VIP-PACAP system in immunity: new insights for multitarget therapy. *Ann N Y Acad Sci.* Jul 2006; 1070: 51-74.

Gras S, Hannibal J, Georg B, Fahrenkrug J. Transient periovulatory expression of pituitary adenylate cyclase activating peptide in rat ovarian cells. *Endocrinology* 1996;137:4779-4785

Gras S, Host E, Fahrenkrug J. Role of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the cyclic recruitment of immature follicles in the rat ovary. *Regul Pept* 2005; 128: 69-74.

Gouge RC, Marshburn P, Gordon BE, Nunley W, Huet- Hudson YM. Nitric oxide as a regulator of embryonic development. *Biol Reprod* 1998;58:875-879.

Hannibal J, Ding JM, Chen D, Fahrenkrug J, Larsen PJ, Gillette MU, Mikkelsen JD. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) in the retinohypothalamic tract: a potential daytime regulator of the biological clock. *J Neurosci* 1997; 17: 2637-2644.

Hannibal J, Fahrenkrug J. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in intrinsic and extrinsic nerves of the rat pancreas. *Cell Tissue Res* 2000; 299: 59-70.

Hannibal J, Mikkelsen JD, Clausen H, Holst JJ, Wulff BS, Fahrenkrug J. Gene expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the rat hypothalamus. *Regul Pept* 1995a; 55: 133-148.

Hannibal J, Mikkelsen JD, Fahrenkrug J, and Larsen PJ (1995b) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide gene expression in corticotropin-releasing factor-containing parvocellular neurons of the rat hypothalamic paraventricular nucleus is induced by colchicine, but not by adrenalectomy, acute osmotic, ether, or restraint stress. *Endocrinology* 1995b; 136: 4116-4124.

Hannibal J. Neurotransmitters in the retinohypothalamic tract. *Cell Tissue Res* 2002; 309: 73-88.

Hardwick JC, Tompkins JD, Locknar SA, Merriam LA, Young BA, Parsons RL. Calcium influx through channels other than voltage-dependent calcium channels is critical to the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-induced increase in excitability in guinea pig cardiac neurons. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1070: 317-321.

Hefler LA, Gregg AR. Inducible and endothelial nitric oxide synthase: genetic background affects ovulation in mice. *Fertil Steril* 2002;77:147-151.

Helyes Zs, Pozsgai G, Börzsei R, Németh J, Bagoly T, Márk L, Pintér E, Tóth G, Elekes K, Szolcsányi J, Reglődi D. Inhibitory effect of PACAP38 on acute neurogenic and non-neurogenic inflammation in the rat. *Peptides* 2007; 28: 1847-1855.

Hiromatsu Y, Toda S. Mast cells and angiogenesis. *Microsc Res Tech.* Jan 1 2003; 60: 64-69.

Huang PL. Lessons learned from nitric oxide synthase knockout animals. *Semin Perinatol* 2000;24:87-90.

- Isobe K, Tatsuno I, Yashiro T, Nanmoku T, Takekoshi K, Kawakami Y, Nakai T. Expression of mRNA for PACAP and its receptors in intra- and extra-adrenal human pheochromocytomas and their relationship to catecholamine synthesis. *Regul Pept* 2003; 110: 213-217.
- Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Komoto M, Ogawa T, Cooke JP. Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 1999;99:3092-3095.
- Jayaprakasan K, Herbert M, Moody E, Stewart JA, Murdoch AP. Estimating the risks of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS): implications for egg donation for research. *Hum Fertil (Camb)* 2007;10:183-187.
- Khairy M, Banerjee K, El-Toukhy T, Coomarasamy A, Khalaf Y. Aspirin in women undergoing in vitro fertilization treatment: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2007; 88(4): 822-31.
- Kielstein JT, Salpeter SR, Bode- Böger SM, Cooke JP, Fliser D. Symmetric dimethylarginine (SDMA) as endogenous marker of renal function—a meta- analysis. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:2446-2451.
- Kim K-C, Friso S, Choi S-W. DNA methylation, an epigenetic mechanism connecting folate to healthy embryonic development and aging. *J Nutr Biochem* 2009;20: 917-926.
- Kimura S, Ohshige Y, Lin L, Okumura T, Yanaihara C, Yanaihara N, Shiotani Y. Localization of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the hypothalamus-pituitary system in rats: light and electron microscopic immunocytochemical studies. *J Neuroendocrinol* 1994; 6: 503-507.
- Kivipelto L, Absood A, Arimura A, Sundler F, Håkanson R, and Panula P. The distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-like immunoreactivity is distinct from helodermin- and helospectin-like immunoreactivities in the rat brain. *J Chem Neuroanat* 1992; 5: 85-94.
- Koppan M, Bodis J, Verzar Z, Tinneberg HR, Torok A. Serotonin may alter the pattern of gonadotropin-induced progesterone release of human granulosa cells in superfusion system. *Endocrine*. Jul 2004; 24:155-159.
- Kornya L, Bodis J, Koppan M, Tinneberg HR, Torok A. Modulatory effect of acetylcholine on gonadotropin-stimulated human granulosa cell steroid secretion. *Gynecol Obstet Invest*. 2001; 52: 104-107.
- Kotani E, Usuki S, Kubo T. Rat corpus luteum expresses both PACAP and PACAP type IA receptor mRNAs. *Peptides* 1997; 18: 1453-1455.
- Köves K, Arimura A, Görös TG, and Somogyvári-Vígh A Comparative distribution of immunoreactive pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and vasoactive intestinal polypeptide in rat forebrain. *Neuroendocrinology* 1991; 54: 159-169.

Köves K, Arimura A, Somogyvári-Vigh A, Vigh S, Miller J. Immunohistochemical demonstration of a novel hypothalamic peptide, pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, in the ovine hypothalamus. *Endocrinology* 1990; 127: 264-271.

Köves K, Görös TJ, Kausz M, Arimura A. Present status of knowledge about the distribution and colocalization of PACAP in the forebrain. *Acta Biol Hung* 1994; 45: 297-321.

Köves K, Vincze E A hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid szerkezete, előfordulása és szerepe az élettani működésben. *Orvosi Hetilap* 2001; 142: 491-496.

Kuo RC, Baxter GT, Thomson SH, Stricker SA, Patton C, Bonaventura J, Epel D. NO is necessary and sufficient for egg activation at fertilization. *Nature* 2000;406:633-636.

Lee J, Park HJ, Choi HS, Kwon HB, Arimura A, Lee BJ, Choi WS, Chun SY. Gonadotropin stimulation of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) messenger ribonucleic acid in the rat ovary and the role of PACAP as a follicle survival factor. *Endocrinology* 1999;140:818-826.

Légrádi G, Das M, Giunta B, Hirani K, Mitchell EA, Diamond DM. Microinfusion of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide into the central nucleus of amygdala of the rat produces a shift from an active to passive mode of coping in the shock-probe fear/defensive burying test. *Neural Plast* 2007; 2007: 79102.

Li M, Funahashi H, Mbikay M, Shioda S, Arimura A. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-mediated intracrine signaling in the testicular germ cells. *Endocrine* 2004; 23: 59-75.

Lucock M. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Mol Genet Metab* 2000;71:121-138.

Luts L, Sundler F. Peptide-containing fibers in the parathyroid glands of different species. *Regul Pept* 1994; 50: 147-158.

MacAllister RJ, Parry H, Kimoto M, Ogawa T, Russel RJ, Hodson H, Whitley GS, Vallance P. Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Br J Pharmacol* 1996;119:1533-1540.

Martens-Lobenhoffer J, Bode-Böger SM. Fast and efficient determination of arginine, symmetric dimethylarginine in biological fluids by hydrophilic-interaction liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2006;42:488-493.

Mathur R, Akande AV, Keavy SD, Hunt LP, Jenkins JM. Distinction between early and late ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril.* 2000; 73: 901-907.

Mathur R, Evbuomwan I, Jenkins J. Prevention and management of ovarian hyperstimulation syndrome. *Curr Obstet et Gynaecol.* 2005; 15: 132-138.

Mathur R, Kailasam C, Jenkins J. Review of the evidence base of strategies to prevent ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Fertil (Camb).* 2007; 10(2): 75-85.

Matsuyama S, Matsumoto A, Hashimoto H, Shintani N, Baba A. Impaired long-term potentiation in vivo in the dentate gyrus of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) or PACAP type I receptor-mutant mice. *Neuroreport* 2003; 14: 2095-2098.

McClure N, Healy DL, Rogers PA, Sullivan J, Beaton L, Haning RV. Vascular endothelial growth factor as capillary permeability agent in ovarian hyperstimulation syndrome. *Lancet*. 1994; 344: 235-236.

Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, Culler MD, Coy DH. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 164: 567-574.

Miyata A, Jiang L, Dahl RR, Kitada C, Kubo K, Fujino M, Minamino N, Arimura A. Isolation of a neuropeptide corresponding to the N-terminal 27 residues of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide with 38 residues (PACAP38). *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 170: 643-648.

Moller K, Zhang YZ, Håkanson R, Luts A, Sjölund B, Uddman R, Sundler F. Pituitary adenylate cyclase activating peptide is a sensory neuropeptide: immunocytochemical and immunochemical evidence. *Neuroscience* 1993; 57: 725-732.

Morris SM, Billiar TR. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am J Physiol* 1994;266:E 829-E-839.

Murck H, Steiger A, Frieboes RM, Antonijevic IA. Pituitary adenylate cyclase activating peptide affects homeostatic sleep regulation in healthy young men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 292: E853-857.

Nagy AD, Csernus VJ. The role of PACAP in the control of circadian expression of clock genes in the chicken pineal gland. *Peptides* 2007; 28: 1767-1774.

Navot D, Bergh PA, Laufer N. Ovarian hyperstimulation syndrome in novel reproductive technologies: prevention and treatment. *Fertil Steril* 1992;58:249-261.

Nargund G, Hutchison L, Scaramuzzi R. Low-dose hCG is useful in preventing OHSS in high-risk women without adversely affecting the outcome of IVF cycles. *Reprod Biomed Online*. 2007; 14: 682-685.

Neulen J, Yan Z, Raczek S, Weindel K, Keek C, Weich HA. Human chorionic gonadotropin-dependent expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in human granulosa cells: importance in ovarian hyperstimulation syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995; 80: 1967-1971.

Nussler AK, Billiar TR, Liu Z-Z, Morris SM. Coinduction of nitric oxide synthase and argininosuccinate synthase in a murine macrophage cell line. Implications for regulation of nitric oxide production. *J Biol Chem* 1994;269:1257-1261.

Nyboe Andresen A, Gianaroli L, Nygren KG. Assisted reproductive technology and intrauterine inseminations in Europe, 2005: results generated from European registers by

ESHRE: ESHRE. The European IVF Monitoring Programme (EIM), for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). *Hum Reprod.* 2009; 24: 1267-1287.

Okada R, Yamamoto K, Ito YM, Mochida H, Tonon MC, Fournier A, Leprince J, Vaudry H, Kikuyama S. VIP and PACAP stimulate TSH release from the bullfrog pituitary. *Peptides* 2007; 28: 1784-1789.

Otto C, Kovalchuk Y, Wolfer DP, Gass P, Martin M, Zuschratter W, Grone HJ, Kellendonk C, Tronche F, Maldonado R, Lipp HP, Konnerth A, Schutz G. Impairment of mossy fiber long-term potentiation and associative learning in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide type I receptor-deficient mice. *J Neurosci* 2001; 21: 5520-5527.

Pahlich S, Zakaryan RP, Gehring H. Protein arginine methylation: Cellular functions and methods of analysis. *Biochim Biophys Acta* 2006;1764:1890-1903.

Papanikolaou EG, Pozzobon C, Kolibianakis EM, Camus M, Tournaye H, Fatemi HM, Van SA, Devroey P. Incidence and prediction of ovarian hyperstimulation syndrome in women undergoing gonadotropin-releasing hormone antagonist in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril.* 2006;85:112-120.

Park HJ, Lee J, Park JH, Kwon HB, Arimura A, Chun SY. Stage-specific expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide type I receptor messenger ribonucleic acid during ovarian follicle development in the rat. *Endocrinology* 2000; 141: 702-709.

Park JY, Park JH, Park HJ, Lee JY, Lee YI, Lee K, Chun SY. Stage-dependent regulation of ovarian pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide mRNA levels by GnRH in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 2001;142:3828-3835.

Pataki I, Adamik A, Glover V, Toth G, Telegdy Gy. The effects of isatin (indole-2, 3-dione) on pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-induced hyperthermia in rats. *BMC Neurosci* 2002; 3: 2.

Patchava S, Gelbaya TA, Nardo LG. Managing the complications associated with assisted reproductive technologies. *Minerva Ginecol.* 2009; 61(4): 347-355.

Pesce M, Canipari R, Ferri GL, Siracusa G, De Felici M. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) stimulates adenylate cyclase and promotes proliferation of mouse primordial germ cells. *Development* 1996; 122: 215-221.

Piggins HD, Stamp JA, Burns J, Rusak B, Semba K. Distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) immunoreactivity in the hypothalamus and extended amygdala of the rat. *J Comp Neurol* 1996; 376: 278-294.

Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril.* 2008; 90: 188-193.

Reglodi D, Gyarmati J, Ertl T, Borzsei R, Bodis J, Tamas A, Kiss P, Csanaky K, Banki E, Bay C, Nemeth J, Helyes Z. Alterations of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-like immunoreactivity in the human plasma during pregnancy and after birth. *J Endocrinol Invest.* 2010; 33(7): 443-5.

Reichenstein M, Rehavi M, Pinhasov A. Involvement of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and its receptors in the mechanism of antidepressant action. *J Mol Neurosci* 2008; 36: 330-338.

Rékási Z, Czömpöly T. Accumulation of rat pineal serotonin N-acetyltransferase mRNA induced by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and vasoactive intestinal peptide in vitro. *J Mol Endocrinol* 2002; 28: 19-31.

Roberto M, Brunelli M. PACAP-38 enhances excitatory synaptic transmission in the rat hippocampal CA1 region. *Learn Mem* 2000; 7: 303-311.

Roselli M, Keller PJ, Dubey RK. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Human Reprod* 1998;4:3-24.

Rowe AJ, Morris KD, Bicknell R, Fraser HM. Angiogenesis in the corpus luteum of early pregnancy in the marmoset and the effects of vascular endothelial growth factor immunoneutralization on establishment of pregnancy. *Biol Reprod.* 2002; 67: 1180–1188.

Royal College of Obstetricians and Gynecologists. The management of ovarian hyperstimulation syndrome. Green-top Guideline No.5. 2006 Sept.

Rubinstein M, Marazzi A, Polak de Fried E. Low dose aspirin treatment improves ovarian responsiveness, uterine and ovarian blood flow velocity, implantation and pregnancy rates in patient undergoing in-vitro fertilization: a prospective, randomized, double-blind placebo-controlled assay. *Fertil Steril.* 1999; 71: 825-829.

Saxena D, Purohit SP, Kumer GP, Laloraya M. Increased appearance of inducible nitric oxide synthase in the uterus and embryo at implantation. *Nitric Oxide* 2000;4:384-391.

Sayasith K, Brown KA, Sirois J. Gonadotropin-dependent regulation of bovine pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on ovarian follicles prior to ovulation. *Reproduction* 2007; 133: 441-453.

Schmidt-Choudhury A, Furuta GT, Galli SJ, Schmidt WE, Wershil BK. Mast cells contribute to PACAP-induced dermal oedema in mice. *Regul Pept.* Jun 30 1999; 82: 65-6.

Seebeck J, Kruse ML, Schmidt-Choudhury A, Schmidt WE. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide induces degranulation of rat peritoneal mast cells via high-affinity PACAP receptor-independent activation of G proteins. *Ann N Y Acad Sci.* Dec 11 1998; 865: 141-146.

Seebeck J, Kruse ML, Schmidt-Choudhury A, Schmidt Mayer J, Schmidt WE. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide induces multiple signaling pathways in rat peritoneal mast cells. *Eur J Pharmacol.* Jul 10 1998; 352: 343-350.

Seki T, Shioda S, Izumi S, Arimura A, Koide R. Electron microscopic observation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)-containing neurons in the rat retina. *Peptides* 2000; 21: 109-113.

Sengoku K, Takuma, N, Horikawa M, Tsuchiya K, Komori H, Sharifa D, Tamate K, Ishikawa M. Requirement of nitric oxide for murine oocyte maturation, embryo development, and trophoblast outgrowth in vitro. *Mol Reprod Dev* 2001;58:262-268.

Siess W. Athero- and thrombogenic actions of lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate. *Biochim Biophys Acta*. 2002; 1582: 204–215.

Soares SR, Gomez R, Simon C, Garcia-Velasco JA, Pellicer A. Targeting the vascular endothelial growth factor system to prevent ovarian hyperstimulation syndrome. *Hum Reprod Update*. Jul-Aug 2008; 14: 321-333.

Somogyvári-Vigh A, Reglődi D. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: A potential neuroprotective peptide. *Curr Pharm Des* 2004; 10: 2861-2889. Review.

Son WY, Lee SY, Yoon SH, Lim JH. Pregnancies and deliveries after transfer of human blastocysts derived from in vitro matured oocytes in in vitro maturation cycles. *Fertil Steril*. 2007; 87: 1491-1493.

Spencer F, Chi L, Zhu M. Temporal relationships among uterine pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, decidual prolactin-related protein and progesterone receptor mRNAs expression during decidualization and gestation in rats. *Comp Biochem Physiol* 2001; 129C: 25-34.

Steenstrup BR, Alm P, Hannibal J, Jørgensen JC, Palle C, Junge J, Christensen HB, Ottesen B, Fahrenkrug J. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide: occurrence and relaxant effect in female genital tract. *Am J Physiol* 1995; 269: E108-117.

Steenstrup BR, Jørgensen JC, Alm P, Hannibal J, Junge J, Fahrenkrug J, Ottesen B. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP): occurrence and vasodilatory effect in the human uteroplacental unit. *Regul Pept* 1996; 61: 197-204.

Stewart JA, Hamilton PJ, Murdoch AP. Thromboembolic disease associated with ovarian stimulation and assisted conception techniques. *Hum Reprod*. 1997; 12: 2167-2173.

Stuhlinger MC, Tsao PS, Her JH, Kimoto M, Balint RF, Cooke JP. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 2001;104:2569-2575.

Sundler F, Ekblad E, Hannibal J, Moller K, Zhang YZ, Mulder H, Elsas T, Grunditz T, Danielsen N, Fahrenkrug J, Uddman R. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide in sensory and autonomic ganglia: localization and regulation. *Ann NY Acad Sci* 1996; 805: 410-428.

Sydow K, Münzel T. ADMA and oxidative stress. *Atherosclerosis* 2003;4 (Suppl):41-51.

Tranguch S, Steuerwald N, Huet-Hudson YM. Nitric oxide synthase production and nitric oxide regulation of preimplantation embryo development. *Biol Reprod* 1998;58:875-879.



Tso LO, Costello MF, Albuquerque LE, Andriolo RB, Freitas V. Metformin treatment before and during IVF or ICSI in women with polycystic ovary syndrome. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009; 2: CD006105.

Ueda S, Kato S, Matsuoka H, Kimoto M, Okuda S, Morimatsu M, Imaizumi T. Regulation of cytokin-induced nitric oxide synthesis by asymmetric dimethylarginine: role of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circ Res* 2003; 92:226-233.

Usuki S, Kotani E. Effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on progesterin biosynthesis in cultured luteal cells from the ovary. *Gynec Endocrinol* 2001; 15: 184-191.

Vaccari S, Latini S, Barberi M, Teti A, Stefanini M, Canipari R. Characterization and expression of different pituitary adenylate cyclase activating polypeptide/vasoactive intestinal polypeptide receptors in rat ovarian follicles. *J Endocrinol* 2006; 191: 287-299.

Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of NO synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992;339:572-575.

Varnagy A, Koppan M., Manfai Z, Busznyak Cs, Bodis J. Low-dose aspirin for prophylaxis of ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril.* 2008; 89: 1035-1036.

Varnagy A, Bodis J, Manfai Z, Wilhelm F, Busznyak Cs, Koppan M. Low-dose aspirin therapy to prevent ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril.* 2010; 93: 2281-2284.

Wang Z, Tang WWH, Cho L, Brennan DM, Hazen SL. Targeted metabolomic evaluation of arginine methylation and cardiovascular risks. Potential mechanisms beyond nitric oxide synthase inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:1383-1391.

Winzell MS, Ahren B. Role of VIP and PACAP in islet function. *Peptides* 2007; 28: 1805-1813.

Wolf SS. The protein arginine methyltransferase family: an update about function, new perspectives and the physiological role in humans. *Cell Mol Life Sci* 2009;66:2109-2121.

Xu F, Tse FW, Tse A. Stimulatory actions of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in rat carotid glomus cells. *Adv Exp Med Biol* 2008; 605: 69-74.

Zeng X, Wang F, Fan X, Yang W, Zhou B, Li P, Yin Y, Wu G, Wang J. Dietary arginine supplementation during early pregnancy enhances embryonic survival in rats. *J Nutr* 2008;138:1421-1425.

Zhong Y, Kasson BG. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates steroidogenesis and adenosine 3',5'-monophosphate accumulation in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 1994;135:207-213.