

Az in vitro fertilizáció kimenetelét és lehetséges szövődményeit meghatározó faktorok vizsgálata

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Dr. Várnagy Ákos

Pécsi Tudományegyetem Egészségtudományi Kar

Egészségtudományi Doktori Iskola

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Bódis József

Programvezető: Prof. Dr. Bódis József

Témavezető: Dr. Koppán Miklós

Pécs, 2011.

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. 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.

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- α), endothelin-1, és vascular endothelial growth factor (VEGF). Az aktivált trombocitákból további anyagok szabadulnak fel, melyek az OHSS tüneteikért 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. Ugyanakkor régóta ismert, hogy az ovuláció gyulladásszerű jellegű élettani folyamatában jelentős szerepet töltenek be a trombociták. Másrészt bizonyítást nyert a pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gyulladásszerű folyamatokban játszott élettani szerepe a tumor nekrosis faktor alfa (TNF- α) 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 ovariális 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 folyadékból és azt, hogy a különböző arginin származékoknak milyen szerepe van az in vitro fertilizáció kimenetelére.

2. Célkitűzések

2.1. Ovariális hiperstimulációs szindróma profilaxisának vizsgálati lehetőségei

Elméleti megfontolásunk alapján, miszerint az ovuláció egy jelentős trombocita aktivációval járó gyulladáshoz vezető folyamat, az *aszpirin* (acetilszalicilsav) adása hatásos profilaxis lehet OHSS veszélye esetén. Korábbi tanulmányok az aszpirinnal kapcsolatban számos pozitív hatást ismertettek IVF kezeléseknél. 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.

2.2. 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 follikuláris folyadék mintákban, illetve bizonyított jelenléte esetén fellelhető-e a mért koncentráció és az ovariális működés, azaz a szuperovulációs kezelésre adott válasz, azaz a follikulum fejlődés között bármilyen összefüggés.

2.3. 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 termelés, bioaktivitás jellemzőjét, valamint a nemrégiben bevezetett arginine-methylation indexet (Arg-MI) vizsgáltuk releváns klinikai információk nyeresének céljából a tüszőfolyadék és a petesejt/embrió interakciójával kapcsolatban.

3. Anyagok és módszerek

3.1 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 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 GnRh agonistával kezelt ciklusok 62%-ában (n=1503) alacsony dózisú (100 mg/nap) aszpirin kezelést folytattunk, 38 %-ban (n=922) aszpirin kezelés nem történt. Az

aszpirin 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 betegeg egyénileg szabott dózisu rekombináns FSH (Gonal-F; Serono® vagy Puregon; Organon®), adással történt, a dózis 100 és 225 egység napi adása között mozgott a tüszőérésától 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 follikulum punkciót végeztünk, az embrió(k) beültetése 3-5 nappal a follikulum punkció után történt.

A megkezdett aszpirin kezelést addig folytattuk, amíg vagy a menzesz jelentkezett, vagy negatív terhességi teszt történt, vagy ultrahang vizsgálat igazolta a magzati szív működést. 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 aszpirint 100 mg napi adagban adtuk, összesen 1503 ciklus során, a 2425 GnRh agonistával kezelt esetből.

3.2. 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 follikulum 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 α -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 FlexContol 2.4 szoftverrel, az értékelést pedig Bruker FlexAnalysis 2.4 szoftverrel végeztük.

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, 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 4⁰C-on.

3.3. 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.

3.3.1. 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-MOPSTM médiumban (Vitrolife[®]) 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.

3.3.2. Fertilizációs módszerek

A petesejteket a későbbi megtermékenyítési módszernek 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-MOPSTM tápoldatban (Vitrolife[®]). A fennmaradó petesejtek fertilizációja a konvencionális IVF technikával történt bikarbonát puffer tápoldatban (G-IVFTM, Vitrolife[®]). A fertilizációt 24 óra elteltével G-1TMv5 tápoldatban ellenőriztük (Vitrolife[®]). Az embriók beültetése 3-5 nappal a petesejtnyerés után történt. A 3. naptól a blastociszta stádiumig az embriókat G-2TMv5 tápoldatban (Vitrolife[®])

tenyésztettük. A használt tápoldatok egyike sem tartalmazott folsavat, a G-IVFTM nem tartalmazott metionint, ugyanakkor a többi médium igen (G-MOPSTM, G-1TMv5, G-2TMv5).

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.[®]).

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

3.3.3. Laboratóriumi vizsgálatok

A tüsszőfolyadék l-arginin, ADMA, SDMA és MMA koncentrációjának meghatározása az irodalomban közölt „liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS) módszerrel történt.

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:

$$\text{Arg-MI} = (\text{ADMA} + \text{SDMA}) / \text{MMA}.$$

3.3.4. 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 χ^2 próbát végeztünk. Az 1. csoporton belüli kezelt és nem kezelt alcsoport összehasonlításakor Yates korrekciót alkalmaztunk a χ^2 próba kiegészítésére.

A PACAP38 follikuláris folyadékban való jelenlétének vizsgálata során nyert eredményeink értékelése során a nyert petesejtek és a tüsszőfolyadék 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-teszttel analizáltuk.

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

4. Eredmények

4.1. Ovariális hiperstimulációs szindróma profilaxisának lehetősége

Az aspirin 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 aspirin 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. 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 aspirin adását tovább folytattuk, ezzel párhuzamosan azonban kis molekulású heparin (LMWH) adását kezdtük tromboprofilaxisként.

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

Az alacsony rizikójú, aspirin kezelésben részesülő betegek között ($n=723$) nem fordult elő súlyos, vagy kritikus stádiumú OHSS (0%). Hasonlóképpen, az alacsony rizikójú, aspirinnel nem kezelt csoportban ($n=510$) sem észleltünk a súlyos vagy kritikus stádiumú OHSS-t.

4.2. PACAP 38 jelenléte a tüszőfolyadékban

4.2.1. 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. 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.

4.2.2. Szuperovulációs kezeléssel elért folliculus-számok

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

4.2.3. 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.

4.2.4. Folliculus 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 mutatottak.

A fentiekkel megegyező cut-off értéket és csoportokat használva a betegenként nyert petesejt számok medián értékei a hP (n=12), hO (n=17) és IP-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.

4.2.5. 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.

4.3. 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.

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: ≤ 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.

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.

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.

5. Megbeszélés

5.1. Ovariális hiperstimulációs szindróma profilaxisa aszpirinnel

Az ovariális hiperstimulációs szindróma egy súlyos, potenciálisan életveszélyes, iatrogén állapot, melyet a túlstimulált petefészekből kiáramló vasoaktív 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. 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. 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 betegségtől.

Ezek alapján állítottuk fel azt a hipotézist, mely szerint az aszpirin kezelés önmagában is alkalmas az OHSS prevenciójára. 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. Ugyanakkor miután csupán két esetben észleltünk aszpirin kezelés mellett súlyos, vagy kritikus OHSS-t, minden esetben ajánljuk a profilaktikus, alacsony dózísú aszpirin adását azoknak a betegeknél, akik OHSS szempontjából magas rizikójúak a kórkép prevenciójára, illetve a tünetek enyhítése céljából.

5.2. 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. Ezen kívül kimutatták a PACAP receptort is a fejlődő tüszőkben. A sárgatestben mind a PACAP-ot, mind a PAC1 receptort kimutatták. Valószínű, hogy a peptid szerepet játszik a primordiális csírasejtek proliferációjában, az éretlen tüszők ciklikus kiválasztódásában és a fejlődés elindításában, a petesejtek meiotikus fejlődésében és a petefészek hormon- illetve enzim termelésében. Az általunk végzett vizsgálatban a PACAP-ot kimutattuk a tüszőfolyadékból. 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 folliculáris 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 betegekben, akiknek szignifikánsan több tüszője van a hCG adás napján.

Egy korábbi prospektív tanulmányban az OHSS kialakulása szempontjából a hCG adásakor kritikus tüszőszám 13 volt. Ez a cut-off érték egybeváág 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.

5.3. Az NO rendszer kapcsolata az IVF kimenetelével

Vizsgálatunkkal igazoltuk, hogy az IVF kezelésben részt vevő nők tüszőfolyadéka 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 reprodukív 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. Ezzel együtt meg kell jegyezni, hogy olyan állatkísérletes modellben, ahol az NO rendszert kódoló génszakasz egyik allélját károsították, a beavatkozás nem járt reprodukív eltéréssel, ugyanakkor mindkét allél károsítása (iNOS/eNOS, eNOS/nNOS, iNOS/nNOS) a korai embrionális fejlődés gátlásával jár.

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.

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. *Per os* bevitt l-arginin szupplementáció kontrollált ovarialis 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. Ezek az eredmények alátámasztják saját megfigyeléseinket, miszerint az emelkedett tüszőfolyadék l-arginin szint alacsonyabb petesejt és embriószámmal jár. Másrészt a kora terhességben étrendszerűen alkalmazott arginin bevitel megnövelte az embrió túlélést és lecsökkentette a szérum l-arginin és NO metabolit szintjét patkányban.

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 gyulladáscsökkentő citokinek közötti szinergizmus hozzájárul a különböző metilargininek akkumulációjához és elősegíti az l-arginin/NO rendszer integritását. 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 metiltransferáz (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.

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 petesejtéret és a korai embrionális fejlődést kísérik. Ennek a folyamatnak azért van jelentősége, mert a tüszőfolyadékban lévő SDMA, mely nem megy keresztül enzimatis degradáción, 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. Az arginin metilációs index csupán a metiláció folyamatát számszerűsíti, magát a metil csoportot ehhez a folyamathoz a folát dependens homocisztein/metionin ciklus nyújtja. 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.

Mindent egybevetve, a tüszőfolyadék 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. További tanulmányok szükségesek a metilarginin pontos hatásának feltérképezésére IVF során.

6. Új eredmények összefoglalása

6.1. 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.

6.2. 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.

6.3. 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.

6.4. 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 reprodukív 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.

7. 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. Reglódi Dórának** és **Dr. Brubel Rékának** önzetlen segítségükért az Anatómia Intézetből.

Hálával tartozom továbbá **feleségemnek** és **gyermemeimnek** a segítő támogatásért.

8. Tudományos közlemények, előadások listája

8.1. Az értekezés témakörében megjelent tudományos közlemények

Varnagy A., Koppan 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., Koppan 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)

Koppan 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)

8.2. Az értekezés témakörében elhangzott előadások

Brubel R., Reglodi D., Tamas A., Lubics A., Matkovits A., Kiss P., Varnagy A., Koppan 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., Koppan 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.

8.3. 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)

8.4. 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 szövödményei. *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 MgSO₄ 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 A.**, Szabó I. Fetal Pulse Oximetry in Our Clinical Practice. *XIX European Congress of Perinatal Medicine*, Athen, 2004.10.13.

Tamas P., **Várnagy A.**, 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 azoospermiás 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., **Várnagy 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