

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Neutrofil granulociták és monociták fagocita
funkciójának vizsgálata endometriózisban**

Dr. Lukács Luca

Témavezető: Dr. Lampé Rudolf Ph.D



DEBRECENI EGYETEM
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2024

Neutrofil granulociták és monociták fagocita funkciójának vizsgálata endometriózisban

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Lukács Luca okleveles orvosdoktor

Készült a Debreceni Egyetem klinikai orvostudományok doktori iskolája
(konzervatív orvostudományok és klinikai vizsgálatok programja) keretében

Témavezető: Dr. Lampé Rudolf, PhD

Az értekezés bírálói:

Dr. Bokor Attila, PhD
Dr. Papp Gábor, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szűcs Gabriella, az MTA doktora
tagok: Dr. Bokor Attila, PhD
Dr. Papp Gábor, PhD
Dr. Gergely Péter Attila, PhD
Dr. Doros Attila, PhD

Az értekezés védésének időpontja:
Debreceni Egyetem ÁOK, Szülészeti és Nőgyógyászati Intézet Tanterme
2024. május 03. 14:00

BEVEZETÉS

Az endometriózis egy olyan benignus, krónikus, szisztémás, ösztrogén-dependens, gyulladásal járó nőgyógyászati megbetegedés, melyben az eredendően eutópiásan (azaz a méh üregén belül) lévő endometriális mirigy és stroma szövetek ektópiás (azaz, az uterus üregén kívüli) lokalizációban jelennek meg. Az ektópiásan megjelenő szövetek a menstruációs ciklussal szinkron és az eutópiás endometriummal hasonló módon funkcionálnak. A betegség egyik vezető tünete a fájdalom (dysmenorrhea, dyspareunia, dysuria és krónikus kismencedei fájdalom), másik a meddőség, melyek együttesen, de akár külön-külön is az életminőség romlásához vezethetnek az érintett nők körében. Ezek miatt a kórkép nemcsak orvosi, de társadalmi és gazdasági szempontból is jelentőséggel bír. A betegség eredetének, lefolyásának és pontos hátterének a meghatározása a mai napig kihívást jelent az orvostudománynak, ugyanis az évtizedek óta tartó kutatások ellenére a patofiziológiájának részletei, a korai diagnózis lehetősége, a műtéti ellátás egységes indikációja és technikája, a recidíva esélyének hatékony csökkentése és a mellékhatásoktól mentes terápia nemzetközileg érvényesíthető, hiánytalan protokollja még várat magára.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Az endometriózis a reprodukzív korú nők legalább 10%-át érinti, azonban a valós prevalencia alábecsült lehet. Az első klinikai tünetek megjelenése legtöbbször 25-45 éves kor közé tehető. Ekkor a krónikus kismencedei fájdalom 30-60%-ban állhat endometriózis a háttérben, míg infertilitás az érintett betegek 30-50%-nál észlelhető. Endometriózisban a meddőség kialakulásához nagyon komplex faktorok és tényezők járulnak hozzá, melyek érinthetik a hüvelyt, a méhet, a petevezetőket és petefészkeket egyaránt, de negatívan hathatnak az oocyták funkcióira, a spermium motilitására és az embrió implantációra is, de a megváltozott

immunfunkciók miatt az oocyták minőségét, és a hormonális környezet hatására bekövetkező reakcióját is módosíthatja, emellett a terhesség beágyazódásának esélyét is ronthatja.

Az endometriózis Magyarországon körülbelül 200.000, világszerte 190 millió reprodukív korú nőt érinthet és prevalenciája -részben a korszerű diagnosztikai eszközöknek is köszönhetően- évről évre növekszik. A tünetek kezelésében alkalmazott gyógyszerek költsége, a korrekt diagnózisig eltelt hosszú idő, és maga a műtéti ellátás rendkívül nagy gazdasági terhet is ró a társadalomra.

Az endometriózisos léziók által a kismedencében leggyakrabban érintett területek a petefészkek (endometrioma, összenövések), a fossa ovarica, a húgyhólyag csúcsa, a Douglas-üreg és a sacrouterin szalagok területe. Utóbbiak érintettsége előfordulhat felszínesen, azonban sok esetben a léziók több, mint 5 milliméter mélyen a hashártya alá is terjedhetnek.

A diagnózis felállítása elsődlegesen a megfelelő anamnesztikus adatokon, a szakmai szabályok szerint elvégzett fizikális vizsgálaton és a megfelelő szakember által elvégzett képalkotó vizsgálatokon (kismedencei transzvaginális ultrahang és MR felvétel) kell, hogy alapuljon.

Összességében elmondható, hogy az endometriózis egy multifaktoriális, komplex etiopatogenezisű kórkép, mely betegség patogenezisének pontos tisztázása nagy kihívás elé állította a nőgyógyászokat, a reprodukcióban jártas szakembereket, az endokrinológusokat és a kutatókat is. A Sampson által 1927-ben leírt retrográd menstruáció elmélete, mely során a menstruációs vér a petevezetéseken keresztül a kismedencébe jut, az endometriózis patogenezisének egyik alappillére, azonban nem az egyetlen tényező, ami szerepet játszik az endometriózis kialakulásában, ugyanis az egészséges nők nagy részében előfordul ez a jelenség az endometriózis kialakulása nélkül. A közelmúltban számos kutatás zajlott az endometriózis kialakulásának és progrediálásának megértése céljából, így patogenezisében számos más tényező is leírásra került, mint például a kismedencén kívül megjelenő endometriotikus léziók

megjelenésére magyarázatul szolgáló limfovaszkuláris (benignus) terjedés, a mezotélium, a cölóma hám transzformációja, az össejtek elmélete, illetve az embriogenetikus elmélet és a genetikai faktorok is. Az intenzív kutatások által számos más, patogenezisben szerepet játszó tényező is felfedezésre került. Endometriózisban a proliferáció és apoptózis egyensúlya felborul, megváltoznak az endokrin funkciók, epigenetikai változások következnek be, valamint a megváltozott mikrobiom szerepe is a kutatások homlokterébe került.

Azonban napjainkban az endometriózis patofiziológiáját érintő kutatásokban a legnagyobb hangsúlyt az immunrendszer változásainak vizsgálata kapja. A veleszületett és a szerzett immunitás egyes elemeinek kóros működése az endometriózissal érintett pácineseknél megfigyelhető. Az azonban, hogy az immunregulációs zavar okozója, vagy következménye az endometriózis kialakulásának, napjainkban is kérdéses.

A szerzett immunitás sejtjeiről számos irodalmi adat áll rendelkezésünkre, azon belül a T-limfociták peritoneális folyadékban történő változása emelendő ki a kutatásokból.

Az 1-es és 2-es típusú T-helper (Th) limfociták közötti egyensúly eltolódása a 2-es típus felé olyan, normálistól eltérő változás, aminek szerepe lehet az endometriózis kialakulásában. A Th2 limfociták a B-limfociták differenciálódására hatnak, így szupprimálják a celluláris és támogatják humorális válaszokat, melyek eredeti célként az autoimmunitás gátlására irányulnak. Az endometriózisban megnövekedett interleukin-10, interleukin-12 szintek hatására bekövetkező Th1 típusú limfociták szuppresszója miatt, a Th1/Th2 arány a Th2 típusú limfociták javára tolódik el a peritoneális folyadékban, hozzájárulva, ahhoz, hogy a potenciálisan káros sejtek eliminálást az immunrendszer figyelmen kívül hagyja. Ilyen sejtek lehetnek például, az ektópiás helyre sodródó endometrium törmelékek is. Valamint endometriózisban a T-regulátor limfociták, melyek szintén a saját antigének elleni immuntolerancia fenntartásában játszanak szerepet, száma a peritoneális folyadékban emelkedett, a perifériás vérben azonban nem változik, ami autoimmun-típusú reakciókhoz,

illetve csökkent lokális celluláris immunválaszhoz vezethet. Az endometriózisban előforduló daganatos és autoimmun betegségek megnövekedett arányához a fent részletezett T limfocitákat érintő változások járulhatnak hozzá.

Endometriózisban a természetes ölő sejtek (NK-sejtek) altípusai közötti egyensúly borul fel, az erősen citotoxikus CD56dimCD16+ NK-sejtek működése gátlás alá kerül az érintett nők peritoneális folyadékában és perifériás vérében, az olyan megnövekedett citokinek hatására, mint az interleukin-6, interleukin-15, transzformáló növekedési faktor béta (TGFβ). A funkciójában csökkent citotoxicitás az ektópiásan megjelenő endometrium szövetek károsodott eliminálásához vezethet.

A megfelelő homeosztázis elérése céljából a fagocitózis számos sejten megtalálható mechanizmus, azonban ezt a funkciót nagy hatékonysággal csak néhány sejtípus képes elvégezni. Ilyen sejtek például a neutrofil granulociták, a monociták (a belőlük származó makrofágok), a dendritikus sejtek, az oszteoklasztok. Ez a funkció hivatott felismerni a szervezetünkbe került patogéneket és a szervezetünkben jelenlévő idegen és károsodott saját szöveteket. Feltételezések szerint, ilyen károsodott saját szövetnek tekinthető az ektópiásan megjelenő endometrium törmelék is.

A veleszületett immunitás sejtjeinek vizsgálata leginkább a peritoneális térben lévő makrofágokra és neutrofil granulocitákra fókuszált.

A makrofágok száma növekszik az endometriózisban szenvedő nők peritoneális terében és az eutópiásan elhelyezkedő endometrium-szigetek környezetében is. A kialakult lokális gyulladás fenntartásához hozzájárul az is, hogy a makrofágok olyan proinflammatorikus citokineket termelnek, mint a transzformáló növekedési faktor alfa (TNFα), interleukin-6, interleukin-8 (IL-8), interleukin-1β, melyek neutrofil granulocitákat vonzanak az endometriózisos léziók közelébe, tovább fokozva az ott jelenlévő gyulladásos miliőt, mely kedvez a fájdalom fokozódásának. Emellett olyan proangiogenetikus, a neoangiogenezishez

nélkülözhetetlen anyagok termelése is fokozódik bennük, mint például a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF). A vizsgálatok eredményei alapján elmondható, hogy a peritoneális térben az endometriózis miatt felgyülemelő makrofágok fagocita funkciója csökkent, aminek egyik oka lehet a bekebelezés folyamatához elengedhetetlen CD-36 scavenger és Annexin A2 receptorok csökkent expresszációja. Azonban a makrofágok, perifériás vérmintákban vizsgált, minőségi és mennyiségi vonatkozásában, valamint a makrofágok perifériás vérben keringő előalakjairól, a monocitákról, és azok működésének változásairól endometriózisban, nincs tudományos adat. Jóllehet, ezek a perifériás vérben keringő monociták is képesek fagocitózisra, antigén prezentálásra és egyes citokinek termelésére, mielőtt a szövetekbe kilépve makrofágokká alakulnának. Fiziológiai körülmények között a monociták fagocitózis révén részt vesznek az szervezet védekezésében, emellett képesek antigén prezentálásra és kemotaktikus faktorok termelésére is.

Annak ellenére, hogy a természetes immunrendszer sejtjei közül a fagocitózisra is képes neutrofil granulociták számban és funkcióban is kiemelt jelentőségűek az „idegen” sejtek és szövetek elleni védekezésben, az endometriózis patofiziológiájában betöltött szerepéről kevés információ van. Endometriózisban a neutrofil granulociták száma a peritoneális folyadékban megnövekedett, ami olyan epiteliális sejtek által termelt faktoroknak köszönhető, mint az epiteliális neutrofil aktiváló peptid-78, humán neutrofil peptid 1-3, amik odavonzzák ezeket a neutrofil granulocitákat. Az így odavonzott neutrofil granulociták, olyan funkcionális változáson mennek keresztül, hogy további neutrofil granulocitákat vonzó inflammatorikus citokineket (VEGF, IL-8, C-X-C kemokin ligand-10) termelnek a peritoneális üregben, amik a lokálisan kialakított gyulladás miatt jelentősen hozzájárulnak az endometriózis kezdeti progressziójához főként az oxidatív stressz létrehozásával, a gyulladásos válaszreakció kialakításával.

CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataink során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. A fagocita funkció vizsgálata endometriózissal érintett betegekben

Vizsgálatainkban azt figyeltük meg, hogy a természetes immunitás fagocitózisra képes sejtjeinek fagocita funkciója változik-e endometriózissal érintett betegeknél, így lehetséges-e az ektópiásan megjelenő endometrium szövetek csökkent eliminációja, illetve vizsgáltuk, hogy az endometriózis eltávolítását követően változik-e a fagocita funkció.

- 1.1. Hogyan változik a perifériás neutrofil granulociták fagocita funkciója endometriózissal érintett nőknél az egészséges populációhoz képest?
- 1.2. Hogyan változik a perifériás monociták fagocita funkciója endometriózissal érintett nőknél az egészséges populációhoz képest?
- 1.3. Hogyan változik a vizsgált sejtek fagocita funkciója a látható endometriózis teljes, sebészi úton történő eltávolítását követően?
- 1.4. Van-e hatása a műtéti beavatkozásnak a vizsgált sejtek fagocita funkciójára?
- 1.5. Az endometriózisos betegeknél, a vizsgált sejtek kapcsán megfigyelhető fagocita funkció változás reverzibilis-e?

2. Plazmakísérletek vizsgálata endometriózis által érintett betegeken

Arra is kíváncsiak voltunk, hogy az első fázis vizsgálatai reprodukálhatóak-e plazmakísérletek által. Különböző plazmamintákban történő inkubáció változtat-e a sejtek fagocita funkcióján. Javítja-e az egészséges nőkből származó plazma az endometriózisos nőkből származó sejtek fagocita funkcióját, és ronthatja-e endometriózisos nő vérmintájából származó plazma az egészséges nők sejtjeinek funkciót.

- 2.1. Van-e hatása az egészséges nőkből származó sejtek fagocita funkciójára annak, ha azokat a saját vérplazmáikban inkubáljuk?

- 2.2. Van-e hatása az egészséges nőkből származó sejtek fagocita funkciójára annak, ha azokat más, egészséges nők vérplazmáiban inkubáljuk?
- 2.3. Van-e hatása az egészséges nőkből származó sejtek fagocita funkciójára annak, ha azokat endometriózisos nők vérplazmáiban inkubáljuk?
- 2.4. Van-e hatása az egészséges nőkből származó sejtek fagocita funkciójára annak, ha azokat olyan nők vérplazmáiban inkubáljuk, akiknél az endometriózis teljes sebészi eltávolítása megtörtént?
- 2.5. Van-e hatása az endometriózisos nőkből származó sejtek fagocita funkciójára annak, ha azokat a saját vérplazmaikban inkubáljuk?
- 2.6. Van-e hatása az endometriózisos nőkből származó sejtek fagocita funkciójára annak, ha azokat más, endometriózissal érintett nők vérplazmáiban inkubáljuk?
- 2.7. Van-e hatása a sejtek fagocita funkciójára annak, ha az endometriózis műtéti eltávolítása előtt izolált sejteket egészséges nő vérplazmájában inkubáljuk?
- 2.8. Van-e hatása a sejtek fagocita funkciójára annak, ha az endometriózis műtéti eltávolítását követően izolált sejteket a saját vérplazmájukban inkubáljuk?
- 2.9. Van-e hatása a sejtek fagocita funkciójára annak, ha az endometriózis műtéti eltávolítását követően izolált sejteket a másik, szintén endometriózisos műtéten átesett nő vérplazmájában inkubáljuk?
- 2.10. Van-e hatása a sejtek fagocita funkciójára annak, ha az endometriózis műtéti eltávolítását követően izolált sejteket egészséges nő vérplazmájában inkubáljuk?
- 2.11. Van-e hatása annak, ha a fenti vizsgálatokat hővel inaktivált plazmamintákkal is elvégezzük?

BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

Vizsgálatban résztvevő nők:

A vizsgálatok első fázisában a Regionális Kutatásetikai Bizottság engedélyének birtokában, a páciensek tájékozott beleegyezését követően 26, tünetek, ultrahang vizsgálat, illetve tapintási lelet alapján feltételezhetően endometriózisban szenvedő nőtől történt pre- és 13 páciensből posztoperatív (műtét utáni hetedik nap) vérmintavétel. A műtétet követően a kórszövettani lelet minden esetben megerősítette az endometriózis diagnózisát.

A műtétes beavatkozás és anesztézia hatását vizsgáltuk egy „műtétes kontroll” csoport kiválasztásával, amibe 14 olyan nőt válogattunk be, akiknél jóindulatú nőgyógyászati kórkép miatt laparoszkópos műtéti beavatkozást terveztünk. A műtétes kontroll csoportban lévő 14 nőnél is történt műtét előtti és utáni mintavétel. A kontroll csoportot pedig 23 egészséges nő alkotta.

Az endometriózisban szenvedő nőbetegeknél beválogatási kritérium volt a tervezett laparoszkópos műtéti technika, az utólag szövettani vizsgálattal igazolt endometriózis, a fertilis életkor (18-45 év). Mivel egyes feltételezések szerint a korai és előrehaladott stádiumú endometriózis patogenezisében jelentős különbségek lehetnek, csak azon betegek vérmintáit vizsgáltuk, akiknél a műtét alatt korai stádiumot igazoltunk.

Kizárási kritériumok közé tartozott a dohányzás, nagyobb belgyógyászati, vagy bármilyen immunológiai eredetű betegség, a hat hónapon belüli rendszeres hormonális komponensű gyógyszerszedés, a 30 kg/m² feletti testtömeg index és a fél éven belüli vakcináció.

A műtétes kontroll csoportnál a beválogatáshoz szintén szükséges volt, hogy a műtét kivitelezése minimál invazív laparoszkópos úton történjen, a műtét után kórszövettani vizsgálattal igazolt jóindulatú nőgyógyászati kórkép, és a fertilis életkor (18-45 év). A kizárási kritériumok az endometriózis csoportban alkalmazottakkal megegyeztek.

Egészséges nőknél beválogatási kritériumnak tekintettük a fertilis életkort (18-45 év), és a rendszeres menstruációs ciklust. A kizárási kritériumok a többi csoportnál alkalmazottakkal megegyeztek, kiegészítve bármilyen nőgyógyászati kórkép meglétével.

Vizsgálataink második fázisában szintén a Regionális Kutatásetikai Bizottság engedélyével, a páciensek tájékozott beleegyezését követően 8 endometriózisos betegről történt vérvétel a műtét előtti reggelen (preoperatív minta) és a hetedik posztoperatív napon (posztoperatív minta). A kontroll csoport 16 egészséges nőből állt. Az egyes csoportok beválogatási és kizárási kritériumai a vizsgálataink első fázisában alkalmazottakkal megegyeztek.

A különböző csoportok mindegyikében a vérvételek a menstruációs ciklus follikuláris fázisában történtek.

Laboratóriumi vizsgálat

Vérplazma és fehérvérsejtek szeparálása a perifériás vérmintákból

A vérvétel EDTA tartalmú, vákuumelven működő, zárt vérvételi csövekbe történt mindegyik vizsgálati csoportban.

A plazmafrakciókat, melyeket a kutatás második fázisában szeparáltunk, mindegyik vizsgálati csoport esetében a vérminták 20°C-on, 800 G-n történő, 10 perces centrifugálása után nyertük. Ezt követően a vérplazmákat két egyenlő részre osztottuk és az egyik felét 30 perc alatt 56°C-os vízfürdőben inaktiváltuk annak érdekében, hogy a feltételezett immunmoduláns faktorok hőrezisztenciáját megállapítsuk, valamint, hogy a komplementrendszer feltételezett fagocitózist befolyásoló hatását kizárjuk.

A plazmafrakciók szeparálását követően, eltérő sűrűség grádiensű (1,119 g/cm³, majd 1,077 g/cm³) Ficoll oldatok rétegzésének segítségével, centrifugálással történt a vizsgált fehérvérsejtek szeparálása. Külön-külön kémcsőbe gyűjtöttük az elkülönült monocita-limfocita sejteket és a neutrofil granulocitákat tartalmazó rétegeket. A sejtek viabilitását ezután tripánkék

festékekkel ellenőriztük, mely minden esetben 96-98%-nak adódott. Az eritrocita kontamináció hiánya miatt a vörösvértestek lízisére nem volt szükség.

A kutatás második fázisában minden plazmakísérletet inaktivált és nem inaktivált plazmával is elvégeztük. Az endometriózisban szenvedő nők műtét előtt szeparált monocitáit és neutrofil granulocitáit egészséges nők plazmájában inkubáltuk. Ugyanígy, az endometriózisban szenvedő nők műtét után szeparált monocitáinak és neutrofil granulocitáinak inkubációja is egészséges nőkből származó plazmában, illetve az egészséges nők monocitáit és neutrofil granulocitáit endometriózisos nők műtét előtt és műtét után szeparált plazmájában inkubáltuk. Annak érdekében, hogy megfigyeljük milyen hatással van az „idegen” vérplazma a monociták és a neutrofil granulociták fagocita funkcióira minden csoport monocitáit és neutrofil granulocitáit a saját plazmájával, illetve azonos csoportból származó, de másik egyén plazmájával kezeltük. Az inkubáció 37°C-on, 60 percig tartott, majd a plazmától megtisztítva vizsgáltuk a fagocita funkciót.

A sejtek kitapasztása sejtenyésző kamrára történt, majd a Zimozan A részecskék fluoreszcein-izotiocianátot tartalmazó pufferben történő fluoreszcens jelölését és opszonizálását követően, azokat a sejtekkel inkubáltuk. A nem fagocitált részecskék fluoreszcenciáját tripánkék festéssel oltottuk ki. Ezt követően a fixálás 4%-os paraformaldehid oldatban történt. Ezt követően a monociták indirekt immunofluoreszcens jelölése következett egérben termeltetett CD14⁺ monocita specifikus antitestekkel majd a fluoreszcensen jelölt (Dylight 594) egér IgG-ellenes másodlagos antitestekkel. A jelöléssel fluoreszcens mikroszkóp alatt piros színnel láthatóvá vált a monociták sejthártyája, mely a monociták azonosítását tette lehetővé. Utolsó lépésben mindkét a neutrofil granulociták és monociták sejtmagjainak fluoreszcens jelölését végeztük 4',6-diamino-2-fenilindol-t tartalmazó fedőmédiummal.

A minták kiértékelése véletlenszerűen kiválasztott látóterekben történt Axioplan fluoreszcens mikroszkóp (Zeiss, Oberkochen, Németország) segítségével. Minden látótérben

100 sejtet vizsgáltunk a részecskéket megszámoltuk. A 100 sejt által fagocitált részecskéket összeadtuk, majd elosztottuk százal így megkaptuk a fagocitózis indexet, ami a bekebelezett Zimozan partikulumok átlagát jelentette egy sejtben. Azokon a lemezeken, melyeken a neutrofil granulociták helyezkedtek el, a sejtek meghatározása morfológiai sajátásaik alapján történt, azokon a lemezeken, amelyeken a monociták voltak, a fent részletezett, pirosan fluoreszkáló sejthártyájuk adott támpontot az azonosításhoz.

Statisztikai analízis

Az eredményeket átlagként tüntettük fel ($\pm$ standard deviancia). A minták eloszlását a Shapiro-Wilk-tesztel ellenőriztük, és azok normál eloszlásúnak bizonyultak. Mindkét kutatási fázisban a résztvevő személyek klinikai adatainak összehasonlítására egy tényezős varianciaanalízist („one-way ANOVA”) használtunk. Azonos csoport műtét előtt és után kapott, illetve inaktivált és nem inaktivált értékeinek összehasonlítására kétmintás t-próbát alkalmaztunk. Ugyanazon nők (endometriózisos betegek, egészséges) monocitái és neutrofil granulocitái különböző plazmával (autológ, heterológ, beteg műtét előtti és utáni) történt kezelésének hatására kapott fagocitózis index értékeinek összehasonlítására ismételt méréses varianciaanalízist használtunk. Statisztikailag szignifikánsnak a $p < 0,05$ értéket tekintettük.

EREDMÉNYEK

A vizsgált nők életkora, testtömeg-indexe, graviditása és paritása nem különbözött szignifikánsan a különböző vizsgálati csoportokban a kísérlet egyik fázisában sem.

A kutatás első fázisának eredményei

Az endometriózisos betegek műtét előtt gyűjtött perifériás vérmintáiból izolált monocitáinak és neutrofil granulocitáinak fagocitózis index értékei szignifikánsan ($p < 0,001$) alacsonyabbak voltak, mint az egészséges nők vérmintáiból származó monociták és neutrofil granulociták fagocitózis index értékei. Az endometriózisos páciensek preoperatív eredményeihez képest a posztoperatív hetedik napon vett mintákból szeparált monociták és

neutrofil granulociták fagocitózis index értékei szignifikáns ($p < 0,001$) növekedést mutattak a preoperatív értékekhez képest. Az egészséges nőkből származó sejtek fagocitózis index értékei és a posztoperatív endometriózisos betegek sejtjeinek fagocitózis indexe értékei nem különböztek egymástól ($p = 0,060$) szignifikánsan. A műtétes kontroll csoportnál a műtét előtti és a hetedik posztoperatív napon ($FI = 3,35 \pm 0,52$) levett vérmintákból származó monociták és neutrofil granulociták fagocitózis index értékei között nem volt szignifikáns különbség ($p = 0,731$).

A plazmakísérletek eredményei

Egészséges nőkből származó neutrofil granulociták és monociták fagocitációs funkciója

Amennyiben egészséges nőkből származó neutrofil granulocitákat inkubáltunk endometriózissal érintett nők műtét előtt izolált inaktivált és nem inaktivált plazmájában, úgy a sejtek fagocitózis indexeiben szignifikáns csökkenés volt látható ($p < 0,001$), összehasonlítva az egészséges nőkből származó autológ és heterológ plazmamintákban történő inkubációt követően mért fagocitózis indexekkel. A vizsgált sejtek fagocitózis indexei nem különböztek szignifikánsan, amikor az egészséges nőkből származó neutrofil granulocitákat autológ és heterológ plazmában inkubáltuk és összehasonlítottuk az endometriózisban szenvedő nők műtéti ellátását követő hetedik napon izolált plazmamintákban történő inkubáció hatásával.

A monociták fagocitózis indexeinek eredményeit áttekintve látható, hogy az endometriózisos betegekből a műtét előtt szeparált plazmamintákkal történt kezelés jelentősen csökkentette (inaktivált, nem-inaktivált: $p < 0,001$) a fagocitózis indexeket az egészséges nőkből származó monociták esetében az autológ és heterológ plazmamintákban történt inkubációt követő eredményekhez képest. Az egészséges nők monocitáinak fagocitózis indexei nem különböznek egymástól szignifikánsan, ha autológ, heterológ, illetve endometriózisos betegekből a műtét utáni hetedik napon izolált plazmamintákban inkubáltuk a sejteket.

Endometriózisban szenvedő nők műtét előtt izolált neutrofil granulocitáinak és monocitáinak fagocita funkciója

Miután az egészséges hölgyekből izolált plazmamintákban kezeltük az endometriózisos nőbeteg preoperatíván szeparált neutrofil granulocitáit szignifikáns növekedést tapasztaltunk ($p < 0,001$) az endometriózisos inaktivált és nem-inaktivált, autológ és heterológ plazmamintákban történt kezelésekhez képest.

Az endometriózisos betegekből preoperatíván izolált monociták autológ, heterológ plazmamintákban történt kezelést követően a monociták fagocitózis indexei szignifikánsan csökkentek ($p < 0,001$) az egészséges nőkből származó inaktivált és nem inaktivált plazmamintákban történő inkubációhoz képest.

Endometriózisban szenvedő nők műtét után izolált neutrofil granulocitáinak és monocitáinak fagocita funkciója

Az endometriózis miatt végzett műtétet követő hetedik napon izolált neutrofil granulocitákat ugyanezen populációból származó autológ és heterológ plazmamintákban történt kezelést követően a fagocitózis indexben nem volt szignifikáns különbség (inaktivált: $p=0,655$ és $0,050$; nem-inaktivált: $p=0,504$ és $0,845$) az egészséges nők plazmamintájában történt kezelés utáni eredményekhez képest.

Hasonlóan, az endometriózisos nőkből műtét után izolált monociták fagocitózis eredményeiben sem volt szignifikáns különbség (inaktivált: $p=0,517$ és $0,300$; nem-inaktivált: $p=0,869$ és $0,072$) az ugyanezen csoportból származó autológ, heterológ és egészséges nők plazmamintáiban történő inkubációt követő eredményeihez képest.

A plazmakísérletek eredményeinek esetében az inaktivált és a nem-inaktivált plazmamintákban történő inkubációt követően nem volt szignifikáns különbség a fagocitózis indexekben, hasonlóan az autológ és heterológ plazmamintákban történő inkubációt követően sem találtunk szignifikáns eltérést.

MEGBESZÉLÉS

Az endometriózis prevalenciája a reprodukzív korú nők körében 10% körül mérhető, emellett a krónikus kismencedei fájdalomban és/vagy infertilitásban szenvedő nők felében endometriózis diagnosztizálható. A tünetek által okozott jelentős életminőségbeli romlás és a kórkép népegészségügyi hatása mára megkérdőjelezhetetlenné vált.

Jelen tudásunk szerint a veleszületett és a szerzett immunitásban, illetve az immunosurveillance-ben bekövetkező változások kulcsszerepet tölthetnek be az endometriózis patogenezisében. Az immunfunkciókban bekövetkező változás hozzájárulhat, ahhoz, hogy a retrográd menstruáció, vagy más módon való terjedés útján az ektópiásan megjelenő endometrium szövet képes megtapadni, növekedni és az érintett területeket károsítani. Az intenzív kutatások ellenére, az a mechanizmus, amely megakadályozza a méh üregén kívül megjelenő endometriális mirigyek és stroma immunsejtek általi eltávolítását, még igen kismértékben tisztázott.

A peritoneális tér immunsejtjeiben bekövetkező változásokról számos adat áll rendelkezésünkre, különösen a T-limfociták funkcióit tekintve. A peritoneális folyadékban és az endometriózis által érintett területen akut gyulladásos válasz alakul ki, ami T-helper és T-regulátor sejteket vonz oda és aktivál. Az akut gyulladás ciklikus csökkenését követően a monociták/makrofágok diszfunkcionális szerepe dominál az érintett területen krónikus gyulladás indukálásával és fenntartásával, érújdonképződés facilitálásával, következményes összenövések és hegesedés megjelenésével, melyek később a klinikai tüneteket (krónikus kismencedei fájdalom és infertilitás) okozhatják. Mind a peritoneális folyadékban, mind a perifériás vérben az NK és T-sejtek citotoxicitása károsodott, ami az endometriózissal érintett nők vérében megfigyelt immunmoduláns faktorok hatására következhet be. Megfigyelték, hogy a veleszületett immunitás sejtjei közül a neutrofil granulociták száma, a peritoneális üregben, az endometriózis korai stádiumában megnövekszik, azonban az előrehaladott betegségben

számuk intraperitoneálisan csökken. A sejtek számbeli változása mellett azok funkciója is módosul, így az általuk termelt az IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 és a TNF α pro- és antiinflammatorikus citokinek mennyisége is megnövekszik az endometriózisos nők szérumában és peritoneális folyadékában is, ami előrehaladott stádiumban még kifejezettebb. Az immunmoduláns faktorok tekintetében egyes növekedési és angiogenezist elősegítő faktor (TGF- β , inzulinszerű növekedési faktor-1 és VEGF) plazmakoncentrációja is megemelkedik az egészségesekhez képest. Azt azonban, csak néhány tanulmány említi meg, hogy az endometriózis immunsejtek általi eliminálása valószínűsíthetően károsodott, ami az endometriózis fennmaradásához és terjedéséhez járulhat hozzá.

Az endometriózisos nők peritoneális folyadékában megjelenő makrofágokban a fagocitózishoz szükséges CD-36 scavenger receptorok expresszációja, valamint ezáltal a mátrix metalloproteázok aktiválása csökkent, aminek oka lehet az endometriózisos nő szérumában keringő, megnövekedett prosztaglandin E2 szintje. Emellett megnövekszik a makrofágok száma és az általuk szekretált proinflammatorikus citokinek mennyisége is endometriózisban, azonban a makrofágok differenciálódása az M2 altípus felé történik meg, ami a sejtek proliferációjának kedvez, és nem az ellenkező hatású M1 altípus felé. Feltételezhető, hogy a monocitáknak és a belőlük differenciálódó makrofágoknak, valamint a fagocitózis szempontjából jelentőséggel bíró neutrofil granulocitáknak szerepük lehet az ektópiás endometrium eliminálásában. Az endometriózisos betegek perifériás vérében lévő immunsejtek működésének vizsgálata kevésbé kutatott terület, így ezzel kapcsolatban viszonylag kis számú szakirodalmi adat áll rendelkezésre.

A hipotézisünknek megfelelően, kutatásunk első fázisában a perifériás vérben lévő neutrofil granulociták és monociták fagocita funkcióját vizsgáltuk az endometriózisos páciensekben műtét előtt és után, az eredményeket egészséges nők és műtétes kontroll csoport hasonló eredményeivel összehasonlítva. A vizsgálataink első fázisban megfigyelt változások

adtak alapot azok folytatására, azaz a plazmakísérletek elvégzésére, melynek során az egyes vizsgálati csoportokból származó sejteket a saját és más csoportok vérplazmájával kezeltük.

Eredményeink alapján elmondható, hogy az endometriózissal érintett nők perifériás vérében lévő neutrofil granulociták és monociták fagocita funkciója jelentősen csökkent az egészséges nőknél megfigyelhető fagocita funkcióhoz képest. Ez a csökkenés reverzibilis, mivel az endometriózis műtéti eltávolítását követően a vizsgált funkció normalizálódik. Elmondható, hogy a laparoszkópos műtéti beavatkozásnak nincs hatása a sejtek fagocita funkciójára, ezekben az esetekben a vizsgált funkció az egészséges kontroll csoport eredményeivel megegyező. A perifériás neutrofil granulociták és monociták fagocita funkciójának csökkenését tehát valószínűsíthetően az endometriózis által termelt faktor(ok) okozhatják.

Annak a feltételezésünknek az igazolására, hogy ezek, az endometriózis által termelt, fagocita funkciót befolyásoló faktorok a perifériás vérben is megjelennek és kifejtik hatásukat, plazmakísérleteket végeztünk. Ezen vizsgálatok igazolták az endometriózisos betegek perifériás vérében keringő, immunmoduláns faktor(ok) jelenlétét, mivel mindegyik vizsgált csoport sejteinek fagocita funkciója lecsökken, ha endometriózissal érintett nő vérplazmájában inkubáljuk. A funkció reverzibilis károsodására újabb bizonyíték, hogy az endometriózissal érintett betegek sejteinek csökkent fagocita funkciója normalizálódik, ha bármelyik másik vizsgálati csoport plazmájában inkubáljuk a sejteket. Az adatok megbízhatósága miatt a vizsgálatokat autológ plazmákkal is elvégeztük, de azok egyik esetben sem változtatták meg a vizsgált funkciót, azaz a kísérleti munka körülményei nem befolyásolták a fagocita funkciót. Hasonló célból, a vizsgálatokat hővel inaktivált plazmamintákkal is elvégeztük, a komplement rendszer immunfunkciót befolyásoló feltételezett hatásának kizárása. Eredményeink alapján a komplement rendszernek fagocita funkciót befolyásoló hatása nincsen, mivel nem volt látható

különbség az inaktivált és nem inaktivált mintákkal végzett kísérletek eredményei között, azonban az általunk feltételezett faktorok hőstabilnak bizonyultak.

Eredményeink alátámasztják feltételezésünket, miszerint az ektópiás endometrium és/vagy ezek mikrokörnyezete olyan immunszuppresszív faktorokat termelhetnek, melyek csökkentik a perifériás vérben lévő monociták és neutrofil granulociták fagocita funkcióját, azonban kiemelendő, hogy ez a funkció romlás reverzibilis, ezen faktorok termelése már a lézió teljes eltávolítását követő hetedik napra megszűnhet/csökkenhet.

Az endometriózisban szenvedő nők plazmájában lévő immunszuppresszív faktorok azonosítása további vizsgálataink tárgyát képezhetik. Feltételezhető, hogy a megemelkedett proinflammatorikus citokinek mellett az endometriózisos betegek vérében jelenlévő antiinflammatorikus citokinek (pl. IL-10) hatással lehetnek a fagocita funkcióra. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a károsodott immunfunkció miatt a hasüregben megjelenő endometrium sejtek eliminálása zavart szenved, így a leírt jelenség az endometriózis progressziójának egyik része lehet.

Kutatásunk arra is rávilágíthat, hogy nemcsak az immunrendszer zavarai okozhatják az endometriózis kialakulását, hanem az endometriózis is hatással lehet az immunológiai funkciókra.

ÖSSZEFOGLALÁS

Az endometriózis egy jóindulatú, krónikus megbetegedés, ami negatívan hat az érintett nők életminőségére, és számos nő esetében felelős az infertilitásért is. A betegség patofiziológiája nem teljesen tisztázott, azonban a károsodott immunválasz kulcsszerepet tölthet be benne. A veleszületett immunrendszer fagocita funkciója szerepet játszhat az ektópiásan megjelenő endometrium eliminálásában. A vizsgálataink célja a neutrofil granulociták és monociták fagocita funkciójának vizsgálata volt. A kutatásunk első fázisában endometriózisos nőből származó műtét előtt és után, egészséges, és más, benignus

nőgyógyászati kórkép miatt műtéten áteső páciens pre- és posztoperatív vérmintájából izolált sejtek fagocita funkcióját vizsgáltuk és hasonlítottuk össze. Munkánk második fázisban pedig plazmakísérleteket végeztünk inaktivált és nem inaktivált plazmamintákkal.

A vizsgálatban összesen 34 preoperatív és 22 posztoperatív vérvétel történt endometriózisban szenvedő nőtől, 32 egészséges nő vérmintája szolgált kontroll csoportként, valamint jóindulatú nőgyógyászati betegségek miatt 14 műtéten átesett nőnél történt pre- és posztoperatív vérvétel. A vizsgált sejteket izoláltuk, majd különböző plazmamintákban inkubáltuk, ezt követően a fagocitózis indexeiket fluoreszcens mikroszkóp alatt meghatároztuk.

Az endometriózisos betegek esetében neutrofil granulociták és monociták fagocita funkciója szignifikánsan csökkent az egészséges nők eredményeivel összehasonlítva. Amennyiben a csökkent fagocita funkcióval bíró sejteket egészséges nőkből származó plazmamintákban inkubáltuk, úgy a vizsgált funkció normalizálódott. Emellett, ha egészséges nőkből származó sejteket endometriózisos nő plazmamintáival kezeltük, úgy a fagocita funkció szignifikánsan csökkent. Nem volt különbség a hővel inaktivált és nem inaktivált plazmaminták eredményei között.

Eredményeink alapján elmondható, hogy az aktív endometriotikus léziók olyan hőstabil, immunmoduláns faktorokat termelhetnek, amelyek a perifériásan megtalálható neutrofil granulociták és monociták fagocita funkcióját csökkentik. Ez a funkció az endometriózis komplett sebészi eltávolítását követően normalizálódik, és újra eléri az egészséges nőkben mérhető szintet.

KÖZLEMÉNYEK



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/5/2024.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Lukács Luca

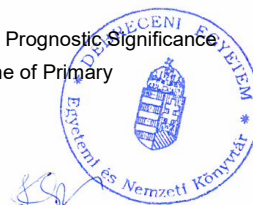
Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Lukács, L.**, Kovács, A. R., Pál, L., Szűcs, S., Lampé, R.: Evaluating the Phagocytic Index of Peripheral Leukocytes in Endometriosis by Plasma Experiments.
Medicina (Kaunas). 58 (7), 1-12, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/medicina58070925>
IF: 2.6
2. **Lukács, L.**, Kovács, A. R., Pál, L., Szűcs, S., Kövér, Á., Lampé, R.: Phagocyte function of peripheral neutrophil granulocytes and monocytes in endometriosis before and after surgery.
J. Gynecol. Obstet. Hum. Reprod. 50 (4), 1-5, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jogoh.2020.101796>
IF: 2.156

További közlemények

3. Bélteki, B., Boldogh, B. Z., Lipták, M. G., **Lukács, L.**, Lampé, R., Török, P.: A meddőség és a méh strukturális rendellenességeinek lehetséges kapcsolata.
86, 254-259, 2023.
4. **Lukács, L.**, Lampé, O., Orosz, M., Krasznai, Z. T., Lampé, R.: A paraaorticus lymphadenectomy szerepe az endometriumkarcinóma ellátásában.
Magy Noorv Lapja. 86, 278-282, 2023.
5. Kovács, A. R., Sulina, A., Kovács, K. S., **Lukács, L.**, Török, P., Lampé, R.: Prognostic Significance of Preoperative NLR, MLR, and PLR Values in Predicting the Outcome of Primary Cytoreductive Surgery in Serous Epithelial Ovarian Cancer.
Diagnostics. 13 (13), 1-13, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/diagnostics13132268>
IF: 3.6 (2022)





6. Kovács, A. R., **Lukács, L.**, Pál, L., Szűcs, S., Kovács, K. S., Lampé, R.: Recovery of the Decreased Phagocytic Function of Peripheral Monocytes and Neutrophil Granulocytes following Cytoreductive Surgery in Advanced Stage Epithelial Ovarian Cancer. *Medicina (Kaunas)*. 59 (9), 1-10, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/medicina59091602>
IF: 2.6 (2022)
7. Patra, S., Dave, A., Manchanda, R., **Lukács, L.**, Török, P.: The role of salpingoscopy and fallopscopy in current clinical practice: A review. *Ital. J. Gynaecol. Obstet. [Epub ahead of print]*, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.36129/jog.2023.140>
8. Kovács, A. R., Pál, L., Szűcs, S., **Lukács, L.**, Póka, R., Lampé, R.: Monocyták és neutrophil granulocyták fagocitafunkciója ovariumcarcinomában. *Orv. hetil.* 159 (33), 1353-1359, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2018.31142>
IF: 0.564
9. Kovács, A. R., Pál, L., Szűcs, S., **Lukács, L.**, Kövér, Á., Krasznai, Z. T., Lampé, R.: Petefészekrákos betegek perifériás monocitáinak és neutrofil granulocitáinak fagocitafunkciója. *Nőgyógy. Onkol.* 23, 54-58, 2018.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 11,52

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 4,756

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2024.01.10.

