

CHIP-TECHNOLÓGIA ALKALMAZÁSA A HUMÁN IN VITRO FERTILIZÁCIÓ EREDMÉNYESSÉGÉNEK JAVÍTÁSÁBAN



PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM
UNIVERSITY OF PÉCS

SZÉCHENYI 2020



MAGYARORSZÁG
KORMÁNYA

Európai Unió
Európai Regionális
Fejlesztési Alap



BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

CHIP-TECHNOLÓGIA ALKALMAZÁSA A HUMÁN IN VITRO FERTILIZÁCIÓ EREDMÉNYESSÉGÉNEK JAVÍTÁSÁBAN

PROJEKT AZONOSÍTÓ: GINOP-2.3.2-15-2016-00021

Fő kedvezményezett: Pécsi Tudományegyetem
Megvalósítás ideje: 2016. október 1. – 2020. szeptember 28.
Támogatás összege: 1 975 947 500,- Ft
Támogatás intenzitása: 100%

Tájékoztató kiadvány a GINOP-2.3.2-15-2016-00021 számú pályázat megvalósításáról
Készült: 500 példányban a Pécsi Tudományegyetem kiadásában
Felelős szerkesztő: Prof. Dr. Kovács L. Gábor
Fotók: PTE archívum



BEVEZETŐ GONDOLATOK	6-9	PUBLIKÁCIÓK	113-116
A HUMÁN REPRODUKCIÓ KIHÍVÁSAI A XXI. SZÁZAD ELEJÉN	10-16	ÖSSZEFOGLALÁS	116-118
NONINVAZÍV EMBRIÓSZELEKCIÓ	17-29	A KIADVÁNY SZERZŐI	118-121
AZ EMBRIÓ ÉLETKÉPESSÉGÉNEK FEHÉRJEMARKEREI	30-39	A PROJEKT MENEDZSMENTJE ÉS MUNKATÁRSAI	122-123
AZ EMBRIÓ ÉLETKÉPESSÉGÉNEK ÉS BETEGSÉGEINEK GENETIKAI MARKEREI	40-54		
A FRAKTALKIN SZABÁLYOZÓ SZEREPE AZ EMBRIÓ BEÁGYAZÓDÁSÁNAK FOLYAMATÁBAN	56-65		
IN VITRO FERTILIZÁCIÓ HATÉKONYSÁGÁNAK NÖVELÉSE: ÚJ DIAGNOSZTIKAI TERMÉK SZÜLETÉSE	66-71		
EMBRIÓ-EREDETŰ EXTRACELLULÁRIS VEZIKULA; AZ EMBRIÓANYAI KOMMUNIKÁCIÓ ESZKÖZE, ÉS AZ EMBRIÓ BEÁGYAZÓDÁSI KÉPESSÉGÉNEK MUTATÓJA	72-79		
A TŰSZŐFOLYADÉK BIOMARKEREINEK VIZSGÁLATA IVF KEZELT BETEGEKBEN	80-87		
MOLEKULÁRIS KÉPALKOTÁS AZ IN VITRO FERTILIZÁCIÓ SZOLGÁLATÁBAN	88-97		
ÚJ BIOMARKER VIZSGÁLATOK FEJLESZTÉSE TESTNEDVEKBEN ÉS SEJTES MODELLBEN	98-107		
A PÁLYÁZAT FŐBB KERETSZÁMAI ÉS MUTATÓI	108-113		

BEVEZETŐ GONDOLATOK

Prof. Dr. Bódis József államtitkár, a Pécsi Tudományegyetem korábbi rektora

” ***A világ népessége folyamatosan nő, mely növekedés nem kiegyensúlyozott. Magyarországon és a fejlett világban negatív irányú demográfiai változások figyelhetők meg, melyek időzített bombát jelentenek társadalmi és gazdasági szempontból egyaránt. A helyzet komoly feladat elé állítja a politikai döntéshozókat és a reprodukció valamennyi területén dolgozó szakembereket is.*** Egy egészséges, termékeny emberpárnak a 20-as éveik közepén rendszeres nemi élet mellett minden hónapban 1:4-hez az esélye arra, hogy gyermekük megfogadjon. Ez azt jelenti, hogy 10-ből 8-9 pár esetében egy éven belül létrejön a várandósság. Meddőségről akkor beszélünk, ha rendszeres, fogamzásgátlástól mentes, gyermeket óhajtó szexuális élet ellenére egy év alatt terhesség nem jön létre. Egy év sikertelen próbálkozás után tekintik indokoltnak a meddőségi kivizsgálást a házaspárnál. Mintegy kétharmaduk szubfertilis, azaz valamilyen egyszerűbb kezelés segítségével születhet gyermekük. Magyarországon az összes meddőségi problémákkal küzdő házaspárok száma eléri a populáció 15%-át, közülük természetesen nem mindenki számára indokolt az IVF kezelés.

A közvélemény a meddőségi kezelést gyakorlatban a lombikbéli eljárással (IVF) teszi egyenlővé, pedig a lényeg éppen az, hogy minden beteg számára egyénre szabottan kell kiválasztani azt a módszert, amelyik a

legkevésbé megterhelő és egyben a legnagyobb hatásfokú. Egy modern meddőségi központban törekedni kell arra, hogy a lehető legmagasabb színvonalú legyen a betegek kivizsgálása és esetleges műtéti kezelése, akiknek pedig valóban IVF kezelés indokolt, azoknak a beavatkozás a lehető legkevésbé kockázattal és a legnagyobb sikerrel járjon. Problémaként merül fel az is, hogy többen vallási okokból kifolyólag elutasítják a nem természetes úton történő megtermékenyítést, számukra biztosítani kell az etikailag elfogadható kivizsgálási és kezelési lehetőségeket.

Hazánkban elsőként Pécsen indult meg a lombikbéli program 1988-ban. Az első hazai lombikbéli tíz évvel maradt el a világszínvonalától, mely tény önmagában is nagy jelentőséggel bír, illetve nagy lendületet ad a mai napig. A gyermek a Pécsi Orvostudományi Egyetem Szülészeti Klinikáján látta meg a napvilágot.

Az első sikeres eljárást követően minden, a világban alkalmazott modern módszer bevezetésre és alkalmazásra került a klinikai rutinban, mely jelentősen fokozta az eredményességet. Ezen túlmenően intenzív kutatás, fejlesztés és innováció folyik, melynek célja az eljárás eredményességének fokozásán túl az embrió maximális védelme!

A Humán Reprodukciós Nemzeti Laboratórium létrehozása az eddigi betegellátási és kutatási tevékenység elismerésén túl új dimenziót nyit ki az Intézmény, a társadalom és a humán reprodukciót meghatározó tudományok számára. ”

Az *in vitro* fertilizációval kapcsolatos kutatások hosszú és eredményeket hozó múltra tekintenek vissza a Pécsi Tudományegyetemen. Ebben meghatározó szerepe volt és jelenleg is a kutatások motorja Bódis József professzor. Munkatársai közül Koppán Miklós professzor és Várnagy Ákos docens úr hatékonyan támogatják együtt a junior kutatókkal. A munka az elmúlt évtizedben további lendület nyert Kovács L. Gábor professzor aktív támogatásával. Az együttműködő partnerek is többen vannak, közülük kiemelendő Szekeres Júlia professzor asszony, aki a reprodukciós immunbiológia, endokrinológia elismert szaktekintélye.

” A megtermékenyítés folyamata molekuláris szinten rendkívül összetett. A megtermékenyített petesejt vagy embrió állapotáról makroszkóposan is sok, de nem elégséges információ nyerhető. A megtermékenyítés valószínű hatásfoka molekuláris markerek segítségével feltehetően jobban megismerhető. A fejlődő embrió közvetlen mintavételes vizsgálata azonban igen nehezen kivitelezhető és kockázatos. Viszont ismert az, hogy a sejtek a környezetükbe is bocsájtanak ki molekulákat, illetve hatással vannak a tápfolyadék molekuláira. Ezek a jelenségek összefüggenek a sejtek állapotával, jó prediktorai lehetnek azok egészséges, vagy kóros fejlődésének. Az elmúlt évtizedek technikai fejlődése lehetővé tette azt, hogy igen alacsony koncentrációban jelen levő markereket is biztonsággal mérjünk. Ilyen módon lehetővé válik az életképesség hatékonyabb megítélése, a magasabb eredményességű *in vitro* fertilizáció.

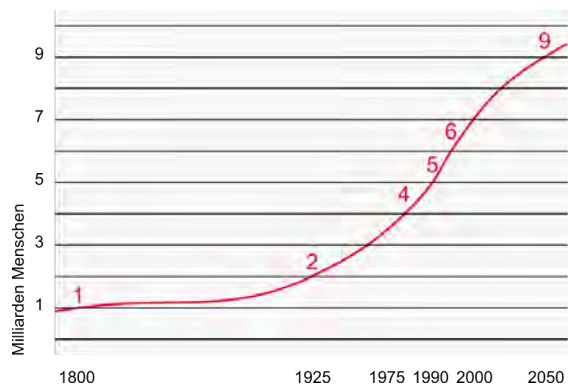
De a kutatók munkája nem korlátozódik csak erre, hanem pl. olyan érdekes jelenségre is, hogy a megvilágítás miként befolyásolja a fejlődő embriót. Túl ezeken a megtermékenyítés endokrin és immun aspektusaival kapcsolatos kutatások is folytatódnak.

Hazánk kormányának a népesség gyarapodását szolgáló népesedéspolitikai kiemelt fontosságú célja, melynek egyik aspektusa az, mellyel kutatóink foglalkoznak. A támogatás adott, tehetségben nincs hiány. A kutatócsoport eddigi eredményei megalapozták annak további fejlesztését. A Pécsi Tudományegyetem tudományfejlesztési stratégiai céljainak egyik fontos eleme ezeknek a kutatásoknak a támogatása, melyhez ezen az úton is sok sikert kívánok!

”

A HUMÁN REPRODUKCIÓ KIHÍVÁSAI A XXI. SZÁZAD ELEJÉN

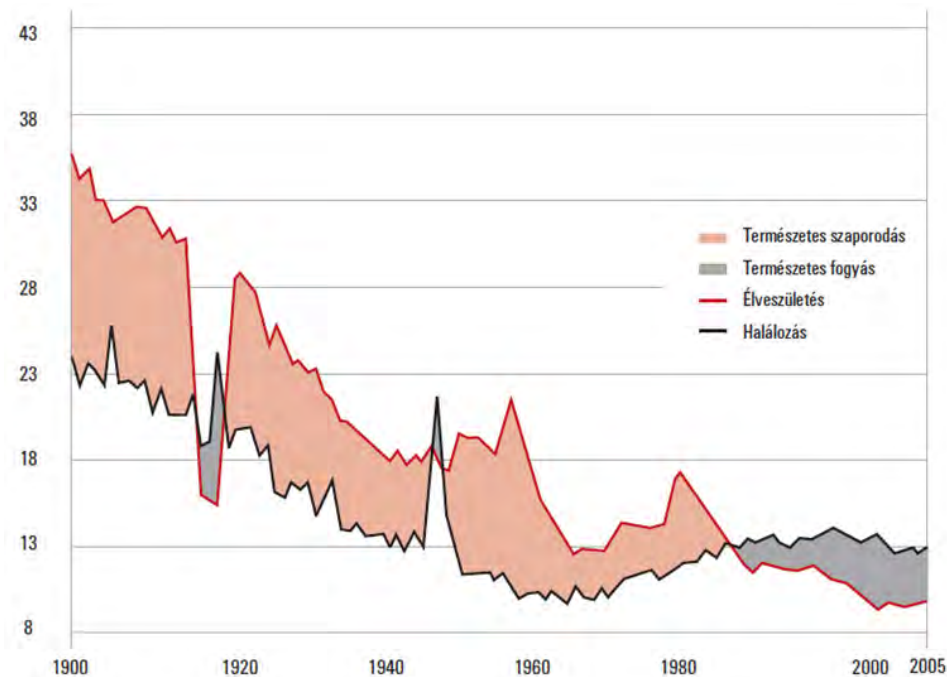
A Föld lakossága folyamatosan nő, de a világ régiói és országai tekintetében a növekedés nem egyenletes, sőt markáns különbségek figyelhetők meg. Általában megállapítható, hogy a gazdaságilag fejlett régiókban alacsony, a fejlődő országokban pedig magas a reprodukciós arányszám. Mértékadó előrejelzések szerint 2050-re az emberiség létszáma 9 Mrd fölé emelkedik. Napjainkban ez a szám csaknem eléri a 8 Mrd-ot (1. ábra).



1. ábra: A Föld népességének növekedése és annak jövőbeli becslése (nepesseg.com)

A FÖLD LAKOSSÁGÁNAK FEJLŐDÉSE

A reprodukciót jellemző un. fertilitás index tekintetében Niger vezette a listát 2017-ben 7,1-es értékkel; India éppen produkálta a szimpla reprodukciót 2,1-el, Kína 1,5-el alig haladta meg Németország 1,4-es értékét. Európában Franciaország volt és van az élen 1,9-el. Magyarország reprodukciós indexe emelkedő tendenciát mutatva 1,53-al az európai középmezőnyben szerepel. A reprodukció szempontjából kifejezetten negatív tendencia elsősorban a gazdaságilag fejlett országokban, hogy az első gyermek vállalásának időpontja egyre magasabb életkorra esik (Európában jelenleg 29,3 év, Magyarországon 28,2 év). Közismert, hogy a termékenység az életkor előrehaladtával progresszíven csökken és nagyjából 40-45 éves életkorra a nullát közelíti, illetve éri el. A vázolt negatív trend sajnos Magyarországon is évtizedek óta megfigyelhető, melynek eredményeként az 1980-as évek közepén a természetes szaporodás és fogyás grafikonon ábrázolt vonala keresztezte egymást (2. ábra), s azóta a magyar reprodukciót a természetes fogyás határozza meg! A közelmúlt történelmében ilyen helyzet csak a két világháború idején volt jellemző.



2. ábra: Magyarország népességének alakulása (KSH)

TERMÉSZETES SZAPORODÁS ÉS FOGYÁS MAGYARORSZÁGON

A reprodukció területén minden „kis” előrelépés óriási jelentőséggel bír és nagyon nagyra becsülendő, ugyanakkor nem dőlhetünk hátra, mert még messze vagyunk az áhított kettő feletti értéktől! Ebben a kiadványban az elmúlt évtized humán reprodukció területén végzett kutatási-innovációs törekvéseit, kiemelten az elmúlt négy év eredményeit valamint közeljövő programját mutatjuk be.

Általánosságban elmondható, hogy ma Magyarországon minden eszközzel és módszerrel rendelkezünk a humán reprodukció, azon belül a szorosabban vett meddőségi diagnosztika és kezelés tekintetében.

Rendelkezésre állnak a laboratóriumi diagnosztika eszközei a hormonális kivizsgálás (FSH, LH, PRL, TSH, AMH, szexuális szteroidok, pajzsmirigy-, és mellékvese hormonok, CH-anyagcsere, inzulin rezisztencia), az immunológiai kivizsgálás, valamint a genetikai kivizsgálás céljaira. Évtizedek óta rendelkezésre áll a diagnosztikus és operatív hiszteroszkópia és laparoszópia, melyekkel vizsgáljuk a reprodukzív szervek anatómiáját, azok eltéréseit, s melyekkel minimálisan invazív módon, a lehető legkisebb megterheléssel oldhatók a meddőséget okozó összenövések, szinechiák, eltávolíthatók a polipok, a lezárt petevezetők átjárhatóvá tehető, a ciszták és miómák eltávolíthatók, az endometriózis ugyancsak eltávolítható, sőt rosszindulatú elváltozások ideg-, és szervkímélő módon operálhatók!

Rendelkezésre állnak a legkorszerűbb ovuláció indukciós gyógyszerek a klomifén citráttól a gonadotrop hormonokon át (vizelet eredetű vagy rekombináns FSH készítmények) a GnRH agonistákig és antagonistákig. Szükség esetén az említettek kombinálása bromocriptinnel, glucocorticoidokkal, metforminnal, stb. A különböző intézmények a petefészek stimulációjára ezeket a gyógyszereket az ultrashort, short és a long

protokollok módszerével alkalmazzák az egyénre szabott terápia szellemében.

A daganatos betegek ellátásában korábban nem látott sikereket értek el a legkülönbözőbb rosszindulatú betegségek vonatkozásában, melynek eredményeként ma már nem csak a gyógyulás, hanem az érintett szervek funkcióinak megtartása is realitás. Az új megközelítés és modern módszerek a gyógyult betegeknek más életminőséget jelentenek, melyben ma már realitás a gyermekvállalás is! A módszertani lehetőségek között megtaláljuk a megelőzés (védőoltás!), a szűrés, a korai és komplex diagnosztika (citológia, hisztológia, UH, CT, MRI, PET, SPECT-CT, PET-CT, PET-MRI) és az adequat kezelés (tumor eltávolítás, nyirokcsomó eltávolítás, trachelectomia, szentinel nyirokcsomó excízió, stb.) hagyományos és legmodernebb eszköztárát és módszertanát.

A gyermekvállalás vonatkozásában a személyre szabott gyógyítás szempontjai szerint szóba jön az onkológiai kezelés előtti petesejt nyeres és fagyasztás stimulált ciklusból, illetve természetes ciklusból, valamint az embrió fagyasztása. Ugyancsak lehetőség van a kezelés előtti petefészek (vagy egy részének) eltávolítására, majd a gyógyulást követő transzplantációra. Ma már a szakmai gondolkodás és a realitás része szükség esetén a méh transzplantációja is. Természetesen minden említett módszer sikeréhez szükség van asszisztált reprodukciós módszerek alkalmazására.

1978-óta a világban, 1988-óta Magyarországon is realitás az in vitro fertilizáció, mely módszer a bevezetés óta igen komoly fejlődésen ment keresztül. Természetes ciklusban nagy eséllyel egy petesejt nyerhető, stimulált ciklusokban rendszerint több petesejthez jutunk, melyek révén több embrió indul fejlődésnek, növelve a várandósság létrejöttét. Egyre növekvő igény van a természetes ciklusokból nyerhető petesejtekre, hiszen ez a módszer szükségtelenné teszi a komoly hormonterhelést. Ugyancsak egyre több páciens részéről elvárás, hogy több rendelkezésre álló embrió esetén is csak egy kerüljön transzferálásra. Az természetes, hogy a transzferálásra nem kerülő embriókat lefagyasztjuk és egy későbbi ciklusban felhasználhatjuk. Ugyanakkor komoly és gyakorlati kérdésként merül fel, hogy milyen módszerrel választjuk ki a visszahelyezendő embriót vagy embriókat? A legszélesebben alkalmazott kiválasztási módszer az embrió morfológiájának vizsgálatán alapul, az egyszerű mikroszkópos módszertől a time lapse technikáig. Ez utóbbi nem csak az embrió morfológiájáról ad fontos információkat, hanem az embrió fejlődésének dinamikájáról is. Egyre szélesebben alkalmazott módszer.

A másik irány a préimplantációs genetikai diagnosztika (PGD), illetve szűrés (PGS), melynek során az embrióból egy sejtet eltávolítanak, s alvetik genetikai és anyagcsere vizsgálatoknak. A módszer hatékonyságához nem

férhet kétség, ugyanakkor invazív volta komoly etikai kérdéseket is felvet.

A tíz éve elkezdett kutatásainkat a gaméták maximális védelme, valamint az **„EL A KEZEKKE AZ EMBRIÓTÓL!”** elv vezérelte. Ennek megfelelően kutatócsoportunk azt a célt tűzte ki, hogy az embriót körülvevő 40 ul tápoldatból találjunk olyan markereket és paramétereket, amelyek biztonsággal mutatják az embrió életképességét, minőségét és megta- padás képességét. A proteomikai vizsgálatok a legkorszerűbb tömeg- spektrometria alkalmazásával, a genetikai vizsgálatunk új generációs szekvenálással, mikrovezikulás meghatározásaink flow-citometriával történtek, a fényvédelmet az alkalmazott eszközök fóliázásával és speciális fényszűrő segítségével biztosítottuk. **Eredményeinkből számos publikáció és szabadalom született, melyekről a következő fejezetekben részletesen beszámolunk. Minden törekvésünk azt a célt szolgálja, hogy humán reprodukció előzőekben felvázolt XXI. századi kihívásaira a lehető legjobb szakmai válaszokat tudjuk adni!**



Prof. Dr. Koppán Miklós Endre



NONINVAZÍV EMBRIÓSZELEKCIÓ

A szervezeten kívüli megtermékenyítés az elmúlt négy évtizedben az orvostudomány, a nőgyógyászat rutin eljárásává vált. 1978-ban megszületett az első lombik-bébi, így az asszisztált reprodukciós technikák (ART) új távlatokat nyitottak azon gyermektelen párok számára, akik kezelésére korábban nem volt lehetőség. Világszerte több mint 5 millió gyermek született az ART eredményeként, a becslések szerint 1,5 millió in vitro megtermékenyítési (IVF) ciklust hajtanak végre világszerte évente, ami 350 000 gyermeket eredményez. Magyarországon a megszületett csecsemők 1,5-2%-a in vitro fertilizációs kezelést követően fogan, és a meddőség valamilyen formája a gyermeket tervező párok ötödét érinti.

A reprodukció endokrinológiája nagy fejlődésen ment át az elmúlt évtizedekben, melynek eredményeként nemcsak elméleti ismereteink bővültek, hanem a mindennapi klinikai gyakorlat számára is forradalmian új lehetőségek nyíltak meg.

Az asszisztált reprodukciós módszerek egyre növekvő hatékonyságára, valamint a szülés körüli élettani és kórélettani folyamatok behatóbb megismerése eredményeként imponálón javuló perinatális eredmények ellenére

az asszisztált reprodukciós módszerek eredményessége nem haladja meg az élettani reprodukciós rátát, s messze elmarad az elméletileg lehetséges sikerességtől.

Jelen módszerekkel a meddőségi kezelés elérte a határait, előre-lépés egyedül abban rejlik, hogy a kezelés során minél több olyan befolyásoló tényezőt tudjunk megismerni, amelyek az egészséges embriót jellemzik, és előre jelezhetik a sikeres terhességet.

A kezelés sikeressége jelenleg megfelel a spontán kialakult terhességi rátának, amiben szerepe van a humán embrió sérülékenységének, érzékenységének is. Ezek eredője, hogy mintegy 100 létrejött embrióból, mind spontán, mind pedig asszisztált keretek között csupán 30-ból alakul ki klinikai terhesség.

A számokat jól jellemzi az is, hogy egy metaanalízis rávilágított, miszerint az IVF születési hatékonysága a nyert petesejtek számához viszonyítva rendkívül alacsony, mindössze 3%, a beültetett embriók esetében ez az arány 9%. A vizsgálat során 61813 metafázis II (MII) petesejt kinyerése 24066 transzferált embriót eredményezett, melyből 2059 gyermek született.

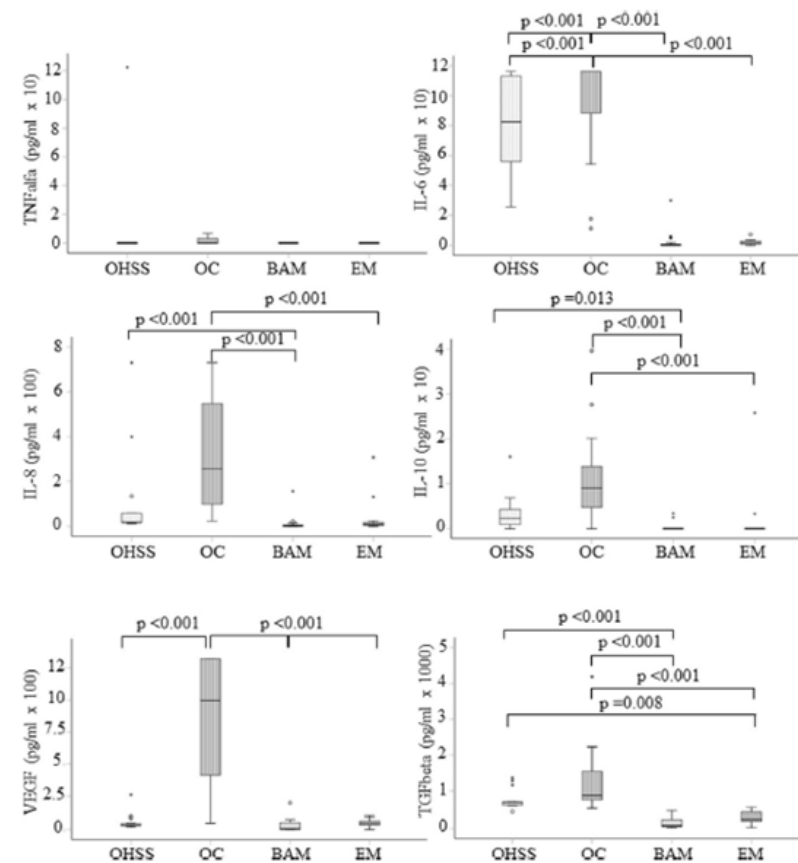
Kutatócsoportunk feladata többrétű volt, egyrészt megalapozni az embrionális tápoldat vizsgálatokat a petesejtekre, az embriókra és a reprodukciós eljárás határfokára jellemző potenciális biomarkerek és endogén faktorok meghatározásával. Vizsgálatot folytattunk az IVF eljárás legsúlyosabb potenciális mellékhatásának az Ovariális Hiperstimulációs Szindróma hátterének felderítésére irányában. Hatékony erőfeszítéseket tettünk az ivarsejtek és embriók védelme érdekében, csökkentve az őket ért környezeti hatások, elsősorban a fény károsító következményét. A molekuláris genetikai munkacsoporttal az embriók aneuploidia szűrésének irányában noninvazív szelektációs modell kidolgozásában vettünk részt, miközben folyamatosan elvégeztük a chip kipróbáláshoz szükséges klinikai vizsgálatokat., biztosítottunk a klinikai hátteret és a mintagyűjtést.

AZ OVARIÁLIS HIPERSTIMULÁCIÓS SZINDRÓMA (OHSS) HÁTTERÉNEK VIZSGÁLATA

Az asszisztált reprodukciós kezelések egyik legsúlyosabb, potenciálisan életveszélyes szövődménye, az ovariális hiperstimulációs szindróma. AZ OHSS egy az egész szervezetet érintő betegség, melynek kialakulásáért a túlstimulált petefészkekből kiáramló vasoaktív anyagok, citokinek felelősek. Bár a kórkép pontos mechanizmusa nem ismert, tény, hogy fokozott érpermeabilitással és trombocita aktivációval jár. Kialakulásában részt vesz a renin-angiotenzin rendszer, citokinek, mint az Interleukin-8 (IL-8), tumor nekrozis faktor alfa, endothelin-1, és vasculáris

endotheliális növekedési faktor (VEGF), mely utóbbinak egyre több szerepet tulajdonítanak. A klinikai kép az enyhe hasi diszkomforttól, a lebocsátást igénylő ascitesen át az intenzív osztályos ellátást igénylő veseelégtelenségig sokféle lehet. A tünetek súlyossága alapján történő stádium beosztás a beteg kezelését is meghatározza, de miután a tünetek időről-időre változhatnak, a terápiás stratégiát ennek megfelelően kell módosítani. A terápia tüneti, alapja a folyadékpótlás, a paracentézis, illetve a súlyos szövődmény elkerülése érdekében végzett thromboprofilaxis. A még nem teljesen tisztázott patomechanizmus és a kezelés tüneti jellege miatt a legnagyobb kihívást a megelőzés jelenti. A megelőzés alapja az egyénre szabott stimuláció (minimális gonadotropin, GnRh antagonistá protokoll, hCG dózis csökkentése), a tünetek súlyosságát csökkenti továbbá az alacsony dózisu aszpirin adása, a késleltetett embrió beültetés (blasztociszta transzfer), és az elektív embriófagyasztás.

Az általunk elvégzett vizsgálatokban a hiperstimulált betegektől tehermentesí-

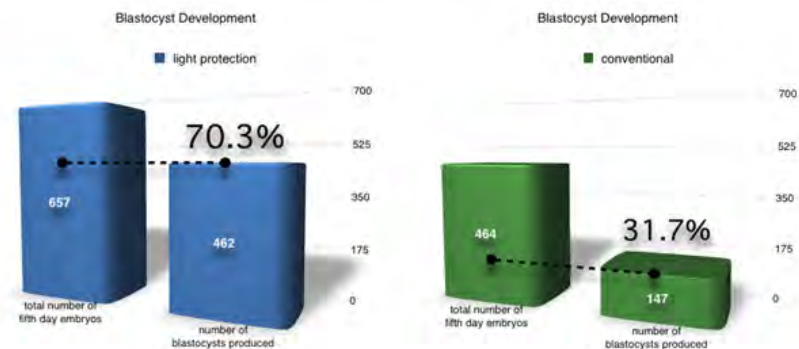


3. ábra: A Föld népességének növekedése és annak jövőbeli becslése (nepesseg.com)

tés céljából lebecsült hasúri folyadék összetételét analizáltuk és hasonlítottuk össze petefészek rosszindulatú daganatos folyamatban szenvedő betegek, illetve jóindulatú petefészek elváltozás miatt, illetve endometriózis miatt operált betegek hasi mosófolyadékával. A vizsgált mintákban jellemzően magasabb volt a gyulladásos mediátorok (interleukinek) szintje a hiperstimulált és a daganatos betegekben, mint a jóindulatú elváltozás miatt operáltakban. Feltételezésünk szerint az előbbi két csoportban a szabad hasúri folyadék képződése a mediátorok szintje alapján hasonló mechanizmussal történhet, még ha a két körkép lefutása teljesen eltérő is. Az említett anyagok vérbeli koncentrációja ugyanakkor szignifikánsan magasabb a tumoros betegekben, mint a hiperstimuláltakban (3.ábra). Ezek a megfigyelések alapján közelebb juthatunk a körkép pontosabb felismeréséhez, ezáltal az ilyen mellékhatással járó kezelések száma reményeink szerint csökkenthető.

EMBRIÓVÉDELEMSEL KAPCSOLATOS VIZSGÁLATOK

A korai embrionális fejlődést gyors sejtosztódás és az embrionális gének aktivációja jellemzi, mely az embriót rendkívül sérülékennyé és érzékennyé tesz a környezeti hatásokra. A női nemi szervek nemcsak előállítják a petesejteket, hanem biztonságos környezetet nyújtanak a gaméták és az embrió számára. Az emberi test védelmet nyújt a látható fényvel szemben csökkentve a besugárzási dózist. IVF és különös tekintettel ezen belül intracitoplazmatikus spermium injekció (ICSI), mint megtermékenyítési módszer során azonban a fény káros hatást fejthet ki a sejtekre, továbbá a petesejtek leszívásakor, a spermiumok előkészítésekor, az embriók inkubálásakor és mikroszkópos vizs-

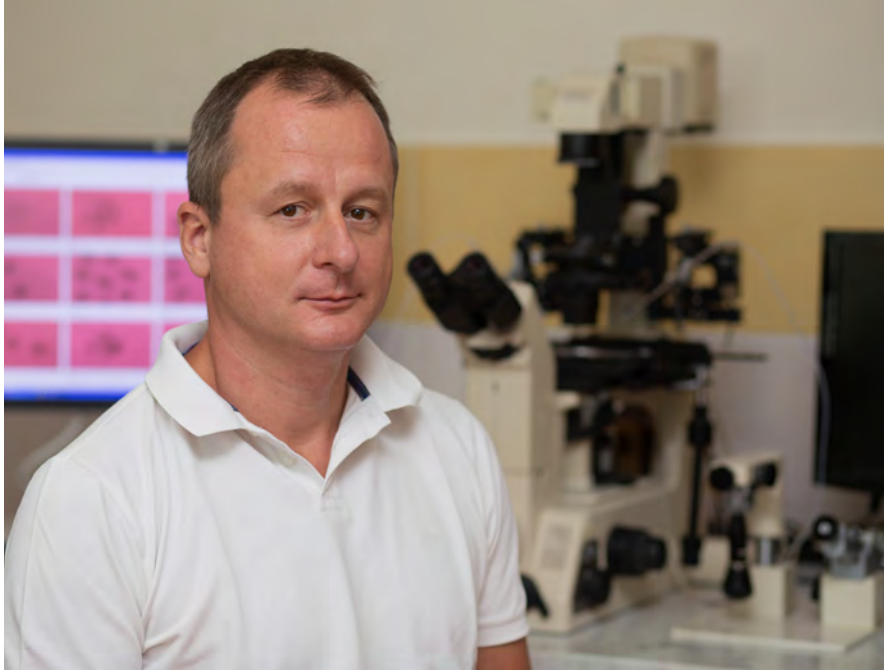


4. ábra: A blasztulációs ráta (fejlődő blasztociszta stádiumú embriók aránya) összehasonlítása fényvédett és a hagyományos csoportban

gálatakor, valamint az embrió beültetése alatt is. Az UV fény toxikus hatása az élő sejtekre már régóta ismert. A látható fény (400-800 nm) toxikus hatása azonban kevésbé köztudott, pedig számos korábbi vizsgálat igazolja a látható fény káros hatását a petesejtekre, a spermiumokra és az embriókra. A fény káros hatása összefüggésben állhat a peroxiszmákban és a mitokondriumokban képződő hidrogén peroxiddal. A sejtekben található flavinok - melyek elnyelik az 500 nm hullámhossz alatti fénysugarakat - lehetnek felelősek a reaktív oxigén gyökök keletkezéséért. Vizsgálatok alapján a fénysugárzás kiválthat stresszgén aktivációt és DNS károsodást is az embriókban. A látható fény káros hatása függ a fény hullámhosszától. A kék fény (400-500 nm) bizonyítottan nagyságrendekkel veszélyesebb, mint a hosszabb hullámhosszú látható fény. Mindezek alapján feltételezhető, hogy fényszűrők alkalmazásával csökkenteni lehet a káros környezeti hatásokat az IVF laboratóriumokban.

Célunk a megvilágítás káros hatásainak vizsgálata és csökkentése volt, az embrióvesztés minimalizálása az in vitro fertilizáció során végzett tevékenységeink során.

Ennek érdekében fényszűrő fóliával borítottuk be a mesterséges megtermékenyítés során alkalmazott eszközöket, a laboratóriumi fényforrásait és az alkalmazott eszközök beépített fényforrásait is. Az így módon védett körülmények után egy éves tapasztalatainkat statisztikai módszerekkel a megelőző év azonos paramétereire hasonlítottuk. Az összes többi laboratóriumi körülmény (inkubátorok, tápoldatok, tenyésztési körülmények) és a stimulációs protokollok változatlanok maradtak, így csupán ez a paraméter befolyásolta a kimenetelt. Megvizsgáltuk a fényvédett és a fényvédelem nélküli csoportokban a fertilizációs arány, a blasztulációs arány és az implantációs arány mértékét konvencionális IVF és ICSI alkalmazása esetén. Ezen paraméterek mindegyikében jobb eredmények születtek a fényvédett csoportban, ebből kiemelendő a jelentős, mintegy 60%-os blasztociszta veszteség csökkenés, vagyis ennyivel több embriót jutott el a differenciáltság ezen fokára (4. ábra). Ennek érdekében fontos ajánlásunk, hogy minimalizáljuk a lehetséges káros környezeti tényezőket. A műtők, laboratóriumok, mikroszkópok megvilágítása csökkentheti az embriók életképességét, mert a szabadgyök képződés káros biológiai folyamatokat indíthat be, csökkentve ezzel a terhességi arányt is.



Dr. Várnagy Ákos

EMBRIÓ SZELEKCIÓS ELJÁRÁSOK

MORFOLÓGIÁN ALAPULÓ OSZTÁLYOZÁSI RENDSZEREK

A beültetésre alkalmas legjobb minőségű embriók kiválasztása főként morfológiai értékeléseken alapszik, ám ez a megközelítés hagyományosan megfigyelő jellegű, ezáltal korlátozott információon alapul. Az elmúlt három évtizedben számos osztályozási rendszert fejlesztettek ki az embriók osztályozására.

A legkézenfekvőbb paraméter, amelyet könnyen meg lehet határozni a petesejttől a blasztociszta stádiumig, a morfológia. Következésképpen a morfológia volt az első paraméter, amelyet részletesen vizsgáltak az IVF korai éveiben is, és számos tanulmány mutatta be a kapcsolatot a petesejt és az embrió morfológiai jellemzői és a terhességi siker aránya között. Azonban az embriológiai laboratóriumként eltérő rutin és gyakorlati szokások (például az embriók ellenőrzésének időpontja) miatt a pusztán morfológiai értékelés rendkívül hajlamos a szubjektívásra. Ez a szubjektivitás az embrió minőség megítélésakor nagyon változó embrió-értékeléseket eredményezhet. Például a megtermékenyítést követő második napon történő ellenőrzés időzítése nagymértékben befolyásolhatja az embriók osztályozását. Hiszen a korai ellenőrzés során a legtöbb embrió két sejtes állapotban található, míg, ha néhány órával később történik a vizsgálat, akkor számos embrió már a négy sejtes stádiumot is elérheti. Vagyis a létrehozott embrió-pontozási rendszerek viszonylag „durva”, a blasztomerek számán és az embriók minőségén alapulnak. Ezenkívül a gyakorlati tapasztalat azt mutatja, hogy rendkívül változatos morfológiájú és pontszámú embriók is sikeresen beágyazódhatnak.

Az egységes statikus morfológiai elemzésre az Európai Humán Reprodukciós és Embriológiai Társaság (ESHRE) nemzetközi pontrendszert vezetett be (Isztambul konszenzus), ez alapján történik ma a rutin osztályozást.

MORFOKINETIKAI OSZTÁLYOZÁS – TIME-LAPSE

Az embriók morfológiai ellenőrzéséhez elengedhetetlen az inkubátorból való kivételük, amellyel különféle stresszfaktoroknak vagyunk kénytelenek kitenni az embriókat (hőmérsékletváltozás, gázkoncentráció megváltozása, fényhatás). További kritikája lehet a klasszikus morfológiai elemzéseknek, hogy legtöbb esetben naponta egyszer történik az embriók állapotának vizsgálata. Azaz egy ötödik napon elvégzett blasztociszta transzfer esetén, mindössze öt statikus megfigyelés alapján történik a legéletképesebbnek gondolt embrió kiválasztása. Ezzel szemben a time-lapse rendszerek esetében az inkubátorba egy kamera van beépítve, amely előre meghatározott időközönként - akár több ezer - fényképet készít az osztódó embriókról, melyek később szoftveresen egy videóba egyesíthetők, és elemezhetőek.

A technika további előnye, hogy az embriók a megtermékenyítéstől egészen a beültetéséig zavartalanul fejlődhetnek, hiszen állapotuk folyamatos nyomon követése az inkubátoron belül biztosított. Azonban a módszer legfontosabb előnye, hogy kiszűrhetővé válnak az osztódási rendellenességek, ezáltal a hibás kromoszómakészlettel rendelkező embriók visszaültetését elkerülhetjük. Azonban fontos megemlíteni, hogy jelenleg nem áll rendelkezésre olyan szakirodalmi adat, mely egyértelműen alátámasztaná, hogy a time-lapse rendszerek használatának döntő hatása lenne a teherbeesési sikerességre, élve születési arányra.

EMBRIONÁLIS DNS IZOLÁLÁS A TENYÉSZTŐ TÁPOLDATÁBÓL

Az anyai vérből izolálható sejtmentes magzati DNS vizsgálata igen szenzitív és specifikus, nem invazív genetikai tesztként rutinszerűen használható például a Down-szindróma kimutatására. Hosszú időn át ismeretlen volt, hogy a magzat fejlődése során mikor bocsát ki először DNS-t, több feltételezés is született, hogy már a legelső osztódási ciklus során, vagy csak az embrionális fejlődés egy későbbi időpontjától kezdődően. Újabb tanulmányok azonban bizonyították, hogy az embrionális fejlődés korai szakaszában is megjelenik a sejtmentes magzati DNS, hiszen sikerült izolálni a tápoldatból, melyben az embrió fejlődik. A tápoldat cseppből

történő genetikai analízis legnagyobb előnye, hogy nem invazív módon nyerhetünk információt az embrió kromoszóma készletéről, esetleges számbeli (aneuploidiák) vagy szerkezetbeli (pl. törlődés, megkettőződés, megfordulás) eltéréseiről, a biopsziából származó potenciális károsodás esélye nélkül. Bizonyították továbbá, a tápoldat cseppek, melyekben embriók fejlődtek tartalmaztak szabad DNS-t és hogy ezek alapján elvégzett genetikai szűrés eredménye megfeleltethető trofektoderma biopszia által nyújtottal. A módszernek azonban jelentős hiányosságai vannak, azonban a legújabb és legkorszerűbb nukleinsav összetételre vonatkozó vizsgálómódszerek (NGS: új generációs szekvenálás) bevezetése lehetővé tette a preimplantációs genetikai szűrés (PGS) és preimplantációs genetikai diagnosztika (PGD) szerepének újraértékelését is, mely kapcsán néhány évvel ezelőtt új nomenklatúra a PGT (preimplantációs genetikai teszt) bevezetése történt.

Jelen vizsgálatunkban ezt a módszert az embrionális tápoldatból történő nukleinsav szekvenálásra alkalmaztuk. A módszer nehézsége abból adódik, hogy az embriót körülvevő tápoldatban csupán nukleinsav részletek (fragmentumok) találhatóak, melyekből nehéz feladat az eredeti teljes szekvenciára következtetni. A molekuláris genetikai vizsgálatot végző munkacsoportnak sikerült egy olyan algoritmust kidolgoznia, melyben különböző bioinformatikai lépések beiktatásával a szekvenálással nyert adathalmazból vissza lehet következtetni az eredeti géntérképre.

A módszer beállításával a vizsgált embrionális tápoldatok többségében 70% feletti egyezést tudtunk kimutatni a standard gén mintával (5. ábra). Különbséget tudtunk detektálni a később élő terhességhez vezető és az elhalt terhességhez vezető embriók tápoldatai között. Ezen túlmenően ismert génhibákat tudtunk felfedezni az elhalt terhességű csoportban, amik az embrionális veszteség potenciális okai is lehetnek.

Ezen felismerések a preimplantációs vizsgálatok új lehetőségét nyithatják meg, amit már külföldi munkacsoportok vizsgálatai is alátámasztanak és így egy noninvazív preimplantációs genetikai teszt (ni-PGT) alapjait teremthetik meg.



Sample Name	gr	Avg. GC	≥ 1X	≥ 5X	Coverage	% Aligned
G1_plus_HSA1_S39412	c	49%	0.9%	0.3%	0.0X	40.9%
G1_plus_HSA2_S39411	c	49%	0.5%	0.2%	0.0X	39.7%
G1_plus_HSA4_S39409	c	47%	0.8%	0.2%	0.0X	35.1%
G1_plus_HSA5_S39408	c	48%	0.7%	0.3%	0.0X	36.2%
G1_plus_HSA6_S39407	c	48%	0.8%	0.3%	0.0X	44.2%
7567_1A_S39415	0	50%	10.6%	0.4%	0.0X	91.9%
7567_1B_S39396	0	48%	4.0%	1.1%	0.0X	76.0%
7010_1A_S39393	0	49%	1.4%	0.4%	0.0X	41.7%
7010_1B_S39390	0	50%	12.6%	0.4%	0.0X	96.2%
7301_1A_S39414	0	50%	11.9%	0.4%	0.0	95.2%
7301_1B_S39416	0	50%	5.0%	1.0%	0.0	84.7%
7316_1A_S39395	0	49%	6.1%	1.0%	0.0	86.4%
7316_1B_S39392	0	50%	9.9%	0.3%	0.0	95.7%
7370_1B_S39394	0	50%	7.5%	0.9%	0.0	87.4%
6341_4B_S39400	1	49%	1.5%	0.4%	0.0	40.4%
6341_4C_S39401	1	50%	2.4%	0.5%	0.0	47.9%
7793_1A_S39404	1	49%	5.7%	1.3%	0.0	83.1%
7793_1B_S39405	1	50%	7.8%	1.1%	0.0X	87.8%
7938_1A_S39398	1	50%	8.1%	1.1%	0.0X	88.8%
7938_1C_S39413	1	49%	9.9%	1.1%	0.0X	92.2%

5. ábra: Embrionális tápoldatból izolált nukleinsav szekvenciák megfeleltetése a standard kontrollhoz képest

SZÜLÉSZETI ÉS NŐGYÓGYÁSZATI KLINIKA KUTATÓCSOPORTJA

A kutatócsoport vezetője:

Prof. Dr. Bódis József

A kutatócsoport vezető kutatói:

Prof. Dr. Koppán Miklós Endre

Dr. Várnagy Ákos

A projektben közreműködő kutató-fejlesztők:

Dr. Erostyák János

Prof. Dr. Ertl Tibor

Dr. Farkas Bálint

Gödöny Krisztina

Dr. Hantosi Eszter

Dr. Kovács Kálmán András

Marics-Kutas Anna

Mauchart Péter

Mauchart-Wágner Emese

Prof. Dr. Sulyok Endre

Dr. Szenczi Ágnes Ilona

Dr. Varjas Tímea

Dr. Vass Réka Anna

Kutatást segítők:

Brunnerné Bayer Zsuzsanna

Grimné Locskai Elvira

Herczeg Mónika

Magyar Éva

A kutatócsoport adminisztrátorai:

Várhelyi Andrea

Walczné Gróf Judit



Prof. Dr. Bódis József

AZ EMBRIÓ ÉLETKÉPESSÉ- GÉNEK FEHÉRJEMARKEREI

Az embrió sikeres beágyazódása egy rendkívül komplex, kétoldalú folyamat, mely egyrésztől igényli a méhnyálkahártya sejteinek befogadóképességét, másrésztől a lehető legmagasabb életképességgel bíró embrió kiválasztását. Mivel a hazánkban elterjedt többszörös embrió beültetés gyakorlata fokozott egészségügyi kockázatot jelent, utóbbi feladat megvalósítására vállalkoztunk e fejezetben bemutatásra kerülő kísérleteinkkel.

Az új szakmai irányelvek szerint a lehetőségeknek megfelelően törekedni kell az egyszeres embriótranszfer gyakorlatára, mely azonban szükségessé teszi, hogy a beültetés előtt meg tudjuk becsülni az embrió beágyazódási képességét. Az egyszeres embrió beültetés alkalmazása terén a Skandináv országok járnak elől, ahol a beavatkozások több mint fele ezen elvek alapján zajlik.

A beültetésre szánt embriók minőségének értékelése etikai okokból csak nem-invazív módszerekkel valósítható meg, amelyek az embrió érintése nélkül zajlanak. Ez a legkézenfekvőbb módon mikroszkópos értékelés alapján történhet, ahol a vizsgáló személy morfológiai bélyegek, mint az embriót alkotó sejtek szimmetriája, sejtmagok, poláris testek elhelyezkedése, sejtplazma minősége stb. alapján állapítja meg az embrió életképességét.

A mesterséges megtermékenyítéssel járó kezelések hajnalán számos, erősen szubjektív értékelési szempont merült fel a beavatkozásokat végző intézmények egyéni elképzeléseinek megfelelően, melyek végül 2011-ben kerültek egységesítésre. Ez a nemzetközi koncepció Isztambul Konszenzus néven került elfogadásra, pontosan meghatározva az értékelési szempontok mellett azok súlyozását is a folyamatban. Ez a három kategóriát alkalmazó pontrendszer „poor” (beültetésre alkalmatlan), „fair” és „good” (beültetésre alkalmas) képezi jelenleg is a mesterségesen megtermékenyített embriók minőségértékelésének protokollját. A protokoll alkalmazását követően nagy általánosságban a kezelések 30%-40%-ban terhességhez vezető eredményesség azonban további növelésre szorul. A megszületett gyermekek aránya az úgynevezett „baby-take-home-rate” inkább a 30%-hoz közelebbi értéket mutat. Természetesen a kiegészítő módszerek kidolgozása során is a nem-invazív, az embriót semmilyen formában nem érintő és így nem károsító megközelítések jönnek szóba.

A MESTERSÉGESEN MEGTERMÉKENYÍTETT EMBRIÓK TÁPOLDATA

Az in vitro fertilizáció folyamata során a petesejt megtermékenyülése egy erre a célra speciálisan gyártott edényben (in vitro) zajlik le. Ezt követően a zigóta egy- az embrió növekedési igényeinek megfelelően összeállított tápoldatban tenyészik a beültetésig.

Hasonlóan az embriók értékelését megvalósító módszerek fejlődéséhez, a tenyésztéshez használt tápoldatok is jelentős változásokon mentek keresztül a mesterséges megtermékenyítéses kezelések egyre szélesebb körű elterjedésével párhuzamosan. Kezdetben általános, bármilyen sejt tenyésztéshez használható tápoldatok kerültek alkalmazásra, őket követték a mesterséges megtermékenyítést végző intézmények által előállított, már célzottabb termékek, melyek után megjelentek a kereskedelmi forgalomban elérhető oldatok. Napjainkban ezeknek az oldatoknak két típusát különböztetjük meg. A monokultúras oldatok összetételét úgy állítják össze, hogy lehetőleg az embrió valamennyi élettani igényét kielégítse fejlődése teljes stádiuma alatt. Ezeknek a tápoldatoknak az előnye, hogy az embriót minimális külső stressz éri, hiszen fejlődése során, egészen a beültetés pillanatáig állandó marad a környezete. Hátránya azonban, hogy a monokultúras oldatok állandó összetételük miatt a fejlődő embrió igényeinek változásaihoz, melyek az első három és a későbbi két nap során nem egyformák, nem tud alkalmazkodni. Az úgynevezett szekvenciális médiumok két oldatból állnak, részben eltérő összetétellel. Az első oldatot a tenyésztés első három, a második oldatot a tenyésztés utolsó két

napján alkalmazzák. A szekvenciális médiumok előnye, hogy az embrió mindig a neki legmegfelelőbb oldatban osztódik, hátránya, hogy amennyiben a beültetést a megtermékenyítést követő ötödik napon kívánják elvégezni -mely egyébként egyre inkább preferált koncepció- az embriót szükséges áthelyezni az első oldatból a másodikba.

A tápoldatok összetételét illetően valamennyi termék alapja egy az élő szervezetnek megfelelő sókoncentrációjú, úgynevezett fiziológiás sóoldat, az embrió fejlődéséhez szükséges tápanyagokkal, aminosavakkal, vitaminokkal, a Ph viszonyok stabilan tartását elősegítő anyagokkal és kis koncentrációban esetenként antibiotikummal kiegészítve. Egy nagyon lényeges eleme a tápoldatoknak az albumin fehérje. Az albumin egy az élő szervezetekben rendkívül nagy koncentrációban előforduló szolúbilis fehérje, mely megtalálható a vérplazmában. Az albumin funkciója a tápoldatokban a pH változások pufferelése, a tápoldatban lévő ozmotikus viszonyok fiziológiás szinten tartása, az embriót alkotó sejtek membránjának stabilizálása, illetve a fejlődő embrió anyagcseréje során keletkező molekulák megkötése, eltávolítása a tápoldatból.

Az embriótenyésztő oldatokban felhasznált albumin két forrásból származhat. Egyrészt speciális szűrési és tisztítási eljárásokat követően a véradások során összegyűjtött, többszörös ellenőrzési, szűrési folyamatokon átment emberi vérplazmából állítható elő. A másik lehetőség a rekombináns genetikai technikákkal módosított alacsonyrendű élőlények, például élesztőgombák által termelt úgynevezett rekombináns albumin. A rekombináns albumin előnye, hogy garantáltan eliminálható a fertőzések átvitelének lehetősége, továbbá a termék 100%-os tisztasága. A tisztított humán albumin azonban tartalmaz olyan, akár ismeretlen faktorokat is, amelyek jelenléte elősegíti az embrió fejlődését, mivel így a tápoldat összetétele jobban megközelíti a leendő anya méhében fennálló környezeti viszonyokat. Ez utóbbi szempont figyelembevételével a tisztított humán szérum albumin használata tekinthető általánosabbnak. Természetesen ez az albumin nem 100%-os tisztaságú, azonban ez nem is követelmény. A gyártási technológia jellegéből fakadóan a termékben ugyan elenyésző százalékban, de mindig jelen vannak egyéb fehérjék is, ezt több publikált vizsgálat bizonyítja.

A tápoldat az embrió beültetését követően biológiai hulladékként megsemmisítésre kerül, ez azonban lehetőséget nyújt arra, hogy az embrió életképességének biológiai markerei után kutassunk benne, ezzel elősegítve legjobb embrió kiválasztását. Az embrió három vagy öt napos jelenléte ugyanis nyomot hagy a tápoldat kémiai összetételében, bizonyos anyagokat elfogyaszt, más anyagokat kibocsát magából, meghatározott tápanyagokat pedig átalakít az anyagcsere folyamatok (metabolizmus) során. Ezeknek a biológia folyamatoknak,

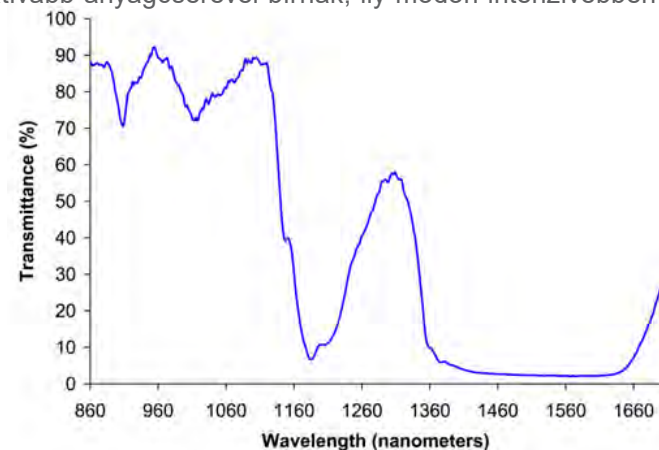
kémiai reakcióknak eredményei, termékei a metabolomika és a proteomika korszerű tudományának eszköztárával vizsgálhatók.

METABOLOMIKAI VIZSGÁLATOK

A metabolomikai és a következőkben leírt proteomikai vizsgálatok közös jellemzője, hogy valamely biológiai folyamatot, élettévesenységet vagy esetleg kóros állapotot, valamilyen mennyiségi és/vagy minőségi változást mutató molekulával mutatunk ki. Ezt a molekulát, vagy esetleg molekulák csoportját biomarkereknek nevezzük. A biomarker egy olyan molekula, mely konzekvensen azonosítható, analizálható és jelenlétével, hiányával vagy koncentrációjának megváltozásával pontosan jelez valamilyen, az érdeklődés tárgyát képező folyamatot. A metabolomikai vizsgálatok az elmondottaknak megfelelően az embrió anyagcseréjét jellemző markerek kimutatását célozzák. Ezen markerek változásaiból pedig következtetéseket, predikciókat vonhatunk le a tápoldatban növekvő embrió életképességét illetően.

A legkézenfekvőbb lehetőség a tápoldatban található glükóz vizsgálata. Az elmélet szerint a magasabb életképességű embriók már fejlődésük korai szakaszában is aktívabb anyagcserével bírnak, ily módon intenzívebben

figyelhető meg a tápoldatban található glükóz fogyása, melyet mennyiségének csökkenésén keresztül követünk nyomon. Lehetőségünk van a tápoldatban található glükóz-koncentráció nulladik, illetve harmadik vagy ötödik napi értékeinek összehasonlítására



6. ábra: Infravörös spektrum a 860-1660 nm-es tartományban.

Forrás: <https://commons.wikimedia.org>

ra vagy többszöri mintavétel esetén a glükózfelhasználás kinetikájának ábrázolására. Ezeket a vizsgálatokat pontosan ilyen jelleggel, csak fordított megközelítés alapján végezhetjük el az embrió által kibocsátott laktát mennyiségének meghatározásával, mely koncentrációjának emelkedését várjuk. A laktát, mint a glükóz lebontás terméke, szintén indikátora le-



het az embrió anyagcseréjének, annak intenzitásának és ezen keresztül az életképességének is. Hasonló, de nem mennyiségi, hanem minőségi vizsgálat a tápoldatban található aminosavösszetétel változásának nyomon követése, a folyamatot „amino acid turnover” néven ismerjük. Ebben az esetben biomarkerként a tápoldathoz hozzáadott, illetve az embrió által kibocsátott aminosavak szolgálnak, melyek egymáshoz viszonyított arányait összefüggésbe hozhatjuk az embrió anyagcseréjével, azaz potenciális életképességével.

Jóval komplexebb és komolyabb felkészültséget igénylő technika a teljes tápoldat „metabolom” vizsgálata és az infravörös spektroszkópia kombinációja. Az infravörös spektroszkópia elve szerint az infravörös tartomány spektrumán belül a molekulákat összetartó kémiai kötések elnyeléssel bírnak. Ha a tápoldatot infravörös spektroszkópiának vetjük alá, természetesen az embrió eltávolítását követően, infravörös spektrumot kapunk, mely hullámokat, csúcsokat tartalmaz (6. ábra). A csúcsook, illetve hullámok pozíciója és intenzitása alapján következtetéseket vonhatunk le a vizsgált oldatban található kémiai kötésekről, ezek változásairól, ily módon pedig detektálhatjuk az oldatban végbement kémiai változásokat, esetünkben a fejlődő embrió metabolizmusának következményeit. Az embrió fejlődése által hagyott lenyomat még specifikusabb vizsgálatára a proteomikai technikák adnak lehetőséget.

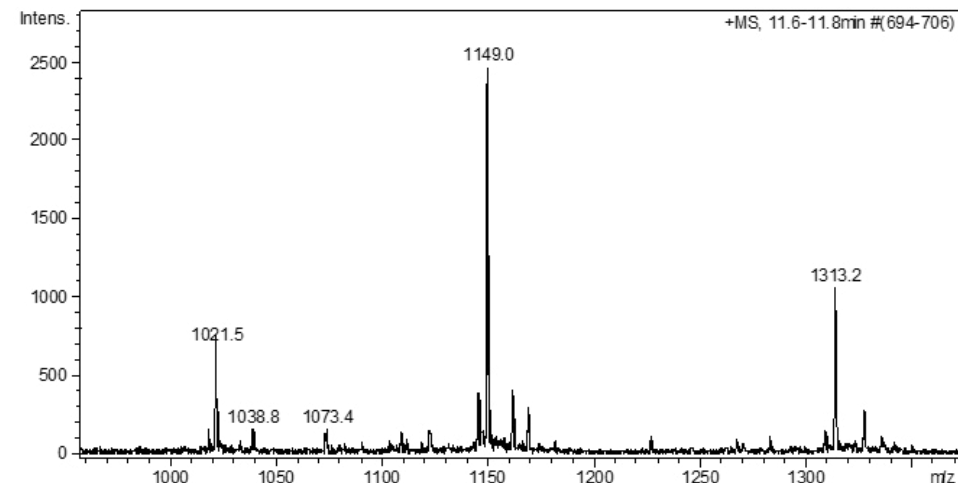
PROTEOMIKAI VIZSGÁLATOK

A proteomikai vizsgálatok alaptézise, hogy a fejlődő embrió, nem csak az általa felhasznált, hanem az általa kibocsátott anyagokon keresztül is lenyomatot hagy az őt a fejlődése során körülvevő tápoldatban. Ennek a fehérjéket érintő molekuláris lenyomatnak a mintázata, kombinálva a modern analitikai kémia eszköztárával lehetőséget ad arra, hogy egy újabb irányból közelítsük meg a mesterségesen megtermékenyített embriók nem-invazív vizsgálatának lehetőségét. A végső cél egy olyan kiegészítő módszertan megalkotása, mely az embriók morfológiai értékelését segítve lehetővé teszi az életképes és a nem életképes embriók pontos elkülönítését. A proteomikai vizsgálatok bizonyos esetekben még a genetikai vizsgálatoknál is pontosabb képet adnak valamely organizmus életműködéséről, hiszen nem a géneket vizsgálja, hanem a konkrétan abban a pillanatban aktív gének termékei segítségével ad áttekintő képet. A proteomikai vizsgálatok eszközei a gél-elektroforézis, mely

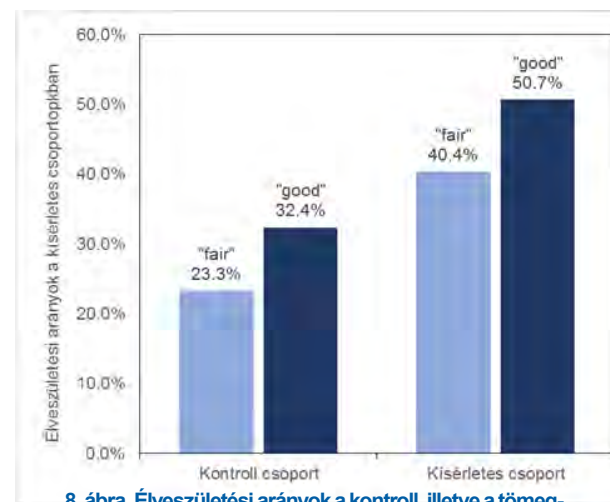
a fehérjék analízis előtti tisztítását teszi lehetővé, az elektroforézissel párhuzamos fehérjeemésztés, mely az emésztés következtében létrejövő peptidek vizsgálatával teszi lehetővé a talált fehérjemarkerek pontos azonosítását, illetve legfőképpen a tömegspektrometria, mely alkalmas valamely anyag egyetlen molekulájának pontos tömegét meghatározni és ezen keresztül azonosítani is azt. A tömegspektrometriához gyakran kapcsolódó folyadékkromatográfia az azonosított fehérjék mennyiségi meghatározását teszi lehetővé. A proteomikai vizsgálatok általános sémája szerint gélelektroforetikus technikákkal körül írhatjuk a mennyiségi, vagy minőségi változást mutató fehérje biomarkerek csoportját. A legigéretesebbnek tűnő jelöltek az elektroforetikus gélből történő eltávolítást követően enzimatikusan emészthetjük, az emésztményben tömegspektrometria segítségével megállapíthatjuk a keletkezett peptidek pontos tömegét és egymáshoz viszonyított mennyiségét, majd ezen tömegspektrumokat bioinformatikai módszerekkel adatbázis keresésnek vetjük alá. Szerencsés esetben sikeres azonosítást követően, a már ismert biomarker jelöltek kimutatását vagy mennyiségi vizsgálatát folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometria segítségével végezhetjük el.

HAPTOGLOBIN ALFA-1 LÁNC, MINT A MESTERSÉGESEN MEGTERMÉKENYÍTETT EMBRIÓK ÉLETKÉPESSÉGÉNEK BIOMARKERE

Vizsgálataink első szakaszában a mesterségesen megtermékenyített embriók tápoldatában négy olyan fehérjét, illetve polipeptidet találtunk, amelyek mennyiségükben jelentős mértékű eltérést mutattak az életképes (élve születés) és a nem életképes (sikertelen terhesség) embriók mintáiban. Statisztikai elemzés során, T-próbával vizsgálva eredményeinket csak az egyik (9184 Da) tömegű molekula alapján sikerült szignifikáns különbséget kimutatni a két embrió csoport között, így a továbbiakban erre az egy biomarker jelöltre koncentráltunk. Megállapítottuk azt is, hogy a fehérjét már a tápoldat előállításához használt albumin készítmény is tartalmazza, az embrió fejlődése során a mennyisége változik meg, a beültetés kimenetelétől függő mértékben (7. ábra).



7. ábra: A biomarkerként azonosított fehérje tömegspektruma. A csúcsok a fehérjékre jellemző, többszörösen ionizált tömegspektrometriás csúcsoknak felel meg.



8. ábra. Élveszületési arányok a kontroll, illetve a tömegspektrometriás analízissel kiegészített kísérletes csoportban.

A fehérjét emésztést követő tandem tömegspektrometriás vizsgálatok segítségével a humán haptoglobin fehérje alfa-1 láncaként azonosítottuk. Az életképes és a nem életképes embriók tápoldatmintái között jelentős, átlagosan 50%-ot meghaladó mértékű mennyiségi különbséget mutattunk ki. A további, folyadékkromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás méréseinket nagyszámú vizsgálatokban kódolt mintákon, anonim kísérletekben végeztük el. A meghatározás és a párhuzamosan zajló retrospektív embrióminőség értékelés során a haptoglobin alfa-1 fehérje mennyiségét a kontrollként használt, üres tápoldat haptoglobin alfa-1 koncentrációjához viszonyítottuk, a koncentráció növekedés mértéke döntötte el az életképes, illetve nem életképes diagnó-

zást.

zist. A vizsgálatokat az embriók beültetését követően, a megmaradt és archivált tápoldat mintákon végeztük el, a beültetés kimenetelének ismerete nélkül, vak kísérletekben. Az elemzéseket követően a feldolgozott anyagot két halmazra csoportosítottuk, és statisztikai elemzésnek vetettük alá. Az első halmazban úgy helyeztük el az embriókat, hogy abban csak a morfológiai értékelésen pozitív minősítést („good” vagy „fair”) kapó embriók helyezkedjenek el, ezt nevezhetjük egyszerűen pozitív vagy kontroll csoportnak. A második halmazban úgy helyeztük el az embriókat, hogy a morfológiai értékelésen felül a tömegspektrometriás vizsgálat során is, azaz együttesen pozitív értékelést kapott embriók helyezkedjenek el. Ezt a csoportot kétszeresen pozitív vagy kísérletes csoportnak nevezhetjük. A csoportosítást követően mindkét halmazban megvizsgáltuk a megszületett gyermekek arányát, azaz a bevezető gondolatoknál említett „baby-take-home-rate”-et (8. ábra).

Megállapíthatjuk, hogy a kontroll csoportban a „fair” minősítésű embriók a kezelések 23%-ban, míg a „good” minősítésű embriók esetében a kezelések 32%-ban tették lehetővé gyermek születését. A kétszeresen pozitív, kísérletes csoportban a „fair” minősítésű embriók a kezelések 40%-ban, míg a „good” minősítésű embriók esetében a kezelések 51%-ban tették lehetővé gyermek születését. Az eredmények arra engednek következtetni, hogy a haptoglobin alfa-1 lánc mennyiségi meghatározása a meglévő morfológiai bélyegek alapján történő embrió minőség értékelést kiegészítve, azzal együttesen alkalmazva növelheti a mesterséges megtermékenyítéses kezelések sikerességét. Természetesen fontos hangsúlyozni, hogy az itt bemutatott eredmények retrospektív, azaz utólagos elemzések eredményei. A módszer alkalmazhatóságát ténylegesen jellemző, prospektív vizsgálati eredmények feldolgozása a jelen kiadvány írásakor még folyamatban van. A leírtak alapján a haptoglobin alfa-1 lánc, melynek forrása a humán szérum albumin szennyeződéseként a tápoldatban megtalálható haptoglobin fehérje, mennyiségi, proteomikai markerként képes az alacsony életképességű embriók azonosítására. Az alfa-1 fragmentum mennyiségi változásának hátterében valamely enzimatis, fehérjebontó folyamat állhat.

Az embrió fejlődése során a sejtek számának növekedése nem lineáris folyamat, hanem sejtosztódás és sejtpusztulás arányának pozitív eredőjeként megvalósuló eredmény. Hipotézisünk szerint az alacsonyabb életképességű embriók esetében a sejtpusztulás mértéke fokozottabb, mely együtt jár az enzimatis vagy kémiai faktorok emelkedett kibocsátásával. Ez a jelenség magyarázhatja megfigyelésünket, miszerint a tápoldatban jelenlévő haptoglobin nagyobb mértékű fragmentációt mutat a nem életképes embriók mintáiban, mint az

életképes embriók mintáiban, mely jelenség a haptoglobinnal származó alfa-1 lánc fokozott keletkezésével jár. Véleményünk szerint helyesebb, ha egy embrió életképesség vizsgáló teszt a nem életképes embriókat szűri, nem pedig a legjobbakat választja ki, mert megvan az esélye, hogy a legjobb embrió sem vezet sikeres terhességhez, a soha ki nem zárható anyai faktorok miatt. De ha teljes bizonyossággal meg tudjuk mondani, hogy „mit ne ültessünk be” a felesleges embriótranszferek száma csökkenhet, ezáltal pedig a kezelések százalékos sikeressége növekedhet.

AZ EMBRIÓ ÉLETKÉPES- SÉGÉNEK ÉS BETEG- SÉGEINEK GENETIKAI MARKEREI

ÚJ GENERÁCIÓS SZEKVENÁLÁSI ELJÁ- RÁS ALKALMAZÁSA A PREIMPLANTÁCIÓS GENETIKAI DIAGNOSZTIKÁBAN

Az in vitro fertilizációs (IVF) eljárások hatékonyságának növelése érdekében olyan szűrővizsgálatok bevezetése is aktuálissá válik, amelyekkel a súlyos genetikai rendellenességeket korai embrionális korban, lehetőség szerint még a gyorsan osztódó embrió beültetése előtt szűrni tudjuk.

A preimplantációs genetikai diagnosztika 1990 óta folyamatosan fejlődő irányvonalat képvisel a molekuláris genetikai terén, mely magzati aneuploiditást, a számbeli rendellenességet mutató kromoszómakészlet-vonatkozásában (PGD-A).

Mára rutinszerű eljárás az anyai vérből kimutatható magzati DNS azonosítása. A vizsgálati módszer alapja a magzati kromoszómakészlet számbeli eltéréseinek meghatározása, melyet alacsony lefedettségű teljes genom szekvenálással történik, az anyai vérben keringő kis mennyiségben jelen levő embrionális DNS-ből. A szekvenálás eredménye megmutatja az egyes mintákban jelen lévő többlet- vagy hiányos kromoszómakészlettel járó, állapotokat. Ez leggyakrabban a 21, 18 és 13-as kromoszómát, illetve a nemi kromoszómákat érinti. Ezen betegségek kockázatát az anya kora, a petesejt genetikai rendellenességeinek emelkedő előfordulása révén nagymértékben növeli. (A 21-es kromoszóma triszómia Down-szindrómát jelez, a 18-as kromoszóma számbeli többlete Edwards-kórt, ami ritka és halálos betegség, és az érintett magzatok 95%-a magzati korban elhal. A 13-as kromoszóma triszómiája a Patau-kórt okozza, mely rendellenesség az élettel nem összeegyeztethető, az érintett magzatok csupán 1%-a születik meg.)

Kutatócsoportunk célja volt olyan módszer elméleti és gyakorlati kidolgozása, mely az IVF eljárás során az embriófejlődés beültetést megelőző szakaszában teszi lehetővé az aneuploid állapot azonosítását.

A megtermékenyített petesejttől (zigóta) a morula kialakulásáig (a 3. napig) a tápoldatba kerülő embrionális DNS-t használjuk fel a genetikai állomány és életképesség vizsgálatára. Így lehetővé tesszük a nem invazív, megfelelően pontos és specifikus, új generációs szekvencia analízisen alapuló módszertan alkalmazását annak megítélésére, hogy az adott mintában a kromoszóma készlet ép, vagy megváltozott összetételű, és ha az utóbbi lehetőséggel találkozunk, meg tudjuk állapítani a genetikai betegséget is. Klinikai szempontból jelentős, hogy a kidolgozásra kerülő eljárás 48 órán belül kivitelezhető legyen, mivel az embrió tenyésztése során a klinikai döntést, az embrió beültetését a 3. nap (morula stádium) és 5. nap (blasztociszta stádium) között meg kell hozni, ezt követően az embrió már nem alkalmas a méhüregben kívüli tenyésztésre.

A DNS szekvencia alapú embriószelekciós eljárás módszertani kidolgozásához a klinikai IVF során 40 intracitoplazmikus sperma injekciós (ICSI) módszerrel megtermékenyített, mikroszkópos morfológiai értékeléskor jó minőségűnek ítélt humán embrió 3 napos tenyésztő-folyadékának új generációs szekvencia analízisét és bioinformatikai elemzését végeztük el. Az embriókat két csoportra osztottuk a terhesség kimenetele alapján: az egészséges és a vetéléssel végződő terhességet létrehozó csoportra. Az egyes csoportok összehasonlításában az embriók morfológiai paraméterei és a szülői nőgyógyászati szempontból feldolgozott adatait az 1. táblázat tartalmazza.

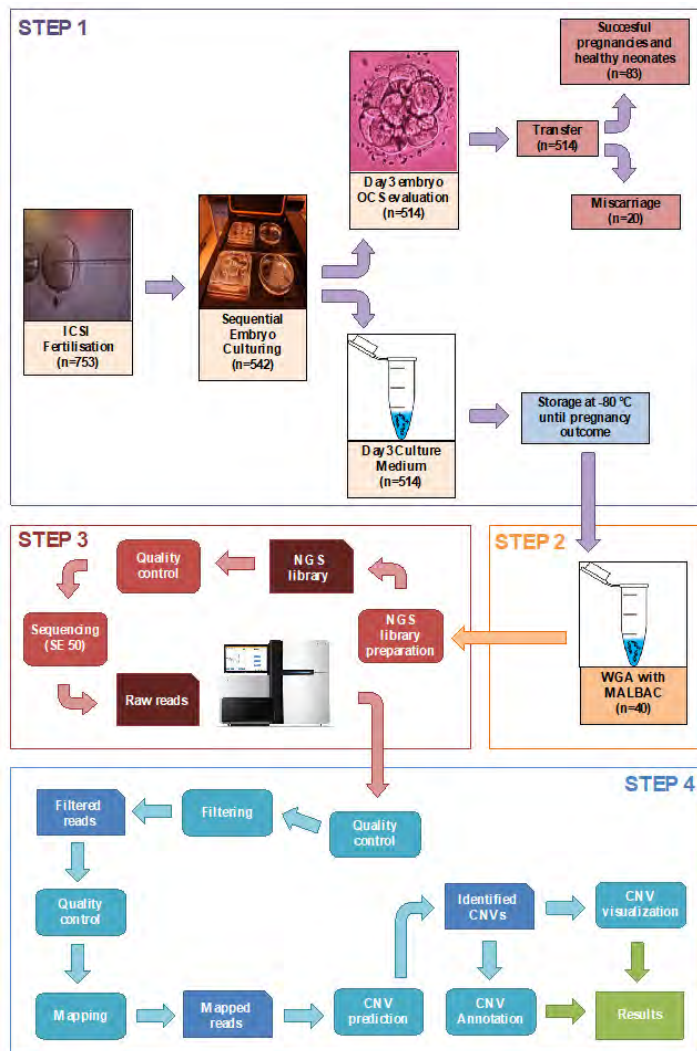
A tápoldatban alacsony koncentrációban jelen levő magzati DNS

mennyiségi és minőségi paramétereikhez alkalmazkodva a tápoldat minták DNS izolálását lineáris teljes genom amplifikációs technikával (Multiple Annealing and Looping Based Amplification Cycles, MAL-BAC) egészítettük ki, valamint könyvtárkészítéskor egyénileg beállított szűkített tartományú méretszelektiót alkalmaztunk az Illumina HiSeq 4000 platformon történő szekvenáláshoz. A bioinformatikai adatelemzés során sikerült olyan elemzési stratégiát kidolgozni, mely során elkülöníthetővé vált a magzati DNS frakció a tápoldatban jelen levő nem embrionális eredetű humán genomiális DNS szennyeződés. Az általunk kidolgozott laboratóriumi munkafolyamat, valamint kap-

1. táblázat: Klinikai adatok és embrionális paraméterek a vizsgált csoportokban.

A terhesség kimenetele	Vetelés	Egészséges újszülött
A szekvenált embrionális		
tenyésztőfolyadékok száma	20	20
Isztambul konszenzus alapján		
történő besorolás		
átlagos blastomer szám	8.2	8.6
térfogatra vonatkozó fragmentáltság	<10%	<10%
blastomer szimmetria	teljes	teljes
Klinikai jellemzők		
anyai átlagéletkor	35.18	34.74
infertilitás oka: tubális faktor	27.27	22.5
infertilitás oka: apai faktor	45.45	42.5
infertilitás oka: egyéb	27.27	25
bazális FSH koncentráció (IU/μl)	7.63	7.2
előző vetelés	0	0
kinyert petesejtek száma	9.3	8.6
tenyésztésre alkalmas embriók száma	2.5	2.5





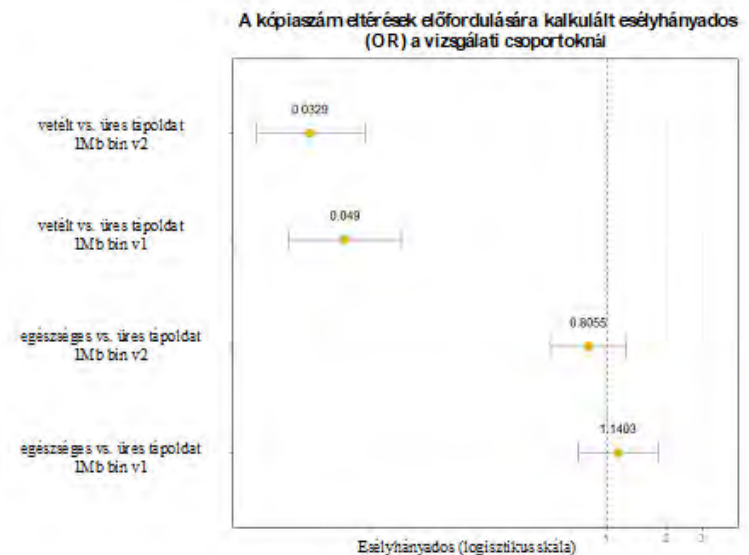
9. ábra: A kidolgozott laboratóriumi munkafolyamat, valamint a hozzá kapcsolódó bioinformatikai elemzési eljárás lépéseit foglalja össze.

csolódó bioinformatikai elemzési eljárás lehetővé teszi a korai fejlettségi stádiumban a humán embriók tápoldatának vizsgálatát (9. ábra). Eredményeink kiértékelése során a magzati genomiális DNS-re vonatkozó kópiaszám eltérések (copy number variations, CNV) statisztikai különbséget igazoltak az életképes, egészséges terhességet

létrehozó embriók és a vetéléssel végződő terhességek esetében a beültetett embriók 3 napos, morula stádiumban nyert tápoldatainak DNS tartalma között (10. ábra).

Mélyebb szekvencia adatfeldolgozással és a UNIQUE, Genetic Alliance és CDO genetikai adatbázisokkal történő összevetéssel a vetéléssel végződő terhességek 75%-ában az embrionális tápoldatok magzati genomiális DNS-ében számbeli eltéréseket azonosítottunk létfontosságú kromoszomális szakaszoknak megfelelően. A csökkent vagy megnövekedett kópiaszámú DNS szakaszok a 2. táblázatban bemutatott kromoszomális szakaszoknak feleltek meg a humán referencia DNS-re történő illesztéskor. Az eltérés az adott szakaszon elhelyezkedő fehérjekódoló gének funkcióját érinti.

10. ábra: Az egészséges terhességet létrehozó és a vetélt embriók 1 megabázis (Mb) hosszúságú DNS szakaszaiban előforduló kópiaszám eltéréseit mutatja, mindkét csoportnál az üres, embrió nem tartalmazó tápoldatra vonatkoztatott arányban. Az esélyhányados számolására kétféle módszert alkalmaztunk: $v1=$ az 1Mb hosszúságú szakaszon minden előforduló CNV-t külön találatnak értékeltünk, $v2=$ az 1 Mb szakaszon a CNV előfordulást, függetlenül azok számától vettük 1-nek.



10. ábra: Az egészséges terhességet létrehozó és a vetélt embriók 1 megabázis (Mb) hosszúságú

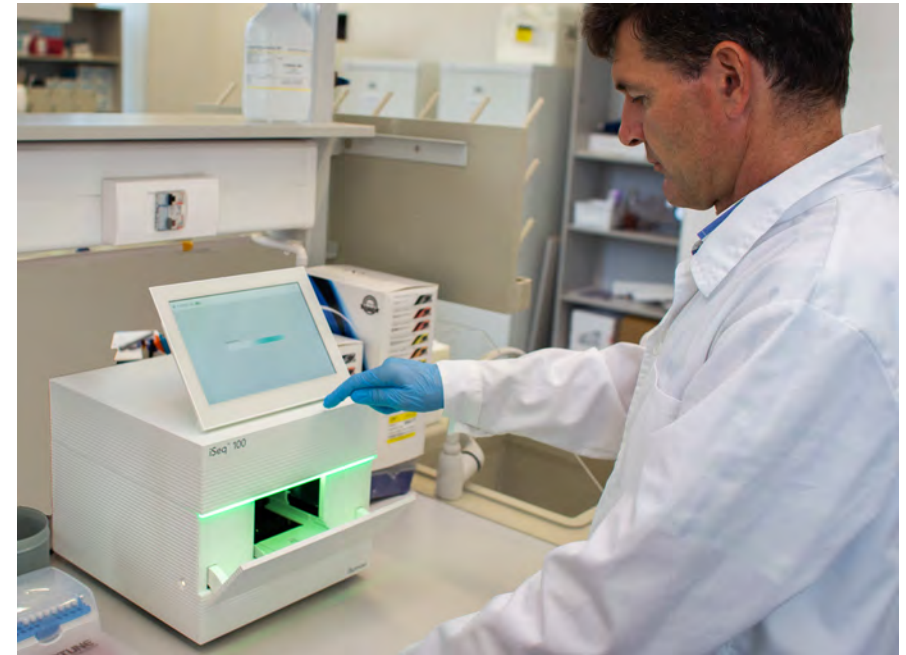
2. táblázat: A megváltozott kópiaszámban kimutatott DNS szakaszok

Kromoszómális			Kromoszómális		
elhelyezkedés	típus	Funkció	elhelyezkedés	típus	Funkció
2q35	deléció	XRCC5 gén inaktiváció - a DNS javító mechanizmusok sérülése	14q32.2-q32.33	deléció	FOXC1 gén inaktiváció, fejlődési zavarok és strukturális központi idegrendszeri rendellenességek
2q37 2,3-2,4 mb d	deléció	IGFBP2 gén inaktiváció	15q13.3	deléció	MTMR10, FAN1 kereteltolódás karyomegáliás intersticiális nephritissel
3p25.3-p25.1	deléció	miR-885 inaktiváció, differenciálódási zavarok	16q23.3-24.3	duplikáció	APRT, FOXC2 indel, adenin foszforibozil transzferáz hiány, disichtiasis lyphoedema szindróma
4p16.3-p16.1	duplikáció	CNV melyet microarray módszerrel azonosítottak fejlődési rendellenességgel vagy veleszületett rendellenességgel rendelkező egyéneknél (ISCA)	17q22-p23.2	deléció	Ateleiotikus törpeség, izolált növekedési hormon hiány
8q24.3	duplikáció	myc proto-onkogén, GWAS vizsgálatokban azonosított génszegény terület	20p12.2-p12.1	deléció	JAG1-el összefüggő Alagille szindróma
9p12-p11.2	deléció	ANKRD20A3 gén inaktiváció, choroid plexus hyperplasia miatti hydrocephalus, glioma	20q13.31-q13.33	duplikáció	PKC1, foszfoenolpiruvát karboxikináz hiány
10q22.1	duplikáció	COL13A1 kereteltolódási hiba (ClinVar)	21q22.3	duplikáció	RIPK4, PCNT popliteális pterygum szindróma, letális típus
11q23.1-23.3	duplikáció	Beckwith-Wiedemann szindróma	21p13-p11.2	deléció	rövid kar vesztő monoszómia
14q31.1-q31.3	deléció	autoszómális domináns hypertelorizmus és süketség(HPPD)	22q13.2-13.31	duplikáció	SCO2 cardioencephalomyopathia, citokróm c oxidáz hiány, fatális

A közös szülőktől származó testvér embriók esetén találtunk egyformán előforduló kromoszómális rendellenességeket is: 9p12-p11.2: ANKR-D20A3 gén inaktivációja, hydrocephalussal, diffúz choroid hyperplasiával járó rendellenesség; 11q23.1-23.3: Beckwith-Wiedemann szindróma, 21q22.3: RIPK4, PCNT popliteális pterygium szindróma letális típusa; 22q13.2-13.31 SCO2 citokróm C-oxidáz hiánnyal összefüggő cardio-encephalo-myopathia. Ezen eltérések minden esetben veteléshez vezettek. Vizsgálataink során sikerült a mindennapi klinikai gyakorlatba illeszthető, 48 órán belül megvalósítható, az új generációs szekvenáló eljárást alkalmazó módszert fejleszteni a humán magzati genomiális DNS nem-invazív stratégiájú preimplantációs genetikai teszteléséhez. A teszt alkalmasnak bizonyult az embrió életképességének megítélésére és a vetelés bekövetkezését jósló, az életképességet alapvetően befolyásoló embrionális kromoszómális rendellenességek meghatározására. Eredményeink alapján képzik az asszisztált reprodukciós eljárás során az embrió adatalapú, objektív értékelésének, melyet következő lépésben in silico - mesterséges intelligencia (MI) alapú (deep learning, machine learning) bioinformatikai algoritmusok alkalmazásával kívánunk továbbfejleszteni. Célunk a legalkalmasabb, legmagasabb implantációs potenciállal rendelkező embrió kiválasztási folyamatának standardizálása, hatékonyságának növelése, amellyel minimalizálni lehet a többszörös beültetések számát, valamint a sikerességi rátát is növelni lehet.

AZ EMBRIÓ KÖRNYEZETÉVEL TÖRTÉNŐ KOMMUNIKÁCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA AZ EMBRIONÁLIS ÉLETKEPESÉG MEGÍTÉ- LÉSÉHEZ

Az embrionális tápoldatból az embrió által aktívan a környezetébe bocsájtott és implantációt elősegítő mikro-RNS (miRNS) molekulák szerkezeti és mennyiségi meghatározása lehetővé teszi a korai embrionális adaptáció megítélését. A miRNS-ek rövid 19-23 bázispár hosszúságú, fehérjék kódolásában részt nem vevő nukleinsav szakaszok, melyeknek a hírvivő (messenger) mRNS transzláció gátlásában, a sejteket felépítő strukturális és az anyagcsere folyamatokat meghatározó funkcionális fehérjék szintézisének szabályozásában van. Számos tanulmány igazolta a miRNS-ek szerepét az embrió fejlődése során állatmodellek és a human embrió esetében is. A miRNS molekulák az embrionális sejtekből vezikuláris



szekréción során kerülnek az embriót körülvevő környezetbe. Az embrionális tenyésztőfolyadék miRNS összetételének vizsgálata lehetőséget nyújt az embrió környezetével történő molekuláris kommunikációjának meghatározására. Az új generációs szekvencia analízisbe bevont embrionális tápoldatok miRNS tartalmát is megvizsgáltuk, droplet digitális PCR (dd-PCR) technológia alkalmazásával, mely egy magas érzékenyséű jelenleg még kevésbé elterjedt, innovatív PCR módszer. A 40 magzati tápoldat minta mindegyikének 20 mikroliternyi térfogatából teljes RNS kivonást követően reverz transzkripció során az RNS tartalmat cDNS-re írtuk át, majd ddPCR analízist végeztünk. Az eljárás során a vizsgált reakcióoldat 1 µl miRNS specifikus primer párt, 12µl QX200 ddPCR EvaGreen Super-



Droplet készítés
11.

PCR amplifikáció
11. ábra: A droplet digitális PCR folyamata.

Droplet analízis

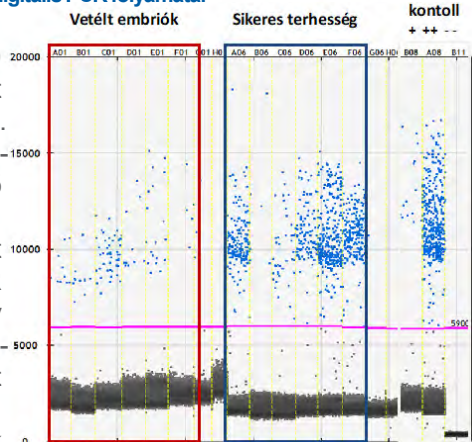
mix-et (Bio-Rad), 9µl vizet és 100 pikogramm mennyiségű cDNS-t tartalmaz a kiindulási mintából. Első lépésként a 20 µl reakcióoldat 15-20.000 dropletre történő emulzifikációját végezzük el, majd a keletkezett dropletokban, mint apró reaktorokban zajlik a PCR hőciklus szabályozott nukleinsav amplifikáció. Végül a reakcióoldatban található dropletok egyenként történő vizsgálatával valósul meg a specifikus primereknek megfelelő, kimutatni kívánt miRNS szakaszok pontos mennyiségének meghatározása (11. ábra).

Vizsgálataink során a miR-191-3p mutatott szignifikáns eltérést a vetéléssel végződő terhesség esetén beültetett embriók és az egészséges terhességet létrehozó embriók tápoldatainak vizsgálata során (12. ábra).

Üres, embriót nem tartalmazó tápoldatban a miR-191-3p jelenlétét nem tudtuk kimutatni. (A tápoldatok miR-191-3p tartalmának statisztikai elemzését IBM SPSS Statistics 21.0, ANOVA teszt ($p \leq 0.01$) LSD post hoc analízissel végeztük.)

Vizsgálatunk során a miR-191-3p szignifikánsan emelkedett koncentrációt mutatott az egészséges terhességet létrehozni képes, jó reprodukív kompetenciájú embriók tápoldatában (12. ábra). A miR-191-3p szerepét más fajok esetén (egér, marha, disznó) embrionális beágyazódás során azonosították. Potenciális jelentőségét a humán embrió intrauterin beágyazódási képességének meghatározásában valószínűsítjük. A miRNS markerek a nem invazív magzati tápoldat új generációs szekvencián alapuló diagnosztikai eljárásai mellett alkalmazva jó kiegészítőként szerepelnek az embrió reprodukív kompetenciájának pontosabb megítéléséhez.

A FÉNYEXPOZÍCIÓ HATÁSA CD1 EGÉREMBRIÓK MOLEKULÁRIS ÓRAGÉNEKET SZABÁLYOZÓ MIRNS RENDSZERÉRE ÉS A NANOG/SMAD4 MEDIÁLT SEJTDIFFERENCIÁCIÓRA



12. ábra: Magzati tápoldatok vizsgálati csoportjai QX200 droplet digitális PCR alkalmazásával. Quantasoft fluoreszcens detekció.

Egyes mikroRNS-ek hatása ismert a cirkadián ritmus fenntartásában, melyet sejtekben megtalálható Clock-gének (CLK) és a gátlásukért felelős periodicitás (PER) gének szabályoznak. Az emlősök esetében az agyban lévő fény érzékeny érzékelők humorális és neuroendokrin folyamatokon keresztül szabályozzák a sejtekben cirkadián ritmust. Fény hiányában a perifériás sejtek is fent tudják tartani a 24 órás ciklusokat, amit negatív autoregulációs visszacsatoló mechanizmus révén képesek irányítani. A miR-192 és miR-194 igazolt célpontja a Per géncsalád, míg a miR-155 a CYC fehérjék kifejeződését akadályozza. A 24 órás periodicitást tekintve, először csökken a miR-192 és -194, majd a PER és TIM fehérjék szintje a citoszolban, majd a sejtmagban is, végül csökken a miR-155 és CYC és CLK inhibitorok szintje, majd 24 óra múlva újra végbemegy ez a molekuláris folyamat, melyet a miRNS szabályozó molekulák hangolnak tovább.

A kutatás során 8-12 hetes in vitro fertilizációs eljárással (IVF) eljárással megtermékenyített CD1 nőtény egerek embrióit vizsgáltuk. Megtermékenyítés után két nappal az embriókat KSOM médiumban tenyésztettük. Amikor az embriók elérték a 4-sejtes állapotot, különböző csoportokra osztjuk őket:

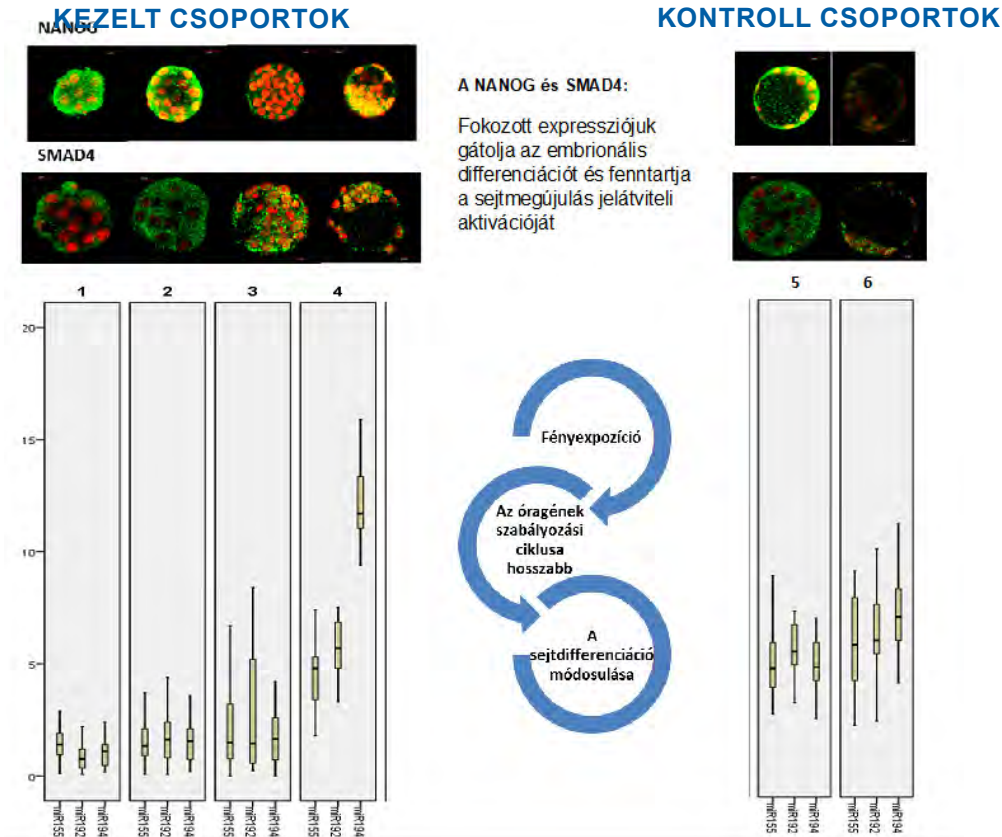
1. csoport: 1x50 percig éri 1130 Lux erősségű fehér fény expozíció (48 órás embrió)

2. csoport: 2x50 percig éri 1130 Lux erősségű fény expozíció (72 órás embrió)

3. csoport: 1x50 percig éri 450 Lux erősségű vörös fény expozíció (48 órás embrió)

5. csoport (kontroll csoport): 1x50 percig inkubáljuk sötétben, szobahőmérsékleten (48 órás embrió)

6. csoport (kontroll csoport): 2x50 percig inkubáljuk sötétben, szobahőmérsékleten (72 órás embrió)



13. ábra: A fehér (1130 lux) és vörös (450 lux) fénykezelés hatására kialakuló miR-155, miR-192 és miR-194 expressziós változások a tenyésztőfolyadékban (y tengelyen kópia/ mikroliterben kifejezve) valamint SMAD4 és NANOG fehérje kifejeződéseinek változásai (zöld fluoreszceninnel jelölve) CD1 egér embriókban.

4. csoport: 2x 50 percig éri 450 Lux erősségű vörös fény expozíció (72 órás embrió)

A fény expozíció után minden embrió inkubációs médiumából RNS-t izolálunk. PCR eljárással vizsgáljuk a miR-155, miR-192 és miR-194 mikroRNSEK jelenlétét, illetve szintjét a médiumokban. Az embriókon SMAD4 és NANOG immunhisztokémiai festést végeztünk (13. ábra).

Egér embrionális modellünkben vizsgáltuk az IVF eljárással megtermékenyített korai morula stádiumú egér embriók és érett blasztociszta stádiumú beültetésre alkalmas egér embriók tápadataiban megjelenő miR-155, miR-192 és miR-194 mennyiségét vizsgálva, valamint az embriókat az embrionális differenciáltságot jelző SMAD4 és NANOG immunhisztokémiai festéseit összehasonlítva a fényexpozíció időtartamának és fényerejének megfelelően jelentős eltéréseket tapasztaltunk. A nagyobb intenzitású fehér fény besugárzása az embrionális differenciáltság szintjét csökkentette, a tápoldatok óragének szabályozásában résztvevő miRNS-regulátorok szintjei szintén csökkent mértékűek voltak mind a vörös fényrel kezelt, mind pedig a sötétben tenyésztett embriókéhoz képest. A vörös fény az első besugárzást követően a fehérhez hasonló hatást váltott ki, de az embriók a második besugárzaskor inkább a kontroll, sötétben tenyésztett embriókhoz hasonló miRNS és fehérje szinteket mutattak. Morfológiai fejlettségük is közelebb állt a sötétben tenyésztett csoportéhoz. A vörös fényforrás hatása kimutathatóan kisebb mértékben befolyásolta az embrionális fejlődés menetét és az az embrionális cikrádián periodicitásra ható miRNS szabályozó rendszer működését.

LAB-ON-A-CHIP KUTATÓCSOPORT

A kutatócsoport vezetője:

Prof. Dr. Kovács L Gábor

A projektben közreműködő kutató-fejlesztők:

Csizmadia Zsuzsanna
Dr. Faust Zsuzsanna
Dr. Fekete Csaba
Gálik Bence
Dr. Gombos Katalin
Dr. Gyenesei Attila
Heidinger-Felső Regina
Dr. Herczeg Róbert
Prof. Dr. Janáky Tamás
Prof. Dr. Kőszegi Tamás Antal
Mendl Edina
Oldal Miklós
Dr. Pandur Edina
Pap Ramóna
Sándorné Soós Mónika
Dr. Szabó Zoltán Iván
Dr. Tőkés-Füzesi Margit
Urbán Péter

Kutatást segítők:

Kalács Krisztina Ildikó
Végh Tamara

A kutatócsoport adminisztrátorai:

Herczeg-Rohrer Violetta
Vörösné Krutki Borbála



Prof. Dr. Kovács L Gábor

A FRAKTALKIN SZABÁLYOZÓ SZEREPE AZ EMBRIÓ BEÁGYAZÓDÁSÁNAK FOLYAMATÁBAN

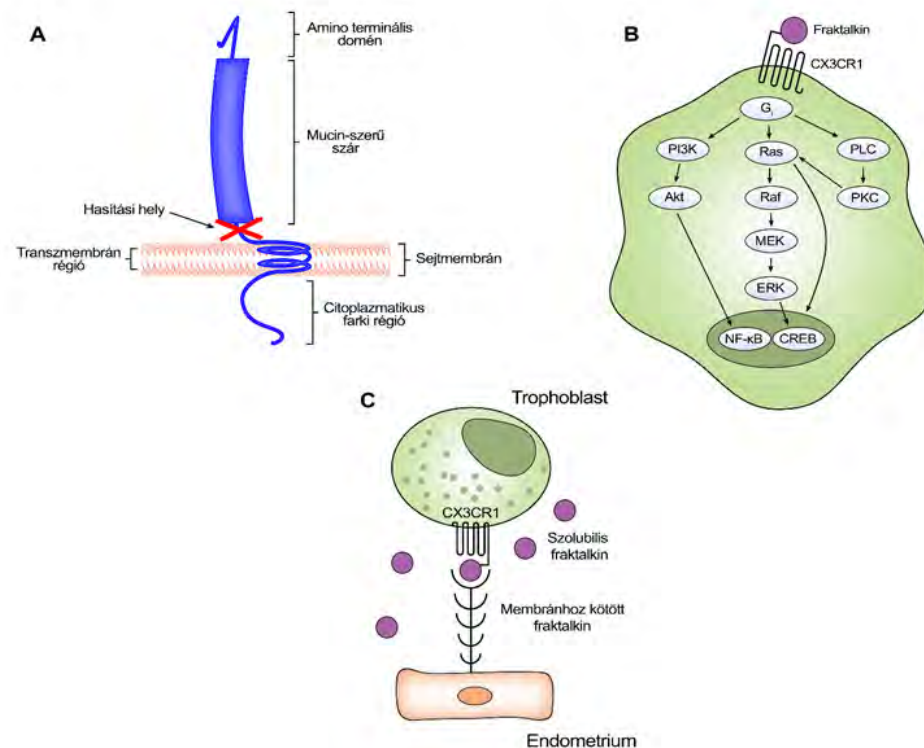
Az embrió beágyazódását hormonok (ösztrogének, progeszteron), citokinek és kemokinek összehangolt munkája szabályozza. A kemokinek kisméretű fehérjék, melyek képesek az immunrendszer sejtjeit a termelődésük helyére vonzani.

Az emberi szervezetben több mint ötven kemokin létezik, melyek szerkezetük alapján négy alcsoportba sorolhatók (C, CC, CXC és CX3C). A legtöbb kemokin kisméretű fehérje, 20-25 aminosav hosszúságú. A kemokinek a sejteken belül érési folyamatot esnek át, majd azt követően a termelő sejtek kibocsátják őket a környezetükbe, ahol kifejtik hatásukat.

Az 1990-es évek végén, egy új és egyedi kemokin alcsoportot fedeztek fel a központi idegrendszerben. Ez a család a CX3C elnevezést kapta, jelenleg ismert egyetlen tagja a fraktalkin, tudományos nevén CX3CL1. A fraktalkin, a többi kemokintól eltérően 373 aminosavból áll, tehát jóval nagyobb méretű és a sejtet határoló membránon átível. Így rendelkezik egy sejtben belüli farki régióval, egy ún. transzmembrán régióval, egy külső mucin-szerű résszel és egy ahhoz kapcsolódó amino terminális régióval. A membránhoz kötött fraktalkin mellett ismert a fehérje szolubilis formája is, mely hasadás révén jön létre a membránhoz kötött fraktalkin külső régiójából. A hasítást különböző ún. metal-

loproteináz fehérje hasító enzimek végzik. Tehát a fraktalkin a többi kemokintól eltérően nem a sejtből kerül ki a környezetbe, hanem a sejt felszínéről hasad le. A szolubilis fraktalkin a mucin-szerű régióból és az amino terminális doménből áll, utóbbi felelős a fraktalkin hatásának közvetítéséért (14. ábra). A fraktalkin szerepét számos betegségben leírták, többek között szív- és érrendszerei megbetegedésekben, HIV fertőzésben, különböző daganatos megbetegedésekben, reumás ízületi gyulladásban, veseelégtelenségben, magas vérnyomásban és különböző, gyulladással és/vagy degenerációval járó központi idegrendszeri megbetegedésekben.

A fraktalkin a receptorán, tudományos nevén a CX3CR1-en keresztül fejti ki hatását. A fraktalkin receptor egy hét transzmembrán régióval rendelkező fehérje, mely a sejt (pl. mikroglia, idegsejt, makrofág, limfociták, trophoblast, endometrium) felszínén képes a fraktalkint megkötni. A fraktalkin receptor a fraktalkin kötődését követően szerkezeti változáson esik át, majd aktivál egy ún. G-fehérjét, mely összekapcsolja a receptort a sejtben belüli szabályozó molekulákkal. A fraktalkin receptor három fő jelátviteli útvonalat indíthat be: a foszfolipáz C/protein kináz C útvonalat, a foszfatidilinozitol-3 kináz/AKT/NFκB



13. ábra: A fehér (1130 lux) és vörös (450 lux) fénykezelés hatására kialakuló miR-155, miR-192 és miR-194 expressziós változások a tenyésztőfolyadékban (y tengelyen kópia/mikroliterben kifejezve) valamint SMAD4 és NANOG fehérje kifejeződéseinek változásai (zöld fluoreszcínnel jelölve) CD1 egér embriókban.

útvonalat és a Ras/mitogén aktivált protein kináz (p38, ERK és JNK) útvonalakat. A foszfolipáz C/protein kináz C útvonal szabályozza a sejtek hormon termelését, valamint aktiválja a fent említett Ras/mitogén aktivált protein kináz útvonalakat. Ez utóbbi útvonalak szerepet játszanak a sejtek osztódásának, növekedésének és túlélésének szabályozásában. A foszfatidilinozitol-3 kináz/AKT/NFκB útvonal ehhez kapcsolódóan képes a sejtek anyagcseréjét (cukor és zsír anyagcsere), a fehérjék szintézisét, az osztódást és a túlélést segíteni (14. B ábra). A membránhoz kötött és a szolubilis fraktalkin hatása eltérő: a membránhoz kötött forma a sejtfelszíni receptorhoz kötődve aktiválja a receptort és az általa szabályozott útvonalakat, míg a szolubilis fraktalkin képes ugyan a receptor aktiválására, azonban nagyobb mennyiségben a receptor sejtfelszínről történő eltűnését okozhatja (deszenzitizáció), így a jelátviteli útvonalak aktivitása csökkenhet, sőt meg is szűnhet.

A fraktalkin és a receptora számos szaporító szövetben megtalálható, így a méhben, a petefészkekben, a petevezetőben és a méhlepényben is. Utóbbi alátámasztja azt a feltételezést, hogy a fraktalkin-fraktalkin receptor kapcsolat szerepet játszik a magzati-anyai kommunikációban. Ismert, hogy az endometrium sejtek, melyek a méh legbelső sejtrétegét alkotják, membránhoz kötött és szolubilis fraktalkint is termelnek (14. C ábra). A fraktalkin receptorát, a CX3CR1-et az embriót körülvevő trophoblast sejtek fejezik ki. A fraktalkin lehetséges szerepét a beágyazódásban 2005-ben vetették fel először Camnas és mtsai. juh trophoblast sejtek vizsgálatát követően. Későbbiekben kiderült, hogy a fraktalkin szabályozza a trophoblast sejtek mozgását azáltal, hogy segíti a megtapadáshoz szükséges ún. adhéziós molekulák és az extracelluláris mátrix komponenseinek termelését. A fraktalkin kétféle módon játszhat szerepet a beágyazódás folyamatában. A membránhoz kötött fraktalkin direkt kapcsolatot alakíthat ki az endometrium és a trophoblast sejtek között, míg a szolubilis fraktalkin szignál molekulaként befolyásolhatja a trophoblast sejtek működését.

Ennek vizsgálatára JEG-3 trophoblast és HEC-1A endometrium sejtek külön-

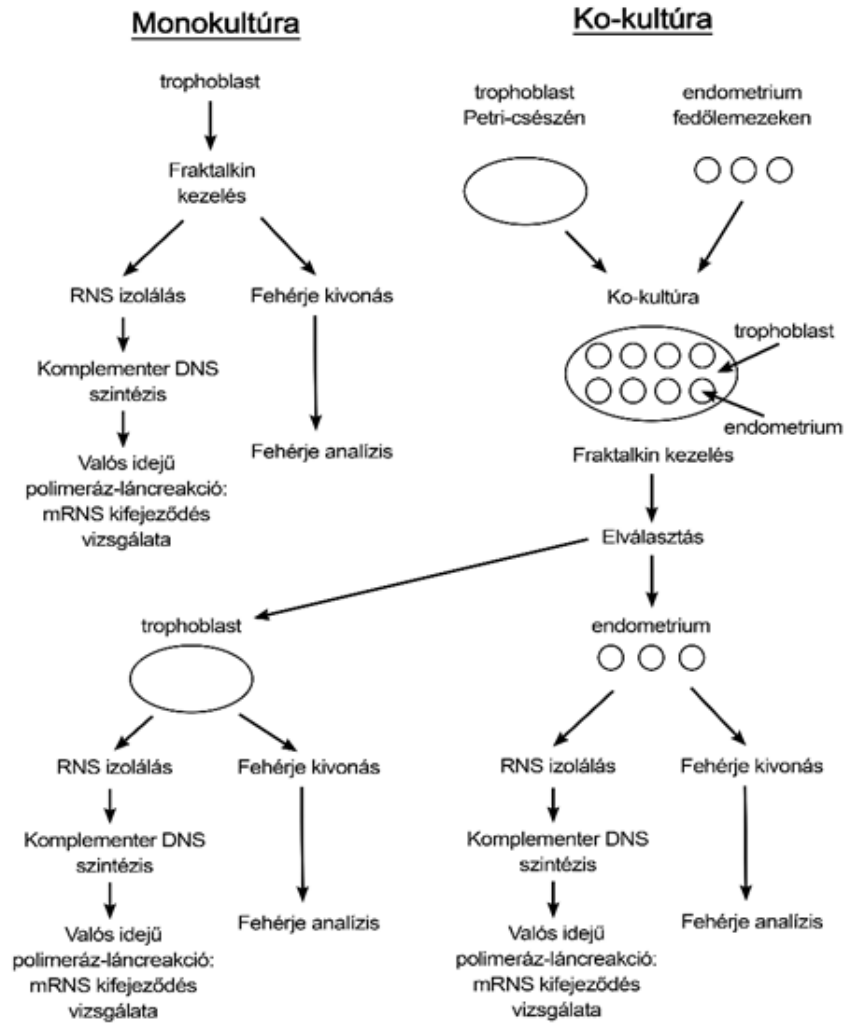
Munkacsoportunk arra kereste a választ, hogy a fraktalkin milyen molekuláris mechanizmusokon keresztül fejt ki a hatását, hogyan befolyásolja a beágyazódásban szerepet játszó gének kifejeződését a trophoblast és endometrium sejtekben.

álló tenyészeteket (ún. monokultúrát) kezeltük fraktalkinnal, mely a beágyazódás előtti időszakot modellezi. Emellett létrehoztunk egy ún. bilamináris ko-kultúra modellt endometrium és trophoblast sejtek tenyészetéből. Ebben a kétféle sejttípust együtt tenyésztettük úgy, hogy őket csak egy vékony folyadékfilm választotta el egymástól, így az általuk termelt anyagok szabadon mozoghattak és kötődhetek a sejtekhez. Ebben a kísérleti rendszerben vizsgáltuk, hogy a fraktalkin kezelés hatására a két sejttípusban (külön-külön), mely beágyazódásban szerepet játszó gének kifejeződése változik meg. Így képet kaphattunk arról, hogy a sejtek fizikai közelsége, illetve a kezelése hatására az általuk kibocsátott anyagok befolyásolják-e a beágyazódási gének kifejeződését. Ezen kívül az is vizsgálhatóvá vált, hogy van-e eltérés a gének kifejeződésében a monokultúráknál kapott eredményekhez képest, így láthatóvá vált az endometrium és trophoblast sejtek kommunikációja és együttműködése.

A sejtkultúras kísérleteinkben három eltérő fraktalkin koncentrációt (5, 10 és 20 ng/ml) és három kezelési időtartamot (6, 24 és 48 óra) alkalmaztunk, így megvizsgálhattuk azt is, hogy a fraktalkin hatása változik-e a koncentráció és/vagy az idő függvényében. A kísérleteket mind trophoblast és endometrium monokultúrákon, mind pedig ko-kultúrák elvégeztük. A kísérletek felépítése és az alkalmazott módszerek a 15. ábrán láthatók. A kísérleteinkben a kiválasztott gének hírvivő RNS és fehérje mennyiségi változásait vizsgáltuk. Az RNS szintű vizsgálatoknál ún. valós idejű polimeráz láncreakciót alkalmaztunk, melynek segítségével kiszámolható a fraktalkin kezelés hatására bekövetkezett hírvivő RNS relatív mennyiségi változása, míg a fehérje szintű analízisben a vizsgált fehérjére specifikus antitestekkel mutattuk ki a sejtekben termelődő fehérjéket és mennyiségi változásukat.

15. ábra: A kísérleti rendszer felépítése. Kísérleteinkben kétféle sejtkultúrát alkalmaztunk: trophoblast és endometrium sejtek önálló tenyészetét, valamint endometrium és trophoblast sejtek együttes tenyészetét, melyben az egyik sejttípus a tenyésztőedény alján helyezkedett el, a másik pedig kisméretű, kerek műanyag lemezekre. Utóbbiakat helyeztük sejtekkel lefelé a tenyésztőedényre. Ebben az ún. bilamináris ko-kultúra modellben a két sejttípust csak egy vékony folyadékfilm választotta el egymástól. Így a sejtek fizikailag is kapcsolódhattak egymással, illetve az általuk termelt anyagok szabadon mozoghattak és kötődhetek a sejtekhez. A fraktalkinnal való kezelést követően a sejteket leválasztottuk a tenyésztő felületekről, majd külön-külön vizsgáltuk az RNS és a fehérje változásokat.

Az embrió beágyazódása során a trophoblast sejtek hozzákapcsolódnak, majd invázióval benyomulnak a méh nyálkahártyájába. Az embrió beágyazódásához számos fehérje összehangolt munkájára van szükség. Ezen fehérjék közül olyanokat vizsgáltunk, melyek szintjének szabályozásában a fraktalkin receptor jelátviteli útvonalai szerepet játszhatnak.



15. ábra: A kísérleti rendszer felépítése. Kísérleteinkben kétféle sejtkultúrát alkalmaztunk: trophoblast és endometrium sejtek önálló tenyészeit, valamint endometrium és trophoblast sejtek együttes tenyészetét, melyben az egyik sejttípus a tenyésztőedény alján helyezkedett el, a másik pedig kisméretű, kerek műanyag lemezek. Utóbbiakat helyeztük sejtekkel lefelé a tenyésztőedényre. Ebben az ún. bilamináris ko-kultúra modellben a két sejttípust csak egy vékony folyadékfilm választotta el egymástól. Így a sejtek fizikailag is kapcsolódhattak egymással, illetve az általuk termelt anyagok szabadon mozoghattak és kötődhetek a sejtekhez. A fraktalkinnal való kezelést követően a sejteket leválasztottuk a tenyésztő felületről, majd külön-külön vizsgáltuk az RNS és a fehérje változásokat.

A progeszteron receptor mind az endometrium, mind pedig a trophoblast sejtek osztódását és differenciálódását szabályozza. A progeszteron receptor (PR) aktivitását befolyásolja a receptor fehérje foszforilálása, mely hozzájárul a fokozott működéshez. A fraktalkin receptor által szabályozott MAPK útvonalak képesek a progeszteron receptort aktiválni, így a fraktalkin kezelés hozzájárul a progeszteron receptor fokozott kifejeződéséhez és aktivitásához. A receptor működését pozitívan befolyásolja az ún. SRC-1 fehérje, mely a progeszteron receptorral együttműködve szintén segíti annak működését. A fraktalkin szintén növeli az SRC-1 fehérje mennyiségét a trophoblast sejtekben.

Az embrió beágyazódásában kulcsfontosságú szerepe van a mátrix metalloproteinázoknak (MMP), amik olyan enzimek, melyek az endometrium sejtek közötti és sejten kívüli kapcsolómolekulák lebontását végzik, így lehetővé teszik az embrió endometriumba történő invázióját. Vizsgálataink során kiderült, hogy a fraktalkin kezelés növeli a mátrix metalloproteináz 2 és 9 hívívő RNS mennyiségét, valamint fehérje szintjüket, azonban eltérően viselkednek a mono-és ko-kultúrákban. A monokultúrában, tehát a beágyazódást megelőzően mindkét enzim mennyisége növekedett, míg a ko-kultúrában, mely az embrió megtapadását és a beágyazódás korai szakaszát modellezi, az MMP9 mennyisége folyamatosan emelkedett, az MMP2 pedig csak a kezelés kései szakaszában. Az MMP fehérjék szintjének emelkedését a PR aktivitása is befolyásolja, mely szintén nőtt a fraktalkin hatására.

A sikeres beágyazódáshoz az endometrium aktívan hozzájárul, hiszen alkalmassá kell válnia az embrió fogadására. Az endometrium fogadóképességét (receptivitást) számos fehérje mennyiségi változása befolyásolja. A fraktalkin receptor nem csak a trophoblast, hanem az általunk vizsgált endometrium sejtek felszínén is megtalálható, így a fraktalkin kezelés befolyásolhatja a progeszteron receptor működését az endometrium sejtekben is.

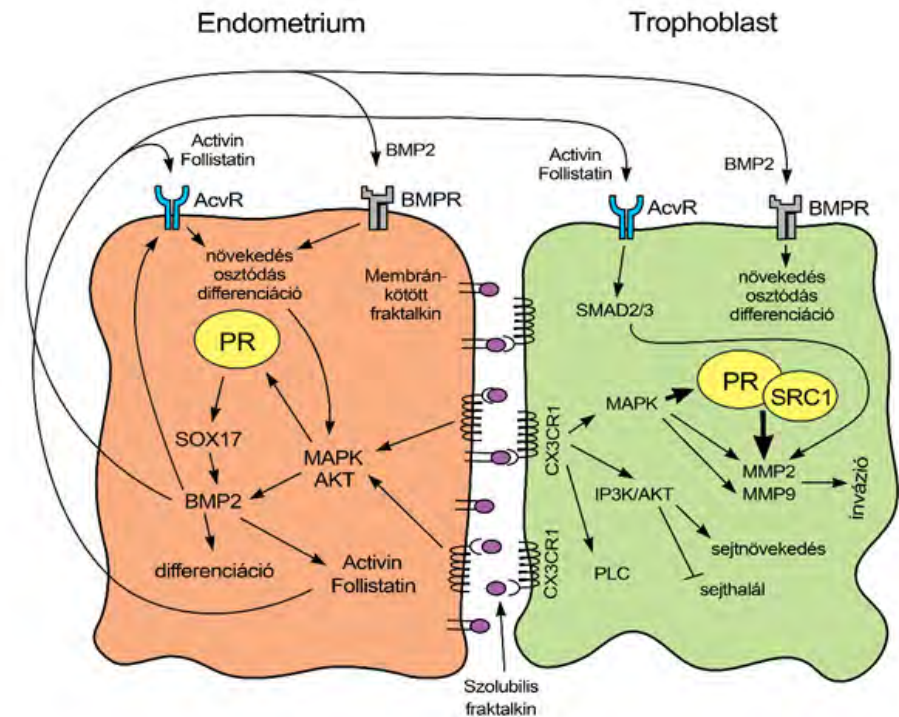
A Sox17 egy transzkripciós faktor, mely számos más, implantációban is szerepet játszó gén kifejeződését szabályozza a sejtmagban. Ismert, hogy a Sox17 jelentős mennyiségben van jelen a beágyazódás helyén az endometriumban és kapcsolatot alakít ki az embrió külső felszínével. Jelenléte aktiválja a beágyazódási ablakot, mely időtartam alatt a méhnyálkahártya állapota a optimális az embrió beágyazódása szempontjából. Vizsgálataink kimutatták, hogy a fraktalkin képes növelni a Sox17 fehérje mennyiségét, ezáltal elősegítheti az embrió megtapadását és beágyazódását az endometriumba.

Az endometrium számos olyan fehérjét bocsát ki a méhbe, melyek potenciális szabályozói az anya-embrió kapcsolatnak. Ebbe a fehérjecsoportba tartoznak az aktívinek, melyek az endometrium sejtekből kikerülve képesek a trophoblast sejtek felszínén elhelyezkedő receptoraihoz kötődni, ezáltal befolyásolni a sejtek működését. A fraktalkin kezelés hatására az endometrium sejtek fokozzák az aktivin molekulák termelését, melyek az aktivin receptorokhoz kötődve növelik a fent említett MMP enzimek termelését, így elősegítik

az embrió beágyazódását. Az aktivin receptorok a fraktalkin receptorhoz hasonlóan szintén képesek a MAPK enzimek termelését fokozni, így közvetve is hozzájárulnak a beágyazódás sikeréhez.

Az aktivin fehérje működésében szerepet játszik az endometrium által termelt follistatin, mely gátló molekulaként képes megakadályozni az aktivin receptorához való kötődését. Vizsgálataink során kiderült, hogy míg a fraktalkin növeli az aktivin molekulák kibocsátását, addig a gátló fehérje termelését csökkenti, így növelve az aktivin hatását a trophoblast sejteken.

A follistatin nemcsak az aktivin, hanem a csont morfogén fehérje 2 (BMP2) működését is képes gátolni. A BMP2 termelését szintén fokozza a fraktalkin kezelés, igaz nem közvetlenül, hanem a Sox17 fehérjén keresztül. A BMP2 sejtekből kikerülve a saját receptorához (BMPR) kötődik a trophoblast sejtek



16. ábra: A fraktalkin szabályozási mechanizmusa az endometrium és a trophoblast sejtekben. A fraktalkin a trophoblast sejt felszínén található fraktalkin receptorhoz kötődve elindítja a MAPK, AKT és PLC útvonalakat. A MAPK fehérjék képesek a progeszteron receptor aktivitását fokozni. Ezen kívül fokozzák az inváziót szabályozó mátrix metalloproteinázok termelését. A fraktalkin az endometrium sejtekben emeli a SOX17 fehérje termelését, mely elősegíti az embrió megtapadását, ugyanakkor növeli az aktivin és a BMP2 fehérjék kibocsátását is. Ezek a molekulák a trophoblast sejtek sejt felszíni receptoraihoz (AcvR és BMPR) kötődve elősegítik a sejtek invázióját és az embrió beágyazódását az endometriumba.

felszínén, hozzájárulva azok osztódásához és differenciálódásához. A BMP2 és az aktivin termelése időbeli eltérést mutat, az aktivin 24 óránál, míg a BMP2 6 és 48 óránál mutat emelkedést, így védve a trophoblast sejteket a túlaktiválódástól és a túlzott enzimtermeléstől. A fraktalkin kezelés hatására bekövetkező sejten belüli változásokat és azok következményeit a 16. ábra foglalja össze.

Kísérleti eredményeink rávilágítottak arra, hogy a fraktalkin az embrió beágyazódásának pozitív szabályozója. Képes befolyásolni a progeszteron receptor, az aktivin receptor és a BMP receptorok működését, valamint a mátrix metalloproteinázok termelését a trophoblast sejtekben, ezáltal segíti az inváziót. Az endometrium sejtekben a fraktalkin fontos szerepet játszik a beágyazódási ablak létrehozásában, azáltal, hogy növeli a Sox17 fehérje termelését, így lehetővé téve az embrió megtapadását. Mindezek alapján elmondható, hogy a fraktalkin kezelés hozzájárulhat az embrió sikeres megtapadásához és a beágyazódás folyamatához.

16. ábra: A fraktalkin szabályozási mechanizmusa az endometrium és a trophoblast sejten. A fraktalkin a trophoblast sejt felszínén található fraktalkin receptorhoz kötődve elindítja a MAPK, AKT és PLC útvonalakat. A MAPK fehérjék képesek a progeszteron receptor aktivitását fokozni. Ezen kívül fokozzák az inváziót szabályozó mátrix metalloproteinázok termelését. A fraktalkin az endometrium sejtekben emeli a SOX17 fehérje termelését, mely elősegíti az embrió megtapadását, ugyanakkor növeli az aktivin és a BMP2 fehérjék kibocsátását is. Ezek a molekulák a trophoblast sejtek sejt-felszíni receptoraihoz (AcvR és BMPR) kötődve elősegítik a sejtek invázióját és az embrió beágyazódását az endometriumba.

Eredményeink azt mutatják, hogy a fraktalkin a legnagyobb alkalmazott koncentrációban (20 ng/ml) volt hatásos a trophoblast sejtek beágyazódást szabályozó génjeinek kifejeződésére. Az endometrium sejtek jelenlétében azonban a trophoblast sejtek már az alacsonyabb fraktalkin koncentrációra (10 ng/ml) is reagáltak. A fraktalkin a receptorán keresztül növelte azon gének kifejeződését, melyek a trophoblast sejtek inváziójához szükségesek (mátrix metalloproteinázok), illetve azoknak a jelátviteli utaknak az aktivitását, melyek hozzájárulnak az beágyazódáshoz szükséges gének fokozott kifejeződéséhez. A fraktalkin emelte továbbá az endometrium sejtek olyan fehérjéinek a kibocsátását (aktivin, BMP2), melyek a trophoblast sejtekhez kapcsolódva képesek az invázió-képesség növelésére, valamint az ehhez szükséges útvonalak aktiválására.



IN VITRO FERTILIZÁCIÓ HATÉKONYSÁGÁNAK NÖVELÉSE: ÚJ DIAGNOSZTIKAI TERMÉK SZÜLETÉSE

A PROJEKT CÉLKITŰZÉSE ÉS A PIACI IGÉNY

Manapság teljesen elfogadott, ha valaki a 30-as vagy akár 35-ös éve után vállalja be az első gyermekét.

Ezzel párhuzamosan azonban az emberek biológiai fertilitása nem tolódtott ki. A fiatal nők továbbra is a húszas éveikben a legtermékenyebbek. A férfiak átlagos spermiumszáma az elmúlt évtizedekben olyan jelentős mértékben csökkent, hogy a WHO-nak új norma limitet kellett meghatároznia. Mindezek megnehezítik a természetes fogantatási folyamatot és egyre jobban ösztönzik a mesterséges megtermékenyítés irányának fejlődését.

Az IVF eljárás klinikai gyakorlatba történő bevezetése óta számos olyan technológia és módszertan született, aminek a célja a megtermékenyítési sikerráta növelése volt. Ennek ellenére a jelenleg elért sikerráta is igen alacsony, nagyságrendileg minden harmadik beültetett embrióból lesz gyermek.

A projekt célja ezen arány javítása volt egy új, eddig klinikumban nem használt technológia segítségével. A technológia a Pécsi Tudományegyetem Szentágothai János Kutatóközpont (PTE SZKK) Lab-on-a-Chip Kutatócsoport által szabadalmaztatott ötletén alapul.

A kutatócsoport retrospektív vizsgálattal kimutatta, hogy az embrió tápfolyadékában olyan fehérje degradációs folyamatok zajlanak, amelyek kapcsolatban vannak az embrió leendő életképességével. Ezért fejlesztési célunk egy olyan diagnosztikai eszköz prototípusának létrehozása volt, amely képes kimutatni e fehérje degradációjának a mértékét egy a degradációs folyamat során keletkező fragmens termék koncentrációjának a meghatározásával. A technológia nagy előnye, hogy a mérési folyamat során az embriót nem tesszük kis semmilyen fizikai vagy kémiai stressznek csupán annak tápfolyadékjából veszünk ki csekély, 20 µl-nyi mintát.

A PROJEKT BEN RÉSZTVEVŐ PARTNEREK ÉS SZEREPEIK

A projekt a PTE SZKK irányítása alatt valósult meg bevonva partner kutatóintézeteket, egyetemeket és a 77 Elektronika és Műszeripari Kft.-t, mint ipari szereplőket. A bevont partnerek mindegyike a megvalósítandó rendszer egy-egy eleméért feleltek:

A Semmelweis Egyetem Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet In vitro biológia kutatócsoportja (SE-OVI) a mérendő fehérje fragmens szintetizálásáért, speciális nagy érzékenységű és magas stabilitású receptorok fejlesztéséért felelt Dr. Mészáros Tamás irányításával.

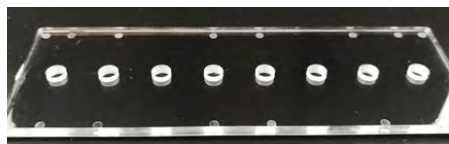
A Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar, "Lendület" Kémiai Nanoérezkelők Kutatócsoportja (BME-SZAKT) Dr. Gyurcsányi E. Róbert irányítása alatt az SE-OVI által fejlesztett egyedi receptor molekulák karakterizálásáért és speciális nanorészecskék e receptor molekulákkal történő funkcionális vizsgálásáért feleltek.

Az Eötvös Lóránd Kutatási Hálózat Energiatudományi Kutatóközpont

Mikrorendszerek Laboratórium kutatócsoportja (ELKH EK) a speciális, bioszszort integrált fogyóeszköz, úgynevezett lab-on-a-chip kazetta fejlesztéséért felelt Dr. Fürjes Péter irányításával.

Végül a 77 Elektronika Kft. (77E) Szabó Barnabás fejlesztési igazgatóhelyettes vezetésével és Varga Máté szakmai irányításával a fenti partneri együttműködést összefogva a mérőkészülék kifejlesztéséért és az egyes modulok rendszerbe történő integrálásáért felelt, valamint támogatást nyújtott a PTE SZKK pre-klinikai validációs méréseiben.

A IVF DIAGNOSZTIKAI RENDSZER FELÉPÍTÉSE



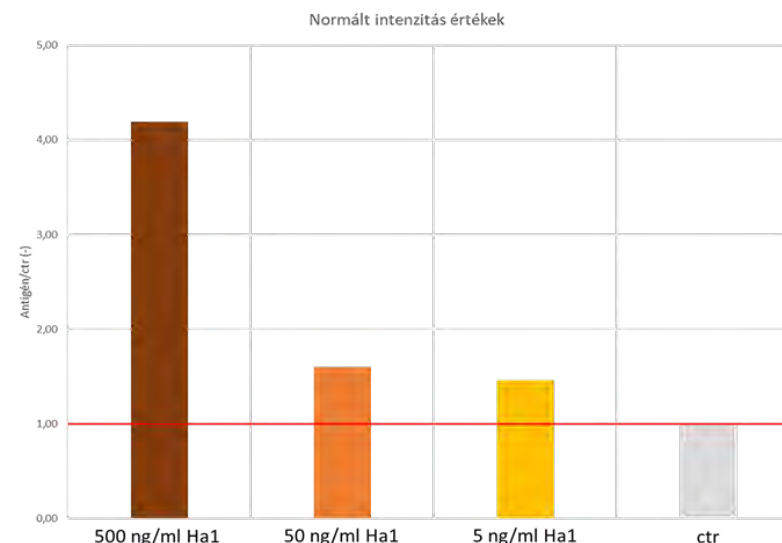
17. ábra: Az IVF készülék (fent) és fogyóeszköze (lent)

A kifejlesztett IVF diagnosztikai készüléknek - mely jelenleg prototípus fázisban van - három nagy alegysége van: (1) mintaelőkészítő modul, (2) mérő modul, (3) fogyóeszköz modul (17. ábra).

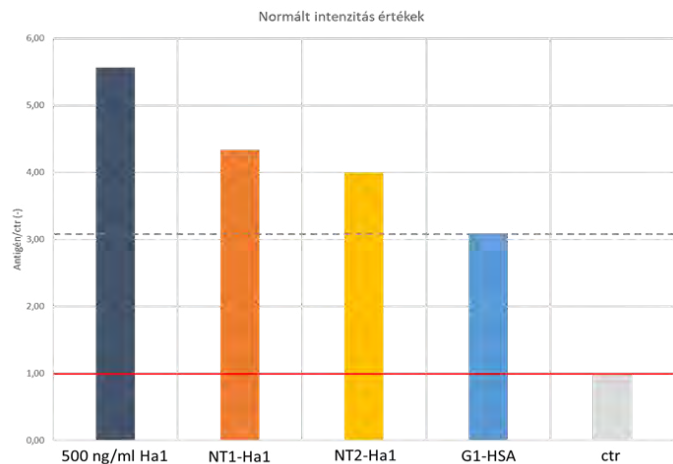
A mintaelőkészítő modul feladata, hogy az embrió tápfolyadékjából a mintát előkészítse a méréshez. Egy speciális protokoll szerint működő pipettázó robot megtisztítja a mérést zavaró fehérje komplextől a mintát. Az antitest-antigén kölcsönhatáson alapuló tisztítás hatásfoka >99%. Ez biztosítja, hogy a mérendő analit (fehérje fragmens) koncentrációja kimutatható legyen. Az antitest-antigén affinitáson alapuló tisztítási folyamatot a modul több lépcsőben végzi el, hogy a kívánt tisztaság biztosított legyen. A készülék képes akár egyszerre 7 páciens 28 mintáját megtisztítani. Egy páciens átlagos mintaelőkészítési procedúrája, embrió számtól függően nagyságrendileg 2 óra.

Az előkészített néhány mikroliternyi minta ezután automatikusan a készülék egyedi kialakítású fogyóeszközébe kerül. A fogyóeszköz egy olyan több csatornás, egyszer használatos, műanyag kazetta, amelybe egy páciens 5 mintája egymás mellett elfér, így öt embrió várható életképességéről kap azonnali információt a klinikus.

Ahhoz, hogy a készülék képes legyen a mérendő analit koncentrációjának változását mérhető fizikai jellel alakítani szükség volt egy nagy érzékenységű bioszszor kifejlesztésére és integrálására a fogyóeszközben. A bioszszor egy antitest-antigén kölcsönhatáson alapuló felületi torma-peroxidáz (HRP) szendvics assay. Ebben a rendszerben két különböző, de az analitra specifikus antitest biztosítja a szelektív és nagy érzékenységű kimutatást. A jelölő antitestet és a mérendő analitot tömbi oldatban a pipettázó robot összekeveri. Az így létrejövő HRP-vel jelölt antitest-antigén konjugátumot juttatjuk bele a kazetába. Itt a befogó antitest szerepe, hogy a konjugátumot a tömbi oldatból megkösse, így kialakítva a befogó antitest – antigén – jelölő antitest szendvicset. Ahhoz, hogy a HRP jelölésű szendvics assay bioszszorként funkcionáljon, szükség van egy speciális előhívó folyadékra (szubsztrát), amellyel reakcióba lépve az elbomlik. A bomlás során adott hullámhosszú megvilágítás hatására fényt emittál a rendszer, ami a mérő modul segítségével már mérhető fizikai jel. A mérőmodul feladata, hogy a fogyóeszközbe helyezett mintát lemérje és azt kiértékelje. A modul egy speciális fluoreszcens fotométer, amely diszkrét hullámhosszon megvilágítja a mintát és az onnan emittált fény intenzitását méri. A mért intenzitás arányos a mérendő analit koncentráció szintjével. A pipettázó robot a kazetában kialakított egyes reakcióterekbe beleméri a megtisztított mintákat. Ezt követően egy speciális előhívó folyadékot ad a mintákhoz majd 5 perces inkubációt követően leméri a mintákat. A mérés automatizált, a kazetta behelyezése manuálisan történik. A mérés ideje 1-2 perc.



18. ábra: 5 ng/ml analit koncentráció G1-ben mérve, rekombináns HSA mellett.



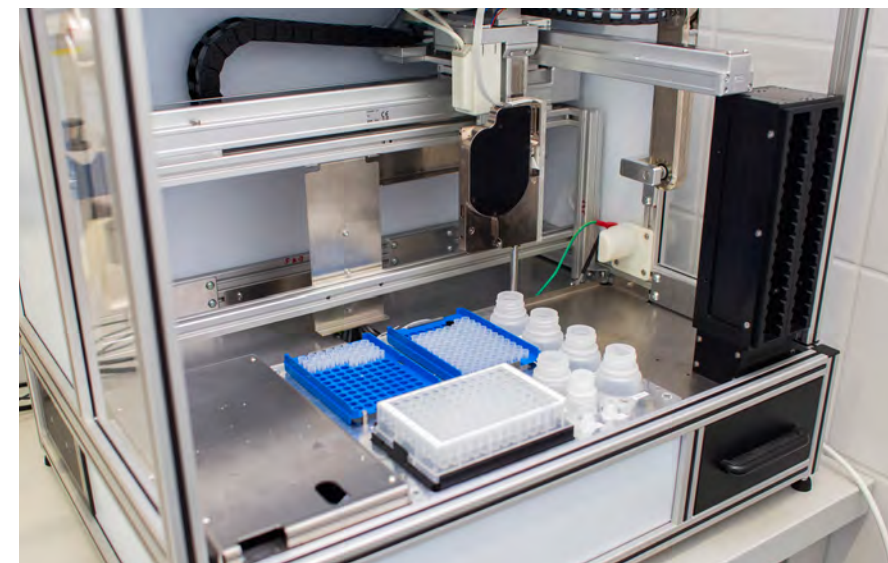
19. ábra: Az életképtelen embriók esetében analít szintje mérhetően megemelkedik a kiindulási állapothoz képest. Ez az életképes embriók esetében nem nő számottevően.

EREDMÉNYEK

A PTE Lab-on-a-chip kutatócsoport előzetes retrospektív klinikai kutatása alapján az IVF készüléknek 100 – 500 ng/ml analít koncentrációt kellett, hogy kimutasson (LOD – limit of detection) kb. 5-10 ng/ml-es kvantálási lépcsőben (LOQ – limit of quantification). A laboratóriumi spike-olt (vizsgálandó oldat ismert analít koncentrációval beállítva) mintákon történt mérések alapján megállapítható, hogy a készülék képes elérni a kívánt LOD és LOQ értékeket. A méréseket klinikai mintákon folytatjuk, ahol a arany standardként kezelt tömegspektroszkópai eredményekhez viszonyítunk. A laboratóriumi mérések, valamint az előzetes preklinikai mérések eredményeit a 18. ábra és a 19. ábra mutatja.

ÚT A PIAC FELÉ

Asszisztált reprodukciós (ART) és in vitro fertilizációs (IVF) módszerekre világszinten egyre nagyobb az igény a bevezetőben részletezett társadalmi és környezeti problémák miatt. Jelenleg a termékeny korban lévő párok ~10-15 %-nak van valamilyen fertilitási problémája, akiknek segítségre van szükségük a gyerekvállaláshoz. A különböző IVF klinikák és centrumok világszerte évi 2,5 millió ciklust végeznek el, melyeknek jellemzően negyede lesz sikeres terhesség, azaz a gyermek egészségesen megszületik. Ez azt jelenti, hogy éves szinten



2,8 % az IVF módszerekkel született gyermekek aránya a világban. Régióként jelentősen eltér ez a szám: Japánban eléri az 5%-ot, míg Indiában csupán 0,1%-ot, de mindenhol növekszik. Célunk a sikerráta növelése egy új és sikeres eszköz segítségével. A klasszikus IVF szelekciós technológiát, azaz az embrió morfológiai jellemzői alapján történő szelekciót a piacon jelenleg a morfokinetikai eszközök és megoldások tudják hatékonyan növelni. Ekkor a beültetési procedúra sikerrátája elérheti optimális esetben az 50 %-ot. A morfokinetikai rendszerek a morfológiai vizsgálatokkal szemben nem csak diszkrét időpontokban adnak információt az embrió állapotáról, hanem kvázi folytonosan. Így a morfológiai változásokról jelentősen több információ áll a klinikus rendelkezésére, ami elősegíti őt a helyes döntésben. További esélyt a többszörös embrióbeültetés ad, ami azonban az ikerterhesség és koraszülés kockázatát növeli.

Az általunk fejlesztett eszköz a jelenlegi klinikai gyakorlat kiegészítését célozza meg. A IVF rendszer az előzetes klinikai kutatások alapján képes a negatív szelekciós eljárásban segíteni a klinikus munkáját, azaz a morfológiai jegyek alapján kiválasztott embriókat tovább szűkíteni aszerint, hogy mely embriók nem lesznek életképesek a beültetés után. Másképpen fogalmazva a kifejlesztett rendszer a beültetés utáni embrió életképtelenségét tudja nagy valószínűséggel meghatározni. Reményeink szerint a fejlesztés eredményeként megszülető rendszerrel kibővített IVF szelekciós protokoll sikerrátája meghaladhatja a 60%-ot is.

A mérőrendszer jelenleg TRL5-ös szinten van, preklinikai vizsgálatok folynak vele. A vizsgálatok eredménye határozza meg a következő fejlesztési irányokat.

EMBRIÓ-EREDETŰ EXTRA-CELLULÁRIS VEZIKULA; AZ EMBRIÓ-ANYAI KOMMUNIKÁCIÓ ESZKÖZE, ÉS AZ EMBRIÓ BEÁGYAZÓDÁSI KÉPESSÉGÉNEK MUTATÓJA

Kutatásaink gyújtópontjában az embrió beágyazódás mechanizmusának vizsgálata, ezen belül a jó implantációs készséggel rendelkező embrió azonosítása állt.

A PIBF SZEREPE A BEÁGYAZÓDÁSBAN

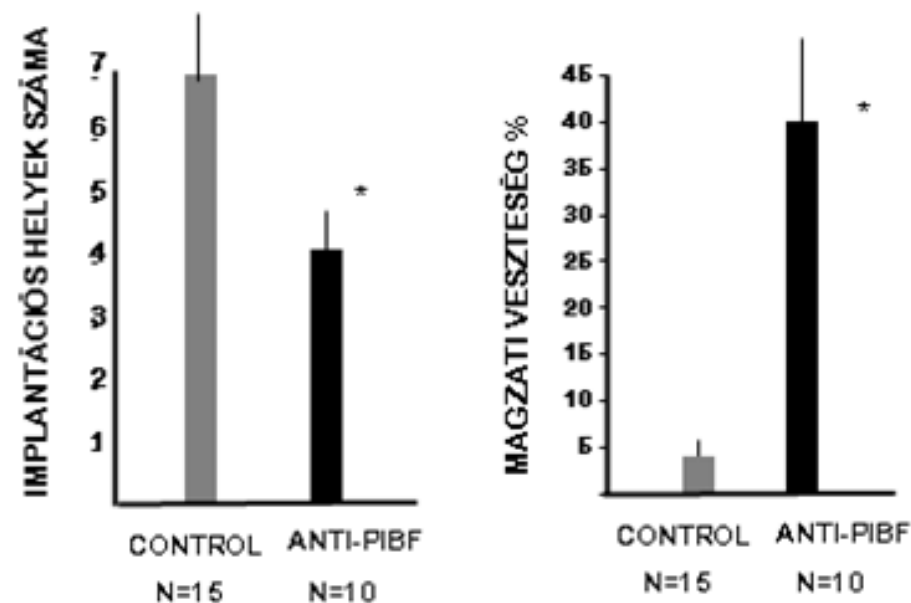
Bár az anya immunrendszere felismeri az a magzaton kifejeződő az apai eredetű antigének jelenlétét, normális lefolyású terhesség során nem támadja meg, hanem tolerálja azokat. A magzat megfelelő fejlődését biztosító immunológiai környezet anyai és magzati eredetű citokinek "párbeszéde" révén jön létre. Ennek a folyamatnak meghatározó szereplői a progeszteron, valamint – egy annak immunológiai hatásait közvetítő fehérje – a progeszteron-indukálta blokkoló faktor (PIBF).

A progeszteronreceptor aktiválódása során termelődő PIBF elősegíti az endometrium sztrómasejtjeinek decidualis átalakulását, és hozzájárul ahhoz, hogy a méhnyálkahártya egy rövid ideig (implantációs ablak) alkalmas legyen a megtermékenyült petesejt befogadására. A PIBF endometriális koncentrációja az implantációs ablak időszakában a legmagasabb, ami valószínűsíti, hogy a

PIBF szerepet játszik a beágyazódás folyamatában.

Valóban, a peri-implantációs időszakban PIBF-hiányos egerekben az implantációs arány szignifikánsan alacsonyabb, mint a kontroll állatokban, és azok az embriók, amelyek mégis beágyazódnak, a terhesség későbbi szakaszában elpusztulnak (20. ábra).

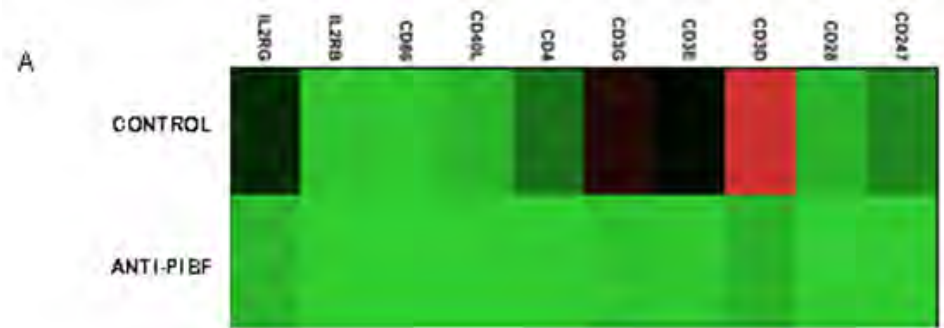
PIBF hiányában az anyai immunválasz is a terhesség fennmaradása szempontjából kedvezőtlen módon változik meg. PIBF deficiens egerek CD4+ T



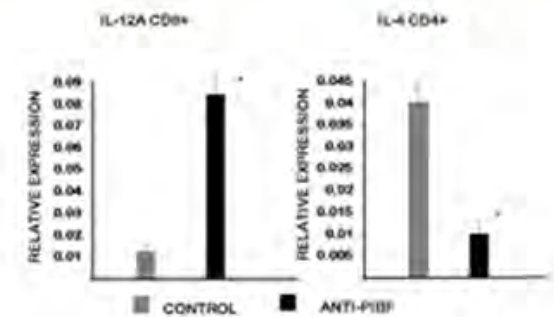
20.ábra PIBF deficiens egerekben a kontrollokhöz képest csökkent az implantációs helyek száma, és fokozott a magzati halálozás. *P<0.05

sejtjein csökken a T sejt aktivációban szerepet játszó gének expressziója (21. A ábra), így azok a T sejtek, melyek a normális lefolyású terhességre jellemző Th2 domináns citokin egyensúly kialakításában szerepet játszanak, működésképtelenné válnak. Fokozza a problémát, hogy a naív T sejtek PIBF hiányában Th1 irányban differenciálódnak, ami kedvezőtlen a magzati antigéneket toleráló immunológiai környezet kialakítása szempontjából (21 B. ábra).

A fentiek alapján nyilvánvaló, hogy a PIBF jelenléte szükséges a terhesség normális lefolyása szempontjából kulcsfontosságú Th2 domináns citokin egyensúly kialakulásához. Felmerül ezek után a kérdés, hogy az implantáció időszakában hogyan kommunikál az embrió az anyai immunrendszerrel. Az extracelluláris vezikulák (EV) lipid membránnal határolt struktúrák, melyekbe a kibocsátó sejt nukleinsavakat, fehérjéket vagy egyéb molekulákat csomagol. Ezek az üzenetek eljutnak a környező sejtekhez, így az extracelluláris veziku-



B

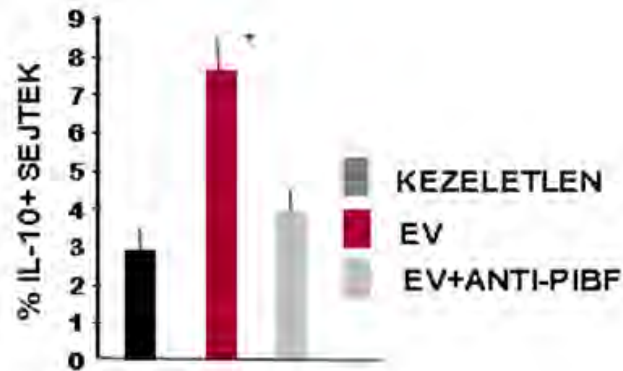


21.ábra: PIBF hányában az anyai T sejtek Th1 irányban differenciálódnak PIBF deficiens egerek CD4+ T sejtjeiben csökken a T sejt aktivációban szerepet játszó gének expressziója (A) és fokozódik a CD8+ sejtek IL-12 expressziója, a CD4+ sejtekben pedig csökken az IL-4 gen expressziója (B).



lák a sejtek közötti párbeszéd eszközeiként működnek. Az embrió által termelt extracelluláris vezikulák kimutathatók a tenyésztett embriók tápfolyadékában, valamint elektronmikroszkóppal, az implantáció helyén, az endometrium és a beágyazódó embrió közti résben. Immunfestéssel igazolható, hogy az embrió által termelt extracelluláris vezikulák egyebek közt PIBF-t is tartalmaznak. Egerek perifériás limfocitái embrió-eredetű extracelluláris vezikulák jelenlétében fokozott mértékben termelik az IL-10 cytokint (22. ábra), tehát az embrió eredetű extracelluláris vezikulák befolyásolják az anyai immunrendszer működését, hozzájárulva a magzat intrauterin fejlődése szempontjából kedvező immunológiai környezet megteremtéséhez.

Az implantáció sikerének másik tényezője a jó minőségű embrió. Több országban elterjedt eljárás az asszisztált reprodukció során, egynél több embrió beültetése. Ez a gyakorlat azonban nem csupán a terhesség esélyét, de az ikerterhesség veszélyét is növeli. Az ikerterhesség a koraszülés leggyakoribb oka. Míg az egyes terhességek 12-15%-a, az ikerterhességek 50%-a végződik koraszüléssel. Nem beszélve az esetleges későbbi következményekről, a

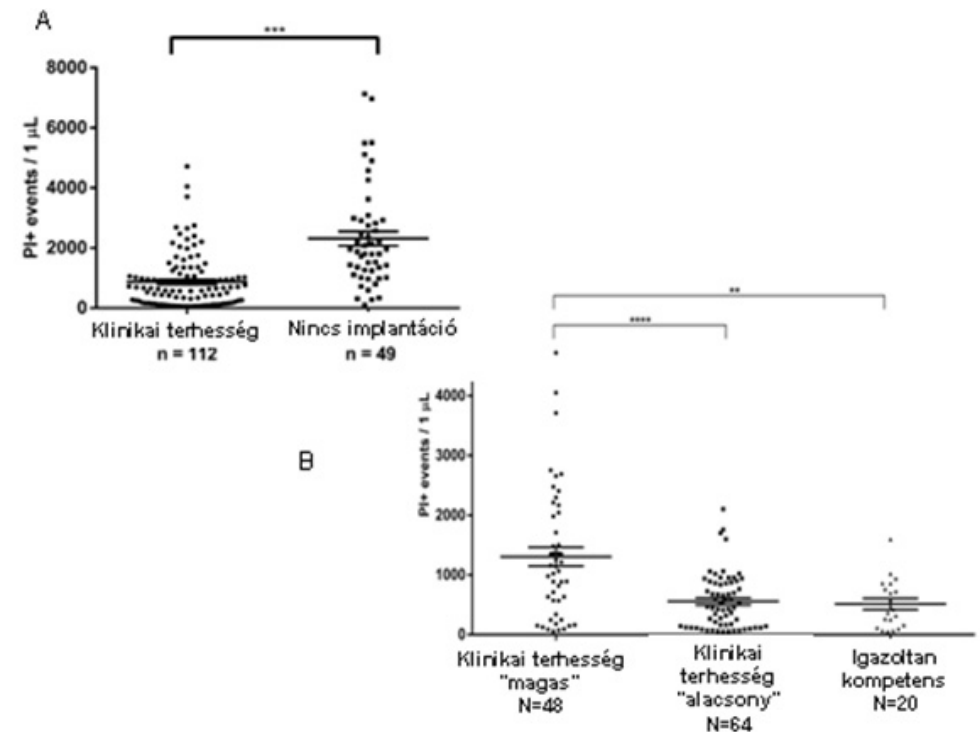


22.ábra: Az embrió által termelt EVk befolyásolják az anyai limfociták citokintermelését. A tenyésztett embrió által termelt, nukleinsavat tartalmazó extracelluláris vezikulák számának meghatározása alkalmas a jó beágyazódási képességgel rendelkező embrió azonosítására

koraszülött csecsemő perinatális ellátásával kapcsolatos költségek tízszer magasabbak, mint a terminusra született egészséges újszülötteké. A fentiek miatt a követendő eljárás egyetlen embrió beültetése lenne, ehhez azonban képesnek kell lennünk azonosítani azt az embriót, amely képes lesz beágyazódni a receptív endometriumba.

Kidolgoztunk egy nem invazív, egyszerűen és gyorsan elvégezhető tesztet, amely alkalmas arra, hogy a tenyésztett embriók 5. napos tápfolyadékában található nukleinsav tartalmú (PI+) tartalmú extracelluláris vezikulák számának meghatározásával a tenyésztett embriók közül kiválasszuk azt, melynek legnagyobb az esélye a beágyazódásra. A vizsgálatba 88 IVF kezelésben részesült nőt választottunk be. Ötvennyolc esetben klinikai terhesség jött létre, harminc esetben sikertelen volt a beültetés. A klinikai terhességet eredményező 112 embrió tápfolyadékában szignifikánsan alacsonyabb volt a nukleinsav tartalmú EV-k száma, mint annak a 49 embriónak a tápfolyadékában, melyek nem implantálódtak (23. A ábra). Tekintve, hogy a hazai gyakorlatnak megfelelően legtöbb esetben egynél több embrió került beültetésre, feltételeztük, hogy a beültetett két embrió közül az implantálódott, amelynek tápfolyadékában alacsonyabb volt a PI+ extracelluláris vezikulák száma (23. B ábra). Ennek a feltételezésnek bizonyítására húsz olyan embrió tápfolyadékát vizsgáltuk, amelyeknek egyes beültetése egy klinikai terhességet eredményezett, így azonosítható volt az összefüggés a beágyazódott embrió és a tenyésztőfolyadékában található PI+ EVk száma között. A vizsgált húsz tápfolyadék közül 19-ben alacsony volt a nukleinsav tartalmú EVk száma, ami azt mutatja, hogy ez a módszer valóban alkalmas a jó beágyazódási képességgel rendelkező embrió azonosítására (23. B ábra).

A módszer előnye, hogy gyorsan elvégezhető így közvetlenül a friss embrió transzfer előtt kiválasztható az az embrió, amelynek a legnagyobb az esélye a beágyazódásra.

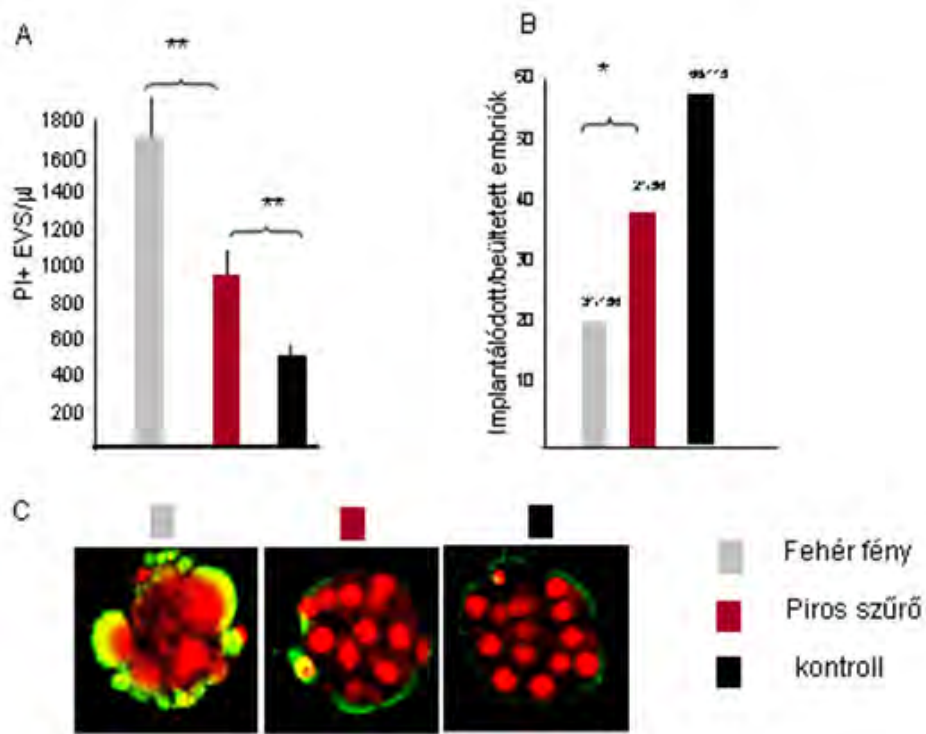


23.ábra: Nukleinsavat tartalmazó extracelluláris vezikulák tenyésztett embriók tápfolyadékában

FÉNY HATÁSA A TENYÉSZTETT EMBRIÓK BIOLÓGIAI TULAJDONSÁGAIRA

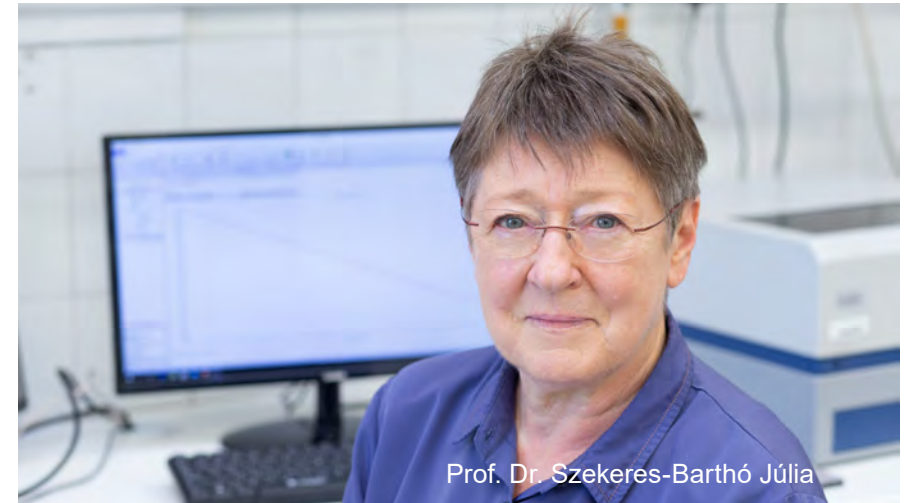
Az embriót tenyésztése során számos stresszhatás érheti, amelyek rontják élettani funkcióit, így beágyazódási képességét. Az egyik ilyen károsító tényező a fehér fénynek való kitettség, amelynek hatásai klinikai körülmények között piros szűrő alkalmazásával csökkenthetőnek bizonyultak. Állatkísérletes modellben vizsgálva a fehér fény embrió-károsító hatásának mechanizmusát, megállapítottuk, hogy a tenyésztett embriók fehér fényel való kezelése növeli a tápfolyadékba kibocsátott nukleinsavtartalmú EVk számát (24.A ábra), fokozza a DNS fragmentációt (24.C ábra) és rontja az implantációs arányt (24. B ábra). A fehér fényforrás elé helyezett piros szűrő alkalmazása valamennyi kedvezőtlen folyamat hatását szignifikánsan csökkentette.

A fenti eredmények alapján megállapítható, hogy a PIBF nélkülözhetetlen a receptív endometrium kialakulásához, az embrió extracelluláris vezikulák segítségével kommunikál az anyai immunrendszerrel, az embrió által termelt



24.ábra: Fény hatása az embriók élettani funkcióira

DNS tartalmú extracelluláris vezikulák számának meghatározása alkalmas a legjobb implantációs készséggel rendelkező embrió kiválasztására és a laboratóriumi manipuláció és tenyésztés során figyelmet kell fordítani az embrió fényvédelmére.



Prof. Dr. Szekeres-Barthó Júlia

ORVOSI BIOLÓGIAI INTÉZET KUTATÓCSOPORTJA

A kutatócsoport vezetője:

Prof. Dr. Szekeres-Barthó Júlia

A projektben közreműködő kutató-fejlesztők:

Balassa Tímea
Bogdán Ágnes
Dr. Bognár Zoltán
Csabai Tímea Judit
Görgey Éva
Dr. Mikó Éva

Kutatást segítők:

Béres Tamás Márton
Molnár Judit
Plótár Noémi

A TÜSZŐFOLYADÉK BIOMARKEREINEK VIZSGÁLATA IVF KEZELT BETEGEKBEN

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

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

Munkacsoportunk a tárgyidőszakban a FF neurohormon (szerotonin, 5-HT; kinurenin, kisspeptin, brain-derived neurotroph faktor, BDNF) tartalmának, oxidatív-stressz-markereinek (8-hidroxi-2'-deoxiguanozin, 8-OHdG; totál antioxidáns kapacitás, TAC) és egyes protektív faktorainak (sirtuin 1, sirtuin 6, resveratrol) jelentőségét kívánta megismerni.

Vizsgálatainkat a már korábban is alkalmazott protokoll szerint végeztük:

a kérdéses biomarkert az ovarium hiperstimuláció előtt, majd az FF és petesejt aspirációval egyidőben nyert anyai szérum mintákban, valamint az FF-ben határoztuk meg. Ily módon lehetővé vált a hiperstimuláció hatásának és az egyes markerek szisztémás, vagy lokális/ovariális eredetének megítélése, valamint az IVF eredményességét jelző paraméterekkel (érett petesejtek és életképes embriók száma, kémiai és klinikai terheség) külön-külön történő összevetése.

NEUROHORMONOK SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA IVF KEZELT BETEGEKBEN

Szerotonin (5-HT)

Az 5-HT neurotranszmitter, mely fontos szerepet játszik a hypothalamus-hypophysis-gonád tengely működésének szabályozásában és a női reprodukcióban: 5-HT-axon végződéseket mutattak ki a hypothalamikus gonadotropin-releasing hormon (GnRH) neuronokban és igazolták szabályozó szerepét a GnRH gén expressziójában és a hormon szekréciójában, közvetve a hypophysealis FSH és LH szintézisben és szekréciójában, ezeken keresztül meghatározó tényezője az ovariumban zajló steroidogenesis, folliculogenesis és oogenesis centrális szabályozásának.

A központi szabályozás mellett kiemelt jelentőségű az 5-HT intraovariális hatása. Ezt látszik alátámasztani, hogy 5-HT-t mutattak ki az FF-ben, és az ovariális granulosa sejtekben az 5-HT közvetlenül is fokozta a progeszteron szekrécióját (2). További jelentős felismerés, hogy az 5-HT rendszer egyes elemeit (triptofán hidroxiláz, 5-HT, 5-HT receptorok, 5-HT transzporterek) mutatták ki petesejtekben és preimplantációs embriókban. Ezek a megfigyelések egyértelműen arra utalnak, hogy az autokrin/parakrin 5-HT rendszer már a fejlődés legkorábbi időszakában is működőképes. Az 5-HT jelentőségének vizsgálatát az is indokolta, hogy az IVF kezelésben részesülő asszonyok körében egyre gyakoribb a szelektív szerotonin re-uptake inhibitorok (SSRI) alkalmazása, mely rontja az eljárás eredményességét, magzati károsodást, terhességi komplikációkat és az újszülöttek adaptációs zavarait okozhatja.

Vizsgálatainkat a Pécsi Tudományegyetem Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján működő Asszisztált Reprodukciós Központban 30 betegnél végeztük. A szuperovulációs kezelés, a fertilizáció módja és az embrió szelekció az eddigi gyakorlatnak megfelelően történt. Az 5-HT meghatározásokat ELISA módszerrel (IBL International GmbH, Hamburg, Germany) végeztük.

Megállapítottuk, hogy az anyai szérum 5-HT az ovarium hiperstimuláció hatására szignifikánsan emelkedett (173.6 ± 64.7 vs 238 ± 107.1 ng/ml, $p < 0.01$)

és a terhes csoportban jelentősen magasabb értékeket mértünk, mint a nem-terhes csoportban ($p < 0.01$) mind a hiperstimuláció előtt, mind azt követően. Az FF-ben az 5-HT alacsony koncentrációban volt jelen (13.1 ± 9.8 ng/ml) és értéke függetlennek bizonyult mind az anyai szérumból, mind az IVF kimenetelétől. Eredményeink többváltozós lineáris regressziós analízisével (Modell 1, $R^2=0.336$) kimutattuk, hogy az érett petesejtek száma, mint függő változó szignifikáns összefüggést mutatott a post-stimulációs anyai szérumból ($\beta=0.447$, $p=0.015$) és az FF 5-HT szintekkel ($\beta=0.443$, $p=0.016$). Többváltozós logisztikus regressziós modell (Modell 3, $R^2=0.595$) alkalmazásával a klinikai terhesség, mint függő változó ugyancsak szignifikáns kapcsolatban volt az anyai szérumból 5-HT koncentrációjával ($\beta=1.028$, $p=0.047$). Vizsgálataink megerősítették, hogy mind a keringő, mind a lokálisan képződő ovariális 5-HT fontos tényező a női reprodukív funkció fenntartásában és az IVF eredményességének biztosításában.

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)

Mivel szoros kölcsönhatást írtak le az 5-HT és több hypothalamikus neuropeptid között, vizsgálatainkat kiterjesztettük a BDNF és a kisspeptin szerepének tisztázására. A BDNF elsődleges forrása a központi idegrendszer, de termelését perifériás szövetekben, köztük a vaszkuláris endotéliumban, simaizom sejtekben és aktivált mononukleáris fehérvérsejtekben is kimutatták. Transzportjáért a trombocyták felelősek, melyek aktiválásakor az 5-HT-vel együtt a plazmába kerül. A BDNF és receptora (TrkB) az ovariumban is megtalálható, autokrin/parakrin működésük alapvető feltétele a zavartalan folliculus képződésnek, a petesejt érésének, az implantációnak és a korai embrió és placenta fejlődésének. IVF kezelésben részesülő betegekben, cumulus és granulosa sejt preparátumokban a BDNF szekréció fokozását figyelték meg ösztadiol, hCG, LH és FSH hatására.

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

Saját vizsgálatainkban, melyeket az 5-HT-vel együtt ELISA módszerrel végeztünk (Ray Biot ech, Peachtree Corners, GA, USA) az ovarium hiperstimuláció nem okozott változást a BDNF szintjeiben és nem találtunk különbséget a terhes és nem-terhes csoportok értékei között. Ugyanakkor a terhes csoport BDNF FF koncentrációja szignifikánsan alacsonyabb volt, mint amit a nem-terhes csoportban mértünk (21.9 ± 12.7 vs 47.6 ± 52.9 , $p < 0.026$). Ennek megfelelően szignifikáns negatív korrelációt igazoltunk a BDNF szintek, valamint a petesejt és embrió szám, továbbá a kémiai és klinikai terhesség gyakorisága között. Alapvetően új megfigyelés, hogy szignifikáns pozitív korrelációt igazoltunk az FF BDNF és 5-HT között, ami arra utal, hogy a két hormon pozitív feed-back

szabályozása ovariális szinten is működik, tehát a BDNF indirekt módon, az 5-HT termelés stimulálása útján hozzájárulhat a reprodukív potenciál megőrzéséhez, vagy javításához.

Kisspeptin

A hypothalamikus peptid hormon, kisspeptin, a reprodukció egyik fontos pozitív szabályozója. A hormont és receptorát az ovariumban is kimutatták és meggyőző adatok bizonyítják, hogy fontos szerepet játszik a tüsző-és petesejt érésében, az embrió implantációjában és a placentációban. Feltételezik, hogy az ovarium eredetű kisspeptin és BDNF együttes hatásként növelik a petesejt érését, működő receptoraik hiányában a jelátviteli rendszer sérül és korai petefészek elégtelenség alakul ki. Klinikai szempontból is jelentős felismerés, hogy az ovarium hiperstimulációs szindróma miatt veszélyeztetett asszonyokban a kisspeptin-54 egyszeri, vagy ismételt dózisban történő adásával kontrollált LH kiáramlást és a petesejt érésének javulását lehetett elérni.

Saját IVF kezelt beteganyagunkban az ELISA-val mért kisspeptin (Peninsula Laboratories International, San Carlos, CA, USA) szérumból koncentrációját a hiperstimuláció szignifikánsan növelte (0.50 ± 0.18 vs 0.79 ± 0.21 ng/ml, $p < 0.01$) de nem találtunk különbséget a terhes és a nem terhes csoportok értékei között. Az FF kisspeptin koncentrációja a többi vizsgált neurohormonhoz hasonlóan a szérumból szintektől függetlennek bizonyult, alátámasztva annak ovariális eredetét. Többváltozós lineáris regressziós modellt alkalmazva igazoltuk, hogy a post-stimulációs szérumból kisspeptin az érett petesejt számát pozitívan befolyásolta ($R^2=0.150$, $\beta=0.398$, $p=0.29$). Eredményeink és az irodalmi adatok alapján a megfelelően alkalmazott kisspeptin kezelés javíthatja az IVF eredményességét.

Triptofán-kinurenin-serotonin (5-HT)

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

A triptofán-kinurenin konverziót két enzim mediálja: a máj eredetű triptofán-2-3-dioxigenáz (TDO), melynek aktivitását a glukokortikoidok fokozzák, a progeszteron és az ösztrogének pedig gátolják. A másik enzim, indolamin-2-3 dioxigenáz, melyet citokinek és gyulladáshoz vezető mediátorok aktiválnak, számos sejttypusban, köztük a monocitákban és makrofágokban is megtalálható. A triptofán szint csökkenését a kinurenin és metabolitjainak növekedése és az 5-HT szintézis csökkenése kíséri. Mivel az 5-HT protektív reprodukív hatását egyértelműen igazolták, a triptofán-kinurenin út aktiválása az 5-HT következményes csökkenésével ronthatja a reprodukív teljesítményt. Ennek ellentmondani látszik, hogy a TDO-t,IDO-t és a kinurenin katabolizmus tovább-



bi enzimeit kimutatták a placentában, a decíduában és a korai embrióban, ahol immunológiai védelmet biztosít a sikeres implantációhoz és a zavartalan embrionális/fötális fejlődéshez. Ezen túlmenően számos vizsgálat arra is felhívta a figyelmet, hogy a triptofán-kinurenin rendszer egyes elemei az immun-tolerancia kialakítása mellett fontos tényezők az oxidatív stressz elleni védelemben. A kinureninek pozitív szerepét egyértelműen az is bizonyítja, hogy az IDO enzim gátlása, vagy a gén deléciója magzati veszteségeket és terhességi szövődményeket okozott.

Tekintettel arra, hogy mind a triptofan-kinurenin, mind a triptofan-5-HT rendszer protektív hatású és mindkét metabolikus út verseng a szubsztrát triptofánért, optimálisnak az látszik, hogy egyik vonal sem dominál, hanem egyensúlyi helyzet alakul ki. Ennek ellenőrzésére a korábbi vizsgálati protokollt alkalmazva HPCL-MS-MS módszer felhasználásával 64 beteg azonos mintáiban meghatároztuk a triptofán, a kinurenin és az 5-HT szérumszintjeit. Megállapítottuk, hogy az ovarium hiperstimuláció hatására mindhárom metabolit koncentrációja csökkent, jelezvén, hogy kevesebb triptofán áll a két katabolikus út rendelkezésére. Az érett petesejtek száma az FF 5-HT-vel pozitív, míg az FF triptofán/5-HT és kinurenin/5-HT arányokkal negatív korrelációt mutatott. Ennek megfelelően a terhes csoportban szignifikánsan magasabb szérumszint (p=0.045) és FF 5-HT (p=0.020), valamint alacsonyabb kinurenin/5-HT arányt (p=0.024) tudtunk igazolni. Többváltozós logisztikus regressziós analízissel az érett petesejtek számát, mint függő változót csupán az FF 5-HT befolyásolta szignifikánsan ($\beta=0.473$, p=0.001). Eredményeink azt igazolják, hogy kedvezőbb IVF kimenetel várható, amennyiben az 5-HT-kinurenin egyensúly az 5-HT javára tolódik el.



Prof. Dr. Sulyok Endre

OXIDATÍV STRESSZ-MARKEREK ÉS ANTIOXIDÁNSOK VIZSGÁLATA IVF KEZELT BETEGEKBEN

8-hidroxi-2'-deoxyguanozin (8-OHdG) és total antioxidáns kapacitás (TAC)

A reaktív oxigén molekulák (reactive oxygen species, ROS; szuperoxid anion, hidrogén peroxid, hidroxil anion) a normális sejt anyagcsere termékei és fontos szerepet játszanak a celluláris folyamatok szabályozásában. Abban az esetben azonban, ha túlzott termelésük meghaladja a sejtek antioxidáns kapacitását, a ROS-ok reakcióba lépnek a sejtek fehérje, lipid és DNS elemeivel és celluláris diszfunkciót, morfológiai károsodást és apoptózist okozhatnak. IVF kezelt betegekben fiziológias ROS képződés szükséges a petesejt egészséges éréséhez, a sikeres fertilizációhoz és az embrió zavartalan fejlődéséhez. Az FF optimális ROS szintje azonban nincs definiálva és mind a túlzott, mind az elégtelen ROS generálás kedvezőtlenül befolyásolja az IVF kimenetelét. Ez a megfigyelés összhangban áll a „quiet metabolism” koncepciójával, mely szerint a normális metabolikus aktivitás felső, vagy alsó határán túl az embrió életképessége csökken.

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

A kérdés további tisztázására munkacsoportunk 61 IVF kezelésben részesült beteg esetében meghatározta az anyai szérumban és FF 8-OHdG szintjét (ELISA; IBL International GmbH, Hamburg, Germany) és totális nem-enzimikus antioxidáns kapacitását (TROLOX-kalibrált kemilumineszcenciás módszer). Megállapítottuk, hogy ovarium hiperstimuláció hatására a szérumban TAC jelentősen növekedett (95.4 ± 17.8 vs 104.8 ± 17.4 $\mu\text{mol/l}$, $p=0.02$), míg a 8-OHdG szignifikánsan csökkent (17.6 ± 5.1 vs 15.6 ± 5.3 ng/ml , $p<0.001$). Mindkét biomarker kimutatható volt az FF-ben, de lényegesen alacsonyabb koncentrációban, mint az anyai szérumban és azzal nem mutatott összefüggést. A TAC és 8-OHdG kapcsolatát vizsgálva azok FF értékei egymástól függetlennek bizonyultak, míg a szérumban koncentrációjuk között szignifikáns negatív korrelációt észleltünk ($r=0.241$, $p=0.009$) jelezvén, hogy a magasabb TAC csökkenti a DNS károsodást. További fontos megfigyelés, hogy mind a TAC ($r=0.302$, $p=0.027$), mind a 8-OHdG ($r=0.268$, $p=0.039$) kedvezőtlenül befolyásolja az embriók életképességét. Eredményeink megerősítik azon törekvések szükségességét melyek az IVF eljárás során az OS csökkentésére irányulnak.

Sirtuinok (SIRT 1, SIRT 6) és rezveratrol

A SIRT-ek NAD-függő hiszton deacetyláz enzim fehérjék, melyek bizonyos védelmet jelentenek az öregedéssel és az öregedéssel kapcsolatos kóros állapotokkal szemben. A protein család 7 tagja ismert (SIRT 1-7), melyek szövet-specifitása, szubcelluláris lokalizációja és aktivitása különböző. Általános jellemzőjük, hogy alapvető sejtfunkciók szabályozásában vesznek részt (energiaforgalom, redox státusz, jelátvitel, sejtciklus, genom stabilitás). Az életkor előrehaladtával az ovarium funkció is beszűkül, a tüsző- és petesejt képzés csökken, a petesejtek minősége romlik. Az ovarium öregedésére jellemző változások szoros összefüggést mutatnak a nukleáris SIRT1 és SIRT6 szintekkel. SIRT1 hiányos egértörzsekben ovarium diszfunkció alakul ki és a petesejtek fejlődési potenciálja beszűkül. A közelmúltban végzett humán vizsgálatok is igazolták, hogy a SIRT 1-7 tagjai a germinális vezikulumokban és az érett petesejtekben jelen vannak, az érés folyamán up-regulációjuk következik be. A SIRT-ek fertilitást javító hatásának közvetítésében az anti-oxidáns rezveratrol és a telomeráz aktivitásának növelése, a telomer integritásának védelme is szerepet játszik.

Ezen irodalmi adatok alapján a korábban is alkalmazott vizsgálati protokoll szerint 30 IVF kezelt betegnél az anyai szérumban és az FF mintákban ELISA módszerrel meghatároztuk a SIRT 1 és SIRT 6, valamint a rezveratrol szinteket (Cloude-Clone Corporation, Houston, TX, USA). Megállapítottuk, hogy az ovarium hiperstimuláció hatására a szérumban SIRT1 a terhes csoportban szignifikánsan növekedett (6.0 ± 5.6 vs 7.9 ± 3.4 ng/ml , $p<0.05$) és jelentősen meghaladta a nem-terhes csoport értékeit (4.7 ± 2.7 ng/ml , $p<0.05$). A SIRT6 esetében ilyen változás nem következett be, de ezek értéke a terhes csoportban csökkent mind a hiperstimuláció előtt (0.31 ± 0.19 vs 0.14 ± 0.07 ng/ml , $p<0.05$), mind azt követően. Mindkét sirtuint (SIRT 1, SIRT 6) kimutattuk az FF-ben, de a szérumban szintektől függetlennek bizonyultak, ami lokális, ovarialis termelésükre utal. Egyéb ható tényezőkre történő korrekció után szignifikáns pozitív korrelációt találtunk az FF SIRT6 és az érett petesejt szám ($F=6.609$), valamint a szérumban SIRT1 ($F=10.008$), szérumban SIRT 6 ($F=5.268$) és a klinikai terhesség gyakorisága között. A rezveratrol sem a SIRT-ekkel, sem az IVF kimenetelét jelző markerekkel nem mutatott összefüggést.

Eredményeink megerősítették a SIRT-ek lehetséges szerepét a reprodukció sikerében, de további molekuláris biológiai vizsgálatok szükségesek a SIRT enzimek aktivitásának meghatározására és az esetleges epigenetikai változásainak feltárására.

MOLEKULÁRIS KÉPALKOTÁS AZ IN VITRO FERTILIZÁCIÓ SZOLGÁLATÁBAN

TÖMEGSPEKTROMETRIÁS KÉPALKOTÓ VIZSGÁLAT

A tömegspektrometria (mass spectrometry, MS) semleges atomok, valamint molekulák ionizációján alapuló szerkezetvizsgáló és analitikai módszer. A technika lényege, hogy a berendezés a vizsgálati anyagból előállított gáz halmazállapotú ionos részecskéket választ el töltéssűrűsége eső relatív tömegük (m/z) szerint csökkentett nyomáson, elektromos vagy mágneses mezők segítségével. A mérés eredményeként egy függvényes ábrát (tömegspektrum) kapunk, melyen az ionintenzitás jelenik meg a tömeg/töltés arányában. A legmagasabb csúcs a báziscsúcs, ehhez viszonyítjuk az összes többi komponensét.

A tömegspektrometria egyik fontos előnye a nagy érzékenység, ami azt jelenti, hogy rendkívül kis mennyiségű (10-12 g) mintából is gyors és megbízható módon tudunk már pontos mennyiségi mérést végezni. Lényegében bármilyen halmazállapotú minta jól vizsgálható vele, csupán az előkészítésen és az ionforráson múlik, hogy a minta gáz fázisba jusson. A jobb készülékek esetén a felbontóképesség, a specificitás és a reprodukálhatóság a legmagasabb igényeket is kielégíti. A technika kapcsán megemlíthető hátrányok közé tartozik, hogy maga az eszköz és a hozzá tartozó laboratóriumi felszerelés igen költséges, valamint, hogy a hatékony üzemeltetéshez szükséges szakértelem megszerzése

időigényes feladat.

A mátrix-segített lézer deszorpciós ionizációs, repülési időn alapuló képalkotó tömegspektrometria (MALDI-TOF MS Imaging) egy új, gyorsan fejlődő módszer, amely lehetővé teszi a molekuláris jelek értékelését közvetlenül a szövetek felszínéről. Az Imaging egy olyan jelölésmentes technika, amely segítségével képesek vagyunk egyetlen mérés alkalmával akár több száz molekula szöveten belüli lokalizációjának vizsgálatára és azt később 2D-ban vagy akár 3D-ban is megjeleníthetjük. A technika segítségével szövettani metszetek, sejtek és sejt kultúrák jelölésmentes képalkotási vizsgálata valósítható meg, akár sejtszintű felbontással. Ennek következtében olyan kép hozható létre, mely igen hasonlít egy szövettani metszethez, mégis annál több, hiszen a molekuláris alkotók térbeli megoszlásáról is információt ad. Így nem csak a terhesség során jelentkező természetes biokémiai változásokat tudjuk nyomon követni, hanem az in vitro fertilizáció (IVF) esetén fellépő esetleges változásokat is detektálni tudjuk.

A LIPIDEK SZEREPE A TERHESSÉGBEN

A lipidek olyan szerves molekulák, melyek fontos szerepet játszanak az emberi szervezetben. Tagjai igen heterogén csoportot alkotnak, és változatos szerepekkel bírnak szervezetünkben. Ezek a molekulák többek között a sejtmembránok felépítésében (foszfolipidek), tartalék tápanyagként (trigliceridek), valamint másodlagos hírvivőként (prostaglandinok, leukotriének) funkcionálnak, valamint szabályozzák a szövetek aktivitását is (szteroidok).

A lipidomikai kutatások, melyek egy szövet vagy szerv teljes lipidösszetételének meghatározását, azonosítását, lipidosztályokra bontását foglalják magukba, egy új és gyorsan fejlődő területet jelentenek többek között az embriók fejlődésével, beágyazódásával, koraterhességgel foglalkozó kutatásokban. Mivel a különböző lipidosztályok igen eltérő funkciókkal rendelkeznek, melyek közül számos csak rövid életű, így ezek gyors tér- és időbeli változása több területen is érdeklődésre tarthat számot.

Az elmúlt években robbanásszerűen növekszik azon tanulmányok száma, melyek a különböző, IVF-el, vagy terhességgel kapcsolatos szövetek, szervek lipidomikáját vizsgálják különféle módszerekkel. Számos kutatócsoport foglalkozott már a különböző állapotok petesejtjeinek, zigótáinak, a korai embriófejlődés szakaszainak, valamint későbbi időpontokban a placenta lipidösszetételének a vizsgálatával, illetve

számos olyan lipid változásával, melyek a jelátvitelben játszanak fontos szerepet.

Egy korábbi állatkísérletes tanulmányban az implantáció, illetve a koraterhesség során számos lipid mind idő- mind térbeli változást mutatott. Egyrészt a különböző lipidosztályok mutattak az idő előrehaladtával dinamikus változást (a beágyazódás előtt a foszfatidilkolin, a beágyazódáskor a glicerofoszfolipid mutatott legnagyobb intenzitást), másrészt a különböző lipideket alkotó zsírsavak is jelentősen változtak (a linolsavat, dokozaheksénsavat tartalmazó lipidek az antemezometriális, míg az olajsavat tartalmazók a mezometriális oldalon voltak nagyobb koncentrációban megtalálhatóak).

A foszfolipidek nem csak a sejtek felépítésében, a membránok kialakításában játszanak központi szerepet, hanem számos biológiailag aktív molekula, mint például az eikozanoidok előanyagaként is szolgálnak, melyek egyik legfontosabb forrása egy többszörösen telítetlen omega-6 zsírsav, az arachidonsav. Az arachidonsavból a ciklooxygenáz 1 és 2 nevű enzimek (COX-1 és COX-2) állítják elő a megfelelő prosztaglandinokat, melyek attól függően, hogy melyik alosztályba tartoznak, különféle élettani hatásokkal rendelkeznek.

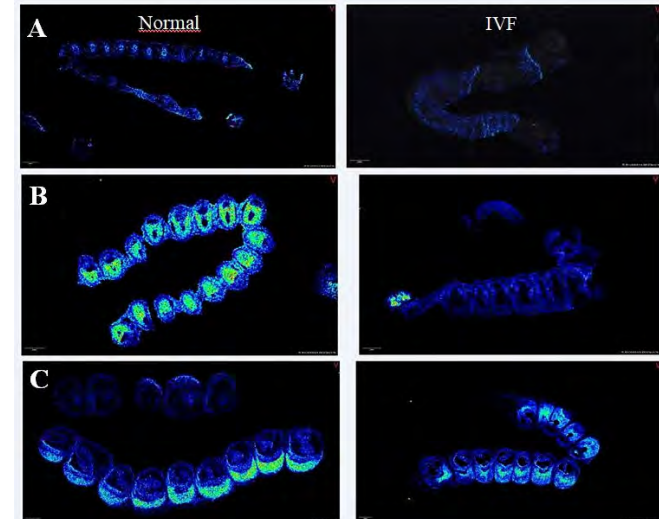
Több kutatás rámutatott a COX-1 és COX-2 enzimek központi szerepére a beágyazódás körüli időszakban. A beágyazódás előtti megnövekedett cox-1 gén kifejeződése, melyet a méh ödémája kísér, jelezheti a COX-1 által kifejeződő prosztaglandinok szerepét a méh nyálkahártyának a megfelelő előkészítésében a megtermékenyített petesejt befogadására. Ugyanakkor a beágyazódás után a cox-2 gén kifejeződése nő meg jelentősen azokon a területeken, ahová az embrió beágyazódott, azt sugallva, hogy a COX-2 által szintetizált prosztaglandinok az érkeződésben és a méhlepény létrehozásában játszanak központi szerepet. A COX-2 által termelt prosztaglandinok közül az egyik legfontosabbnak a prosztaglandin I₂ (PGI₂) tűnik a beágyazódásban, valamint a méhlepény korai fejlődésében.

NORMÁL ÉS IVF MINTÁK ÖSSZEHOSONLÍTÁSA

A sikertelen terhesség hátterében gyakran a beágyazódás előtti, alatti, vagy közvetlen utáni károsodás áll. Az IVF esetében a sikertelenség oka lehet többek között, hogy a megtermékenyített petesejtet egy nem megfelelően felkészített méhbe ültetik be. A befogadásra alkalmas méh

belső rétegének, az endometriumnak strukturális és funkcionális érésen kell átesnie. Amikor ez lejajlott, rövid ideig fogékony lesz a megtermékenyített petesejt érkezésére. A korai embrionális történéseket bizonyítottan befolyásolja a foszfolipid metabolizmus és a hozzá kapcsolódó jelátviteli folyamatok. A foszfolipidek a biológiai membránok lényeges felépítő és szabályozó komponensei, továbbá számos bioaktív molekula előanyagaként is szolgálnak, mint például az eikozanoidok és lizo-foszfolipidek.

Vizsgálati mintáinkat CD-1 egerekből nyert terhes méhek alkották. A kioperált szöveteket -80°C-on tároltuk a feldolgozásig, majd később metszeteket gyűjtöttünk a szövettani vizsgálatokhoz. Ehhez 8 µm vastagságú metszeteket készítettünk egy Leica típusú kriosztát készülékkel, majd a lemezeket standard hematoxilin-eozin festékkel festettük, a dokumentálásra pedig digitális tárgylemez szkennert alkalmaztunk. Ugyanekkor 15 µm vastagságú metszeteket vettünk fel ITO (Indium Tin Oxide) lemezekre is, melyeket Imagingre szántunk. A minta előkészítése kritikus lépés az Imaging eredményei szempontjából. Ehhez a megfelelő vastagságú metszetet egy gondosan kiválasztott mátrixszal kell bevonnai, mielőtt a lemez bekerülne a tömegspektrométerbe. A mátrix oldatot, mely esetünkben α-ciano-4-hidroxifahéjsav (CHCA) volt, spray segítségével juttattuk a minta felszínére minél finomabb cseppek



25. ábra: A) 6 napos terhesség. A PC 36:1 kevésbé dúsult a mesterségesen létrehozott embriókban, normál terhesség esetén azonban az embriók körül jól láthatóan dúsult. B) 8 napos terhesség. A PC 36:4 normál terhesség alatt az antemezometriális zónában jelentkezett jelentős intenzitással, míg IVF esetén szinte teljesen hiányzott ez a molekula. C) 10 napos terhesség. Normális terhességben a mezometriális zónában a PC 34:2 intenzitása magasabb volt, mint az IVF terhességnél.



formájában, hogy az egy homogén bevonatot képezzen. Az optimális mátrix megválasztásában jelentős szerepe van annak, hogy pozitív vagy negatív módban akarunk mérni. Jelenlegi eredményeinket pozitív módú mérés során kaptuk, így főként SM- és PC-csúcsokat detektáltunk. A tömegspektrometriás méréshez Autoflex II TOF/TOF típusú készüléket használtunk.

Eredményeinkből egyértelműen látszik, hogy a mesterséges megtermékenyítés hatással van a méh különböző részeinek, valamint az embrió molekuláris felépítésére. Hogy milyen biokémiai útvonalon valósulhat meg ez a változás, arra az alábbi két teória ad választ (25. ábra).

A méhben található teljes arachidonsav mennyiség mintegy 93%-a tárolódik a foszfolipidekben, ezek közül is 80% raktározódik foszfatidilkolinban (PC), foszfatidiletanolaminban (PE) és trigliceridek (TAG) formájában. A sejtfal foszfolipidjeiből az arachidonsav a foszfolipáz A2 enzim által szabadul fel. Arachidonsavból keletkeznek a ciklooxygenáz enzimek által a prosztaglandinok, melyek az eikozanoidok közé tartozó molekulák. Az ilyen módon előállított prosztaglandinok több típusának (PGI₂, PGE₂, PGF₂α) jelentős szerepe van az ovulációban, a megtermékenyítésben, a beágyazódásban, továbbá a decidualizációban, mely az endometrium sejteinek morfológiai és funkcionális változásait jelenti, kiegészülve az anyai artériák átalakulásával. Elsődlegesen a prosztaciklin (PGI₂) nélkülözhetetlen a beágyazódáshoz és a decidualizációhoz, mely hatását a peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor egyik típusának (PPARβ/δ) aktiválásával fejt ki. A receptor aktiválásával sejtosztódás és érépződés indul, melyek a korai embriófejlődés fázisában elengedhetetlen folyamatok.

Egy másik jelentős molekula a lizo-foszfátidsav (LPA), mely jelátviteli molekulaként a beágyazódáson túl abban játszik még fontos szerepet, hogy a hólyagcsírák egyenlő távolságban ágyazódjanak be a méhbe. Ezt a folyamatot nevezzük spacing-nek. Hogy pontosan hogyan valósul meg ez a folyamat, arról egyelőre csak feltételezések állnak rendelkezésre. Eszerint a LPA a méh simaizom rétegének összehúzóását váltja ki. Az ösztrogén és progeszteron által szabályozott G-protein-kapcsolt egyik receptorának (LPAR3) expressziója különösen az implantáció körüli időszakban emelkedik meg, mely egybe esik a megnövekedett prosztaglandin szintézissel. Ehhez hozzájárulhat, hogy a LPAR3 közvetetten fokozza a COX-2 enzim működését. Ez egy igen szoros interakciót feltételez a két említett jelátviteli útvonal között.

COX-GÁTLÁS ESETLEGES HATÁSA A KORATERHESSÉGBEN

Mivel több kutatás felvetette a COX-1 és COX-2 enzimek központi szerepének a lehetőségét a beágyazódás körüli időszakban, ezért arra a kérdésre is kerestük a választ, vajon egy COX-gátló lényegesen befolyásolja-e a korai implantáció lipidomikai eltéréseit. A COX-1 és COX-2 enzimek izoenzimek: hasonló reakciókat katalizálnak, mégis több különbség adódik egyrészt az általuk létrehozott eikozanoidok között, másrészt részben ebből kifolyólag eltérő élettani hatásokkal is rendelkeznek. Korábbi tanulmányok alapján a COX-1, és az általa létrehozott proszttaglandinok és tromboxánok a szülés megindításában vesznek részt, míg a COX-2 által létrehozott proszttaglandinokat elsősorban az ovulációval, megtermékenyítéssel, beágyazódással és a decidualizációval hozzák összefüggésbe. A terhesség folyamán tehát a COX-1 és COX-2 jelentős időbeli koncentrációváltozáson megy keresztül.

Bár számos szelektív (csak az egyik enzimre ható) COX-gátló gyógyszer létezik, vizsgálatunkban azonban egy nem szelektív COX-gátló, az aszpirin hatását vizsgáltuk a koraterhelességben, mivel ezzel egyszerre mindkét enzim által képződött eikozanoidok képződését gátolni tudjuk. Kísérletünkben CD-1 egereket itattunk aszpirinnel már a terhesség előtt, majd folytattunk a méh kivételének időpontjáig. Az előző vizsgálathoz hasonlóan itt is a kioperált méhből metszeteket készítettünk egyrészt klasszikus szövettani (hematoxilín-eozin), illetve Imaging vizsgálatra. A lipideket ismét pozitív módban vizsgáltuk, így elsősorban a PC és SM frakciók változásait követhettük nyomon.

Az Imaging képek alapján számos lipid mutatott jelentős idő- és térbeli változást a koraterhelességben. A beágyazódás előtt elsősorban a telített zsírsavakat tartalmazó lipidek mutattak az endometriumban jelentős felhalmozódást, míg a többszörösen telítetlen zsírsavakat, elsősorban a proszttaglandinok prekursoraként szereplő arachidonsavat tartalmazó lipidek igen alacsony intenzitást mutattak és nem volt szövetspecifikus felhalmozódás megfigyelhető. Beágyazódás után elsősorban az egyszerűen telítetlen zsírsavakat tartalmazó lipidek dúsultak az antemezometriális zónában. A többszörösen telítetlen zsírsavakat, elsősorban az arachidonsavat tartalmazó lipidek változatlanul igen alacsony intenzitást mutattak, és elsősorban az implantációs zónák között voltak kimutathatók. A 10,5 napos terhes méhekben viszont már megjelentek és erős intenzitást mutattak az arachidonsav tartalmú lipidek, elsősorban a deciduában.

Eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk tehát, hogy nemszelektív

COX-gátlás hatására a koraterhelességben számos lipid jelentős időbeli változást mutatott. Ez a változás összefüggésben lehet a ciklooxigenázok által szintetizált eikozanoidoknak a lipidekre kifejtett hatásaival, azonban a pontos összefüggéseket további vizsgálatokkal kell alátámasztani. A lipidek változása egyrészt oki lehet, tehát a terhesség előrehaladásával magyarázható bizonyos lipidek nagyobb előfordulása, illetve eltűnése bizonyos szövetekből. Másrészt fennáll annak a lehetősége, hogy az általunk tapasztalt változás okozati, tehát a különféle eikozanoidok segítik elő a lipidek megfelelő változását a terhesség folyamán.

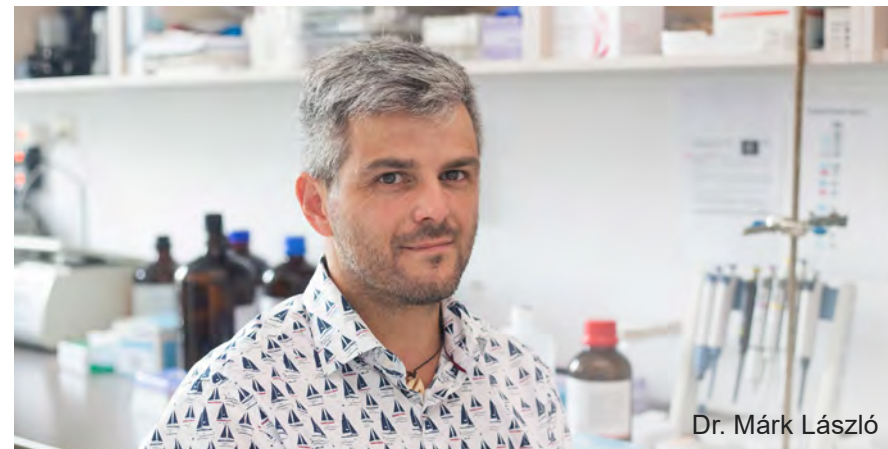
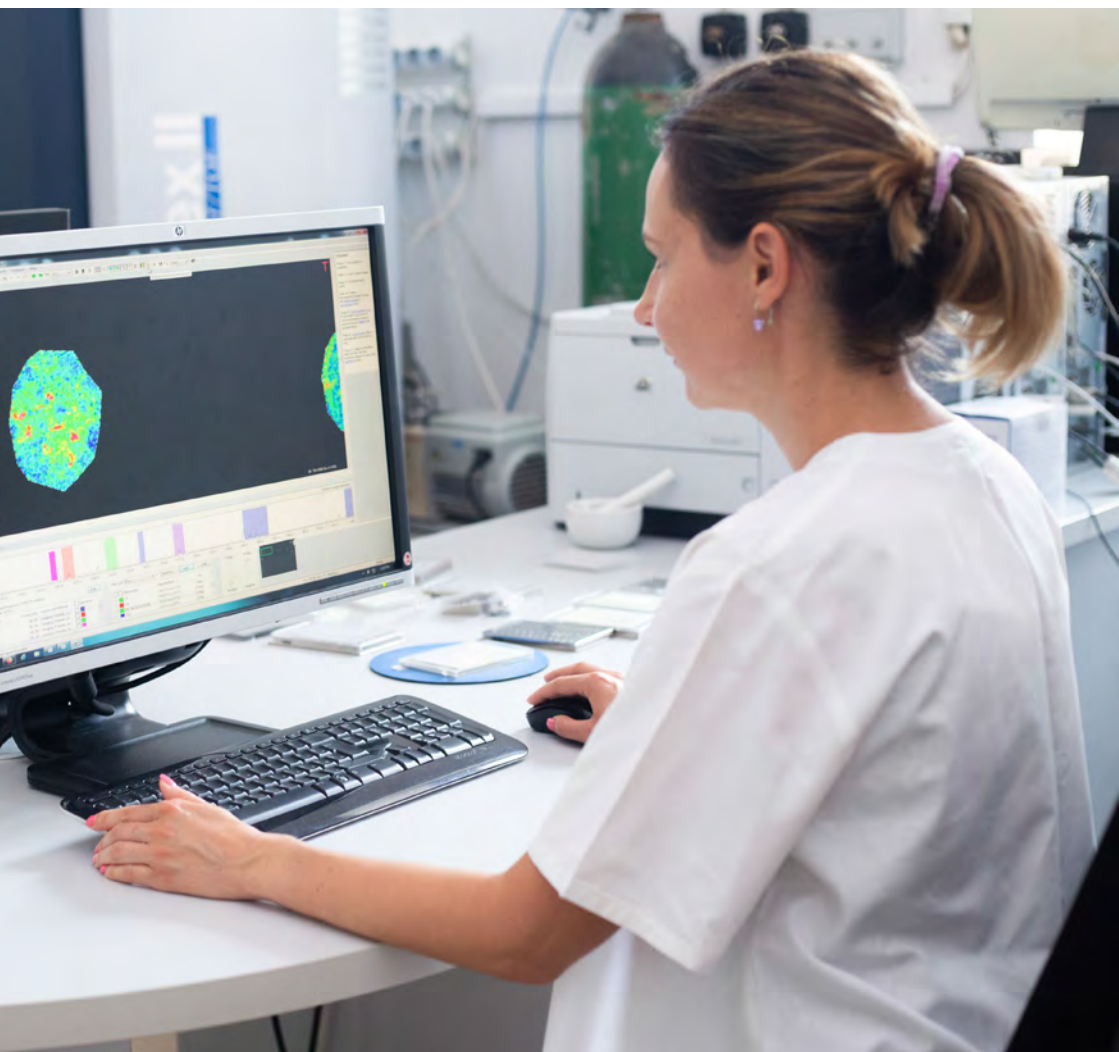
A MOLEKULÁRIS KÉPALKOTÁS ALKALMAZÁSÁNAK AZ ELŐNYEI

A MALDI-TOF MS Imaging egy olyan képalkotási technika, mely egyélti a különféle molekulák tömegspektrometriai azonosítását a hagyományos szövettani metszetek részletgazdag képi megjelenítésével. Ennek a technikának a segítségével lehetővé válik a szövetek vizsgálata előzetes kezelések, roncsolások nélkül.

Számos korábbi tanulmány igazolta már a különböző lipidosztályok, lipid természetű hírvivő molekulák szerepét a koraterhelesség teljes folyamata során: a petesejt kilökődésétől kezdve a megtermékenyítésen, beágyazódáson keresztül egészen a decidualizációig. Ha ebben a finoman hangolt rendszerben bármelyik lépésnél kis hiba is jelentkezik, az maradandó károkat okozhat és megakadályozhatja az esetleg már megtermékenyített petesejt beágyazódását, vagy kilökődést is okozhat. Az IVF sikeressége a téma intenzív kutatása ellenére is még mindig alacsonynak mondható. Ahhoz, hogy a természeteshez viszonylag közel álló viszonyokat tanulmányozni tudjunk, elengedhetetlen az állatmodell alkalmazása. A MALDI TOF MS Imaging nagy előnye a többi tömegspektrometriai technikához képest, hogy a terhes uterus kivétele és lefagyasztása után azonnal metszetek készíthetők, melyek lipidösszetétele anatómiai pontossággal leképezhető. Nem szükséges hosszú, többlépcsős mintaelőkészítés, a szövetek roncsolása a lipidösszetétel meghatározása előtt, hanem fagyasztva metszés és megfelelő mátrixszal való kezelés után rögtön vizsgálható a minta. A másik fő előnye, hogy a fagyasztva metszés során a méh és embrió anatómiai képletei érintetlenül maradnak, azok lipidösszetétele szövetfajta, illetve szerv-

szinten tanulmányozható, nem veszik el ez az információ a szövetek roncsolása során.

Ezzel a technikával tehát a különféle lipidek tér- és időbeli változásai nyomon követhetők az egyes szövettani képletekben és összehasonlíthatók az IVF-el megtermékenyített és normál terhes egérméhekben.



Dr. Márk László

BIOKÉMIAI ÉS ORVOSI KÉMIAI INTÉZET KUTATÓCSOPORTJA

A kutatócsoport vezetője:

Dr. Márk László

A projektben közreműködő kutató-fejlesztők:

Bóna Ágnes

Gitta Stefánia

Marosvölgyi Tamás

Dr. Molnár Helga

Dr. Szabó Éva

Kutatást segítő:

Horváth Anita

Schmidt János Krisztián

A kutatócsoport adminisztrátora:

Benke Gábor

ÚJ BIOMARKER VIZSGÁLATOK FEJLESZTÉSE TESTNEDVEKBEN ÉS SEJTES MODELLBEN

Az emberi szervezet fizikai és szellemi jóléte alapvetően befolyásolja az egyének életminőségét, társadalmi és szociális kapcsolatait és így a gyermekvárás sikerességét is. A testi és lelki jólét nagyon sok összetevőtől függ, beleértve az életmódbeli és táplálkozási szokásokat, fizikai aktivitást, környezeti terheléseket, családi hátteret, munkahelyi körülményeket és még rengeteg egyéb tényezőt.

Az egészség hosszú távú fenntartása sajnos nem mindig sikerül, ennek oka részben az örökletes sajátságokban, részben a környezeti terhelésben keresendő. Az egyik leggyakoribb egészségkárosodás a gyulladásos folyamatok létrejötte, mely lehet lokális és lehet az egész szervezetet érintő kórfolyamat. A helyi gyulladások (pl. orbánc) is szisztémássá válhatnak, ezzel akár életveszélyes állapot képesek okozni (pl. szepszissé fejlődve). Gyulladásos folyamatok a belső szervekben is kialakulhatnak, illetve társulhatnak alapbetegségekhez pl. cukorbetegség, magas vérnyomás, érelmeszesedés, bélbetegségek, autoimmun kórképek stb. Ezek a folyamatok kihatnak a termékenységi rátára is, csökkentve a természetes úton történő fogantatás sikerét, de ugyanúgy kihatnak a mesterséges megtermékenyítés hatásfokára is.

Éppen ezért, nagyon fontos olyan, az emberi szervezetben (vérben és vizeletben) fellelhető molekulák megismerése és mennyiségi mérése,

melyek ezeket a kedvezőtlen folyamatokat érzékenyen jelzik a klinikusok számára. Az ilyen típusú molekulákat szokás biomarkereknek nevezni. Egy másik nagyon fontos terület az egészségi állapot felmérése szempontjából az egyes sejttípusok energiaszintjének, normális működésének a mérése. Ezek a technikák mesterséges körülmények közt tenyésztett sejt kultúrákon végezhetőek el és alkalmasak jövőbeni gyógyszer-molekulák vagy toxikus anyagok hatásainak tesztelésére. Ezeket sejt-es életképességi módszereknek hívjuk.

Az IVF során az orvosnak döntenie kell, hogy a megtermékenyített petesejtekből származó néhány napos embriók közül melyik a legalkalmasabb a beültetésre. A projekt fő célkitűzése az embriók tápfolyadékában található fehérje biomarker (haptoglobín alfa-lánc) mennyiségi meghatározására alkalmas antigén – antitest alapú mérés kidolgozása volt.

A fent leírtak mindegyike fontos szerepet játszhat az IVF sikerességében és az esetleges sikertelenség okainak feltárásában.

A SZERVEZET EGÉSZÉT ÉRINTŐ GYULLADÁSOS FOLYAMATOK

A gyulladás lehet alacsony szintű, hosszú távú jelenség, mely valamilyen krónikus alapbetegséghez (pl. cukorbetegség) társul. Ma ezt a folyamatot tartják az egyik legfontosabb tényezőnek az artériás érkárosodások kialakulásában, következményes szív – érrendszeri betegségek és azok szövődményeinek létrejöttében.

Egy másik, sajnos egyre gyakoribb és akár már gyermekkorban is megjelenő szisztémás gyulladás a tápcsatornában alakul ki (Crohn betegség, colitis ulcerosa), sokszor súlyos szövődményeket okozva. Abban az esetben, ha a szervezet immunsejtjei a saját szövetek vagy fehérjék ellen termelnek antitesteket, akkor ún. autoimmun folyamatról beszélünk. Ilyen gyakori kórkép pl. a mindenki által ismert rheumatoid arthritis.

Az életet súlyosan veszélyeztető általános gyulladás a szepszis. Ez a kórkép kialakulhat bakteriális, virális, gombás fertőzések hatására vagy akár többféle kórokozó együttes fertőzésével. Szepszis sok betegséghez társulhat (immunelnyomó kezelés, daganatos kórképek, égési sérülések, súlyos lokális gyulladások), de szövődményként orvosi beavatkozások következtében is felléphet, pl. nagy kiterjedésű műtétek után.

Ezen betegségek korai felismerése, a betegség nyomon követése és az alkalmazott terápia sikerességének megítélése sokszor igen nehéz. Különösen szepszis esetében a korai diagnózis sokkal jobb gyógyulási eséllyel kecsegtet és az esetleges szövődmények (pl. több szerv károsodása, akut

veseelégtelenség) előre jelzése életet menthet. Ebben a küzdelemben a laboratóriumi módszerek kiemelt szerepet játszanak, és nagy szükség van olyan új, kiegészítő biomarkerek mennyiségi meghatározására melyek a fent leírt követelményeket teljesítik.

SEJTES ÉLETKÉPESSÉGI TESZTEK

Ezek a technikák nem az emberi szervezetből közvetlenül kivett minták (vér, vizelet, stb.) analízisén alapulnak, de vizsgálhatók velük emberi és állati eredetű sejtek egyaránt. Az életképesség megítélése nem könnyű, nagyon sokféle eljárás létezik és ezek általában különböző sejtfunkciókról adnak információt. Ezen módszerek érzékenységének köszönhetően akár egyetlen sejt is vizsgálható, ezért állatkísérletes modellekben a megtermékenyített petesejtekből fejlődő néhány napos embriók „jól-létének” objektív megítélése is kivitelezhető. Minél több paramétert tudunk meghatározni ugyanabból a sejt mintából, annál pontosabban ítélni tudjuk meg azok életképességét. Ezt hívjuk multiparaméteres életképességi tesztnek.

A multiparaméteres vizsgálatok azért is fontosak, mert segítségükkel a sejteket károsító vagy éppenséggel védő anyagok hatása kimutatható és pontosan mérhető. A gyógyszerkutatásban, vagy toxikus anyagok (pl. mikro-gombák toxinjai) vizsgálatában ezek a módszerek nélkülözhetetlenek.

ANTIGÉN – ANTITEST ALAPÚ BIOMARKER MÉRÉSEK

Az általunk tanulmányozott humán biomarkerek fehérjék. A humán fehérjéket idegen faj (állatok) szervezetébe juttatva, azok immunválaszként specifikus fehérje molekulákat, antitesteket termelnek, melyek felismerik a bevitt humán biomarkereket (antigéneket) nemcsak a szervezeten belül, hanem azon kívül is (in vitro).

A fehérjék általában jó antigének és speciális módszerekkel előállíthatók – elsősorban rágcsőkből – olyan antitestek, melyek tökéletesen azonos felépítésűek és az idegen antigénhez csak egy adott ponton (epitópion) kötődnek meg. Ezeket monoklonális antitesteknek hívjuk. Megfelelő körülmények közt az antitestek segítségével a biomarkerek mennyisége nagy érzékenységgel és specifikusan mérhető. Ma már a legtöbb esetben ezek a mérések laboratóriumi automatákon történnek, a készülék kalibrációja

után az eredmények mennyiségi egységekben kifejezve jelennek meg. Az IVF során mérni kívánt haptoglobulin alfa-láncre nézve nem állt rendelkezésre kereskedelmi forgalomban lévő diagnosztikus módszer, a molekula olyan kis mennyiségben fordul elő az embrió tápfolyadékában, hogy csak nagy érzékenységgű, fluoreszcenciás jelölővel ellátott rendszerben volt remény a kimutatására.

VIZSGÁLT GYULLADÁSOS BIOMARKEREK

Gelszolin és Gc-globulin

A természetes sejtelhalás- és megújulás következtében a vérbe kis mennyiségben ugyan, de mindig bekerül a sejtek egyik főbb fehérje alkotóeleme, az aktin. Az aktin a sejt váz (citoszkeleton) egy fontos összetevője, szerepe van a sejtek vándorlásában, a szőlőcukor (glukóz) felvételében és szinte minden életfolyamatban. Ugyanakkor fokozott sejtpusztulás következtében az aktin is nagyobb mennyiségben szabadul ki, ez a szervezet számára kedvezőtlen. Ezért a vérben specifikus, aktint megkötő fehérjék keringenek, melyek elfogják a felesleges aktint és kiürítik azt a keringésből. Legfontosabbak a gelszolin és a Gc-globulin, ezek egymással összhangban működnek. A gelszolin a vázizomzatban termelődik, míg a Gc-globulint elsősorban a máj szintetizálja. A Gc-globulin az aktin megkötése mellett a D vitamint is szállítja.

Amennyiben súlyos fokú sejtpusztulás következik be a szervezetben (pl. szepszis esetében), nagy mennyiségű aktin szabadul ki a sejtekből, ami fokozza a kórfolyamat súlyosságát. Ekkor a gelszolin és a Gc-globulin nem képes az összes aktin megkötésére és vérszintjük is lecsökken. A csökkenés mértéke arányos a folyamat súlyosságával és előre jelzi a betegség kimenetelét.

Mivel mindkét molekula új biomarkernek számít, ezért a gelszolin és a Gc-globulin vérszérumban történő meghatározásához nem áll rendelkezésre kereskedelmi forgalomban lévő diagnosztikus reagens.

Orozomukoid (alfa-1-savas glikoprotein vagy ORM)

Az ORM egy relatíve kis fehérjemolekula, de ugyanakkor sok szénhidrát komponenszt tartalmaz. Elsősorban a májban termelődik, onnan kerül a véráramba. Számos funkciót lát el, többek között sokféle molekulát szállít, és részt vesz a gyulladás kapcsán létrejövő immunválaszban is. A gyulladásos folyamatokban a vérszintje megemelkedik, ezért az ún. akut fázis fehérjék csoportjába tartozik. Az albuminnál kisebb, így a mérete miatt a veséken keresztül a vizeletbe is bekerül, bár egészségesekben csak na-

gyon kis mennyiségben.

Megfigyelték, hogy a vizelet ORM (u-ORM) koncentrációja szisztémás gyulladáshoz kapcsolódó folyamatokban (pl. Crohn betegség, szepszis) megemelkedik, minél súlyosabb és kiterjedtebb a folyamat, annál magasabb u-ORM koncentrációk mérhetők. Súlyos szepszisben ez meghaladhatja az egészségesekre jellemző u-ORM szint 200-szorosát is. Ezért a vizelet ORM koncentrációjának mérése mind a diagnosztikában, mind a betegek követésében kiemelt jelentőséggel bír. Az u-ORM is új jelző molekula, ezért méréséhez szintén nem áll rendelkezésre kereskedelmi forgalomban lévő diagnosztikus reagens.

Cystatin-CA cystatin-C (CYSC) gyakorlatilag a szervezet összes sejtjében megtalálható kisméretű fehérje, elsődleges szerepe a fehérjéket bontó enzimek gátlása (proteáz inhibitor). A CYSC molekula méreténél fogva szintén megjelenik a vizeletben, a véráramból a veseműködés során kiszűrődve. Amennyiben a vese szűrő funkciója károsodik, a CYSC koncentrációja megnő a vérben, ezért mennyiségi mérése jól tükrözi a vesefunkciót. A vérszérum CYSC meghatározáshoz rendelkezésre áll gyári diagnosztikus reagens.

Egészségesekben a vizelet CYSC (u-CYSC) nagyon kis mennyiségben van jelen, de akut vesekárosodáskor a koncentrációja sokszorosára emelkedik. Ezért az u-CYSC szintjének emelkedése előre jelezheti az akut veseelégtelenség kialakulását és az esetleges művese kezelés szükségességét. Mivel jelenleg az u-CYSC szintén nem része a rutin diagnosztikai palettának, ezért méréséhez nem áll rendelkezésre gyári reagens készlet.

MULTIPARAMÉTERES SEJTÉS ÉLETKÉPESSÉGI VIZSGÁLATOK

Az élő sejtek talán legfontosabb sajátosága, hogy energiaszintjük magasabb az őket körülvevő (nem élő állapotú) környezetnél. Ehhez a sejtek tápanyagokat, elsősorban glukózt használnak fel és annak átalakítása során a glukózból nagy energiájú vegyület, az adenzin-trifoszfát (ATP) keletkezik. Az ATP univerzális energia donor, szinte minden életfolyamathoz szükséges. Ezért, ha valamilyen oknál fogva a sejtek ATP tartalma lecsökken, akkor a sejtek fokozatosan a sejthalál felé közelednek, életképességük rosszabb lesz. Egy bizonyos szinten túl pedig bekövetkezik a sejthalál. Önmagában azonban az ATP tartalom mérése nem elegendő az életképesség megítéléséhez, mert azt viszonyítani kell más, csak lassabban változó (referencia) paraméterekhez, pl. a sejtek fehérje- vagy



nukleinsav tartalmához. Az ATP-n kívül mérhető a sejtek glukóz tartalma is, ami szintén az életképességet tükrözi. Ezek a vizsgálatok általában lumineszcenciás módszerekre épülnek, így érzékenyek és nagyon kevés sejt, akár egy állati embrió is elégséges a kivitelezésükhöz. Több életképességi paraméter együttes meghatározása pontos képet ad a sejteket érő pozitív vagy negatív hatásokról (védő vagy toxikus anyagok).

AZ IVF EMBRIÓ TÁPFOLYADÉK BIOMARKERÉNEK MÉRÉSE

A megtermékenyített petesejteket mesterséges környezetben, tápfolyadékban steril körülmények között növesztik, maximum 5 napon keresztül a beültetés előtt. Eközben, az embrionális sejtekből fehérje bontó enzimek szabadulnak ki, melyek lebontják a tenyésztő médiumban lévő haptoglobin nevű fehérjét. A bontás végeredménye a haptoglobin egy része, az ún. alfa-lánc. Az alfa-lánc mennyisége fordítottan arányos az embriók életképességével, ezért annak mérésével a legegészségesebb embriók kiválaszthatók.

A haptoglobin alfa-lánc igen kis koncentrációban van jelen a tápfolyadékban és maga a tápfolyadék mennyisége is nagyon csekély. Ezért a méréshez antigén – antitest alapú módszer szükséges, nagy érzékenységgű fluoreszcenciás detektálással. Ilyen eljáráshoz szükséges gyári reagens készlet szintén nem áll rendelkezésre

AUTOMATIZÁLT IMMUN-TURBIDIMETRIÁS MÉRÉSEK

A fent részletezett gyulladást jellemző fehérjék mennyiségi méréséhez ún. immun turbidimetriás eljárást használtunk. Ennek lényege, hogy a mérendő biomarkerhez (az antigén) specifikus antitestet adunk, majd 37°C-on bizonyos ideig inkubáljuk őket annak érdekében, hogy összekapcsolódjanak egymással. Az így kapott antigén – antitest komplexet megfelelő hullámhosszúságú fényel megvilágítva, az a fény egy részét szétszórja. A reakciót testhőmérsékleten tartott reakció edényben (küvetében) játszátjuk le és folyamatosan követjük a megvilágító fény erősségét (csökkenését) mely arányos a komplexek mennyiségével. Hiteles kalibrátorokat

alkalmazva, a fényszórást koncentráció egységekben kapjuk meg. Munkánk során a gyulladással kapcsolatos paraméterek mérését teljesen automatizáltuk, felhasználva egy diagnosztikai célra alkalmazott laboratóriumi automata adta lehetőségeket. Optimalizáltuk a mérő közeget, a minta és az antitest mennyiséget, és a mérési időt. Az egész folyamatot a készülék emberi kéz érintése nélkül végzi és a minta bemérése után 10 perc múlva ad eredményt, koncentrációban kifejezve.

SEJTES ÉLETKÉPESSÉGI VIZSGÁLATOK

Kísérleteinkben többféle humán sejt vonalat használtunk. A sejteket steril körülmények között 96 lyukú sejttenyésztő lemezen növesztettük, speciális tápfolyadékban. Különböző kezeléseket alkalmaztunk, melyek befolyásolták a sejtek életképességét. Az alábbi méréseket végeztük el, ugyanabból a mintából:

- Sejtes ATP tartalom
- Sejtek glukóz tartalma
- Sejt fehérje tartalom
- Sejt nukleinsav tartalom

Az ATP és a glukóz mennyiségét elosztottuk a fehérje- illetve nukleinsav mennyiségével, ezáltal egy hányadost kaptunk. Minél kisebb volt a hányados értéke, annál nagyobb volt a sejt károsodás.

HAPTOGLOBIN ALFA-LÁNC MEGHATÁROZÁSA

A vizsgálatokhoz tisztított alfa-haptoglobin standardot (antigén) és kétféle specifikus monoklonális antitestet használtunk, melyek két különböző helyre kötődnek az antigénen. A mérést olyan 96 lyukú lemezen végeztük, mely képes megkötni a lyuk aljába pipettázott fehérjét. Elsőként az egyik monoklonális antitestet kötöttük ki a lyukakba, majd ezután a felesleget kimostuk és a még szabadon maradt kötőhelyeket leblokkoltuk. Ezután az alfa-láncból készített hígítási sort tettük az antitest borítású lyukakba és 1 órán keresztül reagáltattuk őket. Újabb mosás után hozzáadtuk a második monoklonális antitestet a lyukakhoz és újabb 1 órás reakció következett. Ily módon egy olyan komplexet kaptunk a lyukakban, mely kikötve tartalmazta a kétféle antitest között az alfa-láncot (szokás ezt a módszert szendvics immunmódszernek is hívni). A kialakult „szendvicsek” kimutatásához egy harmadik antitestet használtunk, mely felismerte a

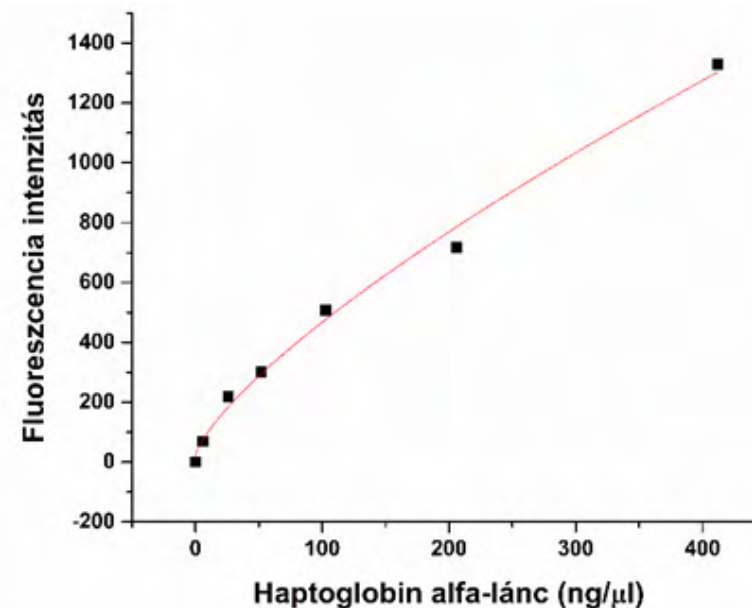
másodszorra adott monoklonális ellenanyagot. Ez a harmadik antitest egy enzim jelölővel (torma peroxidáz) volt ellátva. A mérés során hidrogén-peroxid jelenlétében a torma peroxidáz hatására az előhívó reagensben lévő szintelen molekula (Ampliflu Red) oxidálódott és rózsaszín fluoreszcens terméket képezett. A fluoreszcencia intenzitás a lyukakban arányos volt a komplexek mennyiségével, vagyis az alfa-lánc koncentrációjával. Ezt az eljárást enzim kötött immun-esszének (ELISA) hívjuk.

A gyulladási folyamatok diagnosztikájához és a betegek követéséhez, az esetleges szövődmények előre jelzéséhez új fehérje markerek automatizált mérését dolgoztuk ki. A vészérum gelsolin és Gc-globulin szintje jól tükrözte a betegség súlyosságát és segítséget adott a szepszis korai felismeréséhez. Ehhez társultak a vizeletvizsgálatok. Súlyos szisztémás fertőzésekben az u-ORM szintek a kontroll csoporthoz képest sokszorosára nőttek, a módszer a klasszikus rutin laboratóriumi vizsgálatokat jól kiegészítette. Az akut veseelégtelenség a szisztémás gyulladási állapot egyik legsúlyosabb szövődménye. A vizelet CYSC méréseink érzékenyen és specifikusan jelezték a veseelégtelenség kialakulásának veszélyét és a meglévő állapot súlyosságát. Az u-ORM méréseket először mi alkalmaztuk a Crohn betegség aktivitásának jellemzésére mind felnőtt, mind gyermek betegcsoporton. Ez a vizsgálat különösen gyermekeknél lehet előnyös, mert a vizeletminta gyűjtése teljesen fájdalommentes eljárás.

Összefoglalva, sikerült új fehérje biomarkerek mérését automatizálni, melyek hasznos kiegészítő információkat szolgáltatnak a klinikusok számára a szervezet általános gyulladási állapotaiban. Sejtes vizsgálatainkban sikerült olyan új módszereket bevezetni, melyek nagyon kis mintamennyiségből több paraméter együttes meghatározásával a sejtek életképességéről az eddigieknél pontosabb képet adnak.

Mivel a sejtek energia- és tápanyag szintje kedvezőtlen körülmények közt nagyon gyorsan képes változni, ezért az általunk mért ATP/fehérje- vagy nukleinsav és glukóz/fehérje hányadosok az esetleges toxikus vagy akár védő hatások meglétét, az általuk okozott finom eltéréseket pontosan tükrözik. Ezek a módszerek a tesztelni kívánt, biológiailag aktív molekulák esetében alkalmasak dózis – hatás összefüggések feltárására. Módszere-

ink – mivel lemezolvasóval történik a mérés – lehetővé teszik nagyszámú minta gyors analízisét (96 vagy akár 384 minta egyidejű vizsgálata). Az IVF programban kiemelt jelentőséggel bíró haptoglobin alfa-lánc mérési módszerének kidolgozása sikerrel teljesült antigén – antitest szendvics immun-esszé létrehozásával. Ez az eljárás automatizálható és jóval egyszerűbb a jelenleg alkalmazott folyadék kromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás mérésnél, mely igen drága berendezéseket és különleges szakértelmet követel. A két, különböző helyen kötődő antitesttel egy molekuláris szendvicset hoztunk létre, mely szilárd fázishoz volt kötve. A harmadik, detektáló antitestben lévő torma peroxidáz enzim egy speciális előhívó rendszert alkalmazva fluoreszcens terméket hozott létre, melynek fényintenzitása arányos volt a mérni kívánt haptoglobin alfa-lánc mennyiségével. A módszer tisztított alfa-lánc hígítási sorozat alkalmazásával kalibrálható, így a beültetendő embrió tápfolyadékának alfa-lánc koncentrációja közvetlenül mérhető. Az 26. ábrán a fluoreszcenciás módszerünk kalibrációja látható.



26.ábra: Haptoglobin alfa-lánc szendvics immun-esszé kalibrációs görbéje

A PÁLYÁZAT FŐBB KERETSZÁMAI ÉS MUTATÓI

Monitoring mutató megnevezése	Célérték	Elért érték	Cél dátuma
A kutatási projekt által generált hazai kutatási, vállalati együttműködések száma	11	6	2023.12.31.
A kutatási projekt által generált nemzetközi kutatási, vállalati együttműködések száma	4	5	2023.12.31.
A kutatóhelyre eső kiemelkedő minőségű publikációk száma	23	21	2023.12.31.
A projekt megvalósítása során, a projekt témájához köthető értekezéssel tudományos fokozatot szerző kutatók száma	7	1	2025.12.31.
Új kutatók száma a támogatott szervezetnél	2	2	2020.09.28.

A „Lab-on-a-chip prototípus fejlesztése humán in vitro fertilizáció minőségellenőrzéséhez” elnevezésű szolgáltatás keretében integrált mintaelőkészítést tartalmazó point-of-care (POCT) koncepciójú laboratóriumi készülék 3 db prototípusa jön létre.

A KUTATÁSI PROJEKT ÁLTAL GENERÁLT HAZAI KUTATÁSI, VÁLLALATI EGYÜTTMŰKÖDÉSEK

1. 77 Elektronika Kft.
2. Energiatudományi Kutatóközpont, ELKH
3. Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

4. Semmelweis Egyetem
5. Zsigmondy Vilmos Harkányi Gyógyfürdő Kórház
6. Cyclolab Kft.

A KUTATÁSI PROJEKT ÁLTAL GENERÁLT NEMZETKÖZI KUTATÁSI, VÁLLALATI EGYÜTTMŰKÖDÉSEK

1. Dako A/S, Glostrup, Dánia
2. Agilent Technologies Denmark Aps, Glostrup, Dánia
3. Quadram Institute Bioscience, Norwich Research Park, Egyesült Királyság
4. Institute for Medical Research and Education, Essen, Németország
5. Department of Physiology and Immunology, Faculty of Medicine, University of Rijeka, Rijeka, Horvátország

A PÁLYÁZAT EREDMÉNYEI SZABADALMAK ÉS INNOVATÍV MEGOLDÁSOK TEKINTETÉBEN

A projekt rendkívül sikeresnek mondható a létrejött innovatív eredmények tekintetében is. Összesen 5 darab szellemi alkotást azonosítottunk, amelyek újdonságát a 18 országban megadott szabadalmak bizonyítják Németországtól Svédországon át az Egyesült Királyságig. Ezen túl további 6 folyamatban lévő szabadalmi eljárás sikeres lezárását várjuk többek között a tengerentúlon és Ausztráliában.

A projekt egyik kézzel fogható fejlesztési eredménye egy TRL-5 szinten lévő berendezés prototípus, amelynek hasznosításáról már folynak a tárgyalások. A projekt során azonosított szellemi alkotásokat, azok jogi sorsát és várható útját az alábbiakban foglaljuk össze:

Noninvazív prenatális diagnosztika: szabad embrionális DNS detektálás és genetikai analízis az embrió tenyésztésére használt tápoldatból

Európai bejelentési szám: E15707424.6

Feltalálók: Dr. Rideg Orsolya; Dr. Kovács L. Gábor; Dr. Vermes István; Dr. Bódis József; Dr. Bihari Zoltán; Dr. Pach Ferenc; Bató Emese; Papp Ildikó; Gálik Bence; Szerző Csaba

Jogtulajdonosok: Pécsi Tudományegyetem (70%); Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Közhasznú Nonprofit Kft. (30%)

Szabadalmi státusz: A megadott európai szabadalom az alábbi országokban kerül érvényesítésre: Egyesült Királyság, Franciaország, Magyarország, Németország, Olaszország és Spanyolország

Találmány rövid leírása: A találmány azon betegeknél kerülhet alkalmazásra, akiknél magas kockázat áll fenn arra, hogy születendő gyermeküknek olyan genetikai rendellenességet örökítsenek át, amely jelentősen csökkenti a születendő gyermek életkilátásait vagy életminőségét (magas kockázatú PGD). A PGD javallatát képező betegség egyaránt lehet génmutáció (autoszomális domináns, autoszomális recesszív vagy X-kromoszómához kötött) vagy kiegyensúlyozott szerkezeti kromoszóma-rendellenesség eredménye. A PGD vizsgálatokkal ma már az egy génhez kötött (monogénes) betegségek több száz féle típusa is kizárható. A találmány a megtermékenyítést követően, nem-invazív módon képes kimutatni a genetikailag öröklődő betegségeket, az embrió megsértését elkerülve.

IN VITRO HUMÁN EMBRIÓK ÉLETKÉPESSÉG VIZSGÁLATA TÁPOLDATBAN TALÁLHATÓ FEHÉRJEMARKEREK SEGÍTSÉGÉVEL

Európai bejelentési szám: E1576273.3

Feltalálók: Dr. Montskó Gergely; Dr. Kovács L. Gábor; Dr. Bódis József

Jogtulajdonosok: Pécsi Tudományegyetem (100%)

Szabadalmi státusz: A megadott európai szabadalom az alábbi országokban került érvényesítésre: Belgium, Bulgária, Csehország, Franciaország, Németország, Magyarország, Olaszország, Spanyolország, Svédország, Hollandia, Egyesült Királyság. Emellett az USA hivatala előtt folyamatban van a szabadalmi eljárás.

Találmány rövid leírása: A fejlesztés célja egy biomarker azonosítása volt, mely kvalitatív vagy kvantitatív módon összefüggést mutat az embrió viabilitással. A fejlesztés során in vitro tenyésztett 3 és 5 napos embriók tápoldatát vizsgálták, és elemezték az abban detektálható fehérjéket. A vizsgálatok során négy fehérjét azonosítottak, melyek összefüggést mutattak az embrió transzfer kimenetelével. Nagy esetszámon (100 minta) elvégzett további elemzés eredményei alapján kiválasztásra került egyetlen fehérje, mely a legszorosabb korrelációt mutatta az embrió transzfer klinikai kimenetelével. A találmány lehetővé teszi, hogy az eddigi morfológiai vizsgálattal elért 30%-os eredményességet 60% közelébe lehessen emelni.

Hasznosítási perspektíva: A PTE vezetésével a Semmelweis Egyetem, a Budapesti Műszaki Egyetem, Az Energiatudományi Kutatóintézet, valamint a 77 Elektronika Kft-vel való együttműködés eredményeként létrejött egy, jelenleg TRL-5 szinten álló prototípus, amely lab-on-a-chip technológia alkalmazásával teszi lehetővé a találmány klinikai felhasználását.

TENYÉSZTETT EMBRIÓK TÁPFOLYADÉK FELÜLSZÓJÁBAN LÉVŐ DNS TARTALMÚ MV-K KIMUTATÁSA FACS MÓDSZERREL, AZ IN VITRO FERTILIZÁCIÓ HATÉKONYSÁGÁ- NAK FOKOZÁSA ÉRDEKÉBEN.

Európai bejelentési szám: EP 16834093.3

Feltalálók: Dr. Szekeres Júlia; Dr. Bognár Zoltán; Gödöny Krisztina; Dr. Bódis József; Dr. Pállinger Éva; Dr. Buzás Edit

Jogtulajdonosok: Pécsi Tudományegyetem (66 %); Semmelweis Egyetem (34 %)

Szabadalmi státusz: A találmány Magyarországon szabadalmi oltalmat szerzett. Az Európai Szabadalmi Hivatal, az USA hivatala, valamint Kanada és Ausztrália hivatalai előtt további szabadalmi eljárások vannak folyamatban.

Találmány rövid leírása: A megoldás lényege egy in vitro eljárás embriókompetencia nem invazív értékelésére, amely magában foglalja a következő lépéseket: a) DNS-t tartalmazó extracelluláris vezikulumok (EV) számának meghatározása egynél több, embrió tenyésztésére alkalmazott tápközegből származó mintában, b) magasabb számú DNS-tartalmú EV-ot tartalmazó

tápközegben tenyésztett embrió azonosítása olyan embrióként, amely esetén korlátozott valószínűséggel alakul ki klinikai terhesség egy olyan embrióhoz képest, amely alacsonyabb számú DNS-tartalmú EV-ot tartalmazó tápközegben tenyésztett. A EV mennyiség mérés az eddigi vizsgálati eredmények alapján (a két vizsgálatot hasonló számú sokaságon, nagymintán végezték) 82,6%-ban volt képes előre jelezni a beágyazódást (valódi pozitív arány), míg 77,9%-os pontossággal jelezte az embriók alkalmatlanságát (valódi negatív arány).

FÉNYTŐL VÉDETT ASSZISZTÁLT REPRODUKCIÓS LABORATÓRIUMI ELJÁRÁSOKHOZ HASZNÁLATOS ESZKÖZCSALÁD; ILLETVE A FÉNYTŐL VÉDETT ASSZISZTÁLT REPRODUKCIÓS MÓDSZER (LIGHT-PROT ART)

Feltalálók: Gödöny Krisztina; Dr. Bódis József; Dr. Kornya László; Dr. Várnagy Ákos; Koppán Miklós Endre

Jogtulajdonosok: Pécsi Tudományegyetem (90%); Dr. Kornya László (10%)

Szabadalmi státusz: A szellemi alkotások tekintetében elvégzett újdonságkutatás alapján iparjogvédelmi oltalom iránti eljárás az USA hivatala előtt indult, amely eljárás jelenleg folyamatban van.

A szellemi alkotások rövid leírása: Szakirodalmi adatokkal alátámasztott, hogy az in vitro fertilizáció hatásfokának növelése érdekében csökkenteni érdemes az ivarsejtek (petesejt, hímivarsejt) és az embriók káros, afiziológias fényterhelését. A projekt során bebizonyosodott, hogy ezt leghatékonyabban a fény kizárásával, illetve láthatóságot igénylő munkafázis során vörös fényszűrők alkalmazásával, avagy a vörös fény egy bizonyos tartományával érhetjük el. Az eljárás lényegesen javítja az embriók viabilitását, csökkenti az embrió veszteséget, növeli a terhességi rátát és csökkenti a terhességi veszteséget.

A szellemi alkotások rövid leírása: Szakirodalmi adatokkal alátámasztott, hogy az in vitro fertilizáció hatásfokának növelése érdekében csökkenteni érdemes az ivarsejtek (petesejt, hímivarsejt) és az embriók káros, afiziológias fényterhelését. A projekt során bebizonyosodott, hogy ezt leghatékonyabban a fény kizárásával, illetve láthatóságot igénylő munkafázis során

vörös fényszűrők alkalmazásával, avagy a vörös fény egy bizonyos tartományával érhetjük el. Az eljárás lényegesen javítja az embriók viabilitását, csökkenti az embrió veszteséget, növeli a terhességi rátát és csökkenti a terhességi veszteséget.

PUBLIKÁCIÓK

1. Balassa T, Berta G, Jakab L, Bohonyi N, Szekeres-Bartó J. The effect of the progesterone-induced blocking factor (PIBF) on E-cadherin expression, cell motility and invasion of primary tumour cell lines. *J Reprod Immunol.* 2018 125:8-15. doi: 10.1016/j.jri.2017.10.047.

2. Bódis J, Gödöny K, Várnagy Á, Kovács K, Koppán M, Nagy B, Erostyák J, Herczeg R, Szekeres-Barthó J, Gyenesei A, Kovács GL. How to reduce the potential harmful effects of light on blastocyst development during IVF. *Med Princ Pract.* 2020 (in press) doi: 10.1159/000509016.

3. Bódis J, Sulyok E, Kőszegi T, Gödöny K, Prémusz V, Várnagy Á. Serum and follicular fluid levels of sirtuin 1, sirtuin 6, and resveratrol in women undergoing in vitro fertilization: an observational, clinical study. *J Int Med Res.* 2019 47(2):772-782. doi: 10.1177/0300060518811228.

4. Bódis J, Sulyok E, Kőszegi T, Prémusz V, Várnagy Á, Koppán M. Serum and follicular fluid levels of serotonin, kisspeptin, and brain-derived neurotrophic factor in patients undergoing in vitro fertilization: an observational study: Neurohormones in patients receiving IVF. *J Int Med Res.* 2019 300060519879330. doi: 10.1177/0300060519879330.
5. Bódis J, Sulyok E, Koppán M. és mtsai: Tryptophan catabolism to serotonin and kynurenine in women undergoing in vitro fertilization. *Physiol. Res.* 2020. Accepted for publication.
6. Bognár Z, Csabai TJ, Pállinger E, Balassa T, Farkas N, Schmidt J, Görgey E, Berta G, Szekeres-Barthó J, Bódis J. The effect of light exposure on the cleavage rate and implantation capacity of pre-implantation murine embryos. *J Reprod Immunol.* 2019 132:21-28. doi: 10.1016/j.jri.2019.02.003.
7. Csabai T, Pallinger E, Kovacs AF, Miko E, Bognár Z, Szekeres-Barthó J. Altered Immune Response and Implantation Failure in Progesterone-Induced Blocking Factor-Deficient Mice. *Front Immunol.* 2020 11:349. doi: 10.3389/fimmu.2020.00349.
8. Csepregi R, Temesfői V, Poór M, Faust Z, Kőszegi T. Green Fluorescent Protein-Based Viability Assay in a Multiparametric Configuration. *Molecules.* 2018 23(7):1575. doi: 10.3390/molecules23071575.
9. Csepregi R, Temesfői V, Sali N, Poór M, W Needs P, A Kroon P, Kőszegi T. A one-step extraction and luminescence assay for quantifying glucose and ATP levels in cultured Hepg2 cells. *Int J Mol Sci.* 2018 19(9):2670. doi: 10.3390/ijms19092670.
10. Das S, Gazdag Z, Sente L, Meggyes M, Horváth G, Lemli B, Kunsági-Máté S, Kuzma M, Kőszegi T. Antioxidant and antimicrobial properties of randomly methylated β cyclodextrin - captured essential oils. *Food Chem.* 2019 278:305-313. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.11.047.
11. Horváth-Szalai Z, Kustán P, Szirmay B, Lakatos Á, Christensen PH, Huber T, Bugyi B, Mühl D, Ludány A, Miseta A, Kovács GL, Kőszegi T. Predictive value of serum gelsolin and Gc globulin in sepsis - a pilot study. *Clin Chem Lab Med.* 2018 56(8):1373-1382. doi: 10.1515/cclm-2017-0782.
12. Horváth-Szalai Z, Kustán P, Szirmay B, Lakatos Á, Christensen PH, Huber T, Bugyi B, Mühl D, Ludány A, Miseta A, Kovács GL, Kőszegi T. Validation of an automated immune turbidimetric assay for serum gelsolin and its possible clinical utility in sepsis. *J Clin Lab Anal.* 2018 (3):e22321. doi: 10.1002/jcla.22321.
13. Kustán P, Szirmay B, Horváth-Szalai Z, Ludány A, Lakatos Á, Mühl D, Christensen PH, Miseta A, Kovács GL, Kőszegi T. Urinary

orosomuroid: validation of an automated immune turbidimetric test and its possible clinical use. *Biochem Med (Zagreb).* 2016 26(3):421-430. doi: 10.11613/BM.2016.044.

14. Kustán P, Szirmay B, Kőszegi T, Ludány A, Kovács GL, Miseta A, Mühl D, Németh B, Kiss I, Németh Á, Szabados S, Ajtay Z. Monitoring urinary orosomuroid in patients undergoing cardiac surgery: A promising novel inflammatory marker. *Clin Biochem.* 2017 50(18):1002-1006. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2017.07.010.
15. Montskó G, Gödöny K, Herczeg R, Várnagy Á, Bódis J, Kovács GL. Alpha-1 chain of human haptoglobin as viability marker of in vitro fertilized human embryos: information beyond morphology. *Syst Biol Reprod Med.* 2019 65(2):174-180. doi: 10.1080/19396368.2018.1518499.
16. Mulac-Jeričević B, Šučurović S, Gulic T, Szekeres-Barthó J. The involvement of the progesterone receptor in PIBF and Gal-1 expression in the mouse endometrium. *Am J Reprod Immunol.* 2019 81(5):e13104. doi: 10.1111/aji.13104.
17. Nagy B, Poto L, Farkas N, Koppán M, Várnagy A, Kovacs K, Papp S, Bohonyi N, Bódis J. Follicular fluid progesterone concentration is associated with fertilization outcome after IVF: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online.* 2019 38(6):871-882. doi: 10.1016/j.rbmo.2018.12.045.
18. Nyárády K, Turai R, Funke S, Györgyi E, Makai A, Prémusz V, Bódis J, Sulyok E. Effects of perinatal factors on sirtuin 3, 8-hydroxy-2'- deoxyguanosine, brain-derived neurotrophic factor and serotonin in cord blood and early breast milk: an observational study. *Int Breastfeed J.* 2020 15(1):57. doi: 10.1186/s13006-020-00301-z.
19. Pállinger E, Bognár Z, Bogdan A, Csabai T, Abraham H, Szekeres-Barthó J. PIBF+ extracellular vesicles from mouse embryos affect IL-10 production by CD8+ cells. *Sci Rep.* 2018 8(1):4662. doi: 10.1038/s41598-018-23112-z.
20. Pap R, Montskó G, Jánosa G, Sipos K, Kovács GL, Pandur E. Fractalkine regulates HEC-1A/JEG-3 interaction by influencing the expression of implantation-related genes in an in vitro co-culture model. *International Journal of Molecular Sciences* 2020 21(9):3175. doi: 10.3390/ijms21093175.
21. Szekeres-Barthó J, Schindler AE. Progestogens and immunology. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2019 60:17-23. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2019.07.001.
22. Szekeres-Barthó J, Šučurović S, Mulac-Jeričević B. The role of extracellular vesicles and PIBF in embryo-maternal immune-interactions. *Front Immunol.* 2018 9:2890. doi: 10.3389/fimmu.2018.02890.

23. Szekeres-Barthó J. The role of progesterone in fetomaternal immunological cross talk. Med Princ Pract. 2018 27(4):301-307. doi: 10.1159/000491576.

24. Szirmay B, Kustán P, Horváth-Szalai Z, Ludány A, Lakatos Á, Mühl D, Wittmann I, Miseta A, Kovács GL, Kőszegi T. Novel automated immune turbidimetric assay for routine urinary cystatin-C determinations. Bioanalysis. 2018 10(6):377-384. doi: 10.4155/bio-2017-0228.

25. Szirmay B, Tárnok A, Sarlós P, Szigeti N, Ludány A, Kustán P, Horváth-Szalai Z, Miseta A, Kőszegi T. Elevated urinary orosomucoid excretion as a novel biomarker in Crohn's disease. Eur J Clin Invest. 2019 49(3):e13054. doi: 10.1111/eci.13054.

26. Várnagy Á, Kőszegi T, Györgyi E, Szegedi S, Sullyok E, Prémusz V, Bódis J. Levels of total antioxidant capacity and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine of serum and follicular fluid in women undergoing in vitro fertilization: focusing on endometriosis. Hum Fertil (Camb). 2018 13:1-9. doi: 10.1080/14647273.2018.1535719.

ÖSSZEFOGLALÁS

” A Pécsi Tudományegyetemen a reprodukció kutatásának sokoldalú előzményei vannak. Az egyetemi kutatólaboratóriumok a klinikummal összefogva folyamatosan részt vesznek a tudományos munkákban, fejlesztésekben. Korábban a **TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0053** pályázat (2012.10.01. – 2014.12.31.; Támogatás összege: 755,4 millió Ft.), illetve a **TÁMOP-4.2.2.D-15/1/KONV-2015-0004** (2015.04.01. – 2015.12.15.; Támogatási összeg: 299,2 millió Ft) keretén belül, jelenleg a témában a Magyar **Tudományos Akadémia kutatócsoportja** is dolgozik. (2013.07.01. – 2019.06.30.; majd 2019.07.01-2024.06.30.) Az eddig elért eredmények alapján és Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal jóváhagyásával a **GINOP-2.3.2-15-2016-00021** sz. „Chip-technológia alkalmazása a humán in vitro fertilizáció eredményességének javításában” című projekt

A kutatási projektek célja a mesterséges megtermékenyítési technikák hatásfokának jelentős emelése az embrió potenciális károsodása nélküli vizsgálatokkal.

Célunk olyan biomarkerek azonosítása, ill. az irodalomban leírt markerek olyan kombinációinak azonosítása, amelyek az egészséges embriót jellemzik, és előre jelezhetik a sikeres és egészséges terhességet. Az eredmények megfelelő statisztikai elemzését követően lehetőség nyílik olyan következtetések levonására, melyek alapján a biomarkerek előfordulása és szintjük szerint osztályozhatók lesznek az embriók. Ezen eredmények alapján a cél, hogy a kifejlesztésre kerülő lab-on-chip módszer alkalmas legyen az embrió megtapadásának és viabilitásának prognosztizálására.

2016.10.01. –2020.09.30. között valósul meg. (Költségvetés: 1,976 milliárd Ft.) A Pécsi Tudományegyetem tudományos publikációja érdemelte ki 2015-ben a Laboratóriumi Medicina Európai Szövetsége (EFLM) díját, amellyel a legkiválóbb kutatási eredményeket felmutató szerzőket tüntetik ki. Az ilyen formában elismert, mesterséges megtermékenyítéssel foglalkozó kutatás annak a munkacsoportnak az első kiemelkedő eredménye, mely az asszisztált reprodukció eredményességének fokozását célozta meg az embriót körülvevő tápoldatból történő diagnosztikával. A Laboratóriumi Medicina Európai Szövetségének díját egy független szakértőkből álló bizottság ítéli oda minden évben, a korábban ismert diagnosztikai módszerekhez képest mind klinikai, mind gazdasági szempontból legjobb eredményt és hasznosíthatóságot bemutató tudományos cikk számára. Mindezen kutatási folyamatok eredőjeként a humán meddőségi klinikák szerte a világon az említett asszisztált reprodukciós technikákat alkalmazzák, ahol a szervezeten kívüli mesterséges megtermékenyítés 60-70%-a ICSI-vel történik és 30-40%-a csak a tradicionális IVF. Célunk az asszisztált reprodukciós technikák hatásfokának jelentős emelése az embrió potenciális károsodása nélküli vizsgálatokkal. Több külföldi szerző által is felvetett klinikai gyakorlati igény alapján merült fel az az alapvető cél, melynek lényege a fejlődő embrió anyagcseréjének közvetlen környezetét biztosító tápoldat vizsgálata, olyan markerek irányában, melyek az embrió viabilitását mutathatják.

GINOP pályázatunkat hosszú évek közös klinikai és elméleti kutatásai alapozták meg és a közös munkának nem a végét, hanem egy sikeres közös állomását jelentik a GINOP pályázatban most bemutatott eredmények.

A pályázat legjelentősebb innovációs hozadéka, hogy – az innovációban járatos, elismert vállalkozások, pl. 77 Elektronika Kft segítségével – TRL-5 szintű chip-diagnosztikai berendezést sikerült kifejlesztenünk az embrionális életképesség eredményesebb megítélésére.

Mindezen közös kutatási munkák alapozták meg a továbblépést is: a Pécsi Tudományegyetem az elmúlt hetekben elnyerte kormányzattól a **Humán Reprodukciós Nemzeti Laboratórium** programot, amely 2020-2023 között fogja biztosítani a kutatások nemzetköziesítését és az innovatív eredmények termék irányú továbbfejlesztését.

”

A KIADVÁNY SZERZŐI

Balassa Tímea, egyetemi tanársegéd,
PTE ÁOK Orvosi Biológiai Intézet és Központi
Elektronmikroszkópos Laboratórium

Bencsik-Péter Ildikó, projektmenedzser,
PTE Pályázat- és Projektmenedzsment Igazgatóság

Bogdán Ágnes, egyetemi tanársegéd,
PTE ÁOK Orvosi Biológiai Intézet és Központi
Elektronmikroszkópos Laboratórium

Dr. Bognár Zoltán, tudományos munkatárs,
PTE ÁOK Orvosi Biológiai Intézet és Központi
Elektronmikroszkópos Laboratórium

Prof. Dr. Bódis József, kutatóprofesszor,
PTE KK Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika

Csabai Tímea, egyetemi tanársegéd,
PTE ÁOK Orvosi Biológiai Intézet és Központi
Elektronmikroszkópos Laboratórium

Csepregi Rita, PhD hallgató,
PTE KK Laboratóriumi Medicina Intézet

Dr. Dülk Metta, tudományos munkatárs,
77 Elektronika Kft.

Dr. Farkas Bálint, egyetemi adjunktus,
PTE KK Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika

Gálik Bence, tudományos segédmunkatárs,
PTE Szentágotthai János Kutatóközpont

Gitta Stefánia, PhD hallgató,
PTE ÁOK Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet

Dr. Gombos Katalin, egyetemi adjunktus,
PTE KK Laboratóriumi Medicina Intézet

Gödöny Krisztina, embriológiai laborvezető,
PTE KK Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika

Görgey Éva, egyetemi tanársegéd,
PTE ÁOK Orvosi Biológiai Intézet és Központi
Elektronmikroszkópos Laboratórium

Dr. Gyenesei Attila, tudományos főmunkatárs,
PTE Szentágotthai János Kutatóközpont

Dr. Herczeg Róbert, tudományos munkatárs,
PTE Szentágothai János Kutatóközpont

Dr. Horváth-Szalai Zoltán, PhD hallgató,
PTE KK Laboratóriumi Medicina Intézet

Jánosa Gergely, tanársegéd,
PTE GYTK Gyógyszerészi Biológiai Tanszék

Prof. Dr. Koppán Miklós, intézetigazgató egyetemi tanár,
PTE KK Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika

Kottászné dr. Vass Orsolya, főosztályvezető,
Kutatáshasznosítási és Technológiai-transzfer Központ

Prof. Dr. Kovács L. Gábor, MTA rendes tagja,
professor emeritus, PTE Szentágothai János Kutatóközpont és
PTE KK Laboratóriumi Medicina Intézet

Kósa Brigitta, orvosdiagnosztikai laboratóriumi analitikus,
PTE KK Laboratóriumi Medicina Intézet

Prof. Dr. Kőszegi Tamás, egyetemi tanár,
PTE KK Laboratóriumi Medicina Intézet

Dr. Márk László, egyetemi docens,
PTE ÁOK Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet

Dr. Montskó Gergely, tudományos munkatárs,
PTE Szentágothai János Kutatóközpont

Dr. Pandur Edina, adjunktus, tanszékvezető helyettes,
PTE GYTK Gyógyszerészi Biológiai Tanszék

Pap Ramóna, tanársegéd,
PTE GYTK Gyógyszerészi Biológiai Tanszék

Dr. Pállinger Éva, egyetemi docens,
Semmelweis Egyetem, ÁOK Genetikai,
Sejt- és Immunbiológiai Intézet

Ruszkai-Szaniszló Szilvia, tudományos munkatárs,
77 Elektronika Kft.

Dr. Sipos Katalin, általános és kapcsolatokért felelős dékánhelyettes,
egyetemi docens, PTE Gyógyszertudományi Kar

Prof. Dr. Sulyok Endre, professor emeritus,
PTE Egészségtudományi Kar

Szabó Barnabás, fejlesztési igazgatóhelyettes,
77 Elektronika Kft.

Dr. Szabó Éva, adjunktus,
PTE ÁOK Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet

Prof. Dr. Szekeres-Barthó Júlia, egyetemi tanár,
PTE ÁOK Orvosi Biológiai Intézet és Központi
Elektronmikroszkópos Laboratórium

Dr. Szirmay Balázs, PhD hallgató,
PTE KK Laboratóriumi Medicina Intézet

Temesfői Viktória, PhD hallgató,
PTE KK Laboratóriumi Medicina Intézet

Varga Máté, Point of Care Csoport vezetője,
77 Elektronika Kft.

Dr. Várnagy Ákos, egyetemi docens,
PTE KK Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika

A PROJEKT MENEDZSMENTJE ÉS MUNKATÁRSAI

Bencsik-Péter Ildikó projektmenedzser

Hábelné Kocsis Éva pénzügyi vezető
Prof. Dr. Kovács L. Gábor szakmai vezető

Kottászné Dr. Vass Orsolya főosztályvezető,
Kutatáshasznosítási és Technológiai-transzfer Központ

Dr. Banna Zoltán IP menedzser
Czibók Balázs innováció menedzser
Csongor Zita innováció menedzser
Kincs Gergely innováció menedzser

Bakonyvári Tímea projektasszisztens
Nagyné Gerőcs Szilvia Eszter pénzügyi projektasszisztens

Radó Gábor csoportvezető, Utazási Asszisztensi Csoport
Horváth István asszisztens, Utazási Asszisztensi Csoport
Magyar-Papp Júlia asszisztens, Utazási Asszisztensi Csoport
Ökrös-Héra Fanni asszisztens, Utazási Asszisztensi Csoport

Onhausz Nikolett közbeszerzési szaktanácsadó, közbeszerző
Simon Dorina közbeszerző
Szabó Tamás gazdasági ügyintéző, Közbeszerzési Főosztály
Braidá Viktor gazdasági ügyintéző, Beszerzési Főosztály

Külön köszönet:

***Huba-Varga Nikolettnek, a Pályázat- és
Projektmenedzsment Igazgatóság igazgatójának***

***Nagy Eszternek, a Pályázat- és
Projektmenedzsment Igazgatóság főosztályvezetőjének***

***Kürti Péternek, a Pályázat- és
Projektmenedzsment Igazgatóság főosztályvezető-helyettesének***

Pirkhoffer Zsófiának, az Általános Asszisztensi Csoport vezetőjének


***Végh Tamarának, a Szentágothai János Kutatóközpont
menedzser igazgatójának***

PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM

 H-7622 Pécs

Vasvári Pál utca 4.

 Tel.: +36 -70-72/501-500

 **Email:** info@pte.hu

