

## ΜΑΡΙΑ ΜΠΑΡΜΠΑΡΗ

**“Συσχέτιση οιστρογόνων με IL1b, IL6, TNFa, IL12 κατά τη διάρκεια ωοθηκικής διέγερσης για εξωσωματική γονιμοποίηση”**

### **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Η αναπαραγωγική διαδικασία από την ωοθυλακιογένεση έως την εμφύτευση του ωαρίου και την επίτευξη εγκυμοσύνης αποτελεί μια φλεγμονώδη αντίδραση. Πολλές πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει την ύπαρξη φλεγμονωδών κυτταροκινών τόσο στην περιφέρεια όσο και στο ωοθυλακικό υγρό. Η εκθετική αύξηση των επιπέδων της οιστραδιόλης κατά την ελεγχόμενη διέγερση ωοθηκών σε γυναίκες που υποβάλλονται σε διαδικασία εξωσωματικής γονιμοποίησης, έχει ενοχοποιηθεί για την ευδοτική της δράση στην αύξηση των παραγόντων φλεγμονής τόσο στον ορό όσο και στο ωοθυλακικό υγρό των γυναικών.

Σκοπός αυτής της κλινικής μελέτης είναι η διερεύνηση πιθανής συσχέτισης μεταξύ των επιπέδων της οιστραδιόλης και των κυτταροκινών IL-1β, IL-12, IL-6, TNFa, στον ορό γυναικών που υποβάλλονται σε διαδικασία εξωσωματικής γονιμοποίησης κατά την ελεγχόμενη διέγερση των ωοθηκών.

Στη μελέτη συμμετείχαν 21 γυναίκες ηλικίας 32 έως 45 ετών που δεν έπασχαν από μεταβολικά και αυτοάνοσα νοσήματα, ενδομητρίωση και σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, είχαν επίπεδα FSH < 10 iu/l και φυσιολογική απόκριση στην διέγερση των ωοθηκών. Οι 11 γυναίκες υποβάλλονταν στη διαδικασία εξωσωματικής γονιμοποίησης λόγω ιδιοπαθούς υπογονιμότητας και οι υπόλοιπες 10 λόγω ανδρικού παράγοντα.

Η ελεγχόμενη διέγερση των ωοθηκών έγινε με συνδυασμό GnRH-a και γοναδοτροπινών και συγκεκριμένα σε 12 γυναίκες χρησιμοποιήθηκε το επίμηκες πρωτόκολλο και σε 9 το βραχύ. Στο επίμηκες πρωτόκολλο η καταστολή της υπόφυσης έγινε με leuprorelin acetate ( Daronda®; Abbott) ενώ στο βραχύ χρησιμοποιήθηκε το cetrotorelix ( Cetrotide®; Serono, U.K). Η περαιτέρω διέγερση των ωοθηκών έγινε με ανασυνδυασμένη FSH (Gonal-F®; Serono, U.K) και hMGs ( Puregon®; Organon Holland). Σε κάθε περίπτωση, η πρόκληση της ωορρηξίας έγινε με 10000 IU HCG (Pregnyl®; Organon), όταν το κυρίαρχο ωοθυλάκιο φθάνει σε διάμετρο 18-20 mm στο ενδοκολπικό υπερηχογράφημα και τα επίπεδα οιστραδιόλης ορού εμφανίζουν ικανοποιητική ωοθυλακική απόκριση. Η ωοληψία έγινε 36 ώρες αργότερα. Μετά την ICSI ένα έως τρία έμβρυα μεταφέρθηκαν σε κάθε κύκλο.

Σε κάθε γυναίκα συλλέχθηκαν δείγματα ορού κατά τη διάρκεια της διέγερσης των ωοθηκών σε συγκεκριμένες ημέρες ανάλογα με τον τύπο του πρωτοκόλλου που χρησιμοποιήθηκε. Έτσι, κατά την διέγερση με το βραχύ πρωτόκολλο ελήφθησαν δείγματα ορού (1) μία λήψη πριν τη χορήγηση των γοναδοτροφινών (2-3 ημέρα του τεχνητού κύκλου), (2) δύο λήψεις τέσσερις- πέντε ημέρες μετά τη χορήγηση γοναδοτροφινών και (3) μία λήψη πριν τη χορήγηση της χοριακής γοναδοτροφίνης. Κατά την διέγερση με το επίμηκες πρωτόκολλο ελήφθησαν δείγματα (1) πριν τη χορήγηση των γοναδοτροφινών και αφού έχει γίνει απευαισθητοποίηση της υπόφυσης με GnRH-ανάλογα, (2) δύο λήψεις έξι με επτά ημέρες μετά τη χορήγηση γοναδοτροφινών και (3) μια λήψη πριν τη χορήγηση της χοριακής γοναδοτροφίνης. Όλα τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν για 8 λεπτά σε 3000 rpm και αποθηκεύτηκαν στους -80° C μέχρι περαιτέρω ανάλυση.

Για τη στατιστική επεξεργασία των μεταβλητών χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 13.00 Chicago IL. Οι συσχετίσεις μεταξύ των διαφόρων μεταβλητών έγιναν με την παραμετρική μέθοδο (Pearson 2-tailed correlation), διότι όλες οι μεταβλητές που εξετάστηκαν ακολουθούσαν την κανονική κατανομή, όπως αποδείχθηκε από την στατιστική δοκιμασία Shapiro-Wilks.

Οι συσχετίσεις έγιναν μεταξύ των TNFα στις τέσσερις φάσεις της διέγερσης που αναφέρθηκαν παραπάνω και των αντίστοιχων τιμών οιστραδιόλης, μεταξύ των TNFα και των ωαρίων που ελήφθησαν (EGGS) όπως επίσης μεταξύ των TNFα και των ωαρίων που έφτασαν επιτυχώς στο στάδιο της MII (MII). Επίσης, έγιναν συσχετίσεις μεταξύ των ωαρίων που ελήφθησαν (EGGS) και αυτών που ακολούθως έφτασαν στο στάδιο της MII. Τα επίπεδα των κυτταροκινών IL-1β, IL-12, IL-6 στον ορό των γυναικών ήταν στις περισσότερες μετρήσεις μη ανιχνεύσιμα για αυτό και για την στατιστική επεξεργασία χρησιμοποιήθηκαν κυρίως οι μετρήσεις των επιπέδων του TNFα. Σε κάθε συσχέτιση υπολογίστηκε η στατιστική σημαντικότητα τόσο στο επίπεδο του 5%  $P \leq 0.05$  όσο και στο επίπεδο του 1%  $P \leq 0.01$ .

Όπως προκύπτει από τα στατιστικά δεδομένα θετικά στατιστικά σημαντική συσχέτιση τόσο στο επίπεδο του 5%  $P \leq 0.05$  όσο και στο επίπεδο του 1%  $P \leq 0.01$ , προέκυψε μεταξύ των συνεχώς αυξανόμενων επιπέδων οιστραδιόλης και των ωαρίων που ελήφθησαν (EGGS) αλλά και αυτών που ακολούθως έφτασαν στο στάδιο της δεύτερης μετάφασης (MII). Επίσης, ανάλογη θετικά στατιστικά σημαντική συσχέτιση προέκυψε μεταξύ των ωαρίων που ελήφθησαν κατά την ωοληψία (EGGS) και αυτών που έφθασαν επιτυχώς στο στάδιο της δεύτερης μετάφασης (MII).

Αντίθετα, αντιστρόφως ανάλογη σχέση προέκυψε μεταξύ των επιπέδων του TNFα και των ωαρίων που ελήφθησαν κατά την ωοληψία (EGGS) αλλά και αυτών που ακολούθως έφθασαν επιτυχώς στο στάδιο της δεύτερης μετάφασης (MII). Η παραπάνω αρνητική σχέση όμως δεν αποδείχθηκε στατιστικά σημαντική.

Αντιστρόφως ανάλογη σχέση προέκυψε και μεταξύ των επιπέδων της οιστραδιόλης και των αντίστοιχων επιπέδων του TNFα. Η σχέση αυτή στη συγκεκριμένη κλινική μελέτη δεν αποδείχθηκε στατιστικά σημαντική. Παρατηρούμε όμως ότι τα συνεχώς αυξανόμενα επίπεδα οιστραδιόλης λόγω της χορήγησης των γοναδοτροπινών δεν φαίνεται να ασκούν ευοδοτική δράση στους φλεγμονώδεις παράγοντες και κυρίως στον TNFα, αφού υπάρχει αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ τους αν και αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική. Πρακτικά, όση και να είναι η αύξηση της οιστραδιόλης υπό την χρήση των γοναδοτροπινών, ο προφλεγμονώδης παράγοντας TNFα δεν αυξάνεται στον ορό των γυναικών που έχουν υποβληθεί σε εξωσωματική γονιμοποίηση στη συγκεκριμένη μελέτη. Επομένως, το συμπέρασμα είναι ότι η οιστραδιόλη δεν μπορεί να θεωρηθεί ως παράγοντας που με την αύξησή της θα αυξάνονταν και οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες στο ορό γυναικών που υποβάλλονται σε διαδικασία υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Η αντιστρόφως ανάλογη σχέση του TNFα με την οιστραδιόλη κατά την διέγερση των ωοθηκών έχει αποδειχθεί και σε αντίστοιχη μελέτη που μετρήθηκε ο παραπάνω παράγοντας στο ωοθυλακικό υγρό. Λόγω του γνωστού ρόλου της φλεγμονής στην αναπαραγωγική διαδικασία κατά τη διάρκεια της εξωσωματικής γονιμοποίησης γίνεται όλο και πιο ενδιαφέρον να διαλευκανθεί η επιρροή της οιστραδιόλης στους φλεγμονώδεις παράγοντες ώστε να δρομολογηθεί η ανάπτυξη νέων θεραπευτικών επεμβάσεων.

## DIPLOMATIC RESUME

It is unanimously recognized that many cytokines are of crucial importance in reproductive processes such as follicular development, ovulation, fertilization, implantation and embryo development. The role of cytokines in the female reproductive system has been broadly investigated during controlled ovarian stimulation for in vitro fertilization (IVF) attempts. Interleukins such as IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 and TNF $\alpha$  are some of the numerous inflammatory cytokines produced during ovulation, based on the hypothesis that ovulation has to be regarded as a local inflammatory event.

The aim of the present study is to determine and compare the levels of four cytokines in serum of women during in vitro fertilization cycles with the levels of estradiol (E2) during controlled ovarian stimulation with either the multidose GnRH antagonist or the long agonist protocol. The investigated cytokines included four proinflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 and TNF $\alpha$ ).

The prospective study was carried out with 21 infertile women attending the IVF unit of the department for ICSI cycles according the following criteria: i) absence of any apparent abnormality of their reproductive system, as revealed by their medical history, the clinical examinations and common hormonal tests; the indication for ICSI/embryo transfer was male factor for 10 women and idiopathic sterility for the other 11; ii) absence of any metabolic and immunological disease; iii) age of women between 32 and 45 years and iv) adequate response to controlled ovarian stimulation (COS); low responders as well as patients with basal FSH > 10 Miu/ml were excluded. From each patient, only one cycle was included in the study.

The stimulation was made with recombinant FSH (Gonal-F®; Serono, U.K) and hMGs (Puregon®; Organon Holland). ). The pituitary suppression was made with the use of cetrorelix (Cetrotide®; Serono, U.K) or leuprorelin acetate (Daronda®; Abbott). The COS with cetrorelix followed the multidose protocol and the COS with leuprorelin acetate followed the long protocol. The multidose protocol was followed by 9 women and the long protocol by the other 12. In all cases, the induction of ovulation was made with 10000 IU HCG (Pregnyl®; Organon), when the leading follicle reached a diameter of 18-20 mm measured by transvaginal ultrasound and when E2 levels indicated a satisfactory follicular response. Transvaginal oocyte retrieval assisted by ultrasound monitoring was performed 36 h later. After ICSI, one to three embryos were transferred in each cycle.

Blood serum was collected during controlled ovarian stimulation on the days indicated for each protocol: for the multidose protocol blood serum was collected 1) once before the administration of the gonadotrophins and during the desensibilization of ipofisis (second day of cycle), 2) twice 4-5 days after the administration of the gonadotrophins and 3) once before the administration of the chorionic gonadotrophin. For the long protocol blood serum was collected 1) once before the administration of the gonadotrophins (second day of cycle), (2) twice 6-7 days after the administration of the gonadotrophins and 3) once before the administration of the chorionic gonadotrophin. All samples were immediately centrifuged for 8 min at 3000 rpm and the supernatants were removed. All materials were stored at -80°C until further analysis.

Statistical analysis included descriptive statistics, comparisons between groups and correlations between measured parameters. The normality of all studied parameters was checked with Shapiro-Wilks' W-test. Correlations were evaluated with the parametric Pearson correlation method because of the normal distribution of all the

studied variables. The statistical analysis was performed with statistical package SPSS 13.00 (Chicago IL).  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$  was considered statistically significant, by two-tailed tests.

All study patients responded to gonadotrophins with multiple follicular development and increased serum E2 levels. All patients underwent successful oocyte retrieval.

The results included correlations between TNF $\alpha$  and increased serum E2 levels, TNF $\alpha$  and the retrieved oocytes and those which arrived at metaphase II. Correlations were made also between the increased levels of estradiol and the retrieved oocytes and those which arrived at metaphase II. Regarding the concentrations of the TNF $\alpha$  during the increased serum E2 levels, there was an inverse correlation which is not statistically significant. This inverse correlation existed also between TNF $\alpha$  and the retrieved oocytes and those which arrived at metaphase II. On the other hand E2 levels were positively correlated with the number of the retrieved oocytes ( $P < 0.01$ ) and with those which arrived at MII ( $P < 0.05$ ). A statistically significant correlation existed also between the number of the retrieved oocytes and those which arrived at the metaphase II ( $P < 0.01$ ).

Serum concentrations of IL-1b, IL-12 and IL-6 were below the detection limit in the greatest part of the samples.

In this study, by using ICSI as the fertilization technique, we tried to investigate the relationship between serum estradiol E2 and four cytokine levels as well as the relationship of the above parameters with the oocytes retrieved and those which arrived at metaphase II stage. There were differences between the concentrations of the three proinflammatory cytokines (IL-12, IL-6, IL-1b) during the controlled ovarian stimulation but there were not statistically significant and in the most part were below the detection limit. This result has also been reported by other investigators in samples of women either in serum or in intrafollicular fluid. In the present study there is an inverse correlation between estradiol levels and TNF $\alpha$ , correlation not statistically significant. This result is the most important of the study because it shows that even in "supra-physiologic" levels of endogenous E2, proinflammatory factors like TNF $\alpha$  did not increase which means that estradiol can be considered as an anti-atherogenic factor independently of its levels. Another important correlation of the present study was between the retrieved oocytes and the increased levels of estradiol particularly at the peak levels of estradiol (E2:3, 4), before the administration of chorionic gonadotrophin. This is a statistically significant correlation ( $P < 0.01$ ). On the other side, there is an inverse correlation between the retrieved oocytes and TNF $\alpha$ , even if it is not statistically significant (Table 2). We found the same correlations between estradiol levels and the oocytes at metaphase II, correlation statistically significant ( $P < 0.01$ ), in contrast with TNF $\alpha$  levels and MII which is negative and not statistically significant.

In conclusion, the importance of this study is the inverse not statistically significant correlation between the short-term, acute, "supra-physiologic" levels of estradiol during controlled ovarian stimulation with gonadotrophins, and the levels of TNF $\alpha$ . It would be very important elucidating the effect of E2 on inflammatory markers for the future development of novel therapeutic interventions.