

A hiperstimulációs kezelés hatása a follikulus folyadék hormontartalmára és a megtermékenyülésre

NAGY BÁLINT DR.¹, FORGÁCS VINCE DR.²,
CSÖMÖR SÁNDOR DR.¹, PULAY TAMÁS DR.¹,
GIMES REZSŐ DR.¹, LINDEISZ FERENC³,
HÁRSHEGYI ILONA², PAULIN FERENC DR.¹,
CSÉPLI JÓZSEF DR.²

A Semmelweis Orvostudományi Egyetem I. Női Klinikája (igazgató: Csömör Sándor dr., egyetemi tanár)¹, a Fővárosi Jahn F. Kórház Szülészeti és Nőgyógyászati Osztálya (főorvos: Csépli József dr.)² és a Semmelweis Orvostudományi Egyetem Számítógépközpontja (igazgató: Sali Attila)³ közleménye

Összefoglalás: A szerzők 42 in vitro fertilizáció és embriótransferben résztvevő beteg follikulus folyadékának ösztradiol, FSH, LH, progeszteron és tesztoszteron tartalmát határozták meg radioimmunoassay-vel. A peteérés elősegítésére Pergonal és Clostilbegyt/Pergonal kezelést alkalmaztak. Megállapították, hogy az érett és megtermékenyülésre képes petesejtek a magas ösztradioltartalmú tüszőkből származnak, és lényeges különbséget találtak e hormon szintjében a petesejtet tartalmazó és az üres follikulusok között (E_2 : 454 ± 376 ng/ml; 176 ± 223 ng/ml; $p = 0,0001$). A többi vizsgált hormon nem mutatott lényeges összefüggést a megtermékenyüléssel.

Kulcsszavak: follikulus folyadék, hiperstimulációs kezelés, hormontartalom, megtermékenyülés

A petefészek fiziológiájában, így a petesejt érésében és az ovulációban a follikulus folyadéknak jelentős szerepe van. Az első nagyobb tanulmányt e témában 1974-ben Edwards közli [6].

Az in vitro fertilizáció (IVF) és embriótranszfer (ET) világméretű elterjedésével lehetőség nyílt a pete-nyerés során leszívott follikulus folyadék részletes analízisére.

Vizsgálataink során az IVF alkalmával nyert follikulus folyadékok ösztradiol, progeszteron, tesztoszteron, follikulus stimuláló hormon (FSH) és luteinizáló hormon (LH) tartalmát határoztuk meg, és megvizsgáltuk, hogy a hiperstimulációs kezelés a hormontartalmat mennyire befolyásolja és hogy a megtermékenyüléssel milyen összefüggés mutatkozik.

Anyag és módszer

A follikulus folyadék és a peritoneális folyadék az IVF és ET programunkba bevont 42 asszonytól származik, akik Clostilbegyt/Pergonal, (I. csoport) (29 fő) vagy csak Pergonal (II. csoport) (13 fő) stimulálást kaptak. Szuperovulálásra 7500 E humán chorionadotropin hormont (hCG) használtunk [9, 11, 12, 14]. A pete-nyerés laparoszkópiás módszerrel történt [9, 12, 14]. A leszívott follikulusokból sztereomikroszkóppal megkerestük a petesejteket, majd invert, fáziskontraszt-mikroszkóppal megállapítottuk az érettségüket [16]. A nyert folyadékokat 1500 g-vel lecentrifugáltuk és a hormonmeghatározásokig -20°C -on tároltuk. A peritoneális folyadék a Douglas üregben található folyadék leszívásából származik.

A petesejteket 4–6 óráig 7,5%-os anyai szérumtartalmú Ham's F-10 tápoldatban előinkubáltuk, majd a felülszűrtatásos technikával nyert spermiumok hozzáadásával megtermékenyítettük (100 000 spermium/petesejt). 18–24 óra múlva a cumulussejteket eltávolítottuk a petesejtekről, és fáziskontraszt-mikroszkóppal a megtermékenyülésre (a pronucleusok és a polaris testek megjelenése) kémleltünk [1, 9, 11, 14, 16]. Az osztódás a következő 24 órában volt megállapítható (48 órával a pete-nyerést követően), amikor Rüsck, illetve Wallace katéterek segítségével az embriótranszfert

megtermékenyült, ill. kettő-négysejtes állapotban elvégeztük. Az ösztradiol (SÉRONO), progeszteron (MTA Izinta), tesztoszteron (MTA Izinta), FSH (Pharmacia), LH (Pharmacia) meghatározások RIA I²⁵ módszer segítségével történtek a használati utasításban foglaltak szerint.

102 follikulus folyadékból ösztradiol, 67-ből LH, 68-ből FSH, 52-ből progeszteron és 63-ből tesztoszteron meghatározást végeztünk. 10 peritoneális folyadékból minden hormont meghatároztunk. Egy betegről 1–3 follikulus folyadékmintát vizsgáltunk, melynek mennyisége 2–13 ml között váltakozott. Nem használtuk fel azokat a folyadékokat, amelyek a leszívás során vérrel keveredtek.

Az adatok statisztikai kiértékelését BMDP és SPSS programok felhasználásával végeztük, a szignifikancia szintjét $p \leq 0,05$ -ben határoztuk meg.

Eredmények

a) Különböző stimulálás hatása a follikulus folyadék hormontartalmára

Clostilbegyt/Pergonal és Pergonallal stimulált betegek follikulus folyadéktartalmának az összehasonlításakor az ösztradiolszintek szignifikánsan magasabbnak bizonyultak az első csoportban ($E_2 = 454 \pm 376$ ng/ml; $176 \pm 223,6$ ng/ml $P = 0,0001$).

Az LH és FSH esetében a második csoportban kaptunk magasabb hormonszinteket (LH $28,9 \pm 14,3$ IU/l; $54,8 \pm 36,3$ IU/l $p = 0,0001$; FSH $4,6 \pm 2,6$ IU/l; $7,6 \pm 5,6$ IU/l $P = 0,004$) (lásd I. táblázat).

A tesztoszteron vizsgálatakor a II. csoportnál magasabbak a szintek, de a különbség nem szignifikáns ($4,77 \pm 3,48$ ng/ml; $7,52 \pm 3,15$ ng/ml $P = 0,06$) (lásd I. táblázat).

Progeszteron esetében közel megegyező eredményeket kaptunk ($1347 \pm 1048,3$ ng/ml és $1225 \pm 1031,5$ ng/ml $P = 0,451$) (lásd I. táblázat).

A hiperstimulációs kezelés hatása a follikulus folyadék hormontartalmára

	A vizsgált hormon									
	Ösztradiol (ng/ml)		LH (IU/l)		FSH (IU/l)		Progeszteron (ng/ml)		Tesztoszteron (ng/ml)	
	I. csop.	II. csop.	I. csop.	II. csop.	I. csop.	II. csop.	I. csop.	II. csop.	I. csop.	II. csop.
Átlag	454	176	28,9	58,4	4,6	7,6	1347,4	1225,3	4,77	7,52
Standard deviáció	376,1	223,6	14,3	36,3	2,6	5,6	1048,3	1031,5	3,48	3,15
Standard hiba	50,2	32,9	3	5,4	0,5	0,8	240,5	179	0,79	0,47
Mintaszám	56	46	22	45	23	45	19	33	19	44
Szignifikancia szintje (P)	0,0001		0,0001		0,004		0,451		0,06	

I. csop. = Clostilbegyt/Pergonal stimuláltak

II. csop. = csak Pergonallal stimuláltak

II. táblázat

A follikulus folyadék ösztradioltartalma (ng/ml) és a megtermékenyülés

	A hiperstimulációs kezelés							
	I. csoport				II. csoport			
	Petesejt		Megterm.		Petesejt		Megterm.	
	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
Átlag	292,5	576,5	479	634	123,6	265,2	115	311,5
Standard deviáció	354,4	349,4	422	293	117	320	67,9	355,3
Max. érték	1100	1500	1500	1300	450	1400	190	1400
Min. érték	2	52	52	170	10	25	25	110
Mintaszám	24	32	12	20	29	17	4	13
Szignifikancia szint (P)	0,0006		0,15		0,12		0,24	

A csoportok megegyeznek az I. táblázatban közöltekkel

Petesejt (+) és (-) = találtunk petesejtet vagy nem

Megterm. (+) és (-) = megtermékenyült a petesejt vagy nem

b) A follikulus folyadék hormontartalma és a petesejt megtermékenyülése közötti összefüggés vizsgálata
Ösztradiol

Azokban a follikulusokban, amelyekben petesejtet találtunk, magasabb ösztradiolszinteket mértünk mind a két stimulálási módszer esetében, azonban csak a I. csoportban szignifikáns a különbség (lásd II. táblázat), (I csop. $292,5 \pm 354,4$ ng/ml és $576,5 \pm 292,5$ ng/ml $P = 0,0006$, II. csop. $123,6 \pm 117$ ng/ml és $265,2 \pm 320$ ng/ml $P = 0,12$). A megtermékenyülés

a még magasabb ösztradiolszintekkel járt együtt (I. csoport $311,5 \pm 355,3$ ng/ml és $115 \pm 67,9$ ng/ml; II. csoport 634 ± 293 ng/ml és 479 ± 422 ng/ml) (lásd II. táblázat).

LH

Az LH-szintek a II. csoportban bizonyultak magasabbnak (lásd I. táblázat), a petesejttartalom és a megtermékenyülés vizsgálatakor nem találtunk összefüggést az LH-tartalommal (lásd III. táblázat).

III. táblázat

A follikulus folyadék LH-tartalma (IU/l) és a megtermékenyülés

	A hiperstimulációs kezelés							
	I. csoport				II. csoport			
	Petesejt		Megterm.		Petesejt		Megterm.	
	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
Átlag	25	34,6	41,7	29	61,6	53,1	72	47,3
Standard deviáció	12	16,2	21,1	10	36,3	36,7	37	35,9
Szignifikancia szint (P)	NS		NS		NS		NS	

A rövidítések a II. táblázatban közöltekkel egyeznek meg

IV. táblázat

A follikulus folyadék FSH-tartalma (IU/l) és a megtermékenyülés

	A hiperstimulációs kezelés							
	I. csoport				II. csoport			
	Petesejt		Megterm.		Petesejt		Megterm.	
	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
Átlag	4	5,3	4,9	5,8	7,2	8,2	9,5	7,9
Standard deviáció	2,2	2,9	1,9	3,9	4,9	6,8	4,7	7,4
Szignifikancia szint (P)	NS		NS		NS		NS	

A rövidítések a II. táblázatban közöltekkel egyeznek meg

V. táblázat

A folliculus folyadék progeszterontartalma (ng/ml) és a megtermékenyülés

	A hiperstimulációs kezelés							
	I. csoport				II. csoport			
	Petesejt		Megterm.		Petesejt		Megterm.	
	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
Átlag	1546	1325	1019	1509	1664	702	910	650
Standard deviáció	1032	1126	1478	1006	1051	742	685	775
Szignifikancia szint (P)	NS		NS		0,007		NS	

A rövidítések a II. táblázatban közöltekkel egyeznek meg

VI. táblázat

A folliculus folyadék tesztoszterontartalma (ng/ml) és a megtermékenyülés

	A hiperstimulációs kezelés							
	I. csoport				II. csoport			
	Petesejt		Megterm.		Petesejt		Megterm.	
	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
Átlag	5,4	3,5	4,5	2,8	7,7	7,1	6,9	7,2
Standard deviáció	3,5	3,2	3,8	3,0	3,0	3,4	2,9	3,6
Szignifikancia szint (P)	NS		NS		NS		NS	

A rövidítések a II. táblázatban közöltekkel egyeznek meg

FSH

Az FSH-szintek is a II. csoportban bizonyultak magasabbnak (lásd I. táblázat), a petesejttartalom és a megtermékenyülés vizsgálatok nem találtunk összefüggést az FSH-tartalommal (lásd IV. táblázat).

Progeszteron

Progeszteron esetében a I. és II. csoportban közel azonosak a szintek (lásd I. táblázat). A petesejttartalom és a megtermékenyülés, valamint a progeszterontartalom között nem találtunk összefüggést (lásd V. táblázat).

Tesztoszteron

A tesztoszteronszintek a II. csoportban magasabbak (lásd I. és VI. táblázat).

c) Peritoneális folyadék

A peritoneális folyadékban alacsony ösztadiol értékeket, de magas egyéb hormonszinteket találtunk (lásd VII. táblázat).

Megbeszélés

Az in vitro fertilizációs programokban az egyik fő cél az, hogy minél több érett petesejtet lehessen nyerni az adott ciklusban, ezáltal nagyobb az esély a többes embriótranszferre, vagy a „felesleges” embriók lefagyasztására és egy későbbi ciklusban való visszahelyezésére. Statisztikailag igazolt, hogy háromnál több embriót egyszerre nem érdemes transzferálni, de háromig a beágyazódásban egymást segítik. Vannak azonban olyan sikeres hiperstimulációs ciklusok, amikor 10–12 petesejtet is sikerül nyerni. Stone és mtsai kimutatták, hogy az FSH-val egyedül, vagy clomiphenecitrát/hMG-val kezelt hiperstimulációs ciklusok kedvezőbbek a folliculusok érésének mint a csak hMG, vagy FSH/hMG stimulált ciklusok, és magasabb megtermékenyülési arány érhető el az előbbieknél [15].

A petesejt minőségét jelentős mértékben befolyásolja az a közeg, amelyben az fejlődött, így a folliculus folyadék összetételének (fehéreje, hormon és egyéb anyag tartalmának) meghatározó a szerepe [7, 8, 13, 15].

A folliculus folyadék hormontartalma az érés során jelentősen változik, ebben jelentős szerepet játszanak a granulózasejtek, amelyek megváltoztatják a ciklus folyamán a szteroid-termelő képességüket. Az elsődlegesen ösztadiol-termelő sejtek LH hatására, vagy stimulált ciklusokban a bevitt hCG hatására progeszteron termelőkké válnak. A folliculus folyadék progeszterontartalma szorosan kapcsolódik a petesejt érettségével, és összefügg a „petesejt érést gátló” anyag csökkenő mennyiségével [8]. Érett petesejtek és terhességek a magas ösztadiol- és progeszterontartalmú folliculusokból származnak. Az alacsony FSH, prolaktin, progeszteron-, dihidrotesztoszteron- és androszterontartalmú folliculus folyadékokból származó petesejtek általában éretlenek. Más szerzők a magas ösztadiol és alacsony progeszteron tartalmat tartják kedvezőnek [5].

Előfordul azonban az is, hogy magas ösztadioltartalom alacsony progeszterontartalommal és a petesejt hiányával jár együtt, ez az „üres folliculus szindróma”, amikor is normális méretű folliculusok fejlődnek a stimulálás során, de petét nem tartalmaznak [4, 18].

Vizsgálataink során két hiperstimulálási protokollt használtunk, egyikben Clotilbegyt/Pergonal (I. csoport), a másikban csak Pergonalt (II. csoport) alkalmaztunk a peteérés elősegítésére. A folliculus folyadék ösztadioltartalmát összehasonlítva a két csoportban,

VII. táblázat

A peritoneális folyadék hormontartalma

Hiperstimulációs kezelés	A vizsgált hormon				
	Ösztadiol (ng/ml ± SD)	LH (IU/l ± SD)	FSH (IU/l ± SD)	Progeszteron (ng/ml ± SD)	Tesztoszteron (ng/ml ± SD)
I. csoport (n=2)	59 ± 74	35 ± 18	5,5 ± 2,0	1086,4 ± 540	8,2 ± 0,5
II. csoport (n=8)	54,6 ± 110	57,5 ± 80	6,6 ± 7,5	1100 ± 1619	7,8 ± 5,5

A rövidítések megegyeznek a I. táblázatban közöltekkel

az elsőben lényegesen magasabb szinteket találtunk (454 ± 376 ng/ml, illetve $176 \pm 223,6$ ng/ml, ($P = 0,0001$), a nyert peték számában nem volt lényeges különbség, de az I. csoport a hazai monitorizálási körülmények között jobban kézben tartható. Stone és mtsai is arra a következtetésre jutottak, hogy magasabb megtermékenyülési arány érhető el clomiphene citrát/hMG kezelt ciklusokban [15].

Az LH- és FSH-szintek Pergonal-stimulált betegeknél magasabbak voltak, mint I. csoportban, itt az exogén bevitt hormonmennyiség kb. kétszerese mint a Clostilbegyvet is kapott csoportnál, feltehető, hogy ez is szerepet játszik az eltérésben.

A progeszteronnal kapcsolatban, hogy az alacsony, vagy a magas szint a kedvező [15], eltérőek a világirodalmi adatok is. A mi adataink nem egyértelműek, így összefüggést nem tudtunk megállapítani. A két vizsgált nagyobb csoportban közel azonosak a progeszteronértékek, ebben szerepet játszhat az alkalmazott kit érzékenysége is.

A tesztoszteron szintek a II. csoportban bizonyultak magasabbnak.

Összefoglalva, kétféle hiperstimulálási módszert alkalmazva, majd a follikulus aspiráció során nyert follikulus folyadék hormontartalmát megvizsgálva, lényeges különbséget találtunk az ösztradioltartalommal és a megtermékenyüléssel. A magas ösztradiol az érett, megtermékenyülésre képes petesejteket tartalmazó follikulusok jellemzője. Az FSH- és LH-tartalom a csak Pergonallal stimulált ciklusokban magasabbnak bizonyult. A progeszteronszintekben nem volt lényeges eltérés a két csoportban.

Három esetben az „üres follikulus szindrómával” találkozottunk, amikor is 1000 ng/ml-nél magasabb ösztradiolértékeket mértünk, de petesejtet nem tartalmaztak ezek a tüszők.

IRODALOM

1. Arny, M., Quagliarello, J.: Semen quality before and after processing by a swim-up method relationship to outcome of intrauterine insemination. *Fertil. Steril.* 48, 643–649 (1987). — 2. Bagdasarian, A., Wheeler, J., Stewart, G. J., Ahmed, S. S. és Colman, R. J.: Isolation of alpha-1-protease inhibitor from normal and malignant ovarian tissue. *J. Clin. Invest.* 67, 281–291 (1981). — 3. Channing, C. P., Liu, H.-C., Jones, G. S., Jones, H. W. jr.: Decline of follicular oocyte maturation inhibitor coincident with maturation and achievement of fertilizability of oocytes recovered at midcycle of gonadotropin treated women. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80, 4184 (1983). — 4. Coulam, C. B., Bustillo, M., Schulman, J. D.: Empty follicle syndrome. *Fertil. Steril.* 46, 1153 (1986). — 5. DeCherney, A. H., Tarlatzis, B. C., Laufer, N.: Follicular development: lessons learned from human in vitro fertilization. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 153, 911 (1983). — 6. Edwards, R. G.: Follicular fluid. *J. Reprod. Fertil.* 37, 189–219 (1974). — 7. Imoedemhe, D., Shaw, R. V.: Follicular fluid alfa-1-antitrypsin correlation with fertilising capacity of oocytes. *Br. J. Obstet. Gynecol.* 93, 863–868 (1986). — 8. Kreiner, D., Liu, H.-C., Itskovitz, J., Veeck, L., Rosenwaks, Z.: Follicular estradiol and progesterone are markers of preovulatory oocyte quality. *Fertil. Steril.* 48, 991–994 (1987). — 9. Lopata, A., Nayudu, P., Jones, G., Abramczuk, J.: The quality of human embryos obtained by in vitro fertilisation. In: *Human in vitro fertilisation*. (Eds.: Testart, J., Frydman, R.) Elsevier Sci. Publ. B. V., Amsterdam, 1985. — 10. Manarang-Pangan, S., Menge, A. C.: Immu-

nologic studies on human follicular fluid. *Fertil. Steril.* 22, 367–373 (1973). — 11. Mandelbaum, J., Plachot, M., Cohen, J.: The use of clomid and hMG for in vitro fertilisation consequences for egg quality and luteal phase adequacy. In: *Fertilisation of the Human Egg in vitro*. (Eds.: Beier, H. M., Lindner, H. R.) Springer-Verlag, Berlin, 1983. — 12. McBain, J. C., Gronow, M. J., Bayly, C., Martin, M. J.: Controlled ovarian stimulation with clomiphene and hMG for in vitro fertilisation. In: *Recent Progress in Human in vitro fertilisation*. (Eds.: Feichtinger, W., Kemeter, P.) Vienna, 1984. — 13. Nagy, B., Pulay, T., Szarka, G., Csömör, S.: The serum protein content of human follicular fluid and its correlation with the maturity of oocytes. *Acta Physiol. Hung.* 72, 435–438 (1988). — 14. Plachot, M., Mandelbaum, J., Cohen, J.: Sequential use of clomiphene citrate, human menopausal gonadotropin and human chorionic gonadotropin in human in vitro fertilisation. *Fertil. Steril.* 43, 255–263 (1985). — 15. Stone, B. A., Vargyas, J. M., Marrs, R. P., Quinn, P. J., Batzofin, J. H., Fan, T., Kerin, J. F. P., Serafini, P. C.: Levels of steroid and protein hormones in antral fluids of women treated with different combinations of gonadotropins, clomiphene citrate and a gonadotropin-releasing hormone analog. *Fertil. Steril.* 49, 249–257 (1988). — 16. Testart, J.: Criteries devaluation de la qualite des oocytes et de leur aptitude a la FIV. *Ann. Biol. Clin.* 43, 17–212 (1985). — 17. Tsafiriri, A., Eckstein, B.: Changes in follicular steroidogenic enzymes following the preovulatory surge of gonadotropin and experimentally induced atresid. *Biol. Reprod.* 34, 783–787 (1986). — 18. Tsuiki, A., Bruce, I. R., Hung, T. T.: Steroid profiles of follicular fluids from a patient with the empty follicle syndrome. *Fertil. Steril.* 49, 105–107 (1988). — 19. Vale, W., Rivier, J., Vaughan, J., McClinton, R., Corrigan, A., Woo, W., Karr, D., Ess, J. S. P.: Purification and characterisation of an FSH-releasing protein from porcine ovarian follicular fluid. *Nature* 321, 776–779 (1986).

Надь, Б., Форгач, Ч., Чемер, Ш., Пулай, Т., Гимеш, Р., Линдас, Ф., Харшхеди, И., Паулин, Ф., Чепли, Й.: Действие гиперстимуляции на гормональное состояние фолликулярной жидкости и на оплодотворение.

Авторы определяли уровни эстрадиола, ФСГ, ЛГ, прогестерона, тестостерона фолликулярной жидкости 42 женщин, присутствующих в ИУТ-ЭТ программе. Определения произведены с методом радиоиммунессе. Пергонал и Клостилбегит/Пергонал были использованы для вызывания овуляции. Установлено, хорошие, зрелые клетки вышли из таких фолликулов, в которых уровень эстрадиола был высоким. Остальные гормоны не показали такие разницы.

Ключевые слова: жидкость фолликулов, гиперстимуляция, концентрация гормонов, оплодотворение

Nagy, B., Forgács, V., Csömör, S., Pulay, T., Gimes, R., Lindeisz, F., Hárshegyi, I., Paulin, F., Csépli, J.: The effect of a hyperstimulative therapy on the hormone content of the follicular fluid and on the fertilization of the oocytes

The authors measured the concentrations of the oestradiol, FSH, LH, progesterone in follicular fluids collected from 42 women participating in an IVF programme. Pergonal and Clostilbegyt/Pergonal treatment was used to get more oocytes. The authors found that the mature, fertilizable oocytes were obtained from those follicles, which had high levels of oestradiol, and they observed significant differences between the oestradiol concentrations of these follicles and the empty follicles (454 ± 376 ng/ml and 176 ± 223 ng/ml, respectively. $p = 0,0001$).

The other hormones studied did not show any correlation with the maturity and fertilizability of the oocytes.

Key words: follicular fluid, hyperstimulation, hormone content, fertilization

Közlésre elfogadva: 1988. december 22.