

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Hypophysis adenilát cikláz aktiváló polipeptid (PACAP)
jelátvitel vizsgálata ivarszervek patológiás folyamataiban**

Dr. Szegeczki Vince

Témavezető: Dr. Juhász Tamás



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2025.

Tartalomjegyzék

| | |
|---|----|
| Rövidítések jegyzéke | 4 |
| Összefoglalás | 8 |
| Tárgyszavak: | 8 |
| I. Bevezetés..... | 9 |
| I.1. A PACAP és jelátvitel, élettani és kórélettani hatásai | 9 |
| I.2. A kutatás során vizsgált szövetek: a here | 14 |
| I.3. A kutatás során vizsgált szövetek: a humán endometrium..... | 20 |
| I.4. A kutatás során vizsgált betegségek: az Alzheimer-kór | 29 |
| I.5. A kutatás során vizsgált betegségek: az endometriosis | 34 |
| II. Célkitűzés..... | 44 |
| III. Anyagok és módszerek | 45 |
| III.1. Az első kutatásrész során alkalmazott anyagok és módszerek | 45 |
| III.1.1. A kutatásban alkalmazott állatok | 45 |
| III.1.2. A szövetek HE festése és elemzése | 45 |
| III.1.3. Konvencionális RT-PCR | 46 |
| III.1.4. Western blot..... | 48 |
| III.1.5. Immunhisztokémiai festés | 50 |
| III.1.6. Statisztikai analízis | 50 |
| III.2. A második kutatásrész során alkalmazott anyagok és módszerek..... | 51 |
| III.2.1. A klinikai adatok gyűjtése..... | 51 |
| III.2.2. A kórszöveti diagnózisok csoportosítása | 51 |
| III.2.3. A klinikai és a kórszöveti kizárási és beválogatási kritériumok | 51 |
| III.2.4. Matematikai analízis..... | 52 |
| III.3. A harmadik kutatásrész során alkalmazott anyagok és módszerek | 54 |
| III.3.1. A szövettenyésztési eljárás..... | 54 |
| III.3.2. A szövetek HE festése és kórszöveti elemzése | 56 |
| III.3.3. Konvencionális RT-PCR | 57 |
| III.3.4. Statisztikai analízis..... | 59 |
| IV. Eredmények | 60 |
| IV.1. Az első kutatásrész eredményei..... | 60 |
| IV.1.1. A here kanyarulatot csatornáinak sejtdenzitása és a membrana basalis vastagsága | 60 |
| IV.1.2. A PACAP receptorok és a PACAP jelátviteli elemek expressziója..... | 61 |
| IV.1.3. A here membrana basalis komponenseinek expressziója | 65 |
| IV.2. A második kutatásrész eredményei | 66 |

| | |
|--|-----|
| IV.2.1. A klinikai minták kórszövettani eredménye..... | 66 |
| IV.2.2. A méhnyálkahártya kaparékok (D&C) és biopsziás minták (HSC) kórszövettani eredményei..... | 67 |
| IV.2.3. A méhnyálkahártya kaparékok (D&C) kórszövettani eredményei..... | 68 |
| IV.2.4. A méhnyálkahártya biopsziás minták (HSC) kórszövettani eredményei..... | 69 |
| IV.2.5. A klinikai kritériumok alapján alkalmas méhnyálkahártya kaparékok (D&C) és biopsziás minták (HSC)..... | 70 |
| IV.2.6. A klinikai kritériumok alapján alkalmas méhnyálkahártya kaparékok (D&C) | 71 |
| IV.2.7. A klinikai kritériumok alapján alkalmas méhnyálkahártya biopsziás minták (HSC) | 72 |
| IV.2.8. Az alapkutató vizsgálatokra alkalmas klinikai méhnyálkahártya minták | 73 |
| IV.3. A harmadik kutatásrész eredményei..... | 74 |
| IV.3.1. A PACAP receptorok és a prePACAP mRNS expressziója méhnyálkahártya mintákban..... | 74 |
| IV.3.2. A PACAP receptorok és a prePACAP mRNS expressziója endometriosis mintákban..... | 75 |
| IV.3.3. A TGF β jelátvitel elemeinek mRNS expressziója méhnyálkahártya mintákban..... | 76 |
| IV.3.4. A TGF β jelátvitel elemeinek mRNS expressziója endometriosis mintákban..... | 76 |
| IV.3.5. Az őssejt transzkripciós faktorok mRNS expressziója méhnyálkahártya mintákban | 77 |
| IV.3.6. Az őssejt transzkripciós faktorok mRNS expressziója endometriosis mintákban | 77 |
| IV.3.7. Az endometriosis kialakulásában jelentős egyéb molekulák mRNS expressziójának vizsgálata méhnyálkahártya mintákban | 78 |
| IV.3.8. Az endometriosis kialakulásában jelentős egyéb molekulák mRNS expressziójának vizsgálata endometriosis mintákban | 79 |
| V. Diskusszió..... | 81 |
| VI. Konklúzió | 96 |
| Discussion of Results and New Scientific Findings of the Thesis..... | 98 |
| Köszönetnyilvánítás | 101 |
| Saját és társszerzői eredmények | 102 |
| Függelék (Irodalomjegyzék) | 103 |

Rövidítések jegyzéke

- ABP** – androgen-binding protein (androgénkötő fehérje)
- ACh** – acetil-kolin
- AD** – Alzheimer's disease (Alzheimer-kór)
- ADAS** – Alzheimer's disease Assessment Scale
- ADP** – adenzin-difoszfát
- AMH** – anti-Müllerian hormon
- APOE** – apolipoprotein-E
- APP** – amyloid prekursor protein
- ARF** – ADP-ribosziláló faktor
- A β** – amyloid- β peptid
- BMDCs** – bone marrow-derived stem cells (csontvelői eredetű mesenchymalis őssejtek)
- BME** – basement membrane extract
- BMP** – bone morphogenetic protein
- BNO** – Betegségek Nemzetközi Osztályozása
- BPSD** – behavioral and psychological symptoms of dementia
- BSA** – bovine serum albumine (szarvasmarha szérum albumin)
- CA-125** – cancer antigen 125
- cAMP** – ciklikus adenzin-monofoszfát
- CD** – cluster of differentiation
- cDNS** – komplementer DNS
- CDT** – Clock Drawing Test (órarajzoló teszt)
- CHT** – chromohydro(per)tubatio
- COCP** – combined oral contraceptive pills (kombinált orális fogamzásgátló készítmény)
- COX** – ciklooxygenáz (enzim)
- CREB** – cAMP-response element binding protein
- CT** – computed tomography
- D&C** – dilation and curettage procedure (méhkaparás tágítással)
- DAG** – diacilglicerol
- DAPI** – 4',6-diamidino-2-phenylindole (4',6-diamidino-2-fenilindol)
- DIE** – deep infiltrating endometriosis (mélyen infiltráló endometriosis)
- DMEM** – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNS - dezoxiribonukleinsav

E1 – estron (öszttron)

E2 – estradiol (öszttradiol)

E3 – estriol (öszttriol)

E4 – estetrol (ösztetrol)

ECM – extracelluláris mátrix

ECT – ectopic endometrium (méhen kívüli /ectopiás/ méhnyálkahártya)

eEPs – endometrial epithelial progenitors (endometrialis epithelialis progenitor sejtek)

eMSCs – endometrial mesenchymal stem cells (endometrialis mesenchymalis őssejtek)

EOAD – Early onset Alzheimer’s disease

ERK – Extracellular Signal-regulated Kinases

ESR – ösztrogén receptor gén

EUT – eutopic endometrium (méhen belüli /eutopiás/ méhnyálkahártya)

FSH – follikulumus stimuláló hormon

GHRH – growth hormone-releasing hormone (növekedési hormont felszabadító hormon)

GIT – gastrointestinalis tractus (gyomor-bélrendszer)

GnRH – gonadotropin-releasing hormone (gonadotrop felszabadító hormon)

HE – hematoxilin-eozin festés

HG-DMEM – high glucose DMEM

HSC – hysteroscopy (hysteroscopia-méhtükrözés)

HSCs – hematopoietic stem cells (haemopoeticus őssejtek)

HSV – herpes simplex vírus

ICM – intracelluláris mátrix

IP₃ – inozitol-trifoszfát

IUD – intrauterine decide (méhen belüli fogamzásgátló eszköz)

IVF – in vitro fertilisatio (in vitro mesterséges megtermékenyítés)

KIR – központi idegrendszer

LEEP - loop electrosurgical excision procedure

LH – luteinizáló hormon

LOAD – Late onset Alzheimer’s disease

LUNA – laparoscopic uterine nerve ablation

MAPK – Mitogen-activated protein kinase

MMSE – Mini Mental State Examination

MRI – magnetic resonance imaging (mágneses rezonancia képalkotás)

mRNS – messenger (hírvivő) RNS

NFW – nuclease-free water (nukleázmentes víz)

NINCDS-ARDA – National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke és az Alzheimer's Disease and Related Disorders Association

NK - natural killer sejtek

NMDA – N-methyl-D-aspartate (N-metil-D-aszpartát)

NSAID – nonsteroidal anti-inflammatory drugs (nem-szteroid gyulladáscsökkentő készítmények)

Oct4 – octamer-binding transcription factor 4

OMA – ovarian endometrioma (ovariális /petefészek/ endometriosis)

P4 – progesterone (progeszteron)

PACAP – pituitary adenylate-cyclase-activating polypeptide (hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid)

PACAP KO – PACAP knock out (PACAP génkiütött)

PACE4 – paired basic amino acid-cleaving enzyme 4

PAM – peptidyl glycine α -amidating monooxygenase

PBS - phosphate-buffered saline

PBST – Tween20 tartalmú PBS

PCR – polymerase chain reaction (polimeráz-lánreakció)

PET – positron emission tomography (pozitron emissziós képalkotás)

PKA – protein kináz A

PKC – proteín kináz C

PLC – foszfolipáz C

PLD – foszfolipáz D

PP2A – proteín foszfatáz 2A

PRL – prolaktin

PRP – PACAP-related peptide

PSEN1 – presenilin-1

PSEN2 – presenilin-2

PSN – presacral neurectomy

RIPA – radioimmunoprecipitation assay buffer

RNS – ribonukleinsav

RT-PCR – reverse transcription PCR (reverz transzkripció PCR)

Sox2 - sex determining region Y-box 2

SP – side population sejtek
SPE – superficial peritoneal endometriosis (felszínes hashártya endometriosis)
SPRMs – szelektív progeszteron receptor modulátorok
SRY – sex-determining region Y protein
β-hCG – β-humán chorion gonadotropin
TAD – trained AD (aktív mozgást végző AD egyedek)
TCRE – transcervical resection of the endometrium
TDF – testis determining factor
TGF-β – transforming growth factor beta
TRS – transrectalis sonographia (végbél ultrahang)
TVS – transvaginalis sonographia (hüvelyi ultrahang)
UH – ultrahang
URM – utolsó rendes menstruáció
VEGF - vascular endothelial growth factor (vascularis endothelialis növekedési faktor)
VIP – vasointestinalis peptid
WB – Western blot
WT – wild type (vad típusú egyedek)

Összefoglalás

A PACAP egy olyan neuropeptid, amely a központi idegrendszeren kívül számos perifériás szövet élettani folyamatainál jelentőséggel bír, köztük a reproduktív szervekben is. Bizonyos határértékig védi a szöveteket az oxidatív folyamatok károsító hatásától. E destruktív folyamatok a jelen dolgozatban tanulmányozott Alzheimer-kórban és az endometriosisban is szerepet játszanak a kórképek kialakulása során.

Kísérleteinknél célunk volt a PACAP nemi szervek működésében betöltött szerepéről szerzett tudást bővíteni. A kutatás három témarészből áll: a neuropeptid jelátvitelének vizsgálata Alzheimer-kórt modellező egerek heréiben, a műtétilag kinyerhető méhnyálkahártya molekuláris kísérletekbe való bevonása problémáinak ismertetése, valamint a PACAP által létrehozott mRNS expressziós változások feltárása humán endometrium és endometriosis mintákban.

A hím gonádokat PCR, Western blot, immunhisztokémiai és szövettani festési eljárásokkal tanulmányoztuk. A méhnyálkahártya minták alkalmazását klinikai retrospektív vizsgálattal tártuk fel. Az eutopiás és ectopiás endometrioid szöveteket egy általunk kidolgozott szövettenyésztési módszer segítségével tartottuk fenn és kezeltük az RT-PCR vizsgálatok elvégzése előtt.

A PACAP jelátvitel a neurodegeneratív kórképben hasonló módon károsodik a herében, mint az agy esetében. A neuropeptid szignalizáció változásai hozzájárulhatnak a hím gonádban megfigyelhető mikroszkopikus eltérésekhez. A méhnyálkahártya-minták alap kutatásokban való alkalmazhatóságának esélyét fokozza egy általunk felállított, bevonási és kizárási feltételeken alapuló klinikai kritériumrendszer. Az endometrium és endometriosis mintákban ellentétes mRNS expressziós változások detektálhatók a PACAP női nemi hormonokkal együtt történő adagolása mellett.

A neuropeptid jelátvitelének tanulmányozása bizonyítékkal szolgál arra, hogy Alzheimer-kórban az agytól eltérő szervben is vizsgálhatók a kórképben megfigyelhető szignalizációs eltérések. A PACAP adagolás által létrehozott változásokkal feltártuk, hogy alapvető különbségek lehetnek az ép és a kóros endometrioid szövetek molekuláris folyamatai között. A különböző kór állapotok vizsgálatánál elengedhetetlen a megfelelő modell, illetve szövet kiválasztása.

Tárgyszavak: PACAP, TGF- β , Alzheimer-kór, here, endometriosis, endometrium, szövettenyésztés

I. Bevezetés

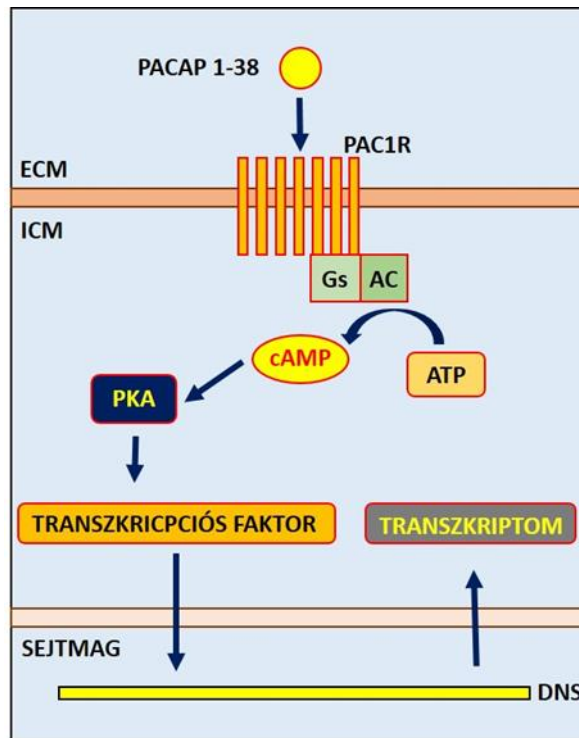
I.1. A PACAP és jelátvittele, élettani és kórélettani hatásai

A PACAP – azaz a hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polypeptid – egy olyan neuropeptid, amelyet először 1989-ben extraháltak birka hypothalamusból. Azóta több ezer publikációban számoltak be a molekulával, receptoraival és hatásaival kapcsolatos felfedezésekről. A PACAP-ot több fajban (köztük a jelen dolgozatban vizsgált emberben és egérben) is vizsgálták, illetve a központi idegrendszeren (KIR) kívül számos perifériás szövetben igazolták a jelenlétét (*Vaudry és mtsai, 2000*). A neuropeptid a VIP- secretin-GHRH-glucagon szupercsalád tagja, a VIP-del szekvenciája 67%-os egyezést mutat. A gerinces fajokban a biológiailag aktív N-terminálisa (27 aminosav) jól konzerválódott az evolúció során. A PACAP prepro-protein formája a DNS egy nagyobb méretű, 167 aminosavat kódoló génjéről expresszálódik. A fehérjéről különböző enzimek hasítják ki a biológiailag aktív izoformákat. Ilyen enzimek a prohormon-konvertázok (PC1,2,4,5,7), a furin, a PACE4 (paired basic amino acid-cleaving enzyme 4) és a PAM (peptidyl glycine α -amidating monooxygenase). A preproforma hasításából így végeredményképp két végtermék képződik: egy aktív izoforma és a PRP (PACAP-related peptide). A biológiailag aktív izoformák közül kettő ismert, amelyeknél a számok a peptid aminosav számát jelzik: a PACAP38 és a PACAP27. Utóbbi a 38 aminosav hosszúságú peptid C-terminálisának hasításából képződik (*Vaudry és mtsai, 2009*). Bár mindkét izoforma megtalálható a szövetekben, a PACAP38 jóval nagyobb mennyiségben képződik (*Lu és mtsai, 2022*). A humán prepro-PACAP gén (ADCYAP1 gén) a 18-as kromoszóma p11 régiójában detektálható. A gén expresszióját több molekula és transzkripciós faktor fokozhatja, köztük érdekességképpen említést érdemel a dexametazon, a progeszteron és maga a PACAP is. A gén öt exonból áll, a PRP-t a 4; a PACAP-ot az 5. kódolja (*Vaudry és mtsai, 2009*).

A neuropeptidet kötő receptorok közül hármat azonosítottak. Ezek a PAC1, a VPAC1 és a VPAC2 receptorok. A PACAP és VIP szekvenciális hasonlósága miatt mindhárom receptor képes a két peptid kötésére, azonban a PAC1R a PACAP-ot jóval nagyobb affinitással, specifikusan köti, míg a másik kettő receptor esetén a kötésaffinitás azonos (*Vaudry és mtsai, 2009*). A humán szövetekben a PAC1R a 7-es kromoszóma p15 régiójában, a VPAC1R a 3-as kromoszóma p22 régiójában, míg a VPAC2R szintén a 7-es kromoszóma q36.3 régiójában lokalizálható (*Vaudry és mtsai, 2000*). A PACAP-kötő receptorok döntő többségben transzmembrán G_s -proteinekhez kapcsolódnak, ritkábban azonban $G_{i/o}$ és $G_{q/11}$ proteinekhez is. Utóbbi jelentősége, hogy a foszfolipáz-C (PLC) aktiválással serkentheti a foszfatidil-inozitol-bifoszfátból való diacilglicerol (DAG) és inozitol-trifoszfát (IP_3) intracelluláris felszabadulását.

A DAG által így aktiválódhat a foszfokináz C (PKC) jelátviteli út, míg az IP₃ által Ca²⁺ szabadulhat fel az endoplazmatikus retikulumból (*Lu és mtsai, 2022*). A PACAP (G_s-protein kapcsolt) receptorhoz való kötődése hatására elinduló kanonikus jelátviteli kaszkád a cAMP közvetítette szignalizáció. Az ily módon aktiválódó protein kináz A (PKA) több transzkripciófaktor (pl.: CREB) foszforilálásával, és így azok magi transzlokációjával számos gén expresszióját eredményezheti (*1. ábra*). A PACAP fokozhatja más receptorok (pl.: NMDA-receptor) és más jelátviteli utak aktivitását is (pl.: MAPK, köztük az ERK aktivitását). Továbbá, a neuropeptid számos szignalizációs utat befolyásol crosstalk mechanizmus segítségével. Ilyenek a BMP, a Notch, a Hedgehog és a TGFβ-jelátviteli utak (*Juhász és mtsai, 2015*). Érdekességképpen megemlítendő, hogy a PACAP aktiválhat nem G-protein kapcsolt folyamatokat is, ilyen az ADP-riboziláló faktor (ARF) általi foszfolipáz-D (PLD) aktiváció (*Lu és mtsai, 2022*).

A PACAP és receptorainak expressziójáról, valamint a neuropeptid élettani és kórélettani hatásairól főként sejtvonalak tanulmányozásából és állatkísérletekből (dominálon egereken és patkányokon végzett kísérletekből) nyerhetők információk, azonban humán szövetekben megfigyelt funkciójáról is születtek publikációk. Ennek ellenére, az emberi szervezetben való expressziójáról és szerepéről kevés ismerettel rendelkezünk, tekintve, hogy a humán szövetek kísérletes tanulmányozása sok esetben komoly etikai akadályokba ütközik. A központi idegrendszerben a PACAP legnagyobb mennyiségben a hypothalamusban, míg a perifériás szövetek közül a legnagyobb mennyiségben a herében expresszálódik (*Hirabayashi és mtsai, 2018; Reglődi és mtsai, 2018 a*). A neuropeptid kétféleképpen lehet jelen és hathat a sejtekre: vagy maga az agyterület, illetve a perifériás szövet expresszálja, vagy egy másik agyterületet afferentáló idegsejt, illetve az adott szövetet ellátó ideg neuronvégződéseiből szabadul fel. A PACAP-kötő receptorok esetében az adott agyterület, illetve perifériás szövet expresszálhatja mindhárom féle receptort, de az is előfordul, hogy csak kettőt vagy egyet. Vaudry és munkatársai PACAP kutatásban etalonnak számító 2009-es publikációjában részletesen látható, melyek azok az agyterületek és perifériás szövetek, ahol a PACAP és receptorai expresszálódnak (*Vaudry és mtsai, 2009*).



1. ábra

A PACAP kanonikus jelátviteli útvonala: a neuropeptid G-protein kapcsolt receptorhoz való kötődése hatására aktiválódik a PKA közvetítette szignalizáció, amely számos gén transzkripcióját eredményezheti. (Saját készítésű ábra).

Több publikáció összevetéséből megállapítható, hogy a neuropeptid elsősorban idegsejtek, simaizmok, valamint endokrin és exokrin mirigyek működésében bír jelentőséggel, azonban egyéb hámeredetű szövetek (pl.: gonádok és vese), és egyéb mesenchymális eredetű szövetek (pl.: porc-, és csontszövet) élettani folyamataira is hatással van (Tóth és mtsai, 2020). A PACAP fiziológias szerepére a szövetekhez adagolt neuropeptid hatásaiból, a különböző kórfolyamatokban megfigyelt jelátviteli változásaiból, valamint a hiányából (PACAP-KO és PACAP-receptor KO modellek) lehet következtetni (Vaudry és mtsai, 2009). A PACAP szövetekben betöltött általános jelentősége a sejtvédelem (cytoprotectio), azaz a szöveteket károsító folyamatok ellenében hat (Ohtaki és mtsai, 2010). Ezt az antiapoptotikus, anti-inflammatorikus és antioxidáns tulajdonságának köszönheti. A különböző publikációk tanulmányozásából feltételezhető, hogy a PACAP szerepe azokban az élettani és kóros folyamatokban jelentős, ahol a fokozottabb anyagcsere miatt megnövekednek a szöveteket érő stresszhatások (pl.: fokozottabb oxidatív stressz). Fontos megemlíteni továbbá, hogy az életkor előrehaladtával csökken a neuropeptid mennyisége a szervezetben, így az öregedés folyamataiban a PACAP is részt vesz (Reglődi és mtsai, 2018 b).

Tekintettel arra, hogy a több ezer PACAP kutatást felölelő publikáció ismeretanyaga meghaladja e dolgozat kereteit, a következőkben a neuropeptid különböző szövetekben betöltött

fontosabb szerepe kerül említésre, a teljesség igénye nélkül. A PACAP a GnRH-val szinergista módon elősegíti a luteinizáló hormon (LH) és a follikulus stimuláló hormon (FSH) felszabadulását, így közvetetten is hatással van a fertilitás folyamatainak szabályozására. Szintén az agyalapi mirigyben fokozza a prolaktin (PRL) gén expresszióját, illetve a hormon felszabadulását is, így részt vesz a tejlérválasztás mechanizmusában (*Oride és mtsai, 2018*). Tekintve, hogy a neuropeptid igen nagy mennyiségben expresszálódik a limbikus rendszer (pl.: amygdala, hippocampus, prefrontális kéreg, stb.) területein, feltételezik, illetve több állatkísérlet eredményéből is arra következtetnek, hogy a PACAP-nak szerepe van bizonyos érzelmi reakciók, stresszre adott válaszreakciók, a tanulás és a memória szabályozásában is (*Boucher és mtsai, 2021*). A cirkadián ritmicitás mechanizmusainak befolyásolásában is igazolták a neuropeptid jelentőségét. A PACAP expressziója a KIR-ben igen fokozott az embrionális fejlődés során is, így szerepe az idegsejtek differenciálódása során esszenciális (*Vaudry és mtsai, 2009*). Ismert, hogy a neuropeptid jelenléte bizonyos határértékig kivédi az ischaemiás és traumás idegrendszeri sérülések káros hatásait, valamint számos neurodegeneratív kórkép (pl.: Alzheimer-kór, Parkinson-kór, Huntington-kór és amyotropiás lateralsclerosis) progresszióját csökkenti, illetve ezen betegségek tüneteit mérsékeli (*Reglődi és mtsai, 2018 c*). Simaizom relaxáló hatása miatt azonban migrénben rohamot provokálhat, így fokozva annak frekvenciáját (*Lu és mtsai, 2022*). A PACAP érzékszervekben bizonyított jelentőségét adja, hogy védelmezi a szaruhártyát (cornea) a hyperkeratinizációt okozó hatásoktól, illetve hasonlóan protektív módon hat az ideghártyát (retina) érő károsító hatásokkal szemben (pl.: glaucoma, diabetogén és hypertoniás retinopathiák) (*Patkó és mtsai, 2022*). Hasonló módon védi a belső fület a károsító ototoxikus hatásokkal szemben (*Tamás és mtsai, 2012*).

A PACAP elősegíti a külső elválasztású mirigyek szekrétermelődését, a könny- és nyálmirigyek nyáltermelését is. Így protektív szereppel bír a szem- és szájszárazságot okozó kórképekkel szemben. A PACAP védelmező szerepe megnyilvánul a cardiorespiratoricus kórképekben (pl.: szívelégtelenség, simaizom relaxáns hatása miatt enyhítheti az allergiás asthma tüneteit), illetve a szívet, a tüdőt és a veséket érő oxidatív és toxikus hatásokkal (pl.: cigaretta, kemoterápiás szerek cytotoxicitása) szemben is. Hasonló protektív szereppel bír a májat érő károsító ágensekkel szemben (*Tóth és mtsai, 2020*). A PACAP szinte az egész gyomor-bélhuzamban (GIT) – köztük az enterális idegrendszerben is – kimutatható. Éppen ezért nem meglepő, hogy befolyásolja szinte a teljes bélhuzal motilitását, nyákszekrécióját, véráramlását és az epitheliális sejtek proliferációját is. A GIT-en belül kiemelendő a hasnyálmirigyben (pancreas) betöltött szerepe. A neuropeptid az említett zsigerben fokozza

mind az exocrin, mint az endocrin mirigysejtek szekrécióját, befolyásolja a hasnyál termelődését, valamint a glucagon és az inzulin felszabadulását (*Karpiesiuk és mtsai, 2021*). A hypophysis és a pancreas említett hormonjai mellett, a PACAP a pajzsmirigyben fokozza a thyroid hormonok felszabadulását is (*Vaudry és mtsai, 2000*).

A neuropeptid jelátvitelét a vázrendszer működésében is vizsgáltuk. A PACAP-nak szerepe van a csontok, fogak és porcszövetek fejlődése során, hiányában szignifikáns változások figyelhetők meg e mesenchymális eredetű szövetek felépítésében (*Szentlélek és mtsai, 2019*). Ezen felül, a peptid védi a porcszövetet az oxidatív és kóros mechanikai erőhatások ellen, valamint a csontgyógyulásban (callusképződés) is jelentőséggel bír (*Józsa és mtsai, 2021*).

A reproduktív szervek működésében a PACAP szerepe nélkülözhetetlen. A petefészekben (ovarium) részt vesz női reprodukciós ciklus finomhangolt szabályozásában: jelentős a folliculogenesis, illetve a peteérés, az ovulatio, a sárgatest (corpus luteum) hormontermelése, és feltételezések szerint az embrió implantációjában is. A nemi ciklus szabályozásához hozzájárul a korábban említett FSH és LH felszabadulás serkentése is. A PACAP-ot a méh simaizomzatában is kimutatták, valamint a placenta formálódására és folyamataira is hatással van (*Koppán és mtsai, 2022*). A perifériás szövetek közül a neuropeptid a legnagyobb mennyiségben a herében termelődik, a hím gonád kialakulásában és működésében betöltött szerepe megkérdőjelezhetetlen. A PACAP-ot a here szinte minden sejtje típusa expresszálja, még a hímivarsejtek acrosomájában is kimutatható. A neuropeptid esszenciális a hím gonád embrionális és pubertáskori fejlődése során, a Sertoli és Leydig sejtek, valamint az FSH és LH felszabadítása révén közvetlenül és közvetetten is részt vesz a hímivarsejtek képzés (spermatogenezis) folyamataiban, továbbá segít fenntartani a vér-here barrier intakt állapotát (*Vaudry és mtsai, 2009; Li és mtsai; 2003, Reglődi és mtsai, 2018 a*). A PACAP hiánya nem csökkenti kóros mértékben a fertilitást, ugyanakkor sérül a spermatogenezis folyamata, a vér-here gát károsodik, illetve morfológiai anomáliák figyelhetők meg a spermiumok alakjában is (*Reglődi és mtsai, 2018 a*).

Érdekességképpen megemlítenéd, hogy a neuropeptidet különböző szekrétumokban is kimutatták, köztük a magzatvízben és az anyatejben is, habár az említett folyadékokban szerepe még nem tisztázott (*Koppán és mtsai, 2022*). A PACAP előbbieken, nagyvonalakban felsorolt jótékony és protektív hatásán kívül sajnos káros hatásai is vannak. Antiapoptotikus szerepe miatt elősegíti bizonyos tumoros szövetek és daganatos sejtvonalak fennmaradását és proliferációját (*Vaudry és mtsai, 2000*).

A PACAP, mint farmakon, az említett előnyös, protektív hatásai miatt ideális jelöltnek bizonyulna a különböző betegségek kezelésében. Tudni érdemes azonban, hogy a neuropeptid véráramban mért féléletideje igen rövid, 2-10 percben mérhető. Ez a gyors bomlás a véráramban lévő proteáz enzimeknek köszönhető. Az egyik kiemelten fontos proteáz a DPP4, mely mint általánosan jelen lévő proteáz, viszonylag gyorsan eliminálja a neuropeptidet a szövetekből (*Vaudry és mtsai, 2009*). A PACAP lokális adagolása több szövet esetében is problémákat vetne fel. Ráadásul az agyvelőnél (ahol rengeteg előnyös hatása lenne) probléma, hogy a PACAP nem penetrál a vér-agy gáton. A neuropeptid receptorain ható agonisták azonosítására és kifejllesztésére a receptorok strukturális tulajdonságait igyekeznek felderíteni. Ezek az agonisták potenciális hatóanyagok lehetnek a jövőben a különböző kórképek kezelésénél (*Lu és mtsai, 2022*). Jelenleg az egyetlen ígéretesnek bizonyuló készítmény a PACAP 1-38 tartalmú szemcsepp, amelyben a peptid szerkezete stabil marad. Tekintve, hogy a neuropeptid képes áthatolni a szem barrier rétegein, a későbbiekben ez a gyógyszerforma hasznos lehet a corneális kórképek és különböző retinopathiák kezelésében (*Kovács és mtsai, 2021*). Érdekesképpen megemlítendő továbbá, hogy a PACAP potenciális, ígéretes biomarkernek bizonyul a szívelégtelenség progressziója során (*Sárszegi és mtsai, 2019*). Megemlítendő továbbá, hogy a migrén kezelésében fontos előrelépést jelent olyan klinikai II-es fázisban lévő PACAP receptorgátlók alkalmazása, amelyek a neuropeptid hatásainak kialakulását hivatottak ellensúlyozni.

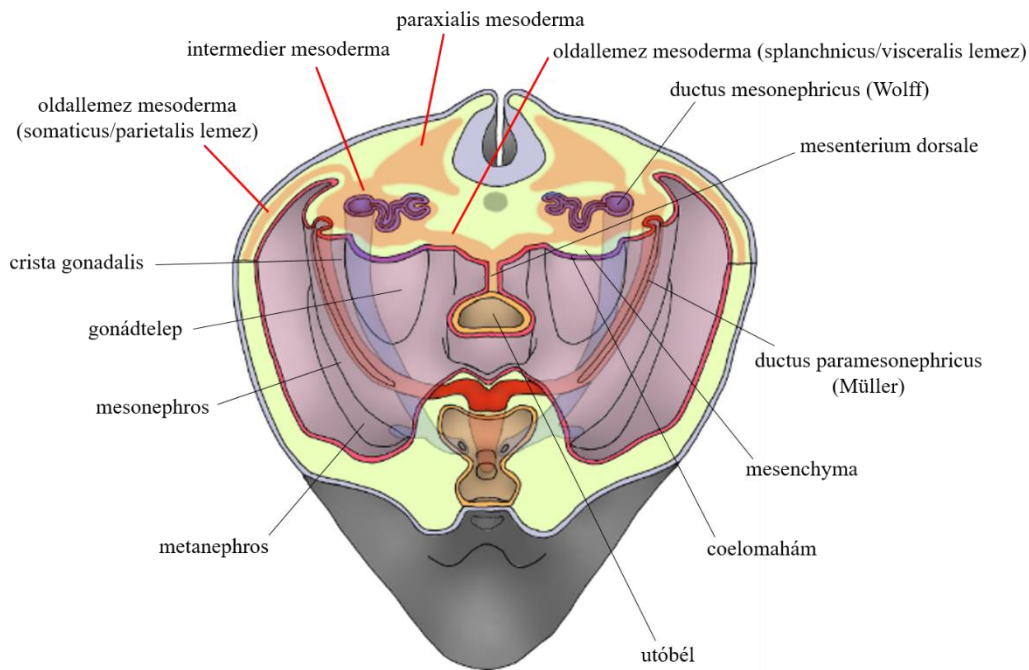
1.2. A kutatás során vizsgált szövetek: a here

A here az állatvilágban a hím egyedek hímivarsejt-képzéséért és androgén hormonok felszabadításáért felelős páros szerv. Előbbi a reprodukciós képességet, utóbbi a szexuális magatartás fenntartását, a spermiumok képzését, illetve bizonyos fajoknál (köztük az embernél) a másodlagos nemi jellegek kialakítását biztosítja. Jelen tudásunk szerint, az emlősök (köztük a jelen dolgozatban vizsgált két faj: az egér és az ember) esetében a hím gonád embrionális fejlődésében, szövettani felépítésében és élettani működésében érdemben nincsenek nagy különbségek (*Mäkelä és mtsai, 2019*).

A here (testis) a legtöbb emlős esetében a herezacskóban (scrotum) foglal helyet. A gonádot egy erős kötőszövetes réteg burkolja: a tunica albuginea. Erről sővények húzódnak (septulum testis) a here állományába, amelyek kisebb rekeszekre (kompartment) osztják azt. A kompartmenteket a herecsatornácskák (tubuli seminiferi) töltik ki, amelyeknek a száma a különböző fajokban eltér egymástól. Ezek a csatornák egy hálózat-szerű struktúra, a rete testis segítségével állnak összeköttetésben a mellékhere (epididymis) csatornájával (ductus

epididymidis). A here érellátása, beidegzése és nyirokelvezetése a szerv hátsó pólusán keresztül valósul meg, ahol az ellátó képletek a here központi részébe lépnek: ez a mediastinum testis. A vascularis képletek a szövetközi állományban (interstitium) haladva táplálják a herecsatonácskákat (*Trainer, 1987*).

A herét kétféle sejttípus építi fel: a csírasejtek és a támogató somaticus sejtek. Előbbihez tartoznak a spermatogoniumok, utóbbihoz a dajkasejtek (Sertoli-sejtek), az interstitialis sejtek (Leydig-sejtek), a peritubularis sejtek (myoid sejtek) és az ellátó képletek sejtjei (pl.: az erek endothel sejtjei) (*Rotgers és mtsai, 2018*). Általános érvényű szabály, hogy a here kifejlődése nem függ a csírasejtektől, azonban a csírasejtek hímivarsejtképzése szorosan függ a somaticus sejtektől (*Mäkelä és mtsai, 2019*). Nem mindegyik sejtféleség fejlődéstani eredete tisztázott teljes mértékben. Az embrió három csíralemeze (ectoderma, mesoderma, endoderma) közül a mesoderma intermedier részéből differenciálódik az ősvese (mesonephros), amely egy hámmal (coelomahám) borított gonadális redőt (crista gonadalis), és az annak vázát alkotó mesenchymába ágyazottan a kiválasztó csatornákat és a ductus mesonephricust (Wolff-cső) alakítja ki (*Satoh, 1991*). Utóbbi mellé fűződik le a felszíni hámból a ductus paramesonephricus (Müller-cső) (*Habiba és mtsai, 2020*). Az XY kromoszómával rendelkező (genetikailag hím) egyedek embrióiban az indifferens állapotban lévő gonádtelep az Y-kromoszóma SRY-régiójának TDF (testis determining factor) génexpresszió hatására köteleződik el a here kialakításának irányába (*Larney, 2014*). A here fejlődése kezdetén a coeloma epithelium membrana basalis integritása megszűnik, így a hámsejtek lefűződnek a gonadális redő mesenchymájába, ahol kötegeket, illetve azok között interstitiumot hoznak létre (*2. ábra*). A coelomahám kétféle fő somaticus sejtpopulációt hoz létre: egy dajkasejt és egy interstitialis progenitor sejtcsoportot. Az előbbiből pre-Sertoli-sejtek, az utóbbiból szteroidogén foetalis Leydig-sejtek és non-szteroidogén felnőtt Leydig-sejtek differenciálódnak.



2. ábra

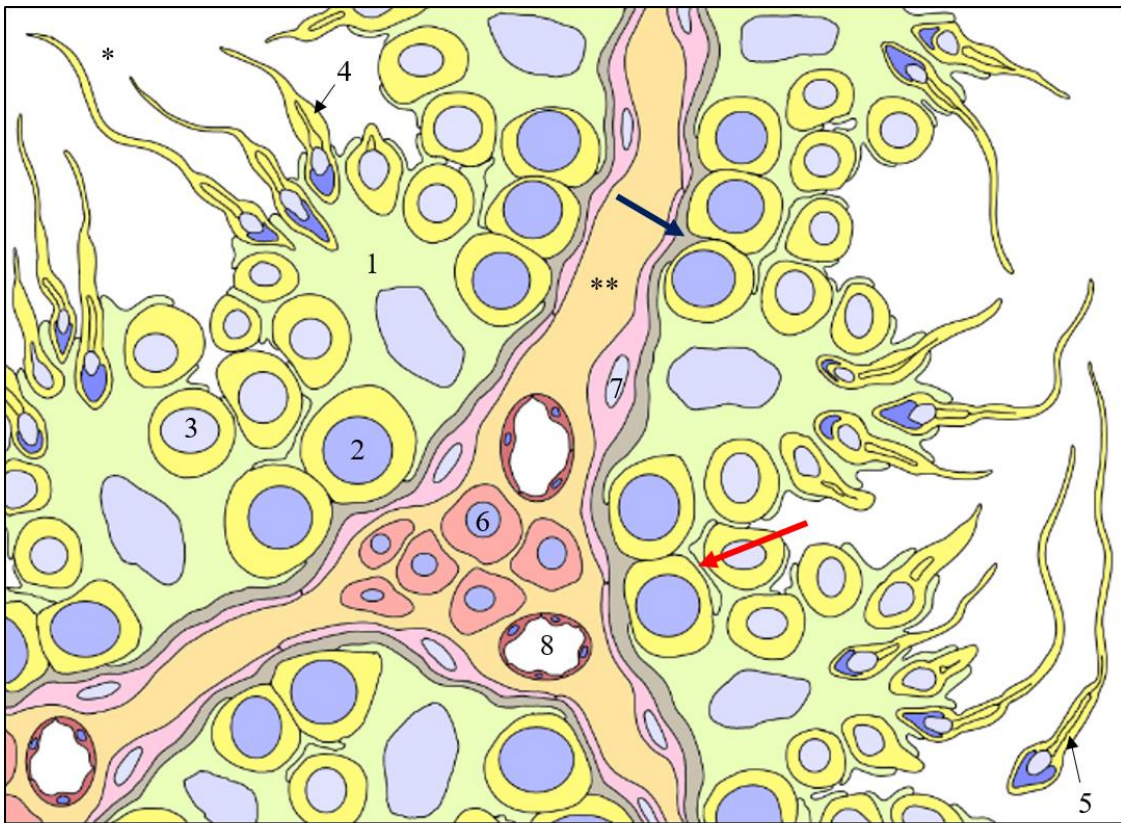
Az embrió caudalis része átmetszve a gonádelepe magasságában. Az embrionális testüreg mellső fala eltávolítva. A here a genitalis redő (crista gonadalis) gonádelepeinek magasságában kezd el fejlődni. Szöveti felépítésében részt vesznek a mesonephros coelomahámjából, ill. mesenchymájából differenciálódó sejtek, valamint a mesenterium dorsale mentén vándorló csírasejtek is. (Saját készítésű ábra).

Foetalis Leydig-sejtek a gonadalis redőbe vándorló mesonephros sejtekből is származhatnak, azonban a migráló sejtekből dominálón vascularis szövetek differenciálódnak az interstitiumban. A SRY-aktiválódás hatására az egyik legfőbb transzkripciós faktor, amelynek expressziója fokozódik, a Sox9. Ennek hatására differenciálódnak a pre-Sertoli sejtek, amelyek anti-Müllerian hormont (AMH) termelnek. Az AMH hatására a Müller-cső visszafejlődik a hímivarú embrióban. A csírasejtek forrása a gonadalis redőn kívül található. Az embriópajzs caudalis részén az epiblastból primordialis csírasejtek differenciálódnak, amelyek az utóbél mentén, a mesenterium dorsalén át a gonadalis redőkbe vándorolnak, ahol a pre-Sertoli sejtekkel együtt kialakítják a herekötegeket. Amint a kötegek létrejönnek a pre-Sertoli sejtek foetalis Sertoli-sejtekké differenciálódnak, majd polarizálódó epitheliális sejtekké, érett Sertoli-sejtekké alakulnak. A primordialis csírasejtek gonocytákká, majd spermatogoniumokká differenciálódnak. A foetalis Leydig-sejtek differenciálódása a Sertoli-sejtektől függ. Ezek a szteroidogén sejtek dominálón androsztendiont termelnek, amelyet a Sertoli-sejtek hidroxiszteroid-17 β -dehidrogenáz-3 enzimaktivitásuknak köszönhetően tesztoszteronná alakítanak. A foetalis Leydig-sejtek LH-független hormontermelése nélkülözhetetlen a Wolff-cső származékainak stabilizálásához és a hím külső nemi szervek kialakításához. A születést

követően a foetalis-Leydig sejtek involutiója következik be, és a felnőtt Leydig-sejtek lesznek felelősek a serdülőkorban az LH-függő szteroidhormon termeléséért. A peritubularis myoid sejtek forrása a mai napig ismeretlen, feltételezhetően a mesonephros által képzett mesenhymából differenciálódnak. A herekötegek kialakulása után a gonád és a coelomahám között egy tömör kötőszövetes réteg, a tunica albuginea alakul ki (Rotgers és mtsai, 2018; Mäkelä és mtsai, 2019). A legtöbb hímivarú emlős magzatban a here a hasüregből a scrotumba száll le. Ennek a folyamatnak két fázisa van: a transabdominalis és az inguinoscrotalis fázis. Előbbinél a gonád a jövőbeni lágyékcsatorna hasüregi nyílásának magasságába vándorol le, míg utóbbinál a lágyékcsatornán át a herezacskóba száll le. Az embernél az inguinocracalis fázis a terhesség 25. és 35. hete között, míg a rágcsálóknál a születés után következik be. A gonád leszállását egy mesenchymalis eredetű, kötőszövetes struktúra, a gubernaculum testis segíti (Mäkelä és mtsai, 2019).

A here szövettani állományát a herecsatornácskák és az interstitium adja (3. ábra). Utóbbi a tubulusok közötti teret tölti ki. A herecsatornácskák vázát az epithelialis sejtek által termelt lamina basalis adja (Trainer, 1987). Ennek a rétegnek a fő fehérjekomponense a IV-es típusú kollagén (Reglödi és mtsai, 2018 a). A lamina basalisra nyugszanak a Sertoli-sejtek és a spermatogonium sejtek (Nishimura és mtsai, 2017). Az egymással szomszédos Sertoli-sejtek közti távolságot azok oldalnyúlványai hidalják át. Ezek között tight junction segítségével szoros kapcsolókomplexusok jönnek létre (Griswold, 1998). Emiatt a herecsatornácskákon belül két kompartment alakul ki: a lamina basalisához közelebbi basalis, illetve a tubulus lumenéhez közelebbi adluminaris rekeszek. Előbbiben a spermatogonia foglal helyet, utóbbiban a spermatocyták és a spermatidák. A Sertoli-sejtek mikroszkópiusan nagyméretű, hengeres alakú sejtek, melyeknek alapja a lamina basalisra nyugszik és a tubulusok lumenéig átérnek a csatornácskák sejtrétegvastagságát. A dajkasejtek cytoplasma alakja hálószerű, tekintve, hogy körbeöleli a csírasejteket és a belőlük differenciálódott sejteket, valamint lipid vacuolumokat és eosinophil granulomokat tartalmazhat. A sejtmag a sejt basalisabb részéhez közelebb található, szabálytalan alakú és vezikuláris kromatinállományt, valamint prominens nucleolust tartalmaz. A spermatogonia kerekded sejtek, amelyek kapcsolatban állnak a lamina basalissal és a basalis kompartmentben foglalnak helyet. A sejtmagjuk denz és homogén kromatinállományt tartalmaz, jellegzetes nucleolusszal. A primer és secunder spermatocyták az adluminaris kompartmentben foglalnak helyet. A primer spermatocyták a differenciálódás előrehaladtával változó morfológiát mutatnak a különböző fejlődési állapotokban (preleptotén, leptotén, zygotén, pachytén és diplotén fázisok). A kromatin szerkezete a finom fonalas és gyöngyfüzérű mintázattól egyre durvábbá válik. A secunder spermatocyták a lumenhez

közelebb található és sejtmagjuk kromatinja finomabb szerkezetű, granuláris jellegű. A spermaticidák magi granulációja durvább, és megfigyelhetők rajtuk a spermiumokra jellemző morfológia kezdetleges vonásai (pl.: az acrosoma megjelenése) (Trainer, 1987). A spermiumok a lumen folyadékterében helyezkednek el és igen jellegzetes morfológiájuk van: feji, nyaki (középdarabi) és fark részeket tartalmaznak. A feji részben egy erősen kondenzálódott mag és egy speciális lysosoma, az acrosoma, míg a középdarabban a mitochondrium helyezkedik el (Dcunha és mtsai, 2022). A here interstitiuma két alegységre osztható: a peritubularis és az intertubularis régiókra. Előbbiben foglalnak helyet a simaizom tulajdonságokkal bíró, összehúzódásra képes peritubularis sejtek, amelyek közös, perisztaltikus összehúzódásai segítik a tubularis folyadékban elhelyezkedő hímivarsejteket a mellékhere csatornája felé terelni. Az intertubularis részben pedig a Leydig-sejtek foglalnak helyet. Ezek a sejtek kerek, vesicularis szerkezetű sejtmagot tartalmaznak, egy vagy két, excentrikusan elhelyezkedő nucleolusszal. Cytoplasmájuk eosinophil és fertilis korban lipidpigmentekben gazdag (Trainer, 1987).



3. ábra

A here szövettani felépítése. A lamina basalison (sötétkék nyíl) nyugvó Sertoli-sejtek (1) kapcsolókompexusai (piros nyíl) két térséget választanak el egymástól: a herecsatornácskák lumenéhez (*) közelebbi adluminalis és az interstitiumhoz (**) közelebbi basalis kompartmentet. Előbbiben a spermatogonia (2), utóbbiban a spermatocyták (3) és a spermaticidák (4) foglalnak helyet. A spermatogenezis végén haploid génállománnyal rendelkező spermiumok (5) jönnek létre. Védelmükre szolgál a vér-here gát, amelyet a Sertoli-sejtek kapcsolókompexusa, a lamina basalis és a peritubularis sejtek (7) hoznak létre. A

Leydig-sejtek (6) az androgén hormonok termeléséért felelnek, melyek a herét ellátó kapillárisok (8) mellett szintén az interstitiumban helyezkednek el. (Saját készítésű ábra).

A reprodukció szempontjából fontos hímivarsejtképzés folyamata a spermatogenezis, melynek során a diploid DNS állományú spermatogoniából haploid spermiumok keletkeznek (Nishimura és mtsai, 2017). A folyamat a fertilis korban a hypothalamus-hypophysis-gonád hormonális tengely befolyása alatt áll. A hypothalamusban pulzatilisen GnRH szabadul fel, melynek hatására az adenohypophysisen FSH és LH szabadul fel. Előbbi dominálón a Sertoli-sejtek receptorain hat, utóbbi főként a Leydig-sejtek receptorain. Az interstitialis sejtek androgén hormonokat (tesztoszteront és androsztendiont) szabadítanak fel. A Sertoli-sejtek és közvetetten a Leydig-sejtek is nélkülözhetetlenek a spermatogonia differenciálódásáért (Kretser és mtsai, 1998). Az interstitialis sejtek által felszabadított tesztoszteron nagy részét a dajkasejtek androgénkötő fehérjéje (ABP: androgen-binding protein) nagy affinitással köti meg (Hagenäs és mtsai, 1975). Így a vérszérumban detektálható androgén hormon mennyisége csupán elhanyagolható töredéke a here állományában detektálhatóénak, ugyanakkor bőségesen elegendő a pubertást követően a másodlagos hím nemi jellegek kialakításához (Jarow és mtsai, 2005). A herecsatornák basalis kompartmentjében kétféle spermatogonia foglal helyet: az A és a B típusú spermatogonia. A testi sejtekével megegyező DNS állományú, diploid A típusú spermatogonia mitotikus osztódások révén kolóniákat hoz létre, majd az utolsó osztódásnál létrejön a B típusú spermatogonia, amely elköteleződik a meiotikus osztódás irányába. A tetraploid primer spermatocyták a B típusú spermatogonia osztódásából jönnek létre. Ezek a meiózis I fázisát követően diploid secunder spermatocytákká osztódnak. A másodlagos sejtek osztódásából pedig, a meiózis II fázisát követően, haploid állományú spermatidák képződnek (Nishimura és mtsai, 2017). A spermatogenezis utolsó szakasza (tulajdonképpen részjelensége) a spermioenezis, amely során a spermatidákból jellegzetes morfológiájú spermiumok alakulnak ki. A spermatogenezis nélkülözhetetlen támogatói a Sertoli-sejtek (Kretser és mtsai, 1998).

A spermatocyták, a spermatidák és a hímivarsejtek DNS állománya lényegében eltér a testi sejtek DNS összetételétől. Emiatt az immunrendszer megtámadná ezeket a sejtfeleségeket. Ennek elkerülése érdekében fejlődött ki a vér-here gát (vagy vér-here barrier), amely lehetetlenné teszi a fehérvérsejtek és számos károsító anyag átjutását a basalis kompartmentből az adluminaris térbe, így megelőzve a reprodukciót fenyegető immunreakció kialakulását (Cheng és mtsai, 2012). A vér-here gát fő komponense a Sertoli-sejtek tight junction-ökből álló kapcsolókomplexusa, ugyanakkor a lamina basalis és a peritubularis sejtek is részt vesznek a barrier alkotásában (Li és mtsai, 2003) (3. ábra). A hímivarsejtek képzéséhez ugyanakkor még

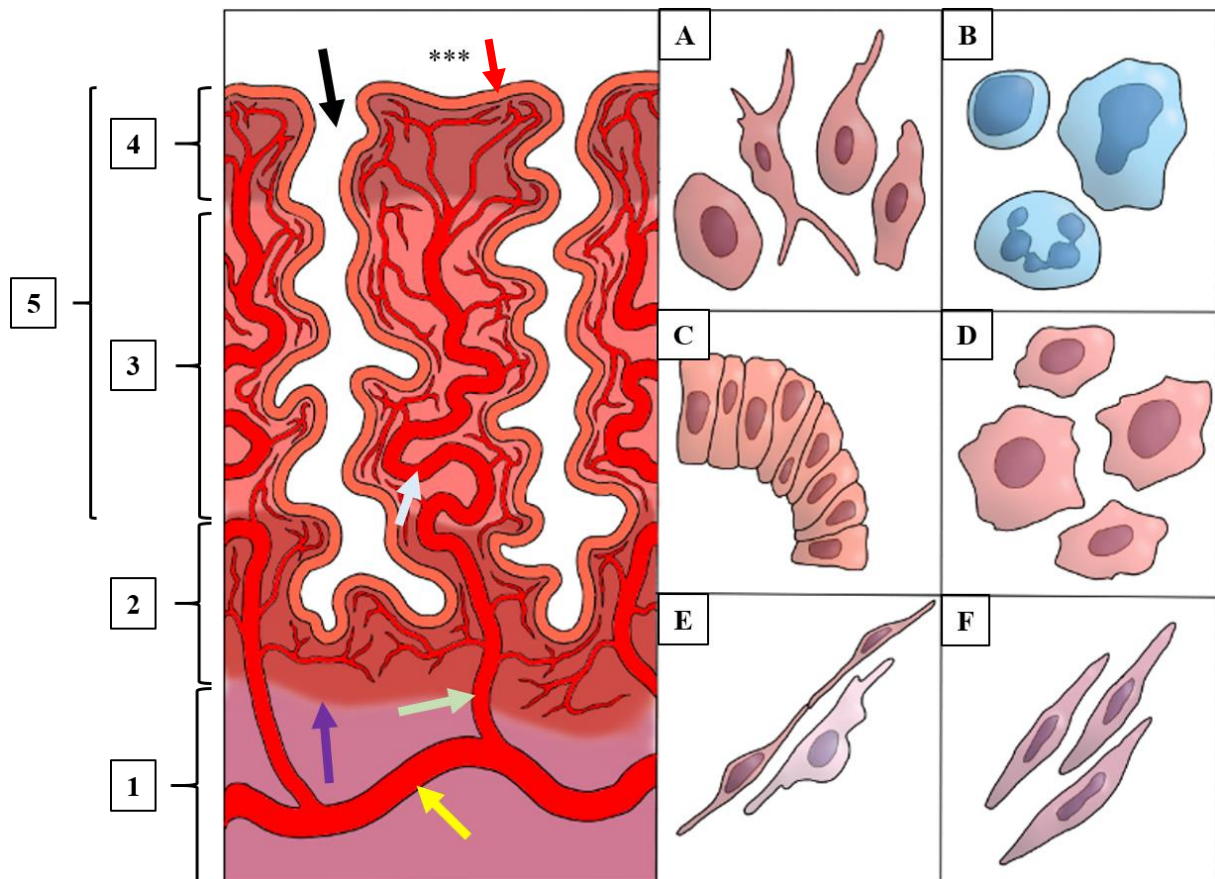
egy fontos dologra szükség van: a test maghőmérsékleténél kb. 2°C-kal alacsonyabb hőmérsékletre. Az evolúció során emiatt fejlődött ki emlősállatoknál a herezacskó, amely a herék hasüreghez közelítésével és távolításával tökéletesen regulálja a hím gonád szöveti hőmérsékletét (*Ivell és mtsai, 2007*). Érdekességképpen megemlítendő, hogy a scrotummal nem rendelkező állatokban (pl.: delfinek) is biztosított a herék hűtése. A cetekben a dorsalis és a farokúszókban lehülő vénás fonatok a hasüregben körbeölelik a hím gonádot ellátó artériás fonatokat, így csökkentve a reproduktív szervbe belépő vér hőmérsékletét (*Pabst és mtsai, 1995*).

1.3. A kutatás során vizsgált szövetek: a humán endometrium

Az endometrium a méh (uterus) nyálkahártyája, amely a zsigeri szerv legbelső rétegét alkotja, bélést biztosítva a női belső nemi szerv üregének (cavum uteri). Az endometrium felel a megtermékenyítést követően az embrió befogadásáért, illetve táplálásáért, közeget teremt annak beágyazódásához, valamint a méhlepény kialakulását követően, vérárama segítségével biztosítja az anyagcserét a magzat és az anya szervezete között (*Strassmann, 1996*).

A méhnyálkahártya a reproduktív életkorban – mikroszkopikus szerkezetét tekintve – egy dinamikusan változó szövet: a menstruációs ciklusban követi a hormonális változásokat. Ennek köszönhetően három fáziskép azonosítható a humán endometrium esetében: menstruációs, proliferációs és szekréciós fázisképek (*Ferenczy és mtsai, 1991*). Utóbbi kettő esetében két szövettani réteg definiálható, amelyek strukturálisan és funkcionálisan is különböznek egymástól: a méh simaizomrétegéhez (myometrium) kapcsolódó bazális réteg (stratum basale), és az ezzel összefüggő, méh lumenéhez közelebb lévő funkcionális réteg (stratum functionale) (*Maclean és mtsai, 2020*). A funkcionális réteg mikroszkóposan további két alrétegből áll: a méh üregéhez közelebbi tömörebb (stratum compactum) és a lazább, szivacsosabbnak imponáló (stratum spongiosum) részekből (*Murata és mtsai, 2022*) (4. ábra). A megtermékenyítés és az embrió beágyazódásának hiányában a női nemi ciklus során a funkcionális réteg degradálódik és vérzés kíséretében leöklődik a megmaradó bazális rétegről, majd kiürül a méh üregéből a hüvelyen (vagina) át a külvilágba (*Maenhoudt és mtsai, 2022*). Ez a folyamat a menstruáció, amely a méhlepényes emlősök között egy egyedülálló folyamat. Néhány állatfaj (pl.: főemlősök) kivételével egyik emlősben sem figyelhető meg (*Emera és mtsai, 2012*). A legtöbb méhlepényes faj endometriuma ugyanis menstruációs ciklus helyett az ún. oestrus ciklus (pro-oestrus, oestrus, metoestrus/dioestrus és anoestrus fázisok) változásait követi (*Sato és mtsai, 2016*). Megtermékenyítés hiányában a megvastagodott endometrium felső rétegei nem válnak le, csupán involutio útján elvékonyodnak (*Ajayi és mtsai, 2020*). A

menstruáció evolúciós előnye nem teljesen tisztázott. Egyes elméletek szerint, a méhnyálkahártya felső rétegeinek lelokésával eltávolíthatók azok a patogének, amelyek fertőzést hozhatnak létre a méh üregében, illetve a hashártyagyulladás (peritonitis) veszélyével fenyegetnek (tekintve, hogy a cavum uterivel kommunikáló petevezetők lumene belenyílik a peritonealis üreg folyadékterébe) (Strassmann, 1996). Továbbá, egy esetlegesen genetikai defektusokkal megfogant és beágyazódott embrió eltávolítása (vetelés) is egyszerűbbé válik az endometrium sérülése nélkül, illetve a szövet megújulására is nagyobb esély nyíthat. Újabb kutatások a menstruáció evolúciós előnyét az embrió beágyazódása nélkül is spontán lezajló decidualizációban látják. Ennél a folyamatnál ugyanis nő az esélye az embrió implantációjának, és a formálódó lepény inváziója is jobban kontrollálható, az anyai szövetek védelme érdekében (Jarrell, 2018).

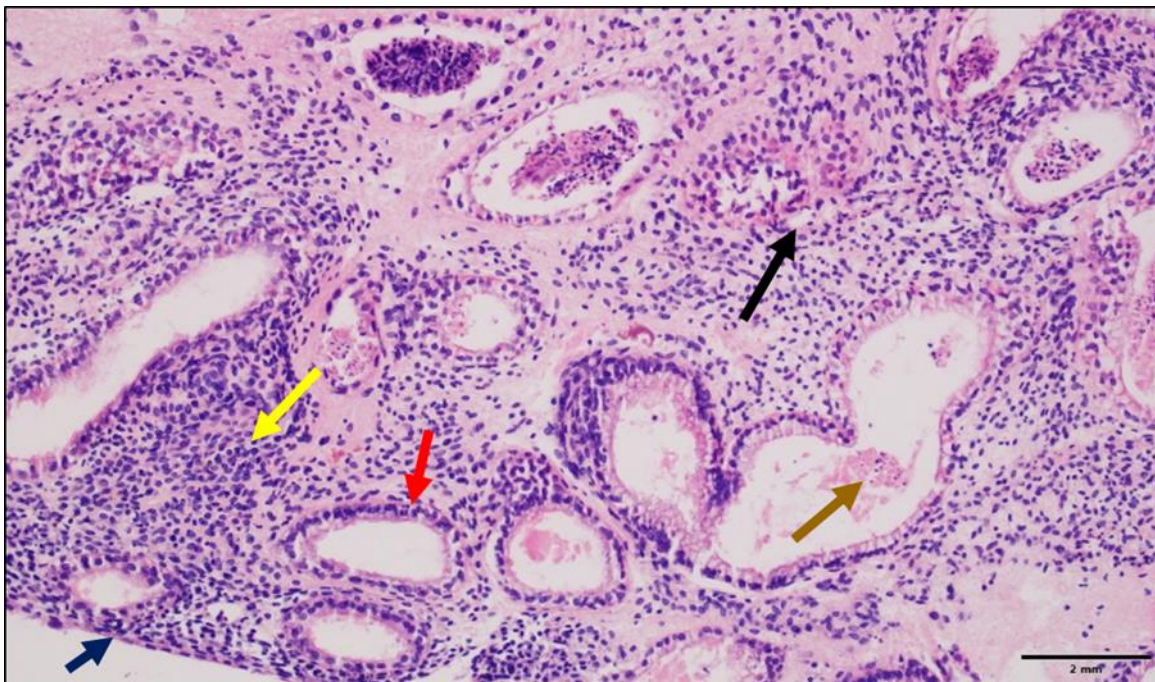


4. ábra

Az endometrium sematikus ábrája. A bal oldalon a szekréciós fázisképző méhnyálkahártya szerkezete látható. Az endometrium és a myometrium (1) között nincs submucosa. A két réteg közvetlen kapcsolódik egymással az endo-myometrialis junctio (lila nyíl) mentén. A stratum basale (2) a menstruációs ciklus során proliferálva kialakítja a stratum functionalét (5), amely mikroszkóposan egy lazább szerkezetű stratum spongiosumra (3) és egy tömörebb szerkezetű stratum compactumra (4) osztható. A kanyargós lefutású mirigyek (fekete nyíl) a méhüregi (***) epithelium (piros nyíl) stromába való lefűződéseinek tekinthetők. Az endometrium érellátását az aa. arcuatae (sárga nyíl) erek aa. radiales (zöld nyíl) ágai

biztosítják, melynek kapillárisai a bazális réteget táplálják. A funkcionális réteg ellátását a spirális erek (halványkék nyíl) és az azokból származó kapilláris fonatok adják. A méhnyálkahártya fő sejtípusain, az epithelialis és mirigyhám (C), illetve a stromalis sejteken (D) kívül számos egyéb sejtfeleség megtalálható, melyek egy komplex szöveti miliót hoznak létre. Ezek az embrionális őssejtek (A), a leukocyták (B), az erek endotheliuma, ill. a pericyták (E), valamint a simaizomsejtek (F). (Saját készítésű ábra).

Első megtekintésre a humán endometrium két fő egységből áll: endometrialis mirigyekből és egy sejtűs, gazdag extracellularis állományt tartalmazó endometrialis stromából. A méh lumene felé az endometriumot egy egyrétegű hámréteg, az endometrialis epithelium borítja, a mirigyek ennek stromába való lefűződéseinek tekinthetők (Critchley és mtsai, 2020) (5. ábra). A méhnyálkahártyát (a belek nyálkahártyájával ellentétben) a méh simaizomzatától nem választja el submucosa, a két réteg egy szabálytalan, hullámos vonal mentén kapcsolódik egymással: ez az endo-myometrialis junctio (Fusi és mtsai, 2006).

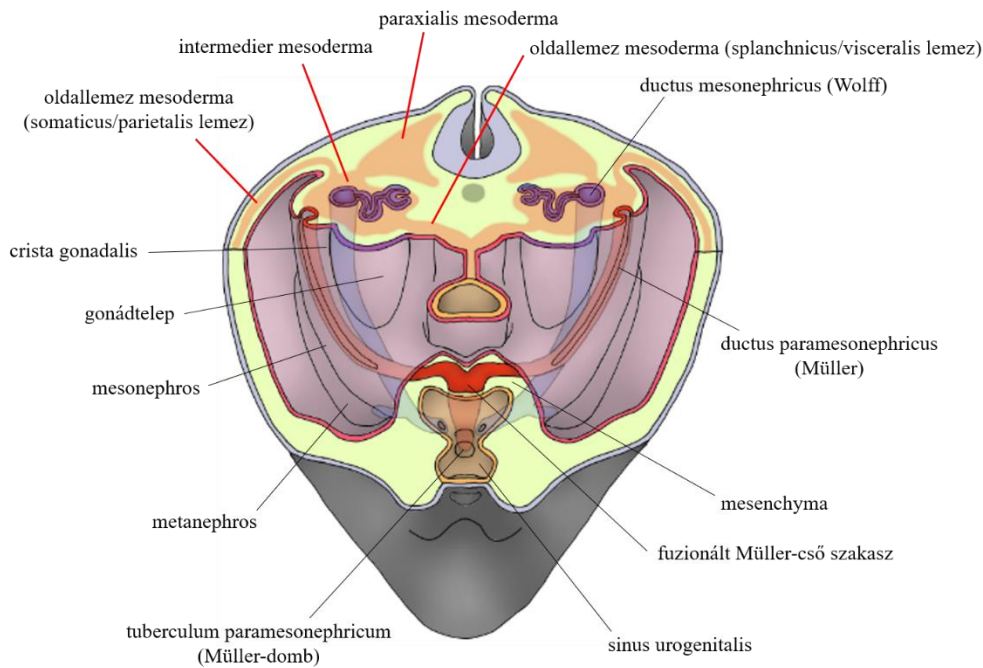


5. ábra

A méhnyálkahártya szövettani metszete (saját minta). H&E festés, 10× nagyítás. Az endometrialis stromába (sárga nyíl) ágyazottan endometrialis mirigyek (piros nyíl) találhatóak, melyek a méhüregbe nyákot (zöldesbarna nyíl) termelnek. A méhnyálkahártya fedőhámja az endometrialis epithelium (kék nyíl). A szövetet a kapillárisok (fekete nyíl) táplálják. (Szövettani metszetről készített saját fotó).

Az endometrium kialakulása az embrionális életkorban veszi kezdetét. A szövet fejlődésének, illetve a fejlődés lépéseinek pontos folyamata a mai napig nem tisztázott teljes mértékben, az információk abortumok, illetve halva született magzatok, újszülöttek boncolásából származnak. Az endometrium fejlődése a páros intermediér mesoderma mesonephros részéből indul. Ebben a magasságban a differenciálódó mesenchyma

kiemelkedést okoz az intraembrionális coelomába (primitív embrionális testüreg), ez a gonadalis redő (crista gonadalis). A redő felszínét coelomahám borítja, a mesenchymába ágyazottan pedig egy vezeték, a ductus mesonephricus (Wolff-cső) húzódik. A coelomahám gonadalis redő mesenchymájába való lefűződéséből egy újabb vezeték, a ductus paramesonephricus (Müller-cső) jön létre. A páros Müller-csövek caudalis részei a fejlődés kb. 10. hetéig fuzionálnak egymással, és egy páratlan csövet hoznak létre. Ennek a páratlan csőnek a cranialis része magasságában kezd el fejlődni a méh. Az endometrium epitheliuma a Müller-cső epitheliumából differenciálódik, amely a 14. fejlődési héten egy, a méh üregét bélelő egyrétegű hámként azonosítható. A közvetlen körötte található intermedier mesodermából származó mesenchymából differenciálódnak az endometrium stromalis sejtjei, míg az ezt körbeölelő mesenchyma kondenzálódik és a myometriumot, valamint a perimetriumot hozza létre (6. ábra).



6. ábra

Az embrió caudalis része átmetszve a gonádtelep magasságában. Az embrionális testüreg mellső fala eltávolítva. A crista gonadalis coeloma lefűződéséből egy új cső jön létre a mesonephrosban: ez a ductus paramesonephricus. A méh fejlődése a páros Müller-cső caudalisan fuzionált szakasz cranialis részén veszi kezdetét. Az endometrium kialakításában a ductus paramesonephricus és a körötte lévő mesenchyma is részt vesz. (Saját készítésű ábra).

A fejlődés 18-21. hetében az epithelium gyors proliferációja miatt a hámréteg többmagsorossá válhat, és megjelennek a kezdetleges, stromába lefűződő, akár elágazó endometrialis mirigyek. Az újszülöttnél a méhtest-méhnyak arány nagyjából 1/3:2/3 mértékű, a méhnyak és nyálkahártyája jobban fejlett, a test ürege kisebb. Felnőttkorra ez az arány megfordul. A méhüri nyálkahártya postnatálisan is folytatja fejlődését. Az újszülöttkorban az endometrium

proliferációs és szekréción fázisképet is mutathat, habár a mirigyek még nem érik át a teljes stroma vastagságát, az endo-myometrialis határtól távolabb vannak. Az első menstruációt (menarche) követően alakul ki az endometrium reproduktív korra jellemző szerkezete (*Habiba és mtsai, 2020*).

A méhnyálkahártyában többféle sejttípus található, amelyek egy komplex szöveti miliót hoznak létre. Az epithelialis hámsejteken, a mirigyhámsejteken és a stromalis sejteken kívül számos őssejt és terminálisan differenciálódott sejt vesz részt az endometrium felépítésében, amelyek között szoros kapcsolat áll fent, köztük élénk kommunikáció zajlik (*Makieva és mtsai, 2018; Evans és mtsai, 2016*). Az őssejtek közül kiemelendők az endometrialis epithelialis progenitor sejtek (eEPs), az endometrialis mesenchymalis őssejtek (eMSCs), az ún. side population sejtek (SP) és a csontvelői eredetű mesenchymalis őssejtek (BMDCs) (*Cousins és mtsai, 2018; Figueira és mtsai, 2011*). Az eEPs-k jelen tudásunk szerint a méhnyálkahártya bazális rétegében található, közel az endo-myometrialis junctióhoz, és a reproduktív korban az endometrium regenerációja során dominálón belőlük differenciálódnak az epithelialis és mirigy hámsejtek. Az eMSCs-k mind a bazális, mind a funkcionális rétegben megtalálható multipotens sejtek, amelyekből a stromalis sejtek, valamint a stromalis sejtekből a szekréción fázis végén a pre-decidualis, beágyazódás esetén a decidualis sejtek képződnek. Az SP-k olyan populációt képeznek, amelyekből főként vascularis endothelialis sejtek differenciálódhatnak, ugyanakkor stromalis, és ritkábban epithelialis sejtek képzésére is képesek (*Cousins és mtsai, 2018*). A BMDCs-k haemopoeticus őssejtek (HSCs) és mesenchymalis őssejtek képzésére is képesek (*Figueira és mtsai, 2011*). Az endometrialis őssejtek csontvelői eredetére bizonyítékul szolgál, hogy férfi donoroktól származó csontvelőtranszplantált nők méhnyálkahártyájában kimutathatók a férfi donortól származó génekészletű endometrialis sejtek (*Maruyama, 2014*).

Az endometriumban – gyulladás (endometritis) nélkül is – fehérvérsejtek (leukocyták) található: neutrophil és eosinophil granulocyták, macrophagok, natural killer (NK) sejtek, hízósejtek, valamint T- és B-lymphocyták. A méhnyálkahártya működésében betöltött pontos szerepük jelenleg még ismeretlen. A granulocyták, NK és hízósejtek a perimenstruális szakban és a menstruáció alatt található meg az endometriumban, szerepük lehet a cytokinek termelésében és a macrophagokkal együtt az elhaló funkcionális réteg szövetfragmentumainak eltávolításában. A macrophagok forrása valószínűleg az erekből a szövetközi térbe migráló monocyták. A proliferációs szaktól a menstruációig számuk egyre növekszik a ciklus során, az endometrialis mirigyek körül csoportokat is képezhetnek. A CD3+ T-lymphocyták a ciklus során alacsony számban végig jelen vannak az endometriumban, mennyiségük a menstruációban növekszik. A bazális rétegben aggregátumokat képeznek, a stromában

elszórta helyezkednek el, illetve intraepithelialisan is megtalálhatók. A CD4+ (helper) és a CD8+ (cytotoxicus) T-lymphocyták aránya az endometriumban (CD4+ : CD8+ = 33% : 66%) a vérben detektálható arány fordítottja. A proliferációs fázisban mérhető aktivitásuk a szekréción fázisban szignifikánsan lecsökken. Ez a növekvő progeszteronhatásnak köszönhető, amelynek szerepe lehet a beágyazódó, idegen génkészlettel rendelkező embrióval szembeni immuntolerancia kialakításában. A B-lymphocyták a teljes ciklus során alacsony számban detektálhatók a méhnyálkahártyában, a perimenstruális fázisban a stromalis sejtek között képeznek tömörüléseket (*Salamonsen és mtsai, 2000*).

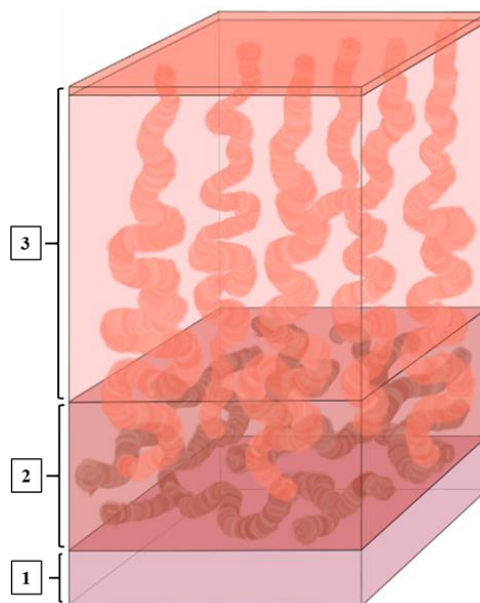
A méh vérellátását az arteria iliaca interna ága, az arteria uterina biztosítja (*Liapis és mtsai, 2020*). A méh verőereinek kanyargós lefutású arteriae arcuatae nevű ágai a myometriumban haladnak, miközben radialis ágakat adnak le az endometrium irányába. Ezek a radialis verőerek biztosítják a méhnyálkahártya vérellátását. Amint az erek átlépik az endomyometrialis junctiót, több kisebb érre oszlanak. A kicsiny bazális artériák ellátják a szövet bazális rétegét, míg a nagyobb spirális arteriolák a funkcionális réteget táplálják. A spirális erek mérete növekszik, míg kanyargóssága fokozódik a ciklus előrehaladtával. A menstruáció végén az újraépülő funkcionális réteg kapillárisai erről az érről képződnek angiogenesisissel. A spirális arteriolák oldalágai ellátják a stromát, illetve periglandularis fonatot képeznek a mirigyek körül, míg végágai az epithelium alatt subepithelialis kapilláris fonatot képeznek. Ezek vérét a vénás rendszer a myometrium irányába vezeti el (*Rogers, 1996*). Az erek endotheliuma körül az endometriumban pericyták és adventitialis sejtek is azonosíthatók, előbbieket a bazális és funkcionális rétegekben is, utóbbiak dominálóan a bazális rétegben (*Tang és mtsai, 2024*). Külön említést érdemel, és élettani szempontból igen fontos, hogy az endomyometrialis junctionál való eredésük magasságában a spirális arteriolák fala simaizmos és elasztikus réteggel is bír, amelyeket a méhüreg felé haladva az endometriumban folyamatosan elveszít (*Chen és mtsai, 2020*).

A reproduktív életkorban az endometrium hormonfüggő szövet: a morfológiája követi a női nemi ciklus hormonális változásait (*Makieva és mtsai, 2018*). A menstruációs ciklust a hypothalamus-hypophysis-gonadalis tengely finomhangolt hormontermelése szabályozza (*Mihm és mtsai, 2011*). Végeredményben, a petefészekben (ovarium) felszabaduló hormonok szabályozzák az endometrium változásait (*Richards, 2018*). Így a menstruációs ciklus fogalma alatt az ovarialis és endometrialis ciklusokat foglalja magába (*ld. 14. ábra*). Az ovarialis ciklus három fő fázisból áll: folliculáris (kb. 11 nap), ovulációs (kb. 5 nap) és luteális (kb. 12 nap) fázisok (*Makieva és mtsai, 2018*). A folliculáris fázis első napjait külön definiálhatjuk korai folliculáris, utolsó napjait pedig késői folliculáris fázisnak (*Rogan és mtsai, 2022*). A

follikuláris fázisban történik a petesejt, illetve a tüsző (folliculus) érése. Az ovulációs fázisban történik meg a petesejt kilökődése (ovulatio) a tüszőből. Ezt követően a folliculus sárgatestté (corpus luteum) alakul át, amely megtermékenyítés és az embrió beágyazódásának hiányában a luteális fázis 11-12. napját követően elsovad és corpus albicanssá alakul át, majd az ovarialis ciklus ismét kezdetét veszi. A ciklus során a petefészkek által termelt két fő hormon az ösztrogén és a progeszteron (P4) (Richards, 2018). Az ösztrogén ösztron (E1), ösztradiol (E2), ösztriol (E3) és ösztetrol (E4) hormonok keveréke, amelyek közül a legnagyobb élettani jelentősége az ösztradiolnak van. Az E2 termelődése a petefészkek aromatáz-enzim aktivitásának köszönhető, amely a gonádban termelődő androgén hormonokat női nemi hormonokká alakítja az androgén szteránvázas molekulák aromatizálásával (Fuentes és mtsai, 2019). Az E2 szérumkoncentrációja a follikuláris fázisban folyamatosan növekszik, majd az ovulációs fázisban eléri a maximumát, ahonnan a luteális fázisban mennyisége folyamatosan csökken. A P4 szérumkoncentrációja az ovulációs fázisban kezdi meg emelkedését, és legnagyobb (állandó) mennyiségben a luteális fázisban termelődik. A méhnyálkahártya az endometrialis ciklusban az E2 és P4 hormonok változásait követi (Richards, 2018).

A menstruációs ciklus első napját az endometrialis ciklus menstruációs vérzés első napjától számítjuk. Egy ciklus átlagosan 28 napos, de 25 és 35 nap közötti rendszeres vérzéseket fiziológiásnak tekintjük (Mihm és mtsai, 2011). Az endometrialis ciklus három fázisból áll: menstruációs, proliferációs és szekréción fázisokból. Mivel a proliferációs fázis elsősorban ösztradiolfüggő, a szekréción fázis pedig progeszteronfüggő, ezért az előbbit elnevezhetjük ösztrogénfázisnak, az utóbbit pedig progeszteronfázisnak is (Critchley és mtsai, 2020). A menstruációs fázis (kb. 5 nap) során az előzőleg megvastagodott endometrium elhalt funkcionális rétege lelékődik és kb. 30-80 ml kevert (75% artériás és 25% vénás) vér kíséretében szövettörmelékek formájában kiürül a méh üregéből (Wulandari és mtsai, 2024). Ezt követően kezdetét veszi a proliferációs fázis (kb. 9 nap). A levedlett, csak bazális réteget tartalmazó méhnyálkahártya vastagsága kb. 1-4 mm (Nalaboff és mtsai, 2001). Dominálón ösztrogénhatásra az őssejtekben gazdag stratum basale sejtszejtjei elkezdenek proliferálni, illetve differenciálódni. A hámfosztott méhnyálkahártyafelszín behámosodik (epithelisatio), az endometrium folyamatosan vastagszik. Utóbbi a stroma és mirigyállomány gyors proliferációjának köszönhető. A stroma nagy mennyiségű szövetközi állományt termel, a spirális arteriolák meghosszabbodnak, illetve fokozódik a szövet kapillarizálódása (neovascularisatio). Az endometrium mirigyei proliferációs fázisképet mutatnak: a stromába ágyazottan keskeny lumenű, egyenes, vagy kissé hullámos lefutású tubuláris mirigyek találhatóak. Ezt követően, dominálón progeszteronhatás miatt elkezdődik a szekréción

átalakulás. Az erek permeabilitása P4 hatásra fokozódik, emiatt a szövet oedémásabbá válik (Ferenczy és mtsai, 1991). Az endometrium összvastagsága eléri a 7-16 millimétert (Nalaboff és mtsai, 2001). A spirális arteriolák kanyargóssága fokozódik. Az endometrialis mirigyek szekréciós fázisképet mutatnak: a stromába ágyazottan megvastagodnak, dugóhúzó-szerűen tekerednek, lumenük kitágul, és fokozott mennyiségű, tápanyagokban (pl. glikogén) gazdag nyákot termelnek (Ferenczy és mtsai, 1991). Ez a váladék a méh üregébe jut, amelynek fontos szerepe van a méhüregbe jutó embrió tápanyagokkal való ellátásában (Alves és mtsai, 2023). A szekréciós fázis (kb. 14 nap) utolsó napjaiban a stromasejtek decidualizációja kezdetét veszi, pre-deciduasejtek képződnek (Evans és mtsai, 2016). Az endometrium mirigyszerkezetének morfológiája legjobban a szekréciós fázisban érhető meg. Korábbi, hosszú éveken át elfogadott leírások szerint, a mirigyek a bazális rétegben kettéoszlanak, és végkamrájuk (a vékonybelek mirigyeihez hasonlóan) cryptaszerűen, vakon végződik. Ez a szerkezet (jelen tudásunk szerint) teljesen igaz az egerek (és valószínűleg az oestrus ciklusos emlős fajok) esetén (Yamaguchi és mtsai, 2021. júl.). Újabb kutatások azonban feltárták, hogy a humán (és a valószínűleg a menstruáló fajok) endometrium szerkezete teljesen eltér ettől. A stratum basáleban ugyanis vakon végződő mirigyvégkamrák helyett rizómához (bizonyos növények egymással kapcsolódó gyökérhajtásai) hasonló, egymással összefüggésben levő, hálózatos szerkezetű mirigyrendszer található (7. ábra).

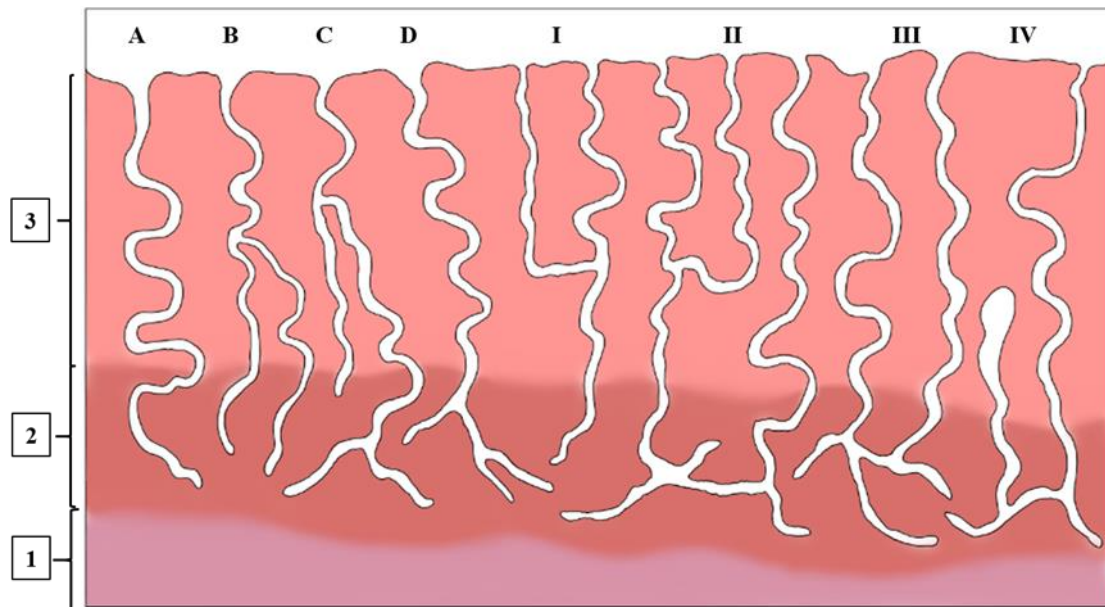


7. ábra

Yamaguchi és mtsai (2021) publikációja nyomán készített ábra, amely a humán endometrium mirigyeinek térbeli szerkezetét mutatja be. A myometriumon (1) nyugvó stratum basáleban (2) egymással összefüggő, „rizóma-szerű” járatrendszert létrehozó mirigyek találhatók. A menstruációs ciklusban a proliferáció során e hálózatos struktúrából képződnek a stratum

functionale (3) méhüreg felé húzódo mirigyei. A bazális réteg járatrendszere által több endometrialis mirigy is kapcsolatban állhat egymással. (Saját készítésű ábra).

Ahogy a rizomás növények estében is, feltételezik, hogy az endometrium bazális rétege jóval ellenállóbbá válik a szerkezetnek köszönhetően a sérülésekkel szemben. A stratum functionáléban elhelyezkedő mirigyek sokféle morfológiát vehetnek fel. Vannak olyan mirigyek, amelyek nem kapcsolódnak a rizómával és nincsenek elágazásaik. Vannak, amelyek a rizómából indulnak ki, de lumenük nem torkollik a méh üregébe, ezek az okklúziós mirigyek (occluded glands). Vannak, amelyek elágazásai a funkcionális rétegben, vagy mindkét rétegben elhelyezkednek. Vannak olyanok is, amelyek a korábban ismert szerkezetet veszik fel (kettéágazó mirigy, vakon végződő cryptákkal). A legtöbb mirigy azonban kapcsolódik a rizómával, és így elágazásaikat a rizóma útján megosztják egymással (Yamaguchi és mtsai, 2021. márc.) (8. ábra).



8. ábra

Yamaguchi és mtsai (2021) publikációja nyomán készített ábra, amely az endometrialis mirigyek elágazásait és más mirigyekkel való kapcsolatait sematikus módon illusztrálja. Az elágazást nem mutató (32%) struktúrákon (A) kívül, a legtöbb mirigy (68%) tartalmaz elágazásokat. Lokalizáció szerint utóbbiak 10%-a a funkcionális rétegben (B), 75%-a a bazális rétegben (D) és 15%-a mindkét rétegben elágazik (C). Két különböző mirigy közti kapcsolat legtöbb esetben (81%) a stratum basaléban (III), 14%-ban a stratum functionáléban (I), míg 5%-ban mindkét rétegben (II) fennállhat. Az endometriumban lehetnek olyan vakon végződő mirigyek is (IV), amelyek nem érik el a méhüreget. (Saját készítésű ábra).

A szekréciós fázis végén, amennyiben a megtermékenyítés és az embrió beágyazódása nem történik meg, a trophoblast sejtek hiányában nem termelődik β -hCG, amely fenntartaná a petefészkek sárgatestjét. Így a corpus luteum élettartama véget ér, a P4 szintje lecsökken (Devoto

és *mtsai, 2009*). A mai napig nem teljesen tisztázott, mik a pontos folyamatok, amelyek a funkcionális réteg leválásához vezetnek, de annyi biztos, hogy a folyamat a progeszteronszint hirtelen lecsökkenésének köszönhető. A hormon hiányában valószínűleg csökken a spirális arteriolák permeabilitása, illetve cytokinek szabadulnak fel, amely végeredményképpen a funkcionális réteg ischaemiájához, majd elhalásához vezet. Így elkezdődik a menstruáció, és újraindul a menstruációs ciklus (*Critchley és mtsai, 2006*).

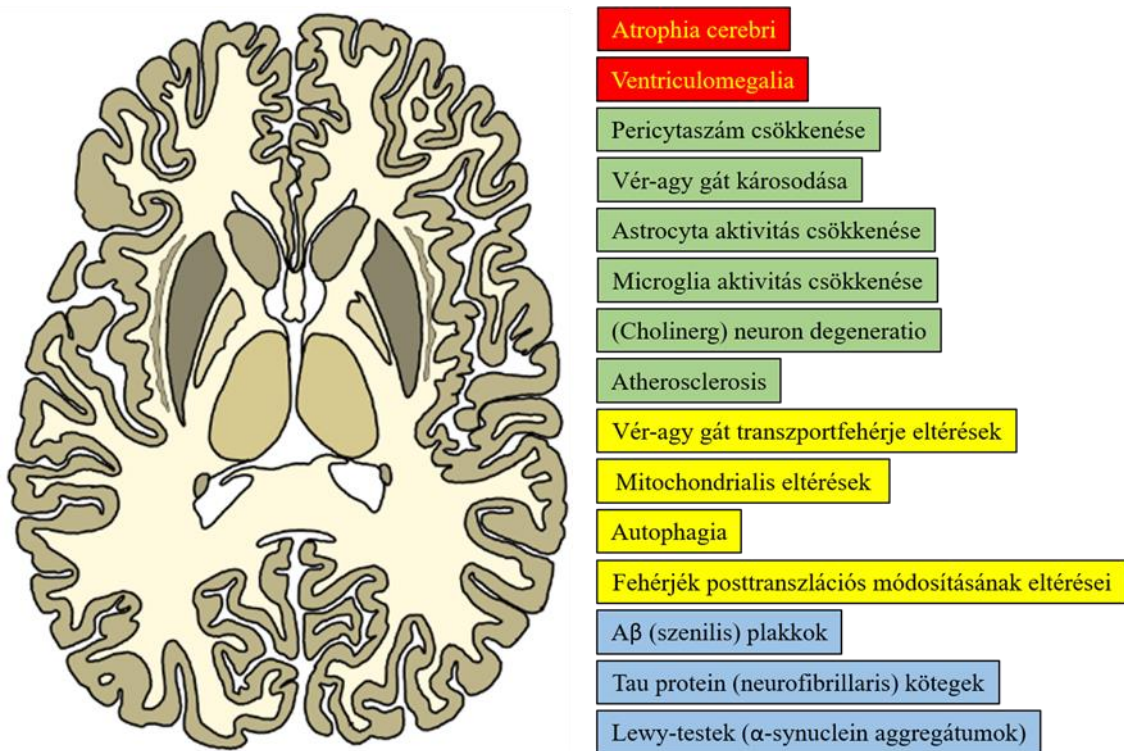
Egy egészséges nő reprodukív életszakasza során nagyjából 400 alkalommal menstruál. Az első menstruációt menarchénak nevezzük (*Jain és mtsai, 2022*). A reprodukív életszakasz végén, az utolsó menset követően, amennyiben 12 hónapon belül nincs vérzés, megjelölhetjük a menopausa időpontját (*Takahashi és mtsai, 2015*). A premenopausalis-perimenopausalis szakban a mensetek rendszeressége felborulhat, az endometrium szövettani morfológiája eltérhet a korábban leírtaktól. Példaként említhető a rendezetlen proliferatív endometrium, amikor a stromába ágyazottan proliferációs és szekréciós fázisképet is mutató mirigyek találhatók egymás mellett (*McCluggage, 2006*). A menopausát követően az endometrium sokféle morfológiát felvehet. A legjellemzőbb szöveti kép a sorvadt (atrophiás) méhnyálkahártya. Az endometrium elvékonyodott, a mirigyek és a stroma nem mutat mitotikus aktivitást. A mirigyek száma lecsökkent, olykor lumenük cysticusan tágult lehet. A stroma gyakran tartalmaz heges (fibroticus) részeket, amely az erek lumenét is szűkíti (*Ferenczy és mtsai, 1991*).

1.4. A kutatás során vizsgált betegségek: az Alzheimer-kór

Az Alzheimer-kór a leggyakoribb a kognitív zavarokat és demenciát okozó betegségek közül az időskori (65 év feletti) populációban (*Abbas és mtsai, 2022*). Egy lassan progrediáló neurodegeneratív kórállapot, amelyet a különféle kóros szerkezetű, illetve kórosan halmozódó fehérjék jelenléte és az idegsejtkárosodás jellemez, elsősorban az agyvelőben (*Breijyeh és mtsai, 2020*). A betegség a nyugdíjkorú felnőttek 3-4%-át érintheti, és a prevalencia az életkor előrehaladtával folyamatosan növekszik (*Abbas és mtsai, 2022*). A kórállapot az érintett betegekre és hozzátartozóikra gyakorolt hatásai mellett komoly társadalmi, gazdasági és egészségügyi terhelést okoz napjainkban is (*Breijyeh és mtsai, 2020*).

A halál utáni (postmortem) vizsgálatok makroszkóposan, mikroszkóposan és molekuláris vizsgálatokkal igazolható elváltozásokat is kimutattak az Alzheimer-kór patogenezisének hátterében. Boncolások során megfigyelték az agyvelő sorvadását (atrophia), amely sok agyterület mellett elsősorban az agykérget (cortex cerebri), a hippocampust, az amygdalát és a limbikus rendszer elemeit érinti (*Breijyeh és mtsai, 2020*). Az atrophia miatt az

agy-gerincvelői folyadékterek (agykamrák és subarachnoidális terek) kitágulnak. Mikroszkópos vizsgálattal kimutathatók rendellenesen jelenlévő fehérjék: az extracelluláris térben kóros mennyiségben felhalmozódott szenilis plakkok, vagy más néven béta-amyloid (A β) plakkok, továbbá az intracellulárisan felhalmozódó neurofibrillaris (tau protein) kötegek és az α -synuclein aggregátumokból felépülő Lewy-testek is. Kórszövettani vizsgálattal megfigyelhetők neurovascularis eltérések úgy, mint a pericyták számának csökkenése és a vér-agy gát sérülése, az astrocyták és a microglia sejtek aktivitásának növekedése, valamint a synapsisok és az idegsejtek (főként a cholinerg neuronok) számának csökkenése. Molekuláris vizsgálatokkal igazolták továbbá a vér-agy gát transzporter fehérjéinek, illetve a sejtek mitochondrialis működésének változásait, az autophagia jelenségét, valamint a különböző fehérjék kóros poszttranszlációs módosításait (pl.: tau protein hyperfoszforiláció) (Nelson, 2022). Mindent összevetve, a leírt elváltozások állandó gyulladós folyamatokat tartanak fenn, amelyek toxicitást és oxidatív stresszhatást eredményeznek a központi idegrendszerben, és ez a neuronok degenerációjához, illetve elhalásához vezet (Swerdlow, 2007) (9. ábra).



9. ábra

Nelson (2022) publikációja nyomán készített ábra. Az Alzheimer-kórban az ép agyállományhoz képest (bal oldalon látható ábrafélfél) különböző folyamatok figyelhetők meg, ill. alakítják ki a progresszív gyulladást és neuronelhalást, amelyek a tüneteket okozhatják. Ezek a makroszkóposan megfigyelhető elváltozások (piros keretek), a neurovascularis egység épségének felborulása (zöld keretek), a subcellularis kórfolyamatok kialakulása (sárga keretek) és a betegség során felhalmozódó kóros fehérjék megjelenése (kék keretek). (Saját készítésű ábra).

Az Alzheimer-kór oka a mai napig ismeretlen. Az évek során különböző elméletek születtek a betegség kialakulására. A cholinerg hipotézis az acetilkolin (ACh) termelődés, felszabadulás és visszavétel zavarával, valamint a cholinerg neuronok elhalásával magyarázza a kórkép kialakulását. Az ACh számos agyi működésben szerepet kap, ilyen például a memória, a figyelem fenntartása, a tanulás és a sensoros működések fenntartása. Hosszú éveken át elfogadott elmélet volt az amyloid hipotézis (*Breijyeh és mtsai, 2020*). Az amyloid prekursor protein (APP) egy membránfehérje, amely számos szövetben kimutatható, köztük jelentős szerepe van a neuronszinapszisok működésében. Az APP részt vesz a szinapszisok kialakítása és javítása szabályozásában, illetve az anterográd neuronális transzportban. A β - és γ -szekretáz enzimek hatására az APP különböző aminosav hosszúságú peptidekre bomlik (*Chen és mtsai, 2017*). Egészséges szövetekben az amyloidgenézis kontrollált folyamat, $A\beta$ a korosodással is képződik az agyban, míg Alzheimer-kórban az $A\beta$ kóros mennyiségben termelődik és aggregátumokat képez (*Aczél és mtsai, 2022*). Az amyloid kaszkád elmélet szerint ez hozza létre a fentebb említett változásokat. Újabb elméletek a mitochondriális diszfunkciót tartják felelősnek a betegség kialakulásáért (mitochondriális kaszkád elmélet) (*Swerdlow, 2007*).

Az Alzheimer-kórnak lehet örökletes (familiáris) és sporadikus formája. Előbbire az autoszomális domináns öröklődésment jellemző, a tünetek 65 évnél fiatalabb korban jelentkeznek (EOAD-Early onset Alzheimer's disease), és három fő gén mutációja okozhatja. Ezek a Presenilin-1 (PSEN1), a Presenilin-2 (PSEN2) és az Amyloid Precursor Protein (APP) gének. A sporadikus formák alkotják az esetek nagy részét, a tünetek 65 évnél idősebb korban jelentkeznek (LOAD-Late onset Alzheimer's disease), és számos rizikófaktort azonosítottak, amelyek növelik a betegség kialakulásának kockázatát (*Andrade-Guerrero és mtsai, 2023*). Sokféle gén mutációját igazolták, amelyek hajlamosíthatnak a kórkép kialakulására, köztük gyakori az Apolipoprotein-E (APOE) bizonyos alléljeinek, illetve az ösztrogén receptor gén (ESR) mutációja. Utóbbi magyarázattal szolgálhat arra, hogy a betegség miért gyakoribb a nők, mint a férfiak körében (*Breijyeh és mtsai, 2020*). A nemek közötti érintettség különbségeit magyarázhatja az is, hogy a luteinizáló hormon (LH) emelkedett mennyisége az amyloid-kaszkád mechanizmusait elősegítheti. Ráadásul a hippocampusban arányában sok LH receptor expresszálódik. Fertilis korban a női nemi hormonok visszaszorítják a termelődő LH mennyiségét, míg az a menopausában az E2 és a P4 csökkenés hatására relatíve emelkedik. Férfiakban az LH-termelődést visszaszorító tesztoszteron mennyisége az életkor előrehaladtával lassabban, és folyamatosan csökken (*Webber és mtsai, 2007*). Az Alzheimer-kutatásban egyre nagyobb figyelmet kap a gyomor-bélrendszer mikrobiomjának kutatása, tekintve, hogy a mikroflóra összetételének felborulása hatással lehet a mikrobiom-bél-

agytengely egyensúlyára (Marizzoni és mtsai, 2023). A betegség rizikóját növelhetik különböző fertőzések, köztük herpeszvírusok, mint a Herpes simplex vírus 1 (HSV-1), illetve tüdőgyulladást (pneumonia) okozó kórokozók is, mint a *Chlamydia pneumoniae* (Nelson, 2022). Összefüggésben lehet az Alzheimer-kórral számos idült betegség, amely a központi idegrendszerre is hatással van. Ilyenek a depresszió, illetve egyéb pszichiátriai kórképek, a különböző kardiovaszkuláris eltérések, mint a pitvarfibrilláció, a magasvérnyomás-betegség (hypertonia) és az érlemezés (atherosclerosis), továbbá fokozottabb a kockázat az elhízottak (obesitás) és a cukorbeteg (diabetes) körében. Az életmódbeli rizikótényezők közül kiemelendők a mozgásszegény életmód és a különböző étkezési szokások. Utóbbinál a betegség kialakulásának kockázatát fokozza a telített zsírsavakban gazdag és magas kalória tartalmú ételek fogyasztása. Néhány környezeti tényező is elősegítheti a kórkép kialakulását úgy, mint a légszennyezettség és bizonyos fémek, mint az alumínium és a kadmium. A legtöbb forrás egyet ért abban, hogy az eddigiekben felsoroltak mellett a legjelentősebb rizikótényező az Alzheimer-kór kialakulásában az öregedés, amely számos szervrendszerben végbemenő komplex változások együttesével befolyásolja a kórkép létrejöttét (Breijyeh és mtsai, 2020).

Mivel az Alzheimer-kór a demenciák egyik típusa, ezért tünetei közé tartoznak a demencia tünetei, amelyek klinikai megnyilvánulása három pilléren alapszik: a neuropszichológiai (kognitív) és a neuropszichiátriai (nem kognitív) tüneteken, valamint a mindennapi tevékenységek elvégzésének változásain. A neuropszichológiai tünetek közé tartozik az emlékezetvesztés (amnesia), a beszédértés, illetve beszédalkotás zavara (aphasia), a mozgásösszerendezés zavara (apraxia), valamint a tárgyak és személyek felismerési zavara (agnosia). A neuropszichiátriai tünetek (BPSD-behavioral and psychological symptoms of dementia) közé tartoznak a depresszió, a paranoid téveszmék, az azonosítási zavar (misidentificatio), hallucinációk, az agresszív viselkedés és az ún. wandering tünet (a beteg céllal, ill. cél nélkül elindul, majd eltéved, elveszti tájékozódási képességét). A mindennapi cselekvések (pl.: étkezés, öltözködés) elvégzésének zavarai szintén a kórkép velejárói lehetnek (Burns, 2000). Érdekességképpen megemlítendő, hogy állatkísérletek bizonyítják, az Alzheimer-kórban az agyvelőn kívül egyéb szervek is érintettek lehetnek. Ilyen a szív, a máj, a vesék és a herék, amelyekben szintén képződhet kóros A β . A perifériás szövetek tüneti manifesztációit azonban eddig kevésbé kutatták (Aczél és mtsai, 2022). Az Alzheimer-kórnak négy stádiuma van. Az első a pre-klinikai stádium (pre-clinical satge), a tünetek megjelenése előtti állapot, amelyet az enyhe memóriazavarok jellemeznek, minden egyéb felsorolt tünet nélkül. A második az enyhe, vagy korai (mild or early stage), a harmadik a mérsékelt (moderate stage) stádium, ahol egyre inkább súlyosodik az emlékezőképesség, megjelennek a

mindennapi cselekvések zavarai mellett a különböző pszichiátriai tünetek és felismerési zavarok. A negyedik a súlyos, vagy késői stádium (severe or late-stage), amelynél a tünetek a legsúlyosabbak, a beteg gyakran ágyhoz kötött, gyakoriak a vegetatív reflexzavarok (pl.: nyelési és vizeletürítési zavarok). Az ezekből következő szövődmények a beteg halálához vezethetnek (*Breijyeh és mtsai, 2020*).

Mivel a fentebb említett tünetek más, demenciát okozó kórképek velejárói is lehetnek, a National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke és az Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ARDA) létrehozott egy kritériumrendszert, amelynek célja a kórkép diagnosztizálása, illetve a kórkép megléte valószínűségének megítélése. Az Alzheimer-kór valószínűsített diagnózisa a tünetek meglétén, megjelenési idején és más kórképek kizárásán alapul, pszichiátriai, neurológiai és belgyógyászati vizsgálatokat is igényel. A tünetek 40 és 90 éves kor között jelennek meg, valamint fontos, hogy kizárásra kerüljenek azok a szisztémás és neuropszichiátriai alapbetegségek, kórállapotok, amelyek demenciát okozhatnak (*Breijyeh és mtsai, 2020*). Mindezek felmérésére különböző vizsgálatok állnak rendelkezésre. A kognitív funkciók felmérésére létrehozott tesztek között megemlítendő a MMSE (Mini Mental State Examination), illetve ennek standardizált formája, továbbá az ADAS (Alzheimer's disease Assessment Scale) és az órarajzolósi teszt (CDT-Clock Drawing Test). A pszichiátriai tünetek felmérésére szintén számos teszt létezik (*Burns, 2000*). A betegség valószínűsített diagnózisának megállapításához hozzájárul továbbá az általános neurológiai fizikális vizsgálat, a különböző laboratóriumi (pl.: B12-vitaminszint meghatározás, az agy-gerincvelői folyadék vizsgálata) és képalkotó (MRI, PET) vizsgálatok is. Az Alzheimer-kór végső diagnózisa postmortem lehetséges. A patológiai boncolás és a kórszöveti vizsgálat erősíti meg a kórkép meglétét (*Breijyeh és mtsai, 2020*).

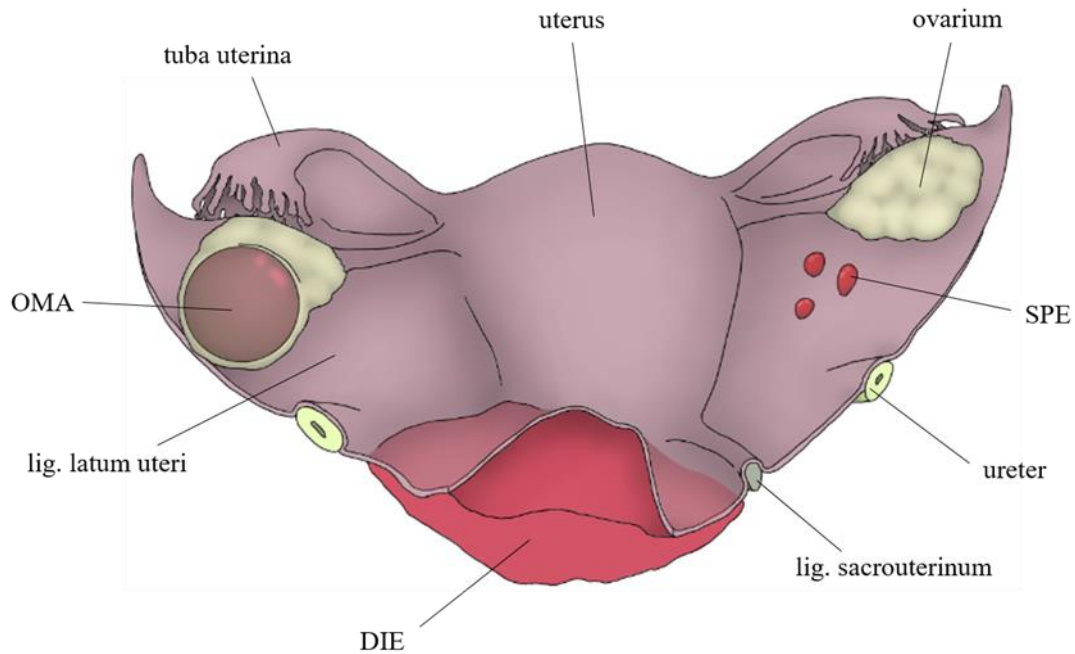
Az Alzheimer-kór napjainkig is gyógyíthatatlan betegség. A jelenlegi kezelési lehetőségekkel kizárólag a kórkép progressziója lassítható, valamint a különböző tünetek mérséklése lehetséges. A konzervatív kezelési lehetőségek közül említést érdemelnek a demenciatünetekre fejlesztett pszichoedukációs tréningek és kognitív terápiák. Fontos a megfelelő betegápolás és betegfelügyelet biztosítása (*Yiannopoulou és mtsai, 2020*). A zene- és fényterápia mellett kiemelendő az aktív fizikai mozgás szerepe, amely bizonyítottan lassítja számos más neurológiai betegség progresszióját is (*Yiannopoulou és mtsai, 2020; Hamer és mtsai, 2009*). A gyógyszeres kezelési lehetőségeket a kórkép patogenezisében résztvevő molekuláris folyamatokat alapul véve igyekeztek és igyekeznek kifejleszteni. Ezek közül sok farmakon klinikai gyógyszeres kísérleti stádiumban van. Példaképp említhetők a β - és γ -

szekretáz gátlók, valamint az A β elleni antitestek létrehozása aktív és passzív immunizációval (Yiannopoulou és mtsai, 2020). Mivel számos KIR neuropeptid szintézise zavart szenved az Alzheimer-kórban, így e neuropeptidek (pl.: ghrelin, neurotensin, PACAP, neuropeptid Y, P-anyag és orexin) fejlesztése és pótlása is ígéretesnek bizonyul (Chen és mtsai, 2019). A jelenleg rendelkezésre álló farmakonok közül a neurotranszmissziót befolyásoló készítmények között az ACh szint emelését biztosító készítmények (pl.: ACh-észteráz gátlók) és az NMDA-receptor antagonisták emelendők ki. Előbbiek közt hatóanyag a donepezil, a rivastigmin és a galantamin, utóbbi esetén pedig a memantin. Kiegészítő terápiának számít a különböző vitaminok és antioxidánsok (B12-, C-, D- és E-vitaminok, omega-3 zsírsav), valamint nyomelemek (pl.: cink) adagolása, illetve a bélflóra helyreállítása különböző probiotikumok pótlásával és diétás étrend felépítésével. A betegségben kialakuló pszichiátriai tünetek gyógyszeres kezelése az adott kórképre jellemző farmakonokkal lehetséges (Breijyeh és mtsai, 2020).

1.5. A kutatás során vizsgált betegségek: az endometriosis

Az endometriosis a méh üregén kívül a szervezeten belül bárhol megtalálható endometrium, amely szöveti felépítésében valóban hasonlít a méhnyálkahártyához (az angol terminológia megfogalmazásában „endometrial-like tissue”, azaz endometrium-szerű szövet) (Agarwal és mtsai, 2010). Az endometriosis széleskörű kutatása ellenére, napjainkban is akár 6-7 évbe telhet (18-45 éves nők korosztálya esetén), mire a kórkép végleges diagnózisát felállítják. Az ectopiás szövet jelenléte súlyos, életminőséget hátrányosan befolyásoló tüneteket okozhat, éppen ezért minél alaposabb kiismerése nélkülözhetlenné vált. A kórállapot a reprodukív korú nők 10-15%-át érintheti, illetve a krónikus kismencedei fájdalom (chronic pelvic pain) kórkép háttérében kb. 70%-ban (Parasar és mtsai, 2017), a női infertilitás esetében pedig kb. 30-50%-ban igazolódik (Macer és mtsai, 2012).

Az endometriosis leggyakoribb lokalizációi a testen belül a petefészkek (ovarium), a kismencedei hashártya (peritoneum) és az infraperitoneális kötőszövetes tér (főként a septum rectovaginale, a hüvely és a végbél közti kötőszövetes tér (Smolarz és mtsai, 2021). Ennek alapján három fő típusa különböztethető meg: ovarialis (endometrioma, OMA), felszínes peritonealis (superficial peritoneal endometriosis, SPE) és mélyen infiltráló endometriosis (deep infiltrating endometriosis, DIE) (10. ábra).



10. ábra

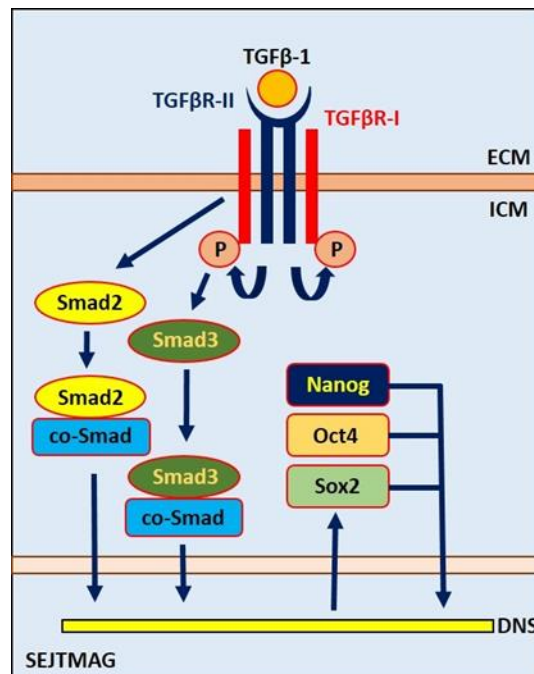
Az endometriosis anatómiai lokalizáció szerinti három fő típusa a petefészekben megjelenő ovarialis endometrioma (OMA), a hashártyalemezeken megtelepedő felszínes peritonealis endometriosis (SPE) és a kismedencei szöveteket destruáló mélyen infiltráló endometriosis (DIE). Utóbbi felett egy darabon a Douglas-üreg peritoneuma eltávolításra került. (Saját készítésű ábra).

Az OMA a fertilis korú nők 2-10%-ában, míg a meddő nők 50%-ában azonosítható. A petefészekben leggyakrabban tömlők (cysta) formájában van jelen, amelyből nagyobb méretű, sötét bennékű, ún. csokoládé-cysták képződhetnek. Az SPE-k a kórkép 15-50%-ában lehetnek jelen (*Imperiale és mtsai, 2023*). Morfológiájuk változatos, a gyakran piciny laesiók leggyakoribb színe lehet vörös, fekete, barna, fehér, kékes vagy sárgás is (*Smolarz és mtsai, 2021*). A DIE az endometriosisos betegek 20%-ban fordulhat elő. A kötőszöveten kívül gyakran beszövi (infiltrálja) a kismedencei zsigeret (pl. vagina, húgyvezeték, végbél) falát is (*Imperiale és mtsai, 2023*). Az említett lokalizációkon kívül az ectopiás szövet egyéb testterületeken is jelen lehet (*Smolarz és mtsai, 2021*). Az irodalomban nincs egységes álláspont az egyéb anatómiai szerveken megjelenő endometriosis típusok csoportosítása tekintetében. A jelen dolgozatban felsorolt beosztás több forrás logikus rendszerezése által született. Az egyéb anatómiai helyeken megjelenő endometrioid szövetek fő csoportjai az abdominalis (hasüregi) extragenitális és a távoli extragenitális lokalizációjú laesiók. Az abdominalis megtelepedés lehet fali (parietalis) vagy zsigeri (visceralis). A parietalis abdominalis ectopiás szövet jelen lehet a köldökben (umbilicalis endometriosis), a korábbi műtétek hasfali vagy gáttájéki hegében (heg-endometriosis), a gáttájékon (perinealis endometriosis) és a lágyékszalag mentén (inguinalis endometriosis). A visceralis abdominalis endometriosis érintheti a kismedencei

zsigereket, köztük a húgyhólyagot (vesica urinaria), a húgyvezetéseket (ureter) és a végbélet (rectum), illetve ritkán a hasüregi zsigereket is, mint a máj, az epehólyag, a hasnyálmirigy és a vesék. A húgyhólyag, a húgyvezeték és a végbél leggyakrabban a DIE esetében érintett, önálló laesióként ritkán infiltrálja őket az endometrioid szövet. A távoli extragenitális ectopiás szövetek irodalmi ritkaságnak számítanak. A legtöbb esetet a mellüregben fedezték fel. Ezek érintették a rekeszizmot (diaphragmaticus endometriosis), a mellhártyát (pleuralis endometriosis) és a tüdőt is (pulmonalis endometriosis). Még ritkább lokalizációjú a központi idegrendszerben, a harántcsíkolt (extrapelvicus) izmokban, az orrüregben és a perifériás idegekben megjelenő endometriosis (*Smolarz és mtsai, 2021; Hirata és mtsai, 2020; Andres és mtsai, 2020*). Az endometriosis speciális megjelenési formája az endometriosis interna, vagy más néven adenomyosis. Ebben a kórképben az endometrialis szövet a myometrium simaizmos rétegei között található (*Upson és mtsai, 2020*). Újabb kutatások szerint kialakulásának hátterében a rizóma-szerű méhnyálkahártya mirigyek kóros simaizom inváziója állhat (*Yamaguchi és mtsai, 2021. márc.*). Az adenomyosis előfordulásáról pontos adatok nincsenek, mivel gyakran csak a halál utáni boncolást, illetve a méheltávolítást (hysterectomia) követő kórszövetteni vizsgálattal igazolják a jelenlétét (*Upson és mtsai, 2020*).

Az endometriosis kóreredetének oka ismeretlen, kialakulására azonban számos elmélet született. Ezek közül a mai napig legelfogadottabb a Sampson-féle retrográd menstruációs teória, amely szerint a menstruáció során keletkező méhnyálkahártya fragmentumok nem a méh nyakcsatorna (cervix uteri) és a külvilág irányába, hanem retrográd úton, a méhkürtökön (tuba uterina) át a kismedence peritoneális tereibe jutnak, ahol megtelepednek és létrehozzák az ectopiás laesiót. A coeloma metaplasia elmélet szerint az embrionális celoma eredetű hám (az ovarium germinális hámja és a peritoneum mesotheliuma) metaplasticusan átalakul (*Macer és mtsai, 2012*). A metaplasia egy adott lokalizációban differenciálódott somaticus sejttípus átalakulását (transzformáció) jelenti ugyanazon helyen, egy másik differenciálódott somaticus sejttípussá. A patológiai mechanizmus feltételezhetően a szövetet érő káros hatások (pl.: pH változás gyulladási folyamatokban, toxinok, hormonarány változások) miatt következik be (*Giroux és mtsai, 2017*). Az embrionális maradvány(sejt) elmélet (embryonic rest theory) szerint az ectopiás laesio a kismedencei peritoneumban embrionális korban visszamaradó Müller-cső maradványokból differenciálódik (*Figueira és mtsai, 2011*). A coeloma metaplasia és az embrionális maradvány elméleteket támasztja alá, hogy ritkán ugyan, de endometriosis férfiakban is kialakulhat. A leírt esetekben a kóros szövet leggyakoribb lokalizációja a visszafejlődött Müller-cső mentén és a Müller-cső embrionális maradványai (appendix testis és utriculus prostaticus) területén alakul ki (*Rei és mtsai, 2018*). A transzplantációs

(lymphovascularis metastasis) elmélet szerint pedig, a daganatos sejtek terjedéséhez hasonlóan, az endometrialis sejtek nyirokutak, vagy a véráram útján szóródhatnak egyéb testtájakra a méhüri endometriumból (eutopiás endometrium) vagy egy már meglévő ectopiás endometrioid szövetből. A legújabb kutatások az endometriosis kialakulását az őssejt elmélettel (stem cell theory) magyarázzák (Macer és mtsai, 2012). A teória szerint az endometrium regenerációjához szükséges őssejtek, illetve a csontvelő őssejtek migrációs, proliferációs és inváziós kapacitása ismeretlen ok(ok) miatt megnövekszik, így azok ectopiás helyre vándorolnak, és ott telepeket képeznek (Maruyama és mtsai, 2012). Az irodalom sok „őssejt transzkripciós faktor” megnövekedett expresszióját írja le, amelyek az említett változásokért felelnek. A leggyakrabban vizsgált transzkripciós faktorok az Oct4, a Nanog és a Sox2, amelyek a sejtek pluripotencia kapacitásának fenntartásáért felelősek (Song és mtsai, 2014). Az említett faktorok a TGFβ-jelátvitel aktiválódására expresszálódnak (Xu és mtsai, 2008), a TGFβ-1 fokozott expressziójának szerepét az ectopiás szövet képződésénél igazolták (Au és mtsai, 2015) (11. ábra). Valójában egyik elmélet sem zárja ki a másik létjogosultságát. Sőt, magyarázattal szolgálnak az ectopiás szövet jelenlétére a különböző lokalizációkban (pl.: a távoli exregenitalis laesiók létrejöttének magyarázata a lymphovascularis metastasis elmélet) (Figueira és mtsai, 2011).



11. ábra

Az endometriosis kialakulás „őssejt-elmélettel” való magyarázata. A TGFβ-1 receptorhoz való kötődése TGFβR-II és TGFβR-I heterotetramer képződését eredményezi. Ennek hatására Smad transzkripciós faktorok aktiválódnak, amelyek fokozzák a Nanog, Oct4 és Sox2 expresszióját. Ezen őssejt transzkripciós faktorok olyan gének átírását eredményezik, amelyek

*serkentik az endometrialis őssejtek migrációs, inváziós és proliferációs kapacitását.
(Saját készítésű ábra).*

Az endometriosis kialakulása oki háttérben feltételeznek kóros immunfolyamatokat, genetikai eltéréseket, környezeti hatásokat, sőt, az endometrium bakteriális mikroflórájának megváltozását is. Az endometriosis egy krónikus gyulladós folyamatot fenntartó kórállapot. Az ectopiás szövetben a leukocyták egy túlélést és növekedést elősegítő mikrokörnyezetet teremtenek, amelynek pontos mechanizmusait még nem tárták fel. Többféle eltérést találtak a laesio leukocyta összetételében: regulátoros T-sejtek és M2 típusú macrophagok jelenlétét, a macrophagok csökkent phagocytá aktivitását, az NK sejtek hiányát, illetve a T helper 2 és T helper 1 sejtarány magas értékét. Az eltérő immunműködés változásokat hozhat létre az eutopiás endometrium fehérvérsejt-populációjában is (*Parkin és mtsai, 2016*). A feltételezett genetikai eltéréseket napjainkban is többféle molekuláris módszerrel igyekeznek feltárni (*Chiorean és mtsai, 2023*). Az endometriosis örökletes háttérére bizonyíték, hogy a kórállapotban érintett nők első fokú családtagjaiban 5-7-szer nagyobb eséllyel igazolják sebészi úton az ectopiás szövet jelenlétét, valamint egyetétjű ikreknél nagyobb arányban érintett mindkét testvér, mint kétetétjű leány ikrek esetén (*Hansen és mtsai, 2010*). A környezeti hatások egyike sem okozza minden esetben az endometriosis kialakulását, de növelheti a kórkép kialakulásának esélyét. Példaként említhető az intrauterin magzatot érő magasabb ösztrogénszint (pl.: ikerterhesség esetén), a vörös húsokban gazdag, illetve zöldségekben és omega-3 zsírsavakban szegény diéta, valamint bizonyos kozmetikumok használata is (*Banaszewska és mtsai, 2021*). Az endometriosis kialakulását elősegíthetik továbbá a különböző kismencedei szervek mikroflórájának megváltozása, bizonyos patogének (főként baktériumok) fokozottabb jelenléte (*Leonardi és mtsai, 2020*). További rizikófaktorok lehetnek az alacsonyabb születési súly, a Müller-cső fejlődési rendellenességei, a korai menarche, a nagyobb mennyiségű menstruációs vérzés, a rövidebb menstruációs ciklusok, az alacsonyabb testtömegindex és a nullparitás (még nem szült nők) (*Filip és mtsai, 2020; Parasar és mtsai, 2017*).

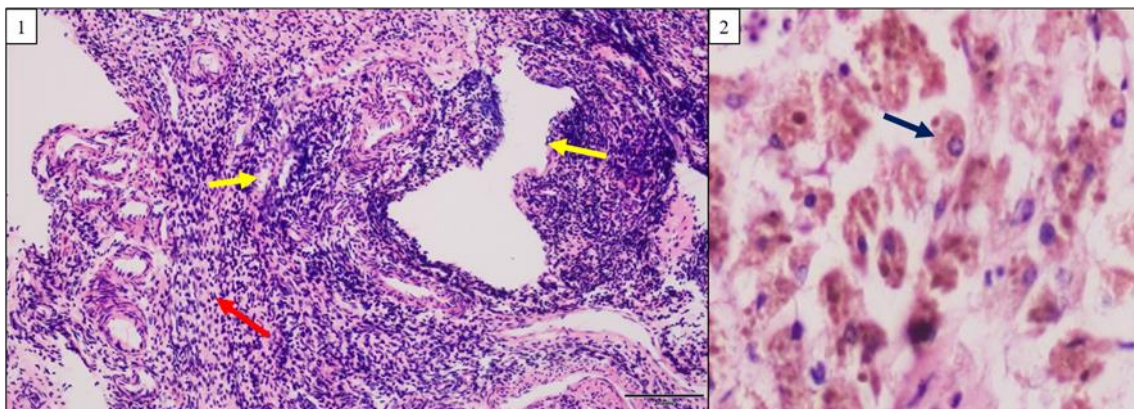
Az endometriosis ösztrogénfüggő szövet, amely az eutopiás méhnyálkahártyához hasonlóan követheti a női nemi ciklus hormonális változásait. Így a menstruáció alatt leválhat és vérezhet. A méhnyálkahártyával ellentétben a vér nem tud a külvilágba ürülni, így a megtelepedés helyén megalvad (ovarialis endometriománál így jön létre például a sűrű, sötét bennéki csokoládé-cysta). Az alvadékot az immunrendszer megpróbálja eliminálni, így egy fájdalmat provokáló steril gyulladás jön létre, ráadásul a véralvadék helyén zsugorító kötőszövetesedés (fibrosis) alakul ki, amely összenövéseket (adhesio) hozhat létre a

peritonealis lemezek között, következményesen kórosan rögzítve a kismedencei zsigereket (*Camboni és mtsai, 2021*). Ráadásul, az ectopiás laesio (főleg az ovariumban) megváltoztatja a megtelepedés helyén a szövet mikrokörnyezetét, annak molekuláris folyamatait úgymond a saját képére formálja (*Klemmt és mtsai, 2018*). Az említett kórélettan következtében alakulnak ki a tünetek, amelyek nagyban függenek az endometriosis megtelepedésének helyétől is. Ezek lehetnek a menstruáció során jelentkező kifejezett fájdalom (dysmenorrhoea), a peritonealis összenövések és az idült gyulladás miatt a krónikus kismedencei fájdalom (chronic pelvic pain), valamint a fájdalmas nemi együttlét (dyspareunia). További tünetek lehetnek a belek érintettsége esetén motilitási zavarok, vérszékelés (haematochesia) és fájdalmas székelés (dyschesia), a húgyhólyag érintettsége esetén hólyagürítési zavarok, fájdalmas vizeletürítés (dysuria) és vérvizelés (haematuria). Távoli áttétek esetén a női nemi ciklussal összefüggő vérzések a megtelepedés helyén (pl.: haemoptoe, azaz vérköhhögés a tüdő érintettsége esetén) (*Allaire és mtsai, 2023*). Az endometriosis jelenlétére gyakran a meddőség kivizsgálása során derül fény. A többféle, infertilitást okozó állapot közül kiemelendő a petevezetők átjárhatóságának megszűnése (a peritonealis összenövések által), amely miatt a petesejt nem jut el ovulatiót követően a méh üregébe, és a megtermékenyítés is lehetetlenné válik, valamint ovarialis endometrioma esetében a petesejt érésének gátlása az ovarialis szövetek megváltozott molekuláris folyamatai miatt (*Bonavina és mtsai, 2022*). Az adenomyosis szintén okozhat meddőséget, valamint elhúzódó, bő hüvelyi vérzéseket (*Upson és mtsai, 2020*). Továbbá a myometrium károsítása miatt sokszor a kór állapot egyetlen megoldása a méheltávolítás (*Taran és mtsai, 2013*). A sokféle említett tünet súlyosan befolyásolja az érintett nők életminőségét (*Farland és mtsai, 2020*). Előfordulhat az is, hogy az endometriosis egész életen át tünetmentes marad és csak boncolást követő kórszövetteni vizsgálat igazolja a jelenlétét (*Parasar és mtsai, 2017*).

Az endometriosis diagnosztizálása általában több lépésben történik, amelyek között non-invazív és invazív eljárások egyaránt rendelkezésre állnak. A beteg anamnézise, a fentebb említett tünetek jelenléte és az általános nőgyógyászati fizikális vizsgálaton tapasztalt eltérések (pl.: érzékenység a méhfüggelékek területén, kötöttség a zsigerekben, tapintható kismedencei terime, stb.) pre-diagnosztikus információkkal szolgálnak a kórkép felderítése során (*Parasar és mtsai, 2017*). Az endometriosis differenciáldiagnózisa főként az extragenitális formáknál válik nehezítetté (pl.: pulmonalis formánál a haemoptoe lehet tüdődaganat jele is) (*Hirata és mtsai, 2020*). A képalkotó eljárásoknál rendelkezésre áll az ultrahang (UH), a computer tomográfia (CT) és a mágneses rezonancia képalkotás (MRI). A hüvelyi (TVS-transvaginalis sonographia), illetve ritkábban, a kevésbé alkalmazott végbél (TRS-transrectalis sonographia)

UH vizsgálat napjainkban egyre inkább kiszorítja az eddigi „gold-standardnak” számító diagnosztikus eljárásokat, könnyen elérhető, olcsón alkalmazható módszer. Az OMA UH képe jellegzetes, hyperechogénebb, hóesésszerű, vagy tejüvegszerű, áramlást nem mutató bennékel rendelkező tömlőként azonosítható. Ebben az esetben a 1,5 cm-nél nagyobb méretű tömlő csokoládé-cystaként ítélt meg. Az adenomyosis és DIE is jól diagnosztizálható TVS segítségével, a kicsiny peritonealis (SPE) laesiók felderítésére, illetve igazolására azonban alkalmatlan. A CT vizsgálatot endometriosis gyanúja esetén nem alkalmazzák rutinszerűen a kórkép diagnosztizálására. Bár a laesiót kimutatja, a kép alapján az eltérés általában nem különíthető el más típusú teriméktől, illetve a sugárterhelése is nagy. A CT vizsgálat során endometriosis általában véletlenszerűen, vagy mellékleteként kerül felfedezésre, főleg az extragenitális formák által okozott panaszok kivizsgálásakor (*Zuber és mtsai, 2022*). Az MRI vizsgálat drága, ugyanakkor kiváló képalkotó eljárás az endometriosis diagnosztikájában. OMA esetén például könnyen elkülöníthető a bevezett egyszerű (simplex) ovarialis cystáktól. Az MRI képalkotást endometriosisban leggyakrabban a laesio kiterjedtségének felmérésére, illetve stádium meghatározására alkalmazhatjuk. Főként DIE esetén segíti a műtéti eljárások preoperatív tervezését. Az SPE-k kimutatására viszont az MRI általában nem alkalmas, az elváltozások kis mérete miatt (*Foti és mtsai, 2018*). Számos biomarkert vizsgálnak jelenleg is, amelyek vérvételt követően diagnosztizálhatóvá teszik az endometriosis. Eddig azonban egyetlen sem azonosítottak, amely specifikus lenne a kórképre és szenzitíven azonosítaná azt (*Parasar és mtsai, 2017*). A legalkalmasabb és legkecsegtetőbb jelölt jelenleg a CA-125. Bár a szérummarker szintje egyéb betegségben is megnövekedhet (pl.: bizonyos ovarium tumorokban, gyomor-bélrendszeri daganatokban), az ectopiás szövet esetén általában emelkedett az értéke. Ebben az esetben a CA-125 a laesio eltávolítása után tökéletesen alkalmas a műtéti beavatkozás hatásosságának követéses detektálására, csökkenő szérumszintje az elimináció eredményességét bizonyíthatja (*Muyldermans és mtsai, 1995*). Az endometriosis invazív diagnosztikai eljárásai közé tartoznak az operatív eljárások: a laparotomia (nyitott hasi műtét) és a laparoscopia. Utóbbit általában elsőként választják, tekintettel arra, hogy a beavatkozást követően a postoperatív fájdalom kisebb mértékű, a hospitalizáció ideje rövidebb, illetve a gyógyulás is gyorsabban végbemehet, valamint a kisebb bőrmetszések miatt esztétikailag is szebb eredményt biztosít (*Kalaitzopoulos és mtsai, 2021*). A laparoscopia az endometriosis diagnosztizálása szempontjából jó ideig „gold-standard” eljárásnak számított, tekintve, hogy a jellegzetes endometrioid elváltozások (köztük a kisméretű SPE-k is) vizualizálhatók a módszer segítségével (*Zuber és mtsai, 2022*). A műtéti beavatkozások ugyanakkor a diagnosztizálás mellett terápiás lehetőséget adnak az endometriosis esetében,

ugyanis a kóros szövetek az eljárás által legtöbb esetben eltávolíthatóvá válnak (Becker és mtsai, 2022). Bár az eddig említett módszerek bizonyíthatják a kórkép fennállását, azonban a végleges diagnózist a kórszövettani vizsgálat adja, illetve az erősíti meg. Az ectopiás endometrium szöveti felépítése hasonló, mint az eutopiás nyálkahártyáé: endometrialis mirigy és endometrialis stroma sejtek alkotják. A testből ki nem üríthető, felgyülemelő vért igyekeznek eltávolítani a szöveti macrophagok, amelyek a hemoglobin hem részét nem tudják lebontani, így haemosiderin pigmenteket halmoznak fel (Camboni és mtsai, 2021). Az eltávolított ectopiás szövetben az endometrialis mirigyek, a CD10 pozitív endometrialis stroma sejtek és a haemosiderin tartalmú macrophagok közül kettő jelenléte igazolja a kórképet, illetve megerősíti az endometriosis diagnózist (Signorile és mtsai, 2023) (12. ábra). Napjaink kutatásai alátámasztják, hogy az endometrioid laesiókban a mirigyek és stroma mellett a méhüri nyálkahártya regenerációját biztosító őssejtek is jelen vannak (eEPs, eMSCs, SP és BMDCs), amelyek biztosítják az ectopiás szövet proliferációját (Cousins és mtsai, 2018; Macer és mtsai, 2012).



12. ábra

Az ovarialis endometrioma cystafal szövettani szerkezete (saját minta). H&E festés, 10× (1) és 20 × nagyításban (2). Az endometriosis diagnózist 3 sejtfeleségből 2 jelenléte igazolja.

Ezek az endometrialis mirigyek (sárga nyíl), az endometrialis stroma (piros nyíl) és a haemosiderinnel telt macrophagok (sötétkék nyíl). (Szövettani metszetről készített saját fotó).

Az endometriosis kezelése a mai napig sem megoldott kérdés. Nincs egyöntetű protokoll a kórállapottal kapcsolatos problémák megoldására, csupán terápiás lehetőségek és terápiás (protokoll) ajánlások léteznek (Becker és mtsai, 2022). A kezeléseknél két fő célja lehet: az ectopiás szövet eliminációja és az általa okozott szövődmények megszüntetése, megoldása, illetve mérséklése (Rafique és mtsai, 2017). A terápia módja több dologtól függ, köztük a tünetektől (pl.: infertilitás, fájdalom), valamint a laesio helyétől és kiterjedésétől (Parasar és mtsai, 2017). A kezelési módszerek között vannak konzervatív és operatív lehetőségek is. Előbbinél szóba jön a gyógyszeres kezelés (hormonális és nem hormonális

készítmények), valamint komplementer eljárások, utóbbinál a laparoscópos és laparotomiás megoldások (*Kalaitzopoulos és mtsai, 2021*). A farmakológiai lehetőségek a már kutatásokkal igazolt, endometriosisban detektált molekuláris eltéréseken alapulnak (pl.: gyulladáscsökkentő mediátorok felszabadulása, az ectopiás szövet ösztadiol dependenciája, az aromatáz enzim fokozottabb aktivitása, a megnövekedett VEGF expresszió, stb.). A nem hormonális gyógyszerek között pre- és postoperatív, valamint műtét nélkül is alkalmazhatók a nem-szteroid típusú gyulladáscsökkentők (NSAIDs). Ezek elsősorban a krónikus gyulladáscsökkentő folyamatok okozta fájdalmak csökkentésére alkalmazhatók. Non-szelektív (COX-1 és COX-2) és szelektív COX-2 gátlók egyaránt használhatók. Utóbbiak a COX-2 receptorok endometrioidban mért magasabb koncentrációja miatt hatásosabbnak bizonyultak. Hasonló módon, és szintén elsősorban fájdalomcsillapításra alkalmazhatók a kombinált fogamzásgátló készítmények (COCP-combined oral contraceptive pills), amelyek ethinilestradiolt és valamely gesztagén komponenst tartalmaznak. Analgetikus hatásuk mellett gátolhatják az ectopiás szövetek proliferációját is (*Rafique és mtsai, 2017*). Elsővonalbeli szerként alkalmazhatók a hormonális lehetőségek között (*Becker és mtsai, 2022*). Hátrányuk, hogy fokozzák a thromboemboliás szövődmények kockázatát (*Rafique és mtsai, 2017*). Ennek kivédésére alkalmazhatók (pro)gesztagén készítmények (pl.: medroxiprogesztéron-acetát, dienogest, levonorgestrel) is, amelyek szintén gátolhatják az endometrioid növekedését (*Kalaitzopoulos és mtsai, 2021*). Szintén hasonló módon alkalmazhatók szelektív progesteron receptor modulátorok (SPRMs, pl.: mifepriston, ulipristal). Az androgén hatású danazol hazánkban nem forgalmazott, hatékony szer, ugyanakkor virilizáló mellékhatásai miatt kevésbé preferált (*Rafique és mtsai, 2017*). A GnRH agonisták és GnRH antagonisták az előzőekben említett készítmények hatástalansága esetén használhatók másodvonalbeli készítményként (*Becker és mtsai, 2022*), illetve kémiai kasztrációt okozó hatásuk miatt használatuk az endometrioid laesio „kiéheztetését” szolgálja. Menopausa-szerű mellékhatásaik miatt (pl.: csonttritkulás, hőhullámok, libido csökkenése, hüvelyszárazság) legfeljebb 6 hónapig alkalmazhatók ezek a készítmények (*Kalaitzopoulos és mtsai, 2021*). Az enzimgátlók közül említést érdemelnek az aromatáz-inhibitorok és a statinok. Előbbiek használata még kísérletes fázisban van, kecsgetető eredményekkel, utóbbiak koleszterincsökkentő hatásuk révén gátolják a szteránvázas hormonok szintézisét és antioxidáns hatással rendelkeznek (*Rafique és mtsai, 2017*). Ajánlások alapján az aromatáz-gátlók jelenleg másod-, illetve harmadvonalbeli készítményként alkalmazhatók (*Becker és mtsai, 2022*). A kísérletes szerek közül megemlítendő a VEGF-gátlók, amelyek az ectopiás szövet fokozott érújdonképződését gátolják (*Rafique és mtsai, 2017*). A műtéti eljárások az endometriosisos laesio eltávolítását

célozzák, amennyiben az lehetséges. OMA esetén, a fertilitás megtartása (minél több ép petefészkek tüsző konzerválása) miatt preferált megoldás a cysta (ill. cystafal) teljes kihámozása (ovarialis endometrioma cystectomy). Az SPE-k esetén a kóros szövetek ablatiója (coagulatio vagy vaporisatio) és kimetszése (excisio) egyaránt elfogadott megoldás. A DIE esetén a preoperatív feltérképezés (pl.: MRI vizsgálattal) gyakorlatilag elengedhetetlen. Sokszor (pl.: zsigeri szervek beszűrtsége miatt) szükség lehet társszakmák segítségére, a húgyúti szervek érintettsége esetén urológus, a belek érintettsége esetén sebész kollégák bevonására (*Kalaitzopoulos és mtsai, 2021*). Extragenitalis lokalizáció igazolása esetén szintén szakmaközi együttműködés szükséges (*Becker és mtsai, 2022*). Az eredményesség és a műtétek kivitelezése nagyban függ az operatórok tapasztalatától és felkészültségétől is. A műtétekkel az ectopiás szövetek által okozott szövődmények megoldására is lehetőség adódik. A peritonealis összenövések oldása (adhesiolysis) segíthet a fájdalom megoldásában a lekötött szervek felszabadítása által. Ritkán alkalmazott analgetikus megoldás lehet a fájdalmat elvezető idegek kiiktatása (pl.: LUNA-laparoscopic uterine nerve ablation, PSN-presacral neurectomy) (*Kalaitzopoulos és mtsai, 2021*). A meddőségi kivizsgálás részeként lehetőség nyílik a petevezetők átjárhatóságának vizsgálatára is a méhüreg felől történő indikátor festékanyag befecskendezésével (CHT-chromohydro(per)tubatio). Amennyiben a tuba uterinák átjárhatatlanok, az infertilitás megoldásaként szóba jöhetnek asszisztált reprodukciós eljárások is (pl.: IVF-in vitro fertilisatio) (*Becker és mtsai, 2022*). Az endometriosis kezelés komplementer megoldásai közé tartozik a különféle diéták alkalmazása, a rendszeres testedzés és az akupunktúra is (*Kalaitzopoulos és mtsai, 2021*). Az eddig említett konzervatív és operatív terápiás lehetőségek egymással kombinálhatók. Lényegében az összes három fő irányelvet képvisel: a termékenység megőrzését és fenntartását, a fájdalomcsillapítást és az ectopiás laesio eliminációját, valamint kiújulásának megelőzését (*Horne és mtsai, 2022*). Sajnos utóbbi szinte lehetetlen feladatnak bizonyul, tekintve, hogy a konzervatív és az operatív megoldások mellett is maradhatnak mikroszkopikus méretű ectopiás szövetmaradványok, amelyek új laesiókat képezhetnek (*Khan és mtsai, 2014*). Valamint, mivel a kórállapot kiváltó oka(i) ismeretlen(ek), ezért azok fennmaradása esetén az ectopiás szövet képzésének hajlama a szervezetben megmaradhat (*Guo, 2009*). Az endometriosis kezelésénél fontos, hogy a kórállapotra specializálódott és tapasztalt orvos, illetve orvosi team tervezze meg és végezze a kezeléseket. Továbbá fontos az is, hogy az endometriosis sokszínűsége miatt a terápia egyénre tervezett legyen (*Horne és mtsai, 2022*).

II. Célkitűzés

Jelen dolgozat kutatási munkája során céлом volt a PACAP ivarszervek patológiás folyamataiban betöltött szerepének felderítése. A kísérletek alatt Alzheimer-kórt modellező egerek heréit, illetve az endometriosis jelátvitelét vizsgáltam. A kutatást három részre osztottam, és a dolgozatban a kísérletek során felhasznált anyagokat és módszereket, valamint a kapott eredményeket is e szerint a felosztás szerint ismertetem.

Az első kutatásrészben céлом volt a következő kérdések megválaszolása:

- Megfigyelhetők-e elváltozások az Alzheimer-kórt modellező egerek heréiben, és ha igen, szerepet kap-e ebben a neurodegeneratív betegségben sérülő PACAP-jelátvitel?
- A kórképben ismerten hasznos fizikai aktivitás képes-e befolyásolni az esetlegesen észlelt eltéréseket?

Az endometriosis tanulmányozása során szükséges azt összehasonlítani egy hozzá hasonló kontroll szövettel, a humán endometriummal. A fiziológias nyálkahártya kinyerése és kísérletes felhasználása komoly nehézségekbe ütközik. A második kutatásrészben ezért céлом volt a következő feltárása:

- A műtéti eljárásokkal nyerhető endometrium minták mekkora hányada alkalmas molekuláris kísérletekbe való bevonásra, illetve az endometriosisal való összehasonlításra?

Ennek meghatározása után pedig a harmadik kutatásrész során céлом volt a következők feltárása:

- Az endometriotikus szövetekben expresszálódnak-e a PACAP, valamint a neuropeptidet kötő receptorok?
- A PACAP adagolás befolyásolja-e az endometriosis kialakulása során megfigyelhető molekuláris elváltozásokat, kiemelten a TGF β -jelátvitel eltéréseit?

III. Anyagok és módszerek

III.1. Az első kutatásrész során alkalmazott anyagok és módszerek

III.1.1. A kutatásban alkalmazott állatok

A kutatás során Alzheimer-transzgenikus (B6C3-Tg(APP^{swe},PSEN1^{dE9})85Dbo/J) és transzgenikusan nem módosított, vad típusú hímvárú egereket hasonlítottunk össze. Az egyedek három kísérleti csoportba oszthatók: transzgenikusan nem módosított és aktív testmozgást nem végző egerek (WT), Alzheimer-transzgenikus és aktív testmozgást nem végző egerek (AD), illetve Alzheimer-transzgenikus, aktív testmozgást végző egerek (TAD). Minden kísérleti csoportban 5-5 egyed vett részt. Az egerek tartását és a kutatást mindvégig az állatkísérletekre vonatkozó etikai irányelveknek megfelelően végeztük (jelen kutatás Etikai Bizottsági engedély száma: PEI/001/2105-6/2014 (09.07.2014), Semmelweis Egyetem). Az állatok tartását és aktív testmozgatását a Semmelweis Egyetem Testnevelési és Sporttudományi Karának munkatársai végezték. A 12-12 órás nappali és éjszakai fényviszonyoknak megfelelő ciklusok között tartott egerek a vízhez és a táplálékhoz a nap folyamán könnyen hozzáfértek. Az aktív testmozgást végző egerek tréningje futókerék igénybevételével történt. Az állatok egy héten 4 alkalommal végeztek 1 órányi testmozgást, amelyet 10 edzésegységre osztottak. Egy edzésegység 2 perc hosszúságú alacsony intenzitású (10 m/perc) és 4 perc hosszúságú magas intenzitású (20 m/perc) futásból állt. Megjegyzést érdemel, hogy a kutatásban transzgenikusan nem módosított, aktív mozgást végző állatok is részt vettek. Mivel azonban a későbbiekben ezen egerekből kapott molekuláris eredmények nem tértek el az aktív mozgást nem végző WT egyedekéétől, ezért az aktív mozgást végző WT csoportot kivettük az eredmények kiértékelésénél. Az összes állat genotipizálását Phire Animal Tissue Direct PCR Kit (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével végezték, a gyártó instrukcióit követve.

III.1.2. A szövetek HE festése és elemzése

A kutatásban résztvevő egereket 3 hónapos korukban terminálták. Egy állatból eltávolított mindkét herét háromszor PBS oldatban átmostuk, majd horizontális síkban elfeleztük. A felek egyikét abszolút etanol és 40%-os formaldehid oldat 4:1 arányú keverékében fixáltuk. A mintát paraffinálást és beágyazást követően az átvágott felszínnel párhuzamosan metszettük le szilanizált tárgylemezekre. Ezt követően, a metszeteket hematoxilin-eozin (HE, Sigma-Aldrich, MO, USA) szövettani festési eljárással, a forgalmazó instrukció alapján megfestettük. A HE metszeteket DP74 kamera (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) használatával, Olympus B×53 mikroszkóppal (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) fotó dokumentáltuk. A gonádokban a

kanyarulat csatornák membrana basalis vastagságát mértük, valamint három sejttípusát (spermatogonium, spermatocytá és spermatozoa), továbbá az interstitium Leydig-sejtjeit számláltuk meg. A membrana basalis vastagságának leméréséhez ImageJ 1.40 g freeware programot használtunk. A szoftver segítségével a membrana basalis hossz tengelyére merőleges vonalakat rajzoltunk. Ezek pixelszámát lemérve, az eredményeket mikrométer értékekre konvertáltuk. A WT, AD és TAD kísérleti csoportokon belül mind az 5-5 here értékeit, 20 független mérés segítségével átlagoltuk. A különböző sejtek meghatározása mikroszkópos morfológiai jellegzetességeik azonosítása alapján történt. A membrana basalis közelében elhelyezkedő kerek, sötétben festődő sejteket spermatogoniumként, a kanyarulat csatornák lumene felé húzódó rétegben található kerek sejtmagvú sejteket spermatocytaként, a lumen közelében található sötét, megnyúlt sejtmagvú sejteket spermatozoaként azonosítottuk. Az I-es és II-es típusú spermatocyták között jelen kutatásban nem tettünk különbséget. A Leydig-sejteket a kanyarulat csatornák közötti térség eozinofilan festődő sejtjeiként azonosítottuk. A sejtek számlálását 10×-es nagyítás mellett 3 kutató egymástól függetlenül végezte el 10 kanyarulat csatornán, 5 különálló látótérben.

III.1.3. Konvencionális RT-PCR

Egy állatból az elfelezett gonádokból egy felet konvencionális RT-PCR segítségével vizsgáltuk. A mintát mechanikai zúzás után TRIzol reagens (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) segítségével oldottuk fel, majd a gyártó RNS izolálási protokollját alkalmazva, 30 perc 4°C-os inkubációs időt követően az izolált totál RNS-t nukleázmentes vízben (NFW) oldottuk fel és -70°C-on tároltuk. A minták tisztaságát és az RNS koncentrációját Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) készülékkel detektáltuk. Az összes minta azonos RNS koncentrációra történő hígítását követően, a reverz transzkripciót High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) segítségével végeztük el. A kutatás során a következő molekulák mRNS expresszióját vizsgáltuk: PAC1R, VPAC1R, VPAC2R, PKA, Sox9, Sox10, PP2A, IV-es típusú kollagén, IX-es típusú kollagén és testatin. Háztartási géneként az aktin bizonyult a legstabilabbnak.

| Gén | Primer | Nukleotid sorozat | Annellációs hőmérséklet (T _m - °C) | Termékhossz (bp) |
|----------------------|---------|----------------------------------|---|------------------|
| PAC1 | forward | TATTACTACCTGTCGGTG AAG | 52 | 213 |
| | reverse | ATGACTGCTGTCC TGCTC | | |
| VPAC1 | forward | TTT GAG G AT TTC GGG TGC | 53 | 266 |
| | reverse | TGG GCC TTA AAG TIG TCG | | |
| VPAC2 | forward | CTC CTG GTA GCC ATC CTT | 53 | 149 |
| | reverse | ATG CTG TGG TCG TTT G TG | | |
| PKA (Prkaca) | forward | GCAAAGGCTACAACAAGGC | 53 | 280 |
| | reverse | ATGGCAATCCAGTCAATCG | | |
| Sox9 | forward | GTA CCC GCA TCT GCACAA CG | 62 | 521 |
| | reverse | GTG GCA AGT ATT GGTCAA ACT CAT T | | |
| Sox10 | forward | ACG ACT GGA CG C TGG TGC | 58 | 283 |
| | reverse | CGC CGA GGT TGG TAC TTG TAG | | |
| PP2A (Ppp2ca) | forward | CTC TGC GAG AAG GCT AAA | 54 | 436 |
| | reverse | TGA TTC CCT CGG AGT ATG | | |
| Collagen IV (Col4a1) | forward | TCG GCT AIT CCT TCG TG ATG | 52 | 209 |
| | reverse | GG ATGGCGTGGGCTTCTT | | |
| Collagen IX (Col9a3) | forward | CAG GTT CCG ATG G TC TTC C | 55 | 492 |
| | reverse | CTG TTG CTC CCT TGT CCC | | |
| Testatin (Cys9) | forward | CTG GAG GG AGAA GGT AAA | 51 | 142 |
| | reverse | CAG GCA GGT GAA GGT AIT | | |
| Actin (Actb) | forward | GCCAACCGTGAAAAGATGA | 54 | 462 |
| | reverse | C AAG AAGG AAGGCTGGAAAA | | |

1. táblázat

A kutatás során PCR kísérletekben alkalmazott primerek adatai.

A különböző gének primerjeit PrimerBlast freeware program alkalmazásával terveztük, melyet az IDT (Integrated DNA Technologies, Interleuvenlaan, Belgium) gyártott le (1. táblázat). A vizsgált gének amplifikációját Thermal Cycler (Labnet MultiGene™ 96-well Gradient Thermal Cycler; Labnet International, Edison, NJ, USA) segítségével kiviteleztek. Az első, 2 perc 95°C-os lépést követően zajlott a hibridizáció 35 ciklusban (30 másodperc 94°C-os denaturálást követően 45 másodperc anelláció a mindenkori primerpár optimalizált reakcióhőmérsékletén, majd DNS szintézis 72°C-on 90 másodpercig), végül az utolsó lépés következett 7 perc 72°C-os hőmérsékleten. A PCR termékek futtatása 1.2%-os, etídium-bromid tartalmú agaróz-gélen történt (120 V feszültségen, 300 mA áramerősséggel, 01:45 idővel). Ezt követően a gél sávjait FluorChem E gél dokumentációs rendszer (FluorChem E, ProteinSimple, CA, USA) segítségével UV fény alkalmazásával fotó dokumentáltuk. A PCR termékek megfelelő sávjainak integrált denzitásértékét ImageJ 1.40 g freeware program segítségével határoztuk

meg. Minden gén integrált denzitásértékét a saját háztartási gén integrált denzitásértékére normáltuk, majd ezt követte a statisztikai kiértékelés.

III.1.4. Western blot

Egy állatból az elfelezett gonádokból egy felet Western blot segítségével vizsgáltunk. Egy mintát mechanikai zúzást követően 100 µL proteáz-gátló tartalmú RIPA puffer oldatban homogenizáltunk. A szuszpenziót 30 másodpercig 40 A pulzációval szonikáltuk (Ultrasonic Processor, Cole-Parmer, IL, USA). A minták fehérjekoncentrációját BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével határoztuk meg. Az abszorbanciareakción alapuló koncentráció-meghatározás során MicroWin 2000 szoftver alkalmazásával ismert standard koncentrációjú BSA hígítási sor abszorbancia-görbéjéhez viszonyítottuk a minták abszorbancia értékét. A görbe meredekségéből és az abszorbancia értékekből visszakövetkeztettünk a minták fehérjekoncentráció értékére. Az abszorbanciaértékeket 570 nm-es hullámhosszon Hidex Bioscan Plate Chameleon Luminometer (Hidex, Turku, Finland) segítségével detektáltuk. Ezt követően, a fehérjesuszpenziók denaturálását és az egységes fehérjekoncentráció elérését 1×-es Laemmli puffer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) hozzáadásával 95°C-os hőmérsékleten 10 perc hevítéssel értük el. Egy minta fehérjéinek tömeg szerinti szeparálását 7,5%-os SDS-poliakrilamid gélen való futtatással végeztük el. Ezt követően az elektroforetikus fehérjetranszfer nitrocellulóz membránra történt. A kutatás során a következő molekulák fehérjeexpresszióját vizsgáltuk: PAC1R, VPAC1R, VPAC2R, PKA, Sox9, P-Sox9, Sox10, PP2A, IV-es típusú kollagén, IX-es típusú kollagén és testatin. Belső kontrollként az aktin fehérjeexpresszióját detektáltuk (2. táblázat).

| Antitest | Gazdaállat | Hígítás | Gyártó |
|---------------|--------------------|-------------|--|
| Anti-Col. IX | nyúl, poliklonális | 0,388888889 | Abcam, Cambridge, UK |
| Anti-Col. IV | nyúl, poliklonális | 0,597222222 | Abcam, Cambridge, UK |
| Anti-Testatin | nyúl, poliklonális | 0,25 | Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA |
| Anti-PKA C | nyúl, poliklonális | 0,458333333 | Cell Signaling, Danvers, MA, USA |
| Anti-Sox9 | nyúl, poliklonális | 0,458333333 | Abcam, Cambridge, UK |
| Anti-P-Sox9 | nyúl, poliklonális | 0,597222222 | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Anti-Sox10 | nyúl, poliklonális | 0,388888889 | Abcam, Cambridge, UK |
| Anti-PP2A C | nyúl, poliklonális | 0,458333333 | Cell Signaling, Danvers, MA, USA |
| Anti-Actin | egér, monoklonális | 1:10000 | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |

2. táblázat

A kutatás Western blot kísérleteiben és immunhisztokémiai festései során alkalmazott primer antitestek adatai.

A nitrocellulóz membrán aspecifikus jeleinek blokkolását 5%-os tejporos PBS oldattal végeztük. A mindenkori vizsgált fehérje ellen termeltetett primer antitest bekötődési reakciója egy éjszakán át 4°C-os hőmérsékleten zajlott. A primer antitest tejporos PBS oldatban történő hígítását a gyártó ajánlásának megfelelően végeztük. A be nem kötődött antitestek eltávolítása 0,1%-os Tween 20-at (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) tartalmazó PBS oldattal (PBST) történt. A peroxidáz-enzim konjugált szekunder antitestek (anti-rabbit, illetve anti-mouse IgG, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) hígítását 1:1500 arányban PBST oldatban végeztük. A szekunder antitestek bekötődési reakciója 60 percen át, folyamatos rázatás mellett (100 rpm) 37°C-on történt. A be nem kötődött antitestek eltávolítása szintén PBST oldattal történt. A nitrocellulóz membrán fehérjesávjait kemilumineszcens kit (Advansta Inc; CA, USA) alkalmazásával, a gyártó ajánlásának megfelelően, FluorChem E géldokumentációs rendszer (FluorChem E, ProteinSimple, CA, USA) segítségével fotó dokumentáltuk. A vizsgált fehérjék megfelelő kDa tömegű sávjainak integrált denzitásértékét ImageJ 1.40 g freeware program segítségével határoztuk meg. Minden fehérje integrált denzitásértékét a saját belső kontroll (aktin) integrált denzitásértékére normáltuk, majd ezt követte a statisztikai kiértékelés.

III.1.5. Immunhisztokémiai festés

A szövetek HE festésénél részletezett módon (ld. III.1.2.) elkészített szövettani preparátumokat immunhisztokémiai festési eljárással is vizsgáltuk. A kutatás során a következő molekulákat detektáltuk: P-Sox9 és IV-es típusú kollagén (2. táblázat). A herékből készített metszeteket deparaffinálást, valamint leszálló alkoholsorral és PBS oldatokkal történő hidrálást követően előkészítettük a festési eljárásra. A preparátumok nem specifikus kötőhelyeit 1%-os BSA (Amresco LLC-VWR Life Science Products, OH, USA) tartalmú PBS oldattal blokkoltuk 37°C-on 60 percig. PBST oldatos mosást követően a mindenkori vizsgált molekula ellen termeltetett primer antitest bekötődési reakciója egy éjszakán át 4°C-on zajlott. A PBST oldatban történő primer antitest hígításának mértékét a gyártó javaslata alapján határoztuk meg. A be nem kötődött antitestek kimosása PBST oldattal történt. A fluoreszcens festékekkel jelölt szekunder antitestek (Alexa Fluor™ antibody, Life Technologies Corporation-Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) bekötődési reakciója sötétkamrában szobahőmérsékleten 120 percig zajlott. Az antitestek hígításának aránya PBST oldatban 1:1000 volt. A be nem kötődött antitestek kimosása szintén PBST oldattal történt. Ezt követően a preparátumok fedését DAPI-tartalmú Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, Peterborough, England) fedőanyaggal végeztük. Az immunfluoreszcens metszetek fotódokumentálása DP74 kamerával ellátott Olympus Bx53 mikroszkóppal (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) történt cellSense Entry 1.5 szoftver (Olympus, Shinjuku, Tokyo, Japan) használatával.

III.1.6. Statisztikai analízis

Jelen kutatásban a három vizsgált csoportból (WT, AD és TAD) nyert eredményeket hasonlítottuk össze. Egy csoportban 5-5 egyed vizsgáltunk. Az AD csoport eredményeit a WT csoport, a TAD eredményeit pedig az AD csoport eredményeivel hasonlítottuk össze. A PCR és a WB kísérletekben minden denzitásértéket a háztartási gén, illetve a háztartási fehérje (mindkét esetben az aktin bizonyult a legstabilabbnak) denzitásértékére normáltunk. A vizsgált csoportok saját kontrolljához viszonyított szignifikáns eltéréseit kétmintás t-próba alkalmazásával mutattuk ki. A szignifikancia küszöbértékét $p < 0,05$ értékben határoztuk meg. A vizsgált csoportoknál a kontroll csoportjához viszonyítás mértékét 0,0-1,0 értékben adtuk meg. Az ábrák az eredmények demonstrálását szolgálják, melyek mind az 5 egyed csoporton belüli normált denzitásértékeit tükrözik.

III.2. A második kutatásrész során alkalmazott anyagok és módszerek

III.2.1. A klinikai adatok gyűjtése

A klinikai adatok gyűjtése a Debreceni Egyetem Egészségügyi Finanszírozási és Kontrolling Igazgatóság Betegdokumentációs Osztály által biztosított lista alapján a DE KK E-MedSolution rendszeréből történt (Debreceni Egyetem Klinikai Központ Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottság kutatásra kiadott engedélyszáma: H.0180-2020). Az általunk kért lista a 2017 januárja és 2020 márciusa között a DE KK Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáról DE KK Patológia Intézetbe „Szabálytalan havivérzés k.m.n.” (N9260) BNO kóddal feladott műtéti minták, illetve az operált betegek adatait tartalmazták. Összesen 1162 eset zárójelentését és az eltávolított minták kórszövettani leletét tanulmányoztuk át. Minden esetben egy táblázatban rögzítettük a következő adatokat: a beteg életkora, az elvégzett műtét típusa, a műtét indikációja, a minta kórszövettani diagnózisa, illetve volt-e a páciens kórelőzményében endometriosis vagy adenomyosis.

III.2.2. A kórszövettani diagnózisok csoportosítása

Az összes eltávolított méhnyálkahártya minta esetében 21 féle kórszövettani diagnózis került leírásra. Patológus kolléga javaslatára, annak céljából, hogy áttekinthetőbb legyen az eredmények értékelése, a hasonló tulajdonsággal bíró kórszövettani diagnózisokat nagyobb csoportokba soroltuk (3. táblázat). Ezzel a módszerrel 10 kórszövettani csoport számadatait tudtuk áttekinteni, és mindezekből következtetéseket levonni. Az említett csoportok a következők voltak: proliferációs fázisképű endometrium, szekréciós fázisképű endometrium, menstruációs fázisképű endometrium, exogén hormonhatás jeleit mutató endometrium, menopauzális endometrium, további kórszövettani elemzésre alkalmatlan endometrium, endometrium polypus, endometrium hyperplasia, malignus tumor és endometritis.

III.2.3. A klinikai és a kórszövettani kizárási és beválogatási kritériumok

Az operáció során egy betegből eltávolított szövet kórszövettani diagnózisa ismeretlen a műtét időpontjában. Ahhoz, hogy növeljük annak esélyét, hogy egy alapkutatásokat (molekuláris kutatásokat) végző laboratóriumba egészséges méhnyálkahártya szövet érkezzon, célszerű klinikai szempontok alapján kizárási és beválogatási kritériumokat alkalmaznunk (4. táblázat). Minden olyan körülmény kizárandó tényezőt jelent, amely az endometrium kóros állapotára utalhat. Ennek figyelembevételével kizárásra kerültek azok az esetek, ahol az operált beteg 45 évnél idősebb volt, illetve ahol a preoperatív vizsgálatok az endometrium kóros állapotát bizonyították, vagy annak gyanúja merült fel (pl.: ultrahang vizsgálattal igazolt megvastagodott

endometrium, illetve endometrium polypus). Kizárásra kerültek továbbá azok az esetek, ahol a méhnyálkahártya kinyerése csupán kiegészítő része volt egy nőgyógyászati műtétnek (pl.: cervicalis polypus ablatio, LEEP műtét), valamint ahol a beteg kórelőzményében a méhnyálkahártya igazolt elváltozása, illetve endometriosis szerepel. Mindezek mellett kizárásra kerültek olyan kórállapotok, amelyek megváltoztathatják, illetve befolyásolhatják az endometrium élettani folyamatait. Ilyen műtéti javallatot jelentett a perimenopauzális, illetve a posztmenopauzális vérzés, a cervicalis cytológiai atypia, a méhen belüli eszköz (IUD) eltávolítása, valamint a preoperatív méhkaparás egy igazolt méhen belüli elváltozás (pl.: tumor) miatt.

A felsorolt kizárási kritériumokat figyelembe véve, klinikai szempontok alapján molekuláris vizsgálatra való bevonásra kerültek a következő esetek (beválogatási kritériumok): ahol az operált beteg 45 évnél fiatalabb volt, valamint a nőgyógyászati műtét kizárólag az endometrium méhüregből való kinyerését célozta. Ezek a műtétek a méhnyálkahártya kaparás (D&C: curettage, fractionált curettage, abrasio, fractionált abrasio), illetve a méhnyálkahártya biopsziás (HSC: HSC + endometrium biopszia és TCRE) műtétek voltak. Beválogatásra kerültek továbbá azok az esetek, ahol a műtét javallata vérzészavar miatt történt (pl.: elhúzódó, bő hüvelyi vérzés, irreguláris menzesz).

A minta kórszövettani diagnózisa csak a minta patológiai vizsgálata után válik ismertté. Retrospektív vizsgálattal így csak az egészséges szövetek kerülhetnek alapkutató vizsgálatra való bevonásra. Ennek alapján kórszövettani beválogatási kritériumot jelentett a proliferációs és a szekréciós fázisképet mutató endometrium. Minden egyéb diagnózis, amely a méhnyálkahártya kóros állapotára utal, vagy annak fiziológiás működését befolyásolja kórszövettani kizárási feltételt jelentett.

III.2.4. Matematikai analízis

A korábban említett 10 vizsgálati csoport eseteinek adatait százalékos értékre konvertáltuk, hogy az eredmények és azok kiértékelése átláthatóbbá váljon.

| CSOPORTOK | KÓRSZÖVETANI DIAGNÓZISOK |
|--------------------------------------|--|
| Proliferációs fázisképzű endometrium | - Proliferációs fázisképzű endometrium |
| Szekréción fázisképzű endometrium | - Szekréción fázisképzű endometrium |
| Menstruációs fázisképzű endometrium | - Menstruációs fázisképzű endometrium |
| Exogén hormonhatás | - Pszeudo-decidualizáció - Gesztagén hatás jeleit mutató endometrium |
| Menopauzális endometrium | - Pszeudo-menopauzális endometrium - Endometrium atrophia |
| Elemzésre alkalmatlan minta | - Deszkvamált endometrium - Inadekvát minta - Submucosus leiomyoma |
| Endometrium polypus | - Polypus endometrii |
| Endometrium hyperplasia | - Simplex endometrialis hyperplasia - Simplex glandularis endometrialis hyperplasia - Komplex endometrialis hyperplasia - Adenomatous endometrialis hyperplasia - Simplex glandularis atipusos endometrialis hyperplasia - Komplex atipusos endometrialis hyperplasia |
| Malignus tumorok | - Endometrioid adenocarcinoma - Carcinosarcoma uteri |
| Endometritis | - Akut endometritis - Krónikus endometritis |

3. táblázat

Az áttekinthetőbb eredmények értékelése érdekében, a hasonló tulajdonsággal bíró kórszöveti diagnózisokat nagyobb csoportokba soroltuk.

| KLINIKAI BEVÁLOGATÁS | Műtéti típus | Műtét javallata | Életkor | Kórszöveti diagnózis | Endometriosis / adenomyosis |
|----------------------|---|------------------------------|---------|--|-----------------------------|
| | frakcionált curettage (Fr.cu.) | elhúzódó, bő vérzés (HMB) | 46 | proliferációs fázisképzű endometrium | nincs |
| | LEEP + curettage | cervicalis cytológiai atypia | 28 | CIN-II, proliferációs fázisképzű endometrium | nincs |
| | frakcionált curettage (Fr.cu.) | elhúzódó, bő vérzés (HMB) | 39 | proliferációs fázisképzű endometrium | nincs |
| | frakcionált curettage (Fr.cu.) | elhúzódó, bő vérzés (HMB) | 44 | rendezetlen proliferatív endometrium | nincs |
| | hysteroscopia (HSC) | kóros ultrahang lelet | 44 | proliferációs fázisképzű endometrium | nincs |
| | hysteroscopia (HSC) | elhúzódó, bő vérzés (HMB) | 26 | proliferációs fázisképzű endometrium | van |
| | hysteroscopia (HSC) | elhúzódó, bő vérzés (HMB) | 31 | proliferációs fázisképzű endometrium | nincs |
| | transcervical resection of polyp (TCRP) | kóros ultrahang lelet | 28 | rendezetlen proliferatív endometrium | nincs |
| | hysteroscopia (HSC) | kóros ultrahang lelet | 39 | proliferációs fázisképzű endometrium | nincs |
| | frakcionált curettage (Fr.cu.) | kóros ultrahang lelet | 48 | proliferációs fázisképzű endometrium | nincs |

| | |
|--|-----------------------------|
| | beválogatásra kerülő eset |
| | kizárásra kerülő eset |
| | kizárás kórszöveti ok miatt |
| | kizárás klinikai ok miatt |

4. táblázat

Több példa annak bemutatására, melyek voltak azok a klinikai és kórszöveti szempontok,

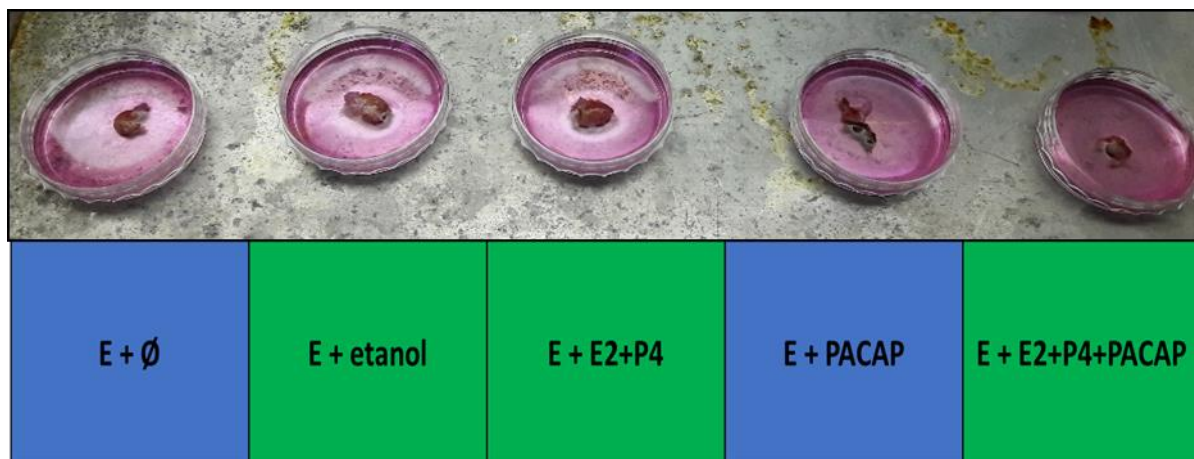
amelyek alapján a különböző méhűri minták beválogatásra, illetve kizárásra kerültek a kutatás során.

III.3. A harmadik kutatásrész során alkalmazott anyagok és módszerek

III.3.1. A szövettenyésztési eljárás

A kutatást a DE KK Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika munkatársaival kollaborációban végeztük, akik kétféle mintát biztosítottak számunkra: ovarialis endometrioid cysta fal részletet (ectopiás endometrium minta), illetve HSC műtét során méhűrből nyert méhnyálkahártya szövetet (eutopiás endometrium). Az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága (ETT TUKEB) által kutatásra kiadott engedélyszáma: 28966-2/2018/EKU. Laborunk kérésére, mindkét típusú mintát csak az alábbi esetekben fogadtuk be: az operált betegek életkora 18 és 45 év közé esett, a pácienseknek nem volt krónikusan kezelt társbetegsége, illetve nem alkalmaztak tartósan gyógyszereket. A műtét során eltávolított szöveteket átszállításig steril fiziológiás sóoldatban tárolták. Minden minta esetében tájékoztatást kértünk az operált beteg életkoráról (születési dátum), az utolsó rendes menstruációjának 1. napjáról (URM-1.) és a küldött minta típusáról.

Az operációt követően, a Jelátviteli Laboratóriumunkba átszállított mintákat 37°C-os steril fiziológiás sóoldattal többször átmostuk, melynek célja a vér, illetve a kisebb szövettörmelékek eltávolítása volt. Mind az eutopiás, mind az ectopiás minták esetében a kutatás során 5 kezelési csoportot alakítottunk ki. A kontroll csoporton kívül, a mintákat női nemi hormonokkal, vagyis ösztadiol (17 β -estradiol, E2) és progeszteron (P4) oldatokkal, PACAP oldattal, valamint hormonokkal és PACAP-pal együttesen kezeltünk. Továbbá egy etanolos kontroll csoport kialakítása is szükséges volt, mivel a progeszteront abszolút etanolban oldottuk fel. A műtét napján beérkezett mintát ennek megfelelően 5 egyenlő részre osztottuk, a szövetdarabokat 60 \times 15 mm-es sejtkultúra tenyésztésére alkalmas petri csészékben (Eppendorf, North America, Inc; New York, NY, USA) helyeztük el (13. ábra). A felosztott szövetdarabok tenyésztő csésze felületéhez való tapadása érdekében a petri csészék aljára 15 μ L matrigel cseppet (Cultrex® BME, Type 2) oszlattunk el. Tenyésztő médiumként 4,5 g/l glükózkoncentrációjú DMEM (HG-DMEM) oldatot (Lonza, Bend, OR, USA) használtunk, melyet a kezelés időtartama alatt minden nap cseréltünk. Az URM-1. ismeretében a kezelés időtartama a menstruációs ciklus 24. napjáig tartott. A minták aktuális ciklusállapotát (azaz amelyik ciklusnapon a szövet eltávolítása megtörtént) szintén az URM-1. ismeretében számoltuk ki.



13. ábra

A kutatás során 5 kezelési csoportot hoztunk létre: 1. kezeletlen kontroll minták, 2. etanolos kontroll minták, 3. hormonkezelt minták, 4. PACAP-kezelt minták, 5. hormon- és PACAP-kezelt minták. A hormonkezelt minták változásait az etanolos kontrollcsoport adataival vetettük össze.

A hormonokkal kezelt csoportok esetében célunk volt *in vitro* körülmények között imitálni a menstruációs ciklus során *in vivo* megfigyelhető hormonális változásokat. Ennek elérésére célunk volt továbbá, hogy a tenyésztő médiumban a hormonok végkoncentrációja megegyezzen a szérumban mérhető hormonkoncentrációkkal. Emiatt négyféle hormonoldatot készítettünk az ovarialis ciklus eltérő hormonállapotainak megfelelően. A hormonoldatok végkoncentrációja a médiumhoz való adagolást követően megegyezett a korai folliculáris fázisban, a folliculáris fázisban, az ovulációs fázisban és a luteális fázisban mérhető szérumban határérték koncentrációk átlagával. Az E2-t (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) steril vízben, a P4-et (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) pedig steril abszolút alkoholban oldottuk fel. Az alacsony hormonkoncentrációk elérését törzsoldatok hígításával értük el.

A hormonkezelt csoportok esetében a kezelést a minta mindenkori ciklusállapotának megfelelő koncentrációjú E2 és P4 oldatokkal kezdtük el. A kezelések előrehaladtával, amikor a minta egy új ciklusállapotú napot ért el, az adott ciklusstátusznak megfelelő hormonkoncentrációjú oldatokkal folytattuk tovább a kezelést. Példaként említhető, ha egy minta az URM-1. alapján számított 9. napon érkezett laborunkba, akkor először a follicularis fázisnak megfelelő koncentrációjú oldatokkal kezeltük 3 napig, majd az ovulációs fázisnak megfelelő hormonkoncentrációjú oldatokkal 5 napig, végül a luteális fázisnak megfelelő koncentrációjú oldatokkal további 8 napig, vagyis a 24. ciklusnapig.

| MENSTRUÁCIÓS | | | | PROLIFERÁCIÓS | | | | | | | | SZEKRÉCIÓS | | | | | | | | | | | |
|--|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|---|----|----|----|----|----|---|----|----|----|----|----|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 |
| KORAI FOLLIKULÁRIS FÁZIS E2 = 8,5 – 75 ng/L → 42 ng/L | | | | FOLLIKULÁRIS FÁZIS E2 = 12,5 – 166 ng/L → 89 ng/L P4 = 0,06 – 0,9 µg/L → 0,5 µg/L | | | | | | | | OVULÁCIÓS FÁZIS E2 = 85,8 – 498 ng/L → 292 ng/L P4 = 0,1 – 12 µg/L → 6,1 µg/L | | | | | | LUTEÁLIS FÁZIS E2 = 43,8 – 211 ng/L → 112,7 ng/L P4 = 1,8 – 24 µg/L → 12,9 µg/L | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

14. ábra

A hormonkezelt minták tenyésztése a fentiek alapján történt. A menstruációs ciklus mindenkor napján beérkezett szövetet az URM-1. napja ismeretében a 24. napig folytattuk. Az alkalmazott hormondózisoknál az ovarialis ciklus normál E2 és P4 szérumszintjeinek átlagát vettük alapul. Az endometrialis ciklus (menstruációs, proliferációs és szekréciós fázisok) előrehaladtával, a ciklusnapnak megfelelő hormonkoncentrációkat hoztuk létre a minták médiumában.

A PACAP-kezelt csoportok esetében PACAP 1-38 oldatot használtunk. Korábbi szövettenyésztési tapasztalatokból kiindulva, a PACAP médiumban mérhető végkoncentrációját 1 ng/ml-ben határoztuk meg.

Mivel a HG-DMEM médiumot minden nap cseréltük a minták minden csoportján, a hormon- és PACAP-kezelt csoportok esetében a kezelőanyagokat is mindig frissen adagoltuk a médiumhoz.

Jelen kutatásban 6 db ectopiás mintát és 3 db eutopiás mintát használtunk fel.

III.3.2. A szövetek HE festése és kórszöveti elemzése

Jelen kutatás alapfeltétele volt, hogy az ectopiás minták esetében kórszöveti vizsgálattal igazoljuk az endometriosiszt, illetve eutopiás minták esetében kizárólag patológiamentes méhüri endometriumot (azaz proliferációs vagy szekréciós fázisképű) vizsgáljunk. A laborba érkező minta méretének függvénye volt, hogy egy kis darab szövetet HE festési eljárással vizsgáljunk tovább, így igazolva a kórszöveti státuszát. Amennyiben a minta mérete ezt nem tette lehetővé, a DE KK E-MedSolution rendszerben utólagosan ellenőriztük, hogy az egy betegből eltávolított, patológiai vizsgálatra küldött minta kórszöveti vizsgálata során mit diagnosztizáltak. Az eutopiás szövetek esetében kizárásra került minden olyan minta, amelynél a normál fázisképű endometriumtól különböző

kórszöveti eltérés igazolódott. Az ectopiás minták esetében a kórszöveti elfogadott diagnosztikus kritériumok teljesülése jelentett vizsgálatba való beválogatási feltételt, azaz az endometrialis mirigysejtek, az endometrialis stromasejtek és a haemosiderin tartalmú macrophagok közül legalább kettő sejttípus jelenléte a szövetben.

Amennyiben a minta mérete lehetővé tette, egy mintadarabot HE festési eljárással vizsgáltunk tovább. A szövetet 4%-os paraformaldehid-oldatban fixáltuk. Paraffinálás után 5 µm vastagságú metszeteket készítettünk, amelyeket StarFrost (StarFrost® microscope slides Knittel Glass, Brunswick, Germany) tárgylemezeken rögzítettünk. Ezt követően, a metszeteket hematoxilín-eozin (HE, Sigma-Aldrich, MO, USA) szövettani festési eljárással, a forgalmazó instrukciói alapján megfestettük. A HE metszeteket DP74 kamera (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) használatával, Olympus Bx53 mikroszkóppal (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) fotó dokumentáltuk. A HE festett szövetek kórszöveti elemzése patológus kolléga segítségével történt.

III.3.3. Konvencionális RT-PCR

A fentebb részletezett szövettenyésztési rendszert alkalmazva, mind az ectopiás, mind az eutopiás minták esetében a kezelések utolsó napja a 24. ciklusnap volt. A 25. ciklusnapon történt a mintákból való RNS izolálás. Az RNS kinyerésére spin-oszlop alapelven működő Invitrogen™ PureLink™ RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) izoláló kitet alkalmaztunk. Az RNS kinyerésének és tisztításának lépéseit a gyártó ajánlott protokollja alapján határoztuk meg. A 25. ciklusnapon egy adott minta mind az öt kezelési csoportjánál a médium leszívását követően 3× steril fiziológiás sóoldatos mosás következett. A szöveteket tartalmazó petri csészéket ezután alufóliával fedett jégrétegre helyeztük a mintázás kivitelezéséig, amelynél egy instrukcióink alapján külön erre a célra gyártott, mechanikai erőkar-elven működő, hőlégenderizálóban sterilizálható acéleszközt használtunk. Egy kezelési csoport szövetét a zúzóeszköz előzetesen folyékony nitrogénnel feltöltött tartályrészebe helyeztük. Az így megkeményedett szövetet a tartályba illeszkedő préshenger segítségével zúztuk össze, majd előzetesen 4°C-ra hűtött lízispuffer oldatot tartalmazó centrifugacsőbe (Falcon 352099 15 mL Disposable Sterile Conical Centrifuge Tubes, General Laboratory Supply Inc; Pasadena, TX, USA) helyeztük. Az adott minta kezelési csoportjai reggeli órákban kerültek a lízispuffer oldatba. Napközben 4°C-on, hűtőszekrényben zajlott a lízis folyamata, a szöveteket pufferoldatban 2 óránként ráztattuk. Az RNS izolálás és a tisztítás folyamatát a kit protokollját követve, a kora esti órákban kezdtük el. Az izolált totál RNS-t 30 µL nukleázmentes vízben (NFW) oldottuk fel. Ezt követően a minták tisztaságát és az RNS

koncentrációját Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) készüléssel detektáltuk MicroWin 2000 szoftver alkalmazásával. A mintákat a másnap történő reverz transzkripcióig -70°C -on tároltuk. Az összes vizsgálati csoport azonos RNS koncentrációra történő hígítását követően, a reverz transzkripciót High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) segítségével végeztük el. A kutatás során a következő molekulák mRNS expresszióját vizsgáltuk: prePACAP, PAC1R, VPAC1R, VPAC2R, TGF β -1, TGF β R-I, TGF β R-II, Smad2, Smad3, Oct4, Nanog, Sox2, p21, VEGF és Aromatáz. Háztartási géneként a GAPDH bizonyult a legstabilabbnak. A különböző gének primerjeit PrimerBlast freeware program alkalmazásával terveztük, melyet az IDT (Integrated DNA Technologies, Interleuvenlaan, Belgium) gyártott le (5. táblázat).

| Gén | Primer | Nukleotid szekvencia | Anellációs hőmérséklet (T _m - °C) | T _m átlag | Termékhossz (bp) |
|--------------------------|---------|--------------------------|--|----------------------|------------------|
| TGF β -1 (TGFB1) | Forward | CACCACACCAGCCCTGTTC | 58,8 | 58,3 | 157 |
| | Reverse | CTTGCAGGTGGATAGTCCCG | 57,7 | | |
| TGF β R-I (TGFB1) | Forward | GCTTAGGGGTGTGGTCTTC | 57,7 | 57,6 | 110 |
| | Reverse | AAGCCAAGTTTTACCCCCA | 57,4 | | |
| TGF β R-II (TGFB2) | Forward | GCACGTT CAGAAGTCGGATG | 56,1 | 56,5 | 131 |
| | Reverse | CTGCACCCTTGTGTGTCAGTG | 56,8 | | |
| Smad2 (Smad2) | Forward | GCTCTTCTGGCTCAGTCTGTT | 56,9 | 55,5 | 179 |
| | Reverse | CCAGAATATGCAAGATGCAATGA | 54,0 | | |
| Smad3 (MADH3) | Forward | GGCTGTCTACCAGTTGACCC | 57,6 | 57,6 | 167 |
| | Reverse | GCTGGCCTAGCTCATCTCTG | 57,5 | | |
| Nanog (NANOGP8) | Forward | AAGGCCTCAGCACCTACCTA | 57,7 | 57,5 | 181 |
| | Reverse | TGCACCAGTCTGAGTGTTC | 57,2 | | |
| VEGF (VEGFA) | Forward | TCTGCTGTCTTGGGTGCATT | 57,1 | 57,1 | 148 |
| | Reverse | GCAGTAGCTGCGCTGATAGA | 57,0 | | |
| Sox2 (SOX2) | Forward | GACAGTTACGCGCACATGAA | 55,8 | 57,0 | 176 |
| | Reverse | TAGGTCTGCGAGCTGGTCAT | 58,1 | | |
| Aromatase (CYP19A1) | Forward | TCTCGATTCCGGCAGCAACT | 56,9 | 56,9 | 125 |
| | Reverse | GGGCCTGACAGAGCTTTCATA | 56,9 | | |
| Oct4 (POU5F1) | Forward | TGACCGCATCTCCCCTCTAA | 57,7 | 57,0 | 353 |
| | Reverse | GGGTTTCTGCTTTGCATATCTCC | 56,2 | | |
| p21 (CDKN1A) | Forward | GCATGATCTGAGTTAGGTCCACCA | 56,5 | 57,3 | 171 |
| | Reverse | ACATGGCGCCTGAACAGAAG | 58,1 | | |
| Prdm4 (PRDM4) | Forward | CCCGAACATGGACCAGTGAC | 58,1 | 56,8 | 126 |
| | Reverse | TCCAGTCCATACACCAACTTCT | 55,5 | | |
| prePACAP (ADCYAP1) | Forward | AGCACTTTGCGGTAGGC | 57,5 | 57,0 | 176 |
| | Reverse | CCAGAGGAAGAGGCGTAC | 56,5 | | |
| PAC1R (ADCYAP1R1) | Forward | TCATCCTTTGTGCTTCC | 54,6 | 55,0 | 170 |
| | Reverse | GACGGCCTTACATTCCAC | 55,5 | | |
| VPAC1R (VIPR1) | Forward | CTTCACACTGACACCAGGAGG | 60,3 | 61,3 | 129 |
| | Reverse | GTTTCCTCATCTCTGCCGTTCCA | 62,3 | | |
| VPAC2R (VIPR2) | Forward | CGTTCCCAGATTTTCGTCG | 56,0 | 56,5 | 149 |
| | Reverse | GAGGCACAGAATTATGCTTCC | 57,0 | | |

5. táblázat

A kutatás során PCR kísérletekben alkalmazott primerek adatai.

A vizsgált gének amplifikációját Thermal Cycler (Labnet MultiGeneTM 96-well Gradient Thermal Cycler; Labnet International, Edison, NJ, USA) segítségével kiviteleztek. Az első, 2 perc 95°C -os lépést követően zajlott a hibridizáció 35 ciklusban (30 másodperc 94°C -os denaturálást követően 45 másodperc anelláció a mindenkor primerpár optimalizált reakcióhőmérsékletén, majd DNS szintézis 72°C -on 90 másodpercig), végül az utolsó lépés következett 7 perc 72°C -os hőmérsékleten. A PCR termékek futtatása 1,2%-os, etidium-bromid tartalmú agaróz-gélen történt (120V feszültségen, 300mA áramerősséggel, 01:45 idővel). Ezt

követően a gél sávjait FluorChem E géldokumentációs rendszer (FluorChem E, ProteinSimple, CA, USA) segítségével UV fény alkalmazásával fotó dokumentáltuk. A PCR termékek megfelelő sávjainak integrált denzitásértékét ImageJ 1.40 g freeware program segítségével határoztuk meg. Minden gén integrált denzitásértékét a saját háztartási gén integrált denzitásértékére normáltuk, majd ezt követte a statisztikai kiértékelés.

III.3.4. Statisztikai analízis

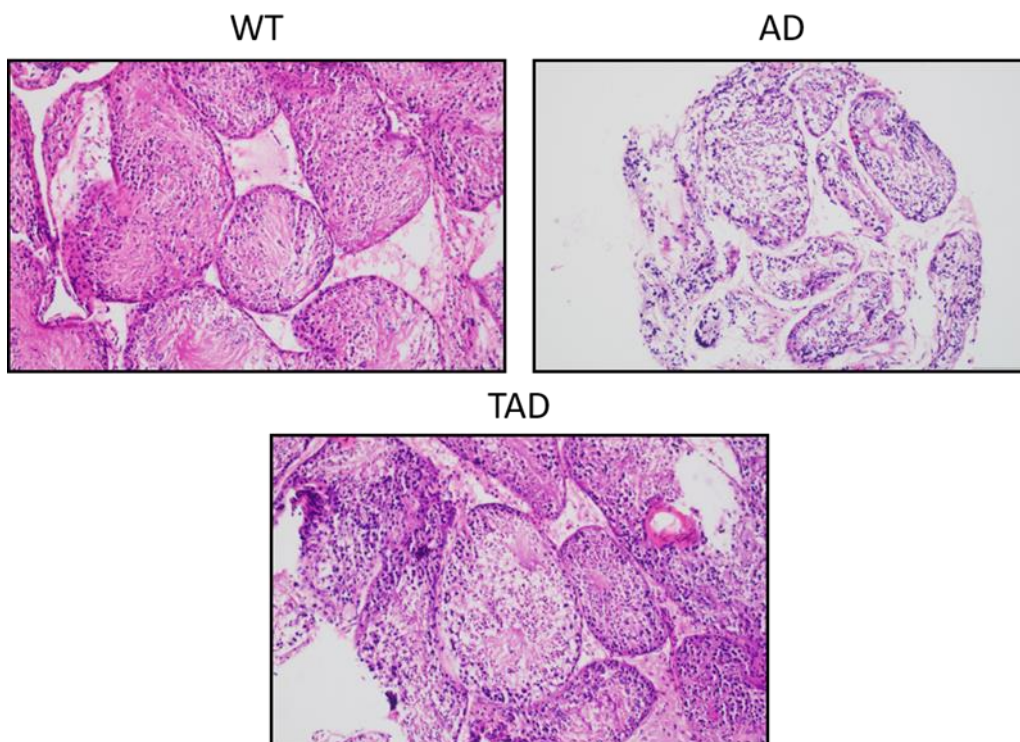
Jelen kutatásban 6 ectopiás mintából és 3 eutopiás mintából nyert eredményeket hasonlítottuk össze. Egy mintánál a kezelési csoportokon belül a PACAP kezelt csoportot a kontroll csoport eredményeihez viszonyítottuk (ectopiás mintánál az ECT+PACAP csoportot az ECT+0 csoporthoz, eutopiás mintánál az EUT+PACAP csoportot az EUT+0 csoporthoz). A hormonkezelt, illetve a hormon- és PACAP-kezelt csoportokat pedig az alkoholos kontroll csoporthoz (ectopiás mintánál az ECT+E2+P4 és ECT+E2+P4+PACAP csoportokat az ECT+etanol csoporthoz, eutopiás mintánál az EUT+E2+P4 és EUT+E2+P4+PACAP csoportokat az EUT+etanol csoporthoz). A kontroll csoportok normált denzitásértékét 100%-nak tekintettük. A különböző kezelési csoportok normált denzitásértékét ehhez viszonyítva konvertáltuk %-os értékre, azaz egy minta esetében azt vizsgáltuk, hogy a kezelési csoportok génexpressziója hány százaléka a kontroll csoportokhoz viszonyítva. Ez a százalékos konvertálás tette lehetővé, hogy a 6 ectopiás, illetve a 3 eutopiás mintából nyert eredményeket össze tudjuk hasonlítani egymással. Az ectopiás minták és az eutopiás minták eredményeit statisztikailag egymással értelemszerűen nem hasonlítottuk össze. A 6 ectopiás, illetve a 3 eutopiás minta egyes kezelési csoportjainak kontroll csoporthoz viszonyított szignifikáns eltéréseit kétmintás *t*-próba alkalmazásával mutattuk ki. A szignifikancia küszöbértékét $p < 0,05$ értékben határoztuk meg. Ezen kívül az összes minta egyes kezelési csoportjain belüli szórásértékeit is meghatároztuk. A táblázatoknál, az összes minta adott kezelési csoportjain belül, a százalékos értékek átlagát ábrázoltuk.

IV. Eredmények

IV.1. Az első kutatásrész eredményei

IV.1.1. A here kanyarulat csatornáinak sejtdenzitása és a membrana basalis vastagsága

Az AD és TAD egerek herecsatornáinak különböző sejttípusainak számát a WT egerek normál fenotípusához viszonyítottuk. Mindemellett, a TAD csoport sejt számait az AD csoport eredményeivel is összehasonlítottuk. A HE festett metszeten 4 sejttípust azonosítottunk és számlálást végeztünk el: spermatogoniumok, spermatocták, spermatozoák és Leydig-sejtek. Az AD egerekben minden sejttípus száma szignifikánsan lecsökkent a herében a WT állatokhoz képest. A sejtdenzitás csökkenése szemmel látható eltérés volt a mikroszkópos kép elemzése közben (15. ábra). A TAD egerekben szintén minden sejttípus száma alacsonyabb volt a WT egyedekhez képest. Megállapítható azonban, hogy a sejt szám értékek normalizálódtak, illetve minden sejttípus száma szignifikánsan növekedett az AD állatok sejt számához képest (16. ábra A).



15. ábra

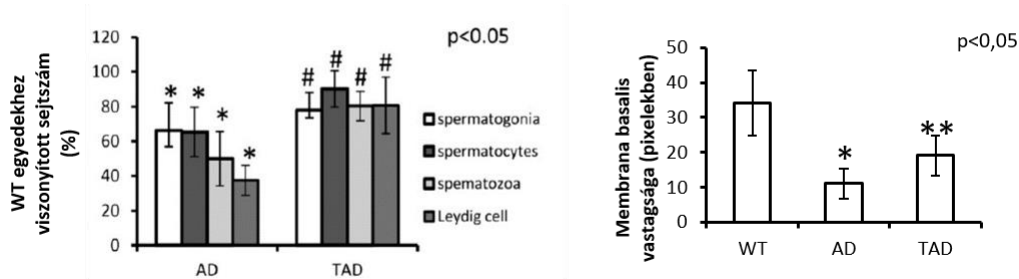
A WT, AD és TAD egyedek heréinek H&E festett metszete, 10× nagyítás. Mikroszkóposan látható az AD állatok sejt sűrűségének csökkenése.

A membrana basalis vastagságának mérése közben hasonló változásokat tapasztaltunk. Az AD egerekben a szövettani réteg vastagsága szignifikánsan lecsökkent a WT állatokéhoz képest. Annak ellenére, hogy a TAD egyedekben a membrana basalis vastagsága szignifikánsan

növekedett az AD egerekhez képest, a vastagság mértéke nem érte el a WT egerekben mérhető értéket (16. ábra B).

A) A kanyarulatos csatornák sejt száma

B) A membrana basalis vastagsága



16. ábra

A) Az AD állatokban a spermatogenezis során differenciálódó sejtek száma szignifikánsan csökkent a WT egyedekéhez képest. Ezt a károsodást az aktív mozgás kompenzálta. (Megj.: spermatogonia: spermatogonia, spermatocytes: spermatocyták, spermatozoa: hímivarsejtek, Leydig cells: Leydig-sejtek) B) Hasonló változás figyelhető meg a membrana basalis vastagságát illetően: TAD állatokban normalizálódik az AD állatokban detektált érték. Szignifikanciaküszöb értéke: $p < 0,05$.

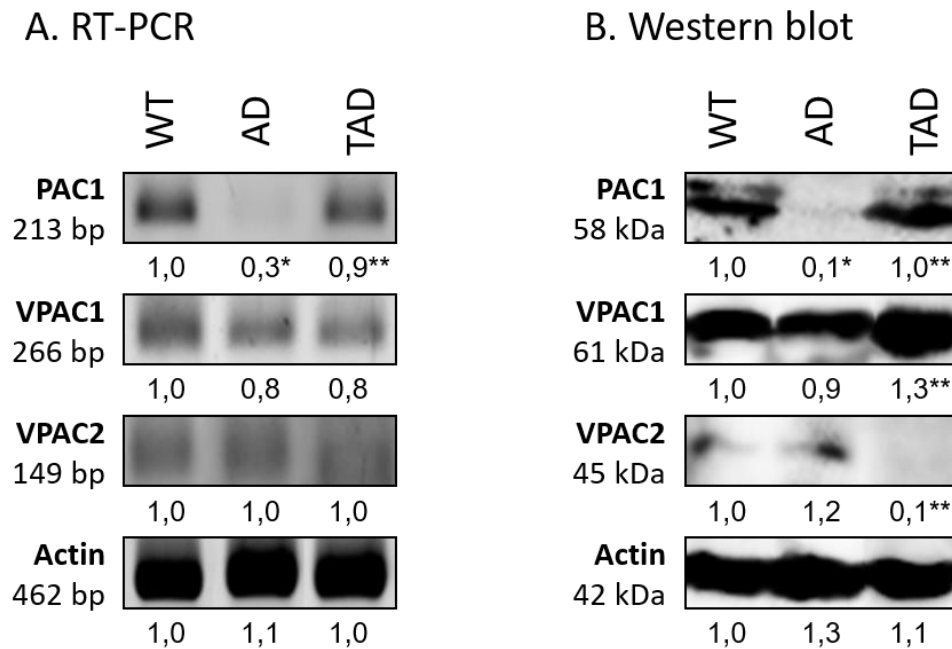
IV.1.2. A PACAP receptorok és a PACAP jelátviteli elemek expressziója

A kutatás során a három PACAP kötő receptor mRNS és fehérjeexpresszióját vizsgáltuk meg: PAC1R, VPAC1R és VPAC2R. Az AD egerek eredményeit a WT egerek eredményeihez viszonyítottuk. Továbbá, a TAD egerek eredményeit összehasonlítottuk az AD egyedek eredményeivel.

Konvencionális RT-PCR segítségével kimutattuk, hogy az AD egerekben a PAC1R expressziója alig detektálható, szignifikánsan lecsökkent a WT egyedekhez képest. A TAD egerekben a receptor mRNS expressziója közel azonos volt, mint a WT állatoké, a korrigált denzitás értéke szignifikánsan növekedett az AD egyedekhez képest. Hasonló, ezzel korreláló változást figyeltünk meg a Western blot analízis során. Az AD egerekben szignifikánsan lecsökkent a PAC1R expressziója a WT egyedekhez képest. A TAD állatokban pedig a fehérjeexpresszió szignifikánsan növekedett az AD állatokhoz képest, mértéke a WT egyedekben megfigyelhetővel azonos volt.

A VPAC1R mRNS expressziója tendenciózusan csökkent a WT egyedekhez képest, az AD és TAD egerekben egyaránt. A TAD állatokban azonban a receptor fehérjeexpressziója szignifikánsan megnövekedett az AD egerekhez képest. Az AD állatokban a VPAC1R fehérjeexpressziója alig tért el a WT egyedekhez képest.

A VPAC2R mRNS-ét alig lehetett detektálni a mintákban, egyik vizsgálati csoportban sem figyeltünk meg eltérést az expresszióban. A fehérjeexpressziót vizsgálva azonban kimutattuk, hogy a TAD állatokban a receptor alig detektálható, expressziójának mértéke szignifikánsan alacsonyabb volt a többi vizsgálati csoporthoz képest (17. ábra).



17. ábra

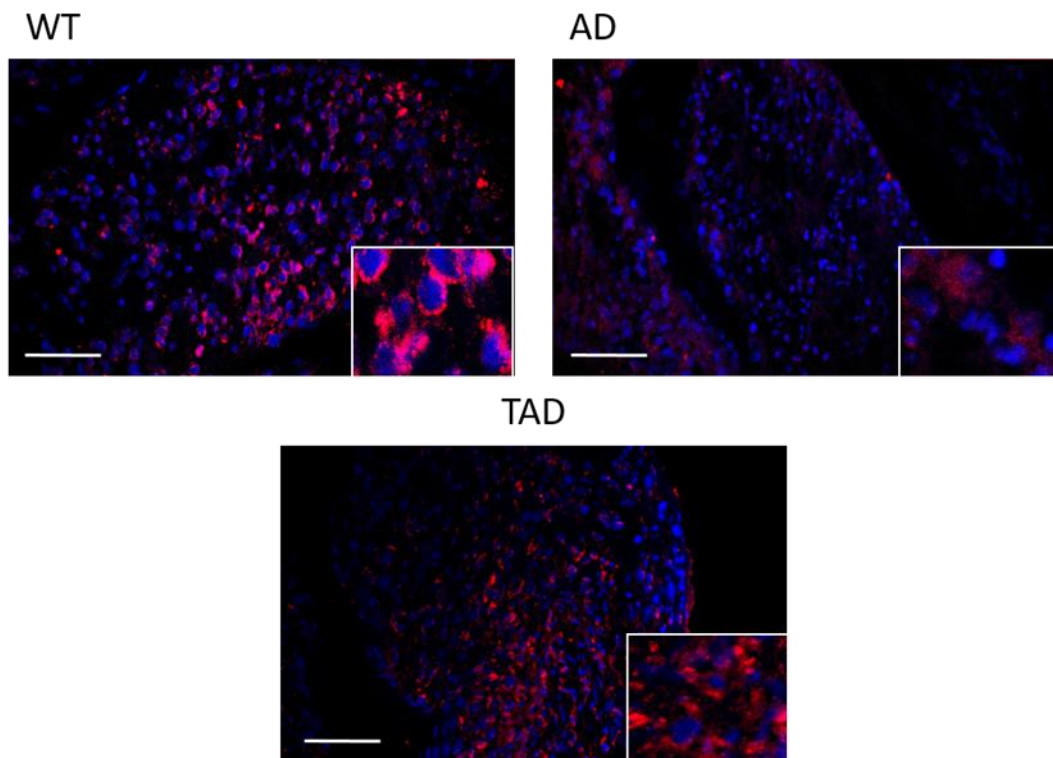
A PACAP receptorok mRNS (A) és fehérjeexpressziós (B) különbségei. A neuropeptidet legnagyobb affinitással kötő PAC1 receptor expressziója sérül az AD egyedekben, míg a fizikai aktivitás ezt az elváltozást kompenzálja. Szignifikanciaküszöb értéke: $p < 0,05$.

A PACAP jelátviteli elemek közül a következő molekulák mRNS expresszióját vizsgáltuk: PKA, Sox9, Sox10 és PP2A. Western blot segítségével ugyanezen molekulák mellett a PKA és Sox9 foszforilált formáinak fehérjemennyiségét is detektáltuk. A P-Sox9 lokalizációját immunhisztokémiai festés segítségével is vizsgáltuk.

A PKA mRNS expressziója a WT állatokhoz viszonyítva szignifikánsan lecsökkent az AD egerekben, míg a TAD egerekben megnövekedett. A TAD egerekben detektált változás szignifikáns volt az AD állatokhoz viszonyítva. A molekula fehérjeexpressziója szintén szignifikánsan csökkent az AD egerekben, míg a TAD állatokban megközelítette a WT egyedekét. A TAD egerekben a PKA fehérjeexpresszió szignifikánsan növekedett az AD állatokhoz képest. A PKA aktívabb, foszforilált formájának mennyisége a TAD egerekben kétszerese volt a WT egerekben detektálható értékhez viszonyítva és szignifikánsan nagyobb az AD egerekben mérhetőhöz képest. Az AD állatokban a P-PKA mennyisége szignifikánsan alacsonyabb volt a WT egyedekhez képest.

A Sox9 mRNS expressziója az AD és TAD csoportban egyaránt csökkent a WT egyedekhez képest. A változás nem volt szignifikáns az AD és WT, illetve a TAD és AD egerek összehasonlítása során. A molekula fehérjeexpressziója az AD és TAD egerekben is magasabb volt a WT egyedekhez képest. A változás szignifikáns volt az AD és WT, illetve TAD és AD egerek összehasonlítása során. A Sox9 aktívabb, foszforilált formájának mennyisége a WT és AD egerekben közel azonos volt, míg a TAD állatokban megemelkedett. A változás az AD egyedekhez viszonyítva szignifikáns volt a TAD egerekben (19. ábra).

Immunhisztokémiai festés során kimutattuk, hogy míg a WT egerekben a P-Sox9 immunpozitivitás a herecsatornácskákban arányosan oszlott el, és dominálón a sejtmagok körül lehetett detektálni, addig az AD állatokban az immunreaktivitás jóval alacsonyabb volt, és a tubuli seminiferi testis perifériásabb részein lehetett megfigyelni. A TAD egerekben a WT egyedekhez hasonló immunreaktivitást figyeltünk meg: a P-Sox9 jelenlétét döntően a sejtmagok körül lehetett detektálni (18. ábra).



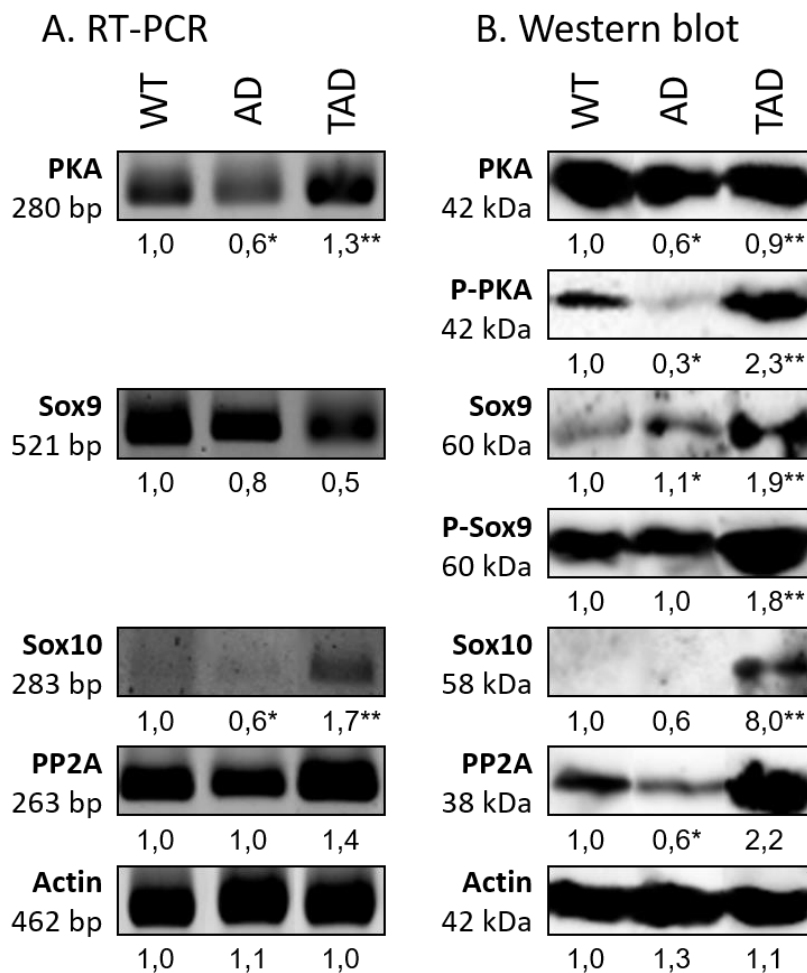
18. ábra

A P-Sox9 lokalizációjának vizsgálata. A WT, AD és TAD egerek heréinek immunhisztokémiai metszetei, 10× (nagyobb képek), ill. 40× nagyítás (kisebb képek). A DAPI kék színt, míg a P-Sox9 vörös színt emittál. A P-Sox9 lokalizációja a sejtmagok körül, nagyobb mennyiségben detektálható a WT és TAD egyedekben, míg az AD állatokban mennyisége csökken, és a periférián figyelhető meg.

A Sox10 mRNS expressziója szignifikánsan lecsökkent az AD állatokban, a WT egyedekhez viszonyítva. A TAD egerekben a molekula expressziója meghaladta a WT

állatokban detektálható. Ez a változás szignifikáns volt az AD egyedekhez képest. A Sox10 fehérjeexpresszióját alig tudtuk detektálni a WT és AD egerekben, míg a TAD állatokban szignifikánsan megnövekedett a molekula expressziója.

A PP2A mRNS expressziója közel azonos volt a WT és az AD egerekben, míg a TAD állatokban tendenciózusan növekedett. Ezzel ellentétben, a PP2A fehérjeexpressziója szignifikánsan lecsökkent az AD egerekben, míg a TAD állatokban kétszerese volt a WT egyedekben detektálható értéknek. Ez a növekedés szignifikáns volt az AD állatokkal való összehasonlítás során (19. ábra).



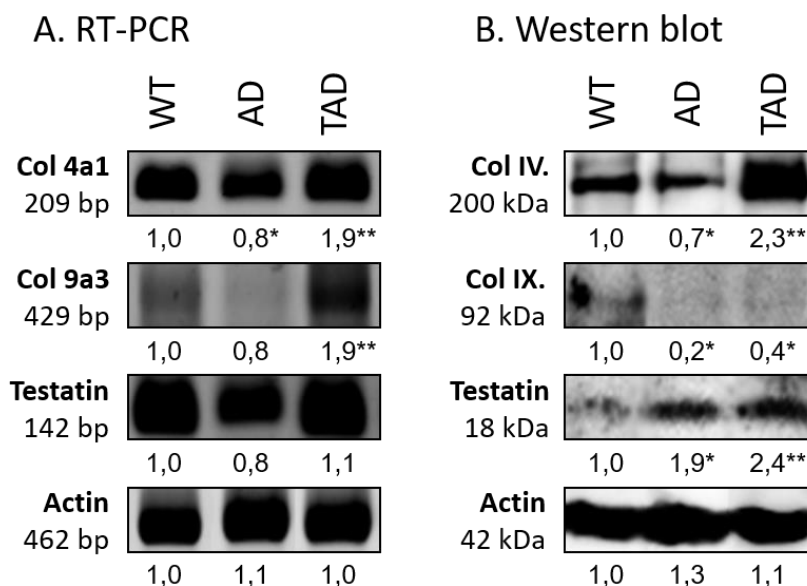
19. ábra

A PACAP kanonikus és herében specifikus jelátviteli molekuláinak mRNS (A) és fehérjeexpressziós (B) különbségei. A fehérjeexpresszió esetében az AD egyedekben megfigyelhető változásokat az aktív mozgás többnyire kompenzálja. Szignifikanciaküszöb értéke: $p < 0,05$.

IV.1.3. A here membrana basalis komponenseinek expressziója

A kutatás során a következő membrana basalist felépítő molekula mRNS és fehérjeexpresszióját vizsgáltuk meg: IV-es típusú kollagén, IX-es típusú kollagén és testatin. A IV-es típusú kollagén jelenlétét immunhisztokémiai festéssel is detektáltuk.

A IV-es típusú kollagén mRNS expressziója az AD egerekben szignifikánsan lecsökkent, míg a TAD állatokban meghaladta a WT egerekben detektálható értéket. Ez a növekedés szignifikáns volt az AD egerekhez képest. Hasonló változást észleltünk a molekula fehérjeexpressziójában: a IV-es típusú kollagén expressziója a WT egyedekhez képest szignifikánsan lecsökkent az AD egerekben, míg a TAD állatokban több, mint kétszeresére emelkedett. Ez a növekedés szintén szignifikáns volt az AD állatokhoz képest (20. ábra).



20. ábra

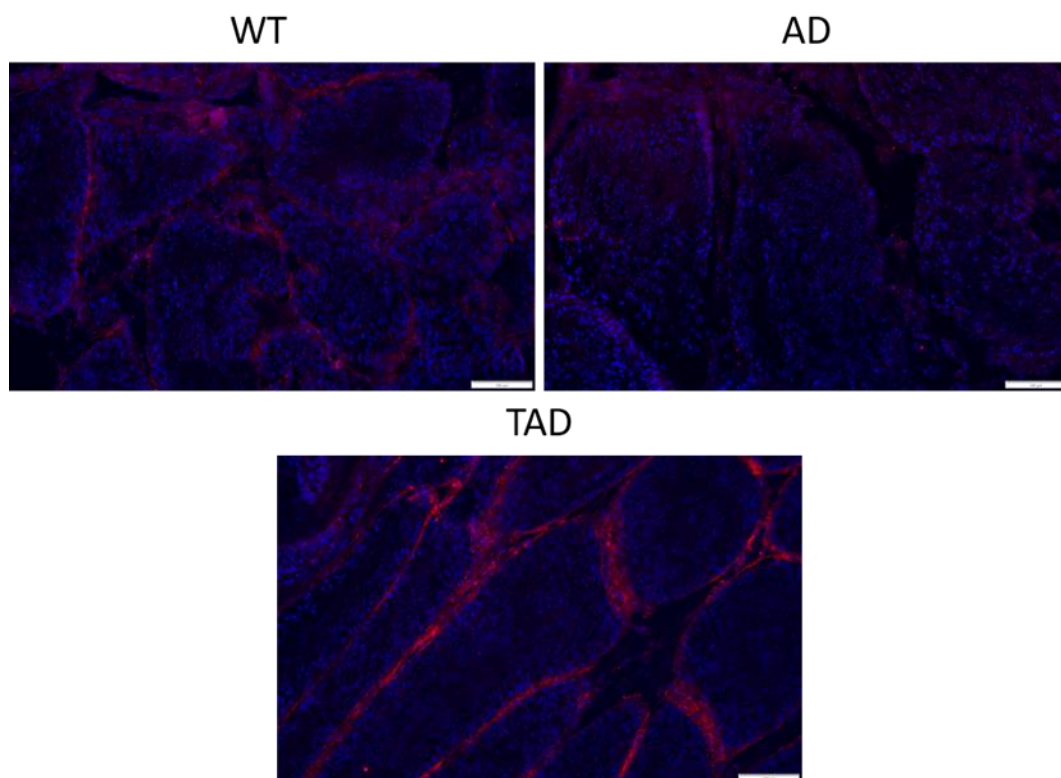
A membrana basalis alkotóinak mRNS (A) és fehérjeexpressziós (B) különbségei. Az AD állatokban a PACAP jelátvitel hatására is expresszálódó célgének és célfehérjék mennyisége többnyire csökken. Az aktív mozgás ezt a változást kompenzálta. Szignifikanciaküszöb értéke: $p < 0,05$.

A WT egerek herecsatornácskái membrana basalisában a IV-es típusú kollagén immunreaktivitása egyenletes eloszlást mutatott. Az AD állatokban a fehérje immunpozitivitását alig észleltük. Ezzel ellentétben, a TAD egerekben a fehérje immunreaktivitása fokozott volt, a membrana basalisban jobban akkumulálódott (21. ábra).

A IX-es típusú kollagén mRNS expressziója hasonló volt a IV-es típusú kollagén mRNS expressziójához: a molekula expressziója tendenciózusan csökkent az AD állatokban, míg a TAD egereké meghaladta a WT egyedekben mérhető denzitásértéket. Ez a növekedés szintén szignifikáns volt az AD állatokhoz képest. Érdekes módon, a fehérjeexpresszió nem korrelált

az mRNS expressziójánál megfigyelhető változásokkal. A IX-es típusú kollagén fehérjeexpressziója az AD és TAD állatokban is alacsonyabb volt, mint a WT egyedekben. A változás szignifikáns volt mind az AD és a WT, mind a TAD és az AD egyedek összehasonlítása során.

A testatin mRNS expressziójában szignifikáns eltérések egyik csoportban sem voltak a WT egyedekhez képest: az AD állatokban tendenciózusan csökkent, míg a TAD egerekben enyhén növekedett. Ezzel ellentétben, az AD és a TAD állatokban a testatin fehérjeexpressziója növekedett a WT egyedekhez képest. Ez a változás szignifikánsnak bizonyult mind az AD és a WT, mind a TAD és az AD csoportok összehasonlítása során (20. ábra).



21. ábra

A IV-es típusú kollagén lokalizációjának vizsgálata. A WT, AD és TAD egerek heréinek immunhisztokémiai metszetei, 10× nagyítás. A DAPI kék színt, míg a IV-es típusú kollagén vörös színt emittál. A fehérje a WT állatok membrana basalisában egyenletes mértékben, az AD egyedekben alig, míg a TAD egerekben fokozottabb mennyiségben detektálható.

IV.2. A második kutatásrész eredményei

IV.2.1. A klinikai minták kórszövettani eredménye

A kórszövettani leletek alapján, az 1162 összesetszám 17,64%-át és 10,67%-át diagnosztizálták proliferációs és szekréciós fázisképű endometriumként. A fennmaradó esetek

kórszöveti diagnózis a következő volt: 1,46% menstruációs fázisképű endometrium, 4,56% menopauzális endometrium, a kóros állapotot mutató minták közül 13,51% endometrium polypus, 24,01% endometrium hyperplasia, 4,04% malignus tumor és 1,72% endometritis. Az eltávolított méhnyálkahártya minták közül 16,18% alkalmatlannak bizonyult további kórszöveti elemzésre, 6,20% pedig exogén hormonhatás jeleit mutatta (6. táblázat).

| Csoport | Esetszám | Százalék (%) |
|-------------------------------------|----------|--------------|
| Proliferációs fázisképű endometrium | 205 | 17.64 |
| Szekréciós fázisképű endometrium | 124 | 10.67 |
| Menstruációs fázisképű endometrium | 17 | 1.46 |
| Exogén hormonhatás | 72 | 6.20 |
| Menopauzális endometrium | 53 | 4.56 |
| Elemzésre alkalmatlan minta | 188 | 16.18 |
| Endometrium polypus | 157 | 13.51 |
| Endometrium hyperplasia | 279 | 24.01 |
| Malignus tumorok | 47 | 4.04 |
| Endometritis | 20 | 1.72 |
| Összes eset | 1162 | 100 |

6. táblázat

Az összes eset kórszöveti eredménye, ahol endometrium mintavétel történt.

IV.2.2. A méhnyálkahártya kaparékok (D&C) és biopsziás minták (HSC) kórszöveti eredményei

Az 1162 mintavétel közül 949 műtét célozta kizárólag a méhnyálkahártya kinyerését a méhürből. A fennmaradó 213 esetben az endometrium reszekciója csupán járulékos része volt egy másik nőgyógyászati operációnak. A kórszöveti vizsgálatok során, az említett 949 eset 15,07%-át és 10,01%-át diagnosztizálták proliferációs és szekréciós fázisképű endometriumnaként. A fennmaradó esetek kórszöveti diagnózis a következő volt: 1,79% menstruációs fázisképű endometrium, 4,32% menopauzális endometrium, a kóros állapotot mutató minták közül 12,33% endometrium polypus, 26,66% endometrium hyperplasia, 4,43% malignus tumor és 1,05% endometritis. Az eltávolított méhnyálkahártya minták közül 19,07% alkalmatlannak bizonyult további kórszöveti elemzésre, 5,27% pedig exogén hormonhatás jeleit mutatta (7. táblázat).

| Csoport | Esetszám | Százalék (%) |
|-------------------------------------|------------|--------------|
| Proliferációs fázisképű endometrium | 143 | 15.07 |
| Szekréción fázisképű endometrium | 95 | 10.01 |
| Menstruációs fázisképű endometrium | 17 | 1.79 |
| Exogén hormonhatás | 50 | 5.27 |
| Menopauzális endometrium | 41 | 4.32 |
| Elemzésre alkalmatlan minta | 181 | 19.07 |
| Endometrium polypus | 117 | 12.33 |
| Endometrium hyperplasia | 253 | 26.66 |
| Malignus tumorok | 42 | 4.43 |
| Endometritis | 10 | 1.05 |
| Összes eset | 949 | 100 |

7. táblázat

Kórszövettani eredmények, ahol a műtétek (D&C, HSC) kizárólag az endometrium mintavételét célozták.

IV.2.3. A méhnyálkahártya kaparékok (D&C) kórszövettani eredményei

A 949 esetből 833 endometriomot méhkaparásos módszerrel nyertek ki a méhürből. A kórszövettani vizsgálatok során ezek 14,17%-át és 9,84%-át diagnosztizálták proliferációs és szekréción fázisképű endometriumként. A fennmaradó esetek kórszövettani diagnózisa a következő volt: 1,80% menstruációs fázisképű endometrium, 4,44% menopauzális endometrium, a kóros állapotot mutató minták közül 12,24% endometrium polypus, 27,25% endometrium hyperplasia, 4,32% malignus tumor és 1,20% endometritis. Az eltávolított méhnyálkahártya minták közül 19,69% alkalmatlannak bizonyult további kórszövettani elemzésre, 5,04% pedig exogén hormonhatás jeleit mutatta (8. táblázat).

| Csoport | Esetszám | Százalék (%) |
|-------------------------------------|------------|--------------|
| Proliferációs fázisképű endometrium | 118 | 14.17 |
| Szekréciós fázisképű endometrium | 82 | 9.84 |
| Menstruációs fázisképű endometrium | 15 | 1.80 |
| Exogén hormonhatás | 42 | 5.04 |
| Menopauzális endometrium | 37 | 4.44 |
| Elemzésre alkalmatlan minta | 164 | 19.69 |
| Endometrium polypus | 102 | 12.24 |
| Endometrium hyperplasia | 227 | 27.25 |
| Malignus tumorok | 36 | 4.32 |
| Endometritis | 10 | 1.20 |
| Összes eset | 833 | 100 |

8. táblázat

Kórszövettani eredmények, ahol a méhkaparás (D&C) során kizárólag az endometrium mintavételét célozták.

IV.2.4. A méhnyálkahártya biopsziás minták (HSC) kórszövettani eredményei

A 949 esetből 116 endometriumot hysteroscopia során végzett biopsziával nyertek ki a méhürből. A kórszövettani vizsgálatok során ezek 21,55%-át és 11,21%-át diagnosztizálták proliferációs és szekréciós fázisképű endometriumként. A fennmaradó esetek kórszövettani diagnózisa a következő volt: 1,72% menstruációs fázisképű endometrium, 3,45% menopauzális endometrium, a kóros állapotot mutató minták közül 12,93% endometrium polypus, 22,41% endometrium hyperplasia és 5,17% malignus tumor. Az eltávolított méhnyálkahártya minták közül 14,66% alkalmatlannak bizonyult további kórszövettani elemzésre, 6,90% pedig exogén hormonhatás jeleit mutatta. A kórszövettani elemzés során egy mintát sem diagnosztizáltak endometritisként (9. táblázat).

| Csoport | Esetszám | Százalék (%) |
|-------------------------------------|------------|--------------|
| Proliferációs fázisképű endometrium | 25 | 21.55 |
| Szekréciós fázisképű endometrium | 13 | 11.21 |
| Menstruációs fázisképű endometrium | 2 | 1.72 |
| Exogén hormonhatás | 8 | 6.90 |
| Menopauzális endometrium | 4 | 3.45 |
| Elemzésre alkalmatlan minta | 17 | 14.66 |
| Endometrium polypus | 15 | 12.93 |
| Endometrium hyperplasia | 26 | 22.41 |
| Malignus tumorok | 6 | 5.17 |
| Endometritis | 0 | 0.00 |
| Összes eset | 116 | 100 |

9. táblázat

Kórszövettani eredmények, ahol a biopszia (HSC) során kizárólag az endometrium mintavételét célozták.

IV.2.5. A klinikai kritériumok alapján alkalmas méhnyálkahártya kaparékok (D&C) és biopsziás minták (HSC)

A minták kórszövettani diagnózisának ismerete nélkül, csak a korábban leírt klinikai kizárási és beválogatási kritériumok alkalmazásával, a 949 esetből 145 (15,28%) bizonyult alkalmasnak további alapkutatásos kísérletekbe való bevonásra. A kórszövettani eredmények retrospektív vizsgálatával meghatározható, hogy e 145 minta 22,07%-át és 15,86%-át diagnosztizálták proliferációs és szekréciós fázisképű endometriumként. A fennmaradó esetek kórszövettani diagnózisa a következő volt: 3,45% menstruációs fázisképű endometrium, 1,38% menopauzális endometrium, a kóros állapotot mutató minták közül 8,97% endometrium polypus, 31,03% endometrium hyperplasia, 0,69% malignus tumor és 0,69% endometritis. Az eltávolított méhnyálkahártya minták közül 10,34% alkalmatlannak bizonyult további kórszövettani elemzésre, 5,52% pedig exogén hormonhatás jeleit mutatta (10. táblázat).

| Csoport | Esetszám | Százalék (%) |
|-------------------------------------|------------|--------------|
| Proliferációs fázisképű endometrium | 32 | 22.07 |
| Szekréción fázisképű endometrium | 23 | 15.86 |
| Menstruációs fázisképű endometrium | 5 | 3.45 |
| Exogén hormonhatás | 8 | 5.52 |
| Menopauzális endometrium | 2 | 1.38 |
| Elemzésre alkalmatlan minta | 15 | 10.34 |
| Endometrium polypus | 13 | 8.97 |
| Endometrium hyperplasia | 45 | 31.03 |
| Malignus tumorok | 1 | 0.69 |
| Endometritis | 1 | 0.69 |
| Összes eset | 145 | 100 |

10. táblázat

Kórszövettani eredmények, ahol a műtétek (D&C, HSC) során klinikai kritériumok alapján alkalmassnak tűntek a minták.

| Műtét jellege | Összesetszám | Klinikailag alkalmas esetek (esetszám) | Klinikailag alkalmas esetek (%) |
|----------------------|--------------|--|---------------------------------|
| D&C + HSC | 949 | 145 | 15.28 |
| D&C | 833 | 116 | 13.93 |
| HSC | 116 | 29 | 25.00 |

11. táblázat

Klinikai kizárási és beválogatási kritériumok alapján alkalmas esetek (D&C, HSC) száma.

IV.2.6. A klinikai kritériumok alapján alkalmas méhnyálkahártya kaparékok (D&C)

A klinikai kritériumok alapján válogatott 145 alkalmasnak tűnő esetből 116 endometriomot méhkaparásos módszerrel nyertek ki a méhürből (11. táblázat). A kórszövettani vizsgálatok során ezek 19,83%-át és 17,24%-át diagnosztizáltak proliferációs és szekréción fázisképű endometriumnaként. A fennmaradó esetek kórszövettani diagnózisa a következő volt: 3,45% menstruációs fázisképű endometrium, 1,72% menopauzális endometrium, a kóros állapotot mutató minták közül 9,48% endometrium polypus, 31,90% endometrium hyperplasia és 0,86% endometritis. Az eltávolított méhnyálkahártya minták közül 10,34% alkalmatlannak bizonyult további kórszövettani elemzésre, 5,17% pedig exogén hormonhatás jeleit mutatta. A kórszövettani elemzés során egy mintát sem diagnosztizáltak malignus tumorként (12. táblázat).

| Csoport | Esetszám | Százalék (%) |
|-------------------------------------|------------|--------------|
| Proliferációs fázisképű endometrium | 23 | 19.83 |
| Szekréción fázisképű endometrium | 20 | 17.24 |
| Menstruációs fázisképű endometrium | 4 | 3.45 |
| Exogén hormonhatás | 6 | 5.17 |
| Menopauzális endometrium | 2 | 1.72 |
| Elemzésre alkalmatlan minta | 12 | 10.34 |
| Endometrium polypus | 11 | 9.48 |
| Endometrium hyperplasia | 37 | 31.90 |
| Malignus tumorok | 0 | 0.00 |
| Endometritis | 1 | 0.86 |
| Összes eset | 116 | 100 |

12. táblázat

Kórszövettani eredmények, ahol a méhkaparás (D&C) során klinikai kritériumok alapján alkalmassnak tűntek a minták.

IV.2.7. A klinikai kritériumok alapján alkalmas méhnyálkahártya biopsziás minták (HSC)

A klinikai kritériumok alapján válogatott 145 alkalmasnak tűnő esetből 29 endometriumot hysteroscopia során végzett biopsziával nyertek ki a méhürből (11. táblázat). A kórszövettani vizsgálatok során ezek 30,03%-át és 10,34%-át diagnosztizálták proliferációs és szekréción fázisképű endometriumnaként. A fennmaradó esetek kórszövettani diagnózisa a következő volt: 3,45% menstruációs fázisképű endometrium, a kóros állapotot mutató minták közül 6,90% endometrium polypus, 27,59% endometrium hyperplasia és 3,45% malignus tumor. Az eltávolított méhnyálkahártya minták közül 10,34% alkalmatlannak bizonyult további kórszövettani elemzésre, 6,90% pedig exogén hormonhatás jeleit mutatta. A kórszövettani elemzés során egy mintát sem diagnosztizáltak menopauzális endometriumnaként és endometritisként (13. táblázat).

| Csoport | Esetszám | Százalék (%) |
|-------------------------------------|-----------|--------------|
| Proliferációs fázisképű endometrium | 9 | 31.03 |
| Szekréción fázisképű endometrium | 3 | 10.34 |
| Menstruációs fázisképű endometrium | 1 | 3.45 |
| Exogén hormonhatás | 2 | 6.90 |
| Menopauzális endometrium | 0 | 0.00 |
| Elemzésre alkalmatlan minta | 3 | 10.34 |
| Endometrium polypus | 2 | 6.90 |
| Endometrium hyperplasia | 8 | 27.59 |
| Malignus tumorok | 1 | 3.45 |
| Endometritis | 0 | 0.00 |
| Összes eset | 29 | 100 |

13. táblázat

Kórszövettani eredmények, ahol a biopszia (HSC) során klinikai kritériumok alapján alkalmassnak tűntek a minták.

IV.2.8. Az alapkutató vizsgálatokra alkalmas klinikai méhnyálkahártya minták

A korábban részletezett okok miatt, amennyiben az endometriumot kontroll szövetként szeretnénk tanulmányozni, csak a proliferatív és a szekréción fázisképet mutató méhnyálkahártya alkalmas további kísérletes vizsgálatokra. A 949 összesetszámból, csak a korábban leírt klinikai kizárási és beválogatási kritériumok alkalmazásával és a kórszövettani diagnózisok ismerete nélkül, 145 (15,30%) minta bizonyult alkalmassnak alapkutató vizsgálatokra való bevonásra. Ebből 116 endometriumot méhkaparásos módszerrel, 29 endometriumot pedig hysteroscopia során végzett biopsziával nyertek ki a méhürből. A molekuláris vizsgálatokra ténylegesen alkalmas esetek csak a minták kórszövettani eredményének ismeretében határozhatók meg retrospektív módon. A kórszövettani kizárási és beválogatási kritériumokat alkalmazva összesen 32 minta volt alkalmas további kísérletes vizsgálatokra. Ez a teljes esetszám (949 minta) 3,37%-a, valamint a klinikailag válogatott esetek (145 minta) 22,07%-a. A 32 ténylegesen alkalmas mintából 28 endometriumot méhkaparásos módszerrel távolítottak el a méhürből. Ez a teljes méhkaparásos esetszám (833 minta) 3,36%-a, valamint a klinikailag válogatott méhkaparásos esetek (116 minta) 24,14%-a. A 32 ténylegesen alkalmas mintából 4 endometriumot hysteroscopia során végzett biopsziával nyertek ki a méhürből. Ez a teljes biopsziás esetszám (116 minta) 3,45%-a, valamint a klinikailag válogatott biopsziás esetek 13,79%-a.

| | D&C + HSC | | D&C | | HSC | |
|--|-------------|-----------------------|-------------|-----------------------|-------------|-----------------------|
| | Összes eset | Klinikailag akamas | Összes eset | Klinikailag akamas | Összes eset | Klinikailag akamas |
| | 949 | 145 | 833 | 116 | 116 | 29 |
| Proliferációs fázisképű endometrium | | | | | | |
| Alkalmas (esetszám) | 13 | | 11 | | 2 | |
| Alkalmas (%) | 1.37 | 8.97 | 1.32 | 9.48 | 1.72 | 6.90 |
| Szekréción fázisképű endometrium | | | | | | |
| Alkalmas (esetszám) | 19 | | 17 | | 2 | |
| Alkalmas (%) | 2.00 | 13.10 | 2.04 | 14.66 | 1.72 | 6.90 |
| Proliferációs és szekréción fázisképű endometrium | | | | | | |
| Alkalmas (esetszám) | 32 | | 28 | | 4 | |
| Alkalmas (%) | 3.37 | 22.07 | 3.36 | 24.14 | 3.45 | 13.79 |

14. táblázat

Alaputatásos vizsgálatokra való bevonásra ténylegesen alkalmas minták száma és aránya az összes eset számához, és a klinikai kritériumok alapján alkalmasnak tűnő minták számához viszonyítva. A táblázat külön részletezi a D&C, ill. HSC mintavételi lehetőségekből nyert adatokat, valamint a proliferációs és szekréción fázisképet mutató endometrium mintákat.

IV.3. A harmadik kutatásrész eredményei

IV.3.1. A PACAP receptorok és a prePACAP mRNS expressziója méhnyálkahártya mintákban

A PACAP receptorok közül a PAC1R és a VPAC2R mindhárom vizsgált mintában expresszáldott, míg a VPAC1R-t az egyik mintában nem lehetett detektálni. Szignifikáns változás egyik kezelési csoportnál sem figyelhető meg.

A PAC1R expressziójában tendenciózus csökkenés észlelhető az EUT+E2+P4+PACAP csoport esetében a kontroll csoporthoz viszonyítva, míg az EUT+E2+P4 és EUT+PACAP csoportoknál változás alig detektálható, illetve az expresszió növekedés mértéke elhanyagolható.

A VPAC2R expressziója esetén mindhárom kezelési csoportnál (EUT+E2+P4, EUT+PACAP, EUT+E2+P4+PACAP) tendenciózus növekedés figyelhető meg a kontroll csoportokhoz képest.

A prePACAP mRNS-ét csupán 1 mintában lehetett kimutatni, így a detektált változások statisztikailag irrelevánsak a változásokat illetően (15. táblázat).

IV.3.2. A PACAP receptorok és a prePACAP mRNS expressziója endometriosis mintákban

A PACAP receptorok közül a VPAC1R minden vizsgált mintában expresszálódott, míg a VPAC2R-t a hatból 5 mintában, a PAC1R-t pedig 4 mintában lehetett detektálni.

A VPAC1R expressziójában az ECT+PACAP és az ECT+E2+P4 csoportok esetében tendenciózus csökkenés figyelhető meg, míg az ECT+E2+P4+PACAP csoportnál a csökkenés mértéke szignifikáns a kontroll csoporthoz viszonyítva.

A VPAC2R expressziójában szignifikáns változások egyik csoportnál sem figyelhetők meg: PACAP-kezelt csoportoknál (ECT+PACAP és ECT+E2+P4+PACAP) kismértékű tendenciózus csökkenés, az ECT+E2+P4 csoportnál kismértékű tendenciózus növekedés detektálható.

A PAC1R esetében szignifikáns változás az ECT+E2+P4 csoportnál figyelhető meg, ahol a receptor expressziója növekedett. A többi kezelési csoportnál kismértékű tendenciózus növekedés detektálható a kontroll csoportokhoz képest.

A prePACAP mRNS-ét a hatból csupán 2 mintában lehetett kimutatni. Mivel egy statisztikailag értékelhető eredményhez legalább 3 minta szükséges, a prePACAP expressziójánál szignifikancia és szórás értékeket nem határoztunk meg. Ugyanakkor, mindkét minta esetében a prePACAP expressziója kismértékben tendenciózusan növekedett az összes kezelési csoportnál (15. táblázat).

| | prePACAP | | PAC1R | | VPAC1R | | VPAC2R | |
|-------------|----------|-----|-------|-----|--------|-----|--------|-----|
| | EUT | ECT | EUT | ECT | EUT | ECT | EUT | ECT |
| ∅ | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| PACAP | 93 | 107 | 105 | 107 | 120 | 80 | 149 | 94 |
| etanol | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| E2+P4 | 187 | 105 | 113 | 137 | 122 | 88 | 124 | 106 |
| E2+P4+PACAP | 3450 | 117 | 75 | 113 | 359 | 65 | 157 | 92 |

15. táblázat

A prePACAP és a PACAP receptorok expressziója EUT (n=3) és ECT (n=6) mintákban. A korrigált és átlagolt integrált denzitásértékeket %-os értékben adtuk meg (mRNS expresszió). A prePACAP mRNS 3/1 EUT, ill. 6/2 ECT mintában mutatható ki. A PAC1R expresszió 6/4, a VPAC2R expresszió pedig 6/5 ECT mintában igazolható. A VPAC1R expresszióját 3/2 EUT mintában detektáltuk. Minden mintában expresszálódik valamely PACAP-kötő receptor. A hormon- és PACAP-kezelt mintákban az EUT és ECT minták esetében ellentétes változások figyelhetők meg. *Szignifikanciaküszöb értéke: $p < 0,05$. A szignifikáns eltérést aláhúzással jelöltük.

IV.3.3. A TGF β jelátvitel elemeinek mRNS expressziója méhnyálkahártya mintákban

Az eutopiás mintákban a következő molekulák mRNS expresszióját vizsgáltuk: TGF β -1, TGF β R-I, TGF β R-II, Smad2 és Smad3.

A TGF β -1 expressziója az EUT+E2+P4 csoportban csökkent, míg az EUT+PACAP csoportban növekedést mutatott a kontroll csoportokhoz képest. A hormonok és a PACAP együttes adagolása hatására (EUT+E2+P4+PACAP) a TGF β -1 mRNS expressziója megközelítette a kontroll csoportban detektálható expresszió mértékét.

A TGF β R-I expressziója mindhárom kezelési csoportban tendenciózusan növekedett (EUT+E2+P4, EUT+PACAP, EUT+E2+P4+PACAP). Szintén növekedés figyelhető meg a TGF β R-II expressziójában a PACAP-kezelt csoportoknál (EUT+PACAP, EUT+E2+P4+PACAP), a hormonkezelt csoportban azonban a receptor mRNS expressziója csökkenést mutat (EUT+E2+P4).

A TGF β R-II expressziójához hasonló változások figyelhetők meg a Smad2 mRNS expressziójában: a PACAP-kezelt csoportoknál az expresszió növekedett (EUT+PACAP, EUT+E2+P4+PACAP), míg a hormonkezelt csoportnál (EUT+E2+P4) az mRNS expresszió mértéke alig változott a kontroll csoportban detektálhatóhoz képest.

A Smad3 expressziójában szintén a TGF β R-II expressziójához hasonló változások figyelhetők meg: a hormonkezelt csoportban csökkenés, a PACAP-kezelt csoportoknál kismértékű növekedés detektálható (16. táblázat).

IV.3.4. A TGF β jelátvitel elemeinek mRNS expressziója endometriosis mintákban

Az eutopiás mintákhoz hasonlóan, az ectopiás mintákban is a következő molekulák mRNS expresszióját vizsgáltuk: TGF β -1, TGF β R-I, TGF β R-II, Smad2 és Smad3.

A TGF β -1 expressziója az ECT+PACAP és az ECT+E2+P4 csoportokban alig tért el a kontroll csoportokhoz képest, előbbinél kismértékben tendenciózusan növekedett. Az ECT+E2+P4+PACAP csoportnál azonban tendenciózus csökkenés detektálható.

A TGF β R-I esetében minden kezelési csoportnál tendenciózus csökkenések figyelhetők meg a kontroll csoportokhoz képest.

A TGF β R-II expressziója az ECT+E2+P4 csoport esetén kismértékű tendenciózus növekedést mutatott, míg a PACAP-kezelt csoportoknál csökkenés detektálható a kontroll csoportokhoz képest. Az ECT+E2+P4+PACAP esetében szignifikáns a csökkenés mértéke.

A Smad2 expressziója minden kezelési csoportnál tendenciózusan csökkent a kontroll mintákhoz képest.

A Smad3 esetében a Smad2-höz hasonló változások figyelhetők meg, az ECT+E2+P4+PACAP csoportnál azonban az expresszió csökkenés mértéke szignifikáns volt (16. táblázat).

| | TGFβ-1 | | TGFβR-I | | TGFβR-II | | Smad2 | | Smad3 | |
|-------------|--------|-----|---------|-----|----------|-----|-------|-----|-------|-----|
| | EUT | ECT | EUT | ECT | EUT | ECT | EUT | ECT | EUT | ECT |
| ∅ | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| PACAP | 152 | 106 | 138 | 91 | 297 | 88 | 125 | 79 | 107 | 82 |
| etanol | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| E2+P4 | 90 | 100 | 111 | 94 | 84 | 106 | 100 | 95 | 86 | 91 |
| E2+P4+PACAP | 103 | 79 | 164 | 94 | 146 | 74 | 130 | 82 | 107 | 69 |

16. táblázat

A TGFβ jelátviteli elemek expressziója EUT (n=3) és ECT (n=6) mintákban. A korrigált és átlagolt integrált denzitásértékeket %-os értékben adtuk meg (mRNS expresszió). A hormon- és PACAP-kezelt mintákban az EUT és ECT minták esetében ellentétes változások figyelhetők meg. *Szignifikanciaküszöb értéke: $p < 0,05$. A szignifikáns eltérést aláhúzással jelöltük.

IV.3.5. Az összejt transzkripciós faktorok mRNS expressziója méhnyálkahártya mintákban

Az eutopiás mintákban a következő molekulák mRNS expresszióját vizsgáltuk: Oct4, Nanog és Sox2.

Az Oct4 expressziója a PACAP-kezelt csoportok (EUT+PACAP, EUT+E2+P4+PACAP) esetében növekedett, míg a hormonkezelt csoportban (EUT+E2+P4) kismértékben csökkent a kontroll csoportokhoz képest.

A Nanog esetében mindhárom kezelési csoportban (EUT+E2+P4, EUT+PACAP, EUT+E2+P4+PACAP) expresszió emelkedés figyelhető meg, amely a hormonkezelt csoportnál kismértékű a kontroll csoportéhoz viszonyítva.

Az összes vizsgált molekula közül a Sox2 mRNS expressziója az egyik, amelynél szignifikáns változás figyelhető meg az eutopiás mintákban: az EUT+E2+P4+PACAP csoportban az expresszió mértéke szignifikánsan csökkent a kontroll csoporthoz viszonyítva. Az EUT+PACAP csoportban tendenciózus növekedés, az EUT+E2+P4 csoportban csökkenés detektálható a Sox2 expressziójában (17. táblázat).

IV.3.6. Az összejt transzkripciós faktorok mRNS expressziója endometriosis mintákban

Az eutopiás mintákhoz hasonlóan, az ectopiás mintákban is a következő molekulák mRNS expresszióját vizsgáltuk: Oct4, Nanog és Sox2. Míg a Nanog és Sox2 minden mintában expresszálódott, addig az Oct4-et csak a minták felében lehetett detektálni.

A Nanog esetében minden kezelési csoportnál expresszió csökkenés figyelhető meg a kontroll csoportokhoz képest. Míg az ECT+E2+P4 és az ECT+PACAP csoportoknál a csökkenés tendenciózus, addig az ECT+E2+P4+PACAP csoportnál a csökkenés mértéke szignifikáns volt.

A Sox2 expressziójánál a Nanog expresszióhoz hasonlóan minden kezelési csoportnál csökkenések figyelhetők meg a kontroll csoportokhoz képest, szignifikáns változást azonban nem az ECT+E2+P4+PACAP, hanem az ECT+E2+P4 csoportnál detektáltunk.

A korábban említett 3 mintában, amelyekben az Oct4 detektálható, a molekula mRNS expressziója a PACAP-kezelt csoportoknál tendenciózusan emelkedett, míg az ECT+E2+P4 csoportnál tendenciózusan csökkent a kontroll csoporthoz képest. Megjegyzendő, hogy a szórásérték mértéke minden kezelt csoportnál elég magas (17. táblázat).

| | Nanog | | Oct4 | | Sox2 | |
|-------------|-------|-----|------|-----|------|-----|
| | EUT | ECT | EUT | ECT | EUT | ECT |
| ∅ | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| PACAP | 155 | 88 | 115 | 127 | 122 | 82 |
| etanol | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| E2+P4 | 104 | 88 | 97 | 80 | 90 | 88 |
| E2+P4+PACAP | 133 | 75 | 156 | 112 | 123 | 82 |

17. táblázat

*Az összejt transzkripciós faktorok expressziója EUT (n=3) és ECT (n=6) mintákban. A korrigált és átlagolt integrált denzitásértékeket %-os értékben adtuk meg (mRNS expresszió). A Nanog és Sox2 expressziónál hormon- és PACAP-kezelt mintákban az EUT és ECT minták esetében ellentétes változások figyelhetők meg. Oct4-expresszió 6/3 ECT mintában detektálható. *Szignifikanciaküszöb értéke: $p < 0,05$. A szignifikáns eltérést aláhúzással jelöltük.*

IV.3.7. Az endometriosis kialakulásában jelentős egyéb molekulák mRNS expressziójának vizsgálata méhnyálkahártya mintákban

Az eutopiás mintákban a következő molekulák mRNS expresszióját vizsgáltuk: Aromatáz, p21 és VEGF.

Az összes vizsgált molekula közül az Aromatáz mRNS expressziója szintén az egyik, amelynél szignifikáns változások figyelhetők meg az eutopiás minták esetében. A hormonkezelt csoportokban (EUT+E2+P4, EUT+E2+P4+PACAP) szignifikáns emelkedés figyelhető meg az Aromatáz expresszióban, míg az EUT+PACAP csoportban az mRNS expresszió alig tért el a kontroll csoporthoz viszonyítva.

A p21 expressziója mindhárom kezelési csoportban (EUT+E2+P4, EUT+PACAP, EUT+E2+P4+PACAP) növekedett a kontroll csoportokhoz viszonyítva.

Az összes vizsgált molekula közül a VEGF mRNS expressziója az utolsó, amelynél szignifikáns változás figyelhető meg az eutopiás minták esetében: az EUT+E2+P4 csoportnál az expresszió szignifikánsan növekedett a kontroll csoporthoz viszonyítva. A PACAP-kezelt csoportoknál (EUT+PACAP, EUT+E2+P4+PACAP) tendenciózus növekedés figyelhető meg a VEGF expressziójában (18. táblázat).

IV.3.8. Az endometriosis kialakulásában jelentős egyéb molekulák mRNS expressziójának vizsgálata endometriosis mintákban

Az eutopiás mintákhoz hasonlóan, az ectopiás mintákban is a következő molekulák mRNS expresszióját vizsgáltuk: Aromatáz, p21 és VEGF. Mindhárom molekula esetében expresszió csökkenések figyelhetők meg a hormon- és a PACAP-kezelt csoportoknál is.

Az Aromatáz esetében, míg az ECT+E2+P4 és az ECT+PACAP csoportoknál az expresszió csökkenése kismértékű, addig az ECT+E2+P4+PACAP csoportnál a változás mértéke szignifikáns a kontroll csoporthoz viszonyítva.

A p21 molekulát vizsgálva megállapítható, hogy az ECT+E2+P4 csoport mRNS expressziója alig tér el a kontroll csoporthoz képest, míg az ECT+PACAP csoportnál a tendenciózus csökkenés mértéke jóval nagyobb. Az ECT+E2+P4+PACAP csoportnál pedig az expresszió csökkenés mértéke szignifikáns.

A VEGF esetében egyik kezelési csoportnál sem detektáltunk szignifikáns változást a kontroll csoportokhoz képest. Míg az ECT+E2+P4 csoportban alig tért el az mRNS expresszió mértéke, addig a PACAP-kezelt csoportoknál a tendenciózus csökkenés mértéke jóval nagyobb mértékű volt (18. táblázat).

| | Aromatase | | VEGF | | p21 | |
|-------------|-----------|-----|------|-----|-----|-----|
| | EUT | ECT | EUT | ECT | EUT | ECT |
| ∅ | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| PACAP | 106 | 93 | 192 | 79 | 143 | 74 |
| etanol | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| E2+P4 | 153 | 95 | 136 | 96 | 140 | 100 |
| E2+P4+PACAP | 195 | 80 | 132 | 70 | 307 | 74 |

18. táblázat

Az endometriosis kialakulásánál jelentős egyéb molekulák expressziója EUT (n=3) és ECT (n=6) mintákban. A korrigált és átlagolt integrált denzitásértékeket %-os értékben adtuk meg

*(mRNS expresszió). A hormon- és PACAP-kezelt mintákban az EUT és ECT minták esetében ellentétes változások figyelhetők meg. *Szignifikanciaküszöb értéke: $p < 0.05$. A szignifikáns eltérést aláhúzással jelöltük.*

V. Diszkusszió

A PACAP egy 38 aminosavból álló peptid, amelynek jelenlétét számos szervben kimutatták (*Vaudry és mtsai, 2000*). A szövetek működésében, valamint a különböző kórfolyamatokban betöltött szerepének részletezése túlmutat jelen disszertáció keretein. A PACAP általánosságban egy bizonyos határértékig képes kivédeni a szöveteket érő oxidatív stresszfolyamatok káros hatásait (*Reglődi és mtsai, 2018 b*). A jelen kutatásban is vizsgált Alzheimer-kór és endometriosis kialakulásának háttérében gyulladáso, oxidatív stresszfolyamatokkal járó patogenezis feltételezhető.

A központi idegrendszer mellett, a PACAP a perifériás szövetek közül legnagyobb mennyiségben a herében mutatható ki. Számos kísérlet igazolja a neuropeptid hím gonádban betöltött szerepét, illetve a hiányában megfigyelhető elváltozásokat is (*Brubel és mtsai, 2012*). Érdekes módon a here és az agy sejtípusai között strukturális és funkcionális hasonlóságokat is megfigyelhetünk. A neuronok és a spermiumok magasan differenciált, jelen ismereteink szerint non-proliferatív sejtek. A neuron-gliasejt és a Sertoli-csírsejt közti szoros kapcsolat szerepe a kétféle sejt között megkérdőjelezhetetlen (*Li és mtsai, 2003*). Az agy és a here sejtjeit is vér-szöveti barrierek (vér-agy gát, illetve vér-heré gát) védelmezik a szisztémás, gyakran káros hatásokkal szemben (*Cheng és mtsai, 2012; Mital és mtsai, 2011*). Nem meglepő tehát, ha azt feltételezzük, hogy bizonyos neurodegeneratív betegségek a központi idegrendszeren kívül perifériás szövetekben is bizonyos mértékben manifesztálódnak. Az Alzheimer-kór patogenezisének háttérében az A β -peptid kóros mennyiségben való termelődését, illetve akkumulálódását feltételezik (*Breijyeh és mtsai, 2020*). Ez a molekula az APP-ból képződik, amely nemcsak a központi idegrendszerben, de a herében is termelődő és megtalálható fehérje (*Silva és mtsai, 2015*). Az ép szövetekben az amyloidgenézis kontrollált folyamat. Ezzel szemben Alzheimer-kórban patológiás amyloid képződik (*Aczél és mtsai, 2022*). Bár e neurodegeneratív kórképben a PACAP expressziója a kórosan halmozódó amyloid mennyiségével csökken, a neuropeptid kísérletesen protektív hatással bír: gátolja az amyloid lerakódását és javítja a kognitív funkciókat (*Han és mtsai, 2014; Lee és mtsai, 2014*). Napjainkban különféle neuropeptidek fejlesztésével is igyekeznek terápiás lehetőségeket biztosítani az Alzheimer-kór gyógyszeres kezelésénél (*Chen és mtsai, 2019*). A farmakonok alkalmazásán kívül, sok egyéb konzervatív lehetőség áll rendelkezésre az Alzheimer-kór progressziójának lassítására. Az aktív mozgás, a rendszeres edzés bizonyítottan jótékony hatással bír számos neurológiai kórképben, mint például a Parkinson-kór, a migrén és az Alzheimer-kór is (*Hamer és mtsai, 2009; Amin és mtsai 2018; Bhalsing és mtsai, 2018*). A

fizikai aktivitás terápiás hatásosságának háttérében álló molekuláris folyamatok felderítése a tudományos közösségben jelenleg is zajlik.

Annak detektálása mellett, hogy az Alzheimer-kórban megfigyelhetők-e változások a here PACAP jelátvitelében, célt volt annak felderítése is, hogy az aktív testmozgás hasonlóan protektív szereppel bír-e egy perifériás szervben (jelen esetben a hím gonádban), mint a központi idegrendszerben.

A herék mikroszkópos vizsgálata során igazoltuk, hogy az Alzheimer-kórt modellező egereknél a kanyarulat csatornák sejtszáma, illetve sejtdenzitása is csökkent, valamint a vér-her barrier lamina basalis rétege is szignifikánsan vékonyabb a vad típusú egyedekben detektálhatóhoz képest. A TAD egerekben az összes megfigyelt eltérés normalizálódott, még ha nem is érte el a WT állatokban mérhető matematikai értékeket. Korábbi kísérletek során igazoltuk, hogy PACAP KO egyedekben sérül a vér-her barrier és a hímivarsejtek morfológiája is (*Reglődi és mtsai, 2018 a*). Ez a tény, valamint a hím gonád mikroszkópos vizsgálata megerősítette azt a hipotézist, hogy a neurodegeneratív kórképben sérülhet a PACAP jelátvitel.

Kísérleteinket ezért a PACAP-kötő receptorok vizsgálatával kezdtük. Mindhárom receptor mRNS és fehérjeexpresszióját kimutattuk az összes vizsgálati csoportnál (WT, AD és TAD), habár a TAD egyedeknél a VPAC2R fehérjeexpressziót alig lehetett detektálni. A PAC1R és a VPAC1R esetében általánosan megfigyelhető, hogy az AD csoportnál csökken a receptorok mRNS és fehérjeexpressziója, míg a TAD egyedeknél normalizálódnak az értékek, mértékük közel azonos a WT csoportnál mérhetőekkel. A változás legszembetűnőbb a PAC1R esetében. Erre magyarázatot adhat, hogy irodalmi adatok alapján a herében a neuropeptid kötésében első sorban a PAC1R-nak van jelentősége, a PACAP dominánsan e receptort aktiválva fejt ki hatásait a hím gonádban (*Li és mtsai, 2004; Prisco és mtsai, 2020*). A neuropeptid is a PAC1R-hoz kötődik a háromféle receptor közül a legnagyobb affinitással (*Vaudry és mtsai, 2000*). Emiatt feltételeztük, hogy a peptid jelátvitelében is változások következhetnek be az Alzheimer-kórt modellező egereknél.

A PACAP leggyakrabban vizsgált, kanonikus jelátviteli útja a cAMP és PKA közvetítette kaskád (*Perényi és mtsai 2020*). A PKA mRNS és fehérjeexpressziója is szignifikánsan csökkent az AD csoportnál, míg a TAD egyedeknél normalizálódott. A PKA aktív, foszforilált formájának mennyisége is hasonló változást mutatott, a TAD egyedek esetében meg is növekedett. Logikus következtetés, hogy az Alzheimer-kórt modellező állatoknál csökkenhetett a PKA által aktivált transzkripciós faktorok kiváltotta géneexpresszió mértéke, míg TAD állatoknál kompenzálódott ez a változás. A vér-her gát felépítésében

résztevő fehérjék génexpresszióját a Sox8, Sox9 és Sox10 transzkripciós faktorok aktiválódása fokozza (Georg és mtsai, 2012). A P-PKA a herében aktiválja ezeket a transzkripciós faktorokat. A hím gonád működésében fontos szerepet játszik a Sox8, Sox9 és Sox10, melyek mind a SoxE proteincsalád tagjai (Jo és mtsai, 2014). A Sox8 esszenciális a Sertoli-csírsejt között fennálló kapcsolat, így a fertilitás megtartásáért. Hiánya sterilitáshoz vezet. Érdekes módon azonban a vér-here gát barrier alkotóinak termelése nem sérül (O'Bryan és mtsai, 2008). Mindezek miatt nem tartottuk szükségesnek a Sox8 vizsgálatát. A Sox9 és Sox10 egymás redundáns faktorai, éppen ezért bármelyik hiányában alig sérül a hím gonád fiziológiája (Jo és mtsai, 2014). E két transzkripciós faktor fehérjeexpressziója esetében, illetve a Sox9 foszforilált (aktív) formájának mennyiségében érdemi eltérés nem igazolódott az AD és WT csoportok összehasonlítása során, míg a TAD egyedeknél mindhárom fehérjét megnövekedett mennyiségben detektáltuk. Ennél a megfigyelésnél nagyobb jelentőséggel bír, hogy a P-Sox9 faktort a kanyarulat csatornákon belül hol lehetett detektálni. A génexpresszióhoz szükséges sejtmagi transzlokációt, a sejtmag körüli halmozódást a WT és TAD állatokban lehetett megfigyelni, míg az AD egyedekben az aktivált transzkripciós faktor eloszlása a kanyarulat csatornákon belül aránytalan volt. A PP2A a PKA által aktiválható enzim, amely defoszforilálhatja a PKA által aktivált transzkripciós faktorokat (Reglődi és mtsai, 2018 b). Ismert, hogy e foszforiláz mennyisége csökkent Alzheimer-kórban (Nicholls és mtsai, 2016), amelyet jelen kísérletben a herében is igazoltunk. A PP2A gátlása a KIR-ben fokozza az A β -protein felhalmozódását (Sontag és mtsai, 2014). Habár az Alzheimer-kórban sérül a PACAP-jelátvitel, a PACAP génhányos egereknél a PP2A fokozottabb mennyiségben expresszálódik a herében (Reglődi és mtsai, 2018 a). Fizikai aktivitás hatására a foszfatáz fehérjeexpresszióját szintén fokozódott mennyiségben detektáltuk. Mindebből feltételezhető, hogy a PP2A expressziója a betegségben jobban függ az Alzheimer-kórban zajló egyéb jelátviteli változásoktól, mint a neurodegeneratív kórképben sérülő PACAP jelátviteli út aktivitásától.

A Sox9 több olyan fehérje expresszióját is fokozza, amelyek részt vesznek a here kanyarulat csatornákon vér-here gátját biztosító lamina basalis alkotásában. Ilyen fehérjék a IV-es típusú kollagén, a IX-es típusú kollagén és a testatin (Georg és mtsai, 2012). A lamina basalist alkotó fő fehérje a IV-es típusú kollagén (Liu és mtsai, 2021). A PCR, WB és immunhisztokémiai vizsgálatok is alátámasztották, hogy a fehérje expressziója és megléte szignifikánsan csökken az AD állatokban, a lamina basalis sérül, míg a fizikai aktivitás normalizálja a neurodegeneratív betegségben megfigyelhető elváltozásokat. A neuronális szövetekben szintén kimutatták, hogy az Alzheimer-kórban csökken a IV-es típusú kollagén

expressziója (*Christov és mtsai, 2008*), illetve a fehérje jelenléte csökkenti az A β -képződését (*Kiuchi és mtsai, 2002*). Korábbi kísérleteink során azt is igazoltuk, hogy a PACAP KO egerekben hasonló elváltozások detektálhatók: szignifikánsan csökken a IV-es típusú kollagén expressziója, sérül a vér-here gát barrierfunkciója, és ezáltal sérül a hímvarsejtképzés is (*Reglódi és mtsai, 2018 a*). A herében a IX-es típusú kollagén mRNS és fehérjeexpressziója a IV-es típusú kollagénhez hasonlóan változott: az AD egyedekben csökkentek, a fizikai aktivitás hatására pedig normalizálódtak az értékek. A testatin egy specifikusan a herében (főként a pre-Sertoli sejtekben) expresszálódó gén, amely felelős az ún. cystatin proteinek (cystein proteáz inhibitorok) transzkripciójáért (*Töhönen és mtsai, 1998*). Annak ellenére, hogy legfontosabb szerepe a korai heredifferenciálódásban van, kismértékben a felnőtt gonádban is expresszálódik (*Eriksson és mtsai, 2002*). Az embrionális fejlődés során a testatin expressziója a Sry-függő Sox9 expresszióját követi (*Töhönen és mtsai, 1998*). Ezzel összefüggésbe hozható, hogy mind az AD, mind a TAD egereknél hasonló mértékben változott a testatin fehérje mennyisége, mint a Sox9-é. A testatin expressziója növekedett a fizikai aktivitás hatására az AD egyedekben detektálhatóhoz képest, habár a neurodegeneratív betegségben is fokozottabb volt a fehérje mennyisége, mint a WT egerekben. A IV-es és IX-es típusú kollagén expressziók változásai magyarázattal szolgálhatnak a mikroszkóposan látható eltérésekre. A neurodegeneratív kórképben sérül a vér-here gát, s így közvetetten csökken a herecsatornák sejtszáma is. A fizikai aktivitás hatására pedig normalizálódnak az értékek, habár sosem érik el a vad típusú egyedekben detektálható mértéket. A korábbi kísérletekben a PACAP hiányában megfigyelt elváltozások hasonlóak az Alzheimer-kórban észlelhetőkhöz, így valószínűsíthető, hogy a betegségben sérül a neuropeptid jelátvittele a herében.

A PACAP szerepét, az Alzheimer-kóron kívül, több kórfolyamatban is tanulmányozták. Lényegében az összes szervrendszert érintő főbb oxidatív kórállapotban leírták cytoprotektív hatásait (*Tóth és mtsai, 2020*). Több tanulmány is részletezi a neuropeptid hímnemi traktusban, főleg a here működésében betöltött szerepét. A gonád fiziológiás folyamatai mellett, annak patológiás állapotaiban is vizsgálták a PACAP hatásait, példaképpen említhető a heretumorokban betöltött szerepe (*Nakamura és mtsai, 2014*). Ahogy a férfi nemi működésben, úgy a női reproduktív traktusban is részletezik a neuropeptid funkcióit. A méh esetében a PACAP hatásait leírták a beágyazódás, a méhtevékenység (myometrialis kontrakciók) és az uteroplacentaris keringés folyamataiban is (*Koppán és mtsai, 2022*). Érdekes módon azonban a neuropeptid jelenlétét és hatásait endometriumban, valamint szerepét a méhnyálkahártyával összefüggésben lévő kórállapotokban (pl.: endometriosis) eddig még nem vizsgálták. Az

oxidatív stresszt okozó női reprodukív kórfolyamatok közül az endometriosis keltette fel a figyelmünket. A nőgyógyászat pestisének is nevezett kórképről beszélünk, ha a méh üregén kívül, lényegében bárhol a testben, a női nemi ciklus hormonális változásaira reagáló méhnyálkahártya található (*Macer és mtsai, 2012*). Ahhoz, hogy feltérképezzük a kórosan működő szövetben létrejövő biokémiai változásokat, érdemes azt összehasonlítani egy vele mikroszkóposan hasonlóságokat mutató, ép szövet fiziológias folyamataival. A leginkább elfogadott elmélet szerint az ectopiás endometrium a méhüri, azaz eutopiás méhnyálkahártyából származik, kórszövettanilag azonos sejtek építik fel a kétélé szövetet, ezért összehasonlításuk triviálisnak mondható (*Laganà és mtsai, 2019*). Az endometriosisban detektálható biokémiai folyamatok feltételezett elváltozásainak feltárásához először érdemes megvizsgálni az ép endometriumban zajló molekuláris folyamatokat.

A legtöbb – humán betegségek gyógyítását célzó – molekuláris kutatásban egy hipotézis megerősítését, illetve megcáfolását leggyakrabban először sejtvonalakon végzik, majd állatkísérletek után következik a humán gyógyászatban történő gyakorlati alkalmazás, tesztelés. Az endometrium, illetve az endometriosis jelátvitelének feltérképezésében is léteznek ezek a lehetőségek. A humán ectopiás és eutopiás szövet azonban rendkívül speciális összetételű és lényegében egyedül az emberi faj esetében, amennyiben a méhlepényes élőlényeket vizsgáljuk. A legtöbb emlős – köztük a kísérletekre leggyakrabban használt egyszemélyes – méhnyálkahártyája menstruációs ciklus helyett oestrus cikluson megy keresztül a reprodukív életszakasz során (*Ajayi és mtsai, 2020; Sato és mtsai, 2016*). Néhány állatfaj (pl.: főemlősök) kivételével menstruációs ciklusa csak a humán endometriumnak van (*Emera és mtsai, 2012*), melynek során az őssejtekben gazdag alaprég proliferációjával egy funkcionális réteg épül fel, amely napokig fennmarad, érlik, majd a trophoblastproliferáció hiányában leválik a ciklus elején (*Ferenczy és mtsai, 1991*). A menstruáló emlősökkel való kísérletezés hátránya, hogy a „hozzáférhetőségük” rendkívül nehéz, tartásuk költséges, illetve a velük való kísérletezés súlyos etikai problémákat vet fel. Mindezekon túl, az endometriosis szintén „humánspecifikus” kórállapot, ugyanis ectopiás endometrium spontán kizárólag az emberben és a menstruáló fajokban alakul ki (*Simitsidellis és mtsai, 2018*). Bár léteznek olyan oestrus ciklussal bíró állatmodellek, amelyeket az endometriosis kialakulásának tanulmányozására hoztak létre, egyik sem tökéletes, nem fedi le a kórállapot összes aspektusát. Példaként említhetők azok az állatmodellek, amelyeknél méhüri endometriomot ültetnek műtéti úton a hasfali peritoneumra. Bár az adhézió tanulmányozása lehetségessé válik, ha feltételezzük, hogy az eutopiás és ectopiás méhnyálkahártya biokémiai folyamatai sok tekintetben eltérnek egymástól, ezeknél a modelleknél lényegében különbségek nem detektálhatók molekuláris szinten, hiszen

mindkétféle vizsgált szövet ép, egészséges (*Grümmer, 2006; Story és mtsai, 2004, Taniguchi és mtsai, 2021; Tirado-González és mtsai, 2010*).

A méhnyálkahártya egy komplex szövet, amelyet sokféle sejttípus épít fel: az endometriumot alkotó össejtek és terminálisan differenciálódott sejtek (*Evans és mtsai, 2016; Gargett és mtsai, 2009*). Ez a diverz populáció egy olyan szöveti miliót hoz létre, amely finomhangolt, élénk sejtközi kommunikáción alapuló folyamatokkal biztosítja a nyálkahártya ciklusonkénti felépülését, megújulását és ép funkcióját (*Nikolakopoulou és mtsai, 2021*). Az ectopiás és eutopiás szövet mikroszkóposan (kórszövettanilag) azonos sejtekből épül fel (*Camboni és mtsai, 2021*). Az endometrium vizsgálatára használt sejtvonalakat gyakran patológiás eutopiás méhnyálkahártyából, vagy menstruációs vérből izolálják, és általában csak egyféle sejttípusát tartalmazzák a szövetnek. Emiatt ezekkel a sejtvonalakkal való kísérletezés során az endometriumnak csak bizonyos tulajdonságait lehet vizsgálni. Ráadásul sok sejtvonal immortalizált. Ezeknek, és a kóros nyálkahártyából izolált sejteknek a molekuláris folyamatai sok ponton eltérnek az ép szövet működésétől (*Du és mtsai, 2016; Musina és mtsai, 2008; Noumoff és mtsai, 1987; Holdsworth-Carson és mtsai, 2019*). Az endometriosis modellezésére használt sejtvonalak szintén nem tartalmazzák a szövet minden sejttípusát, így például a sejtközi kommunikáción alapuló folyamatok nem vizsgálhatók, a sejtvonal nem tükrözi hűen a komplex szövet működésének minden aspektusát (*Fan, 2020*).

A fentebb említett okok miatt a sejtvonalak és az állatmodellek alkalmazása, bár bizonyos szöveti tulajdonságok vizsgálatára kiválóan megfelelnek, mégsem alkalmasak ennek a sokrétű szövetnek a tanulmányozására. Logikus következtetés tehát, hogy a biokémiai folyamatok feltérképezésére a legmegfelelőbb döntés magának a humán endometriumnak és endometrioid mintának a kísérletekbe való bevonása. Tudni érdemes azonban, hogy míg az ectopiás szövet eltávolításával relatíve könnyen elérhető minta biztosított az alapkutatókat végző szakemberek számára, addig a méhüregi nyálkahártya kinyerése komoly etikai problémákat vet fel. Az eutopiás szövetből történő mintavétel ugyanis csak és kizárólag megfelelő sebészeti javallatra történhet. Ezeket – a szövet kinyerését célzó – műtéteket általában azért végzik, mert a preoperatív kivizsgálás során egy, a nyálkahártya működésében bekövetkezett patológiás folyamatot feltételeznek az indikációt adó tünetek háttérében (pl.: rendellenes, bőséges hüvelyi vérzés háttérében gyakran polypus jelenléte, vagy endometrium hyperplasia áll) (*McCluggage, 2006; Maclean és mtsai, 2020*). Így jelentősen csökken az esélye annak, hogy egy kutató ép eutopiás nyálkahártyamintát vizsgáljon a kísérletek során.

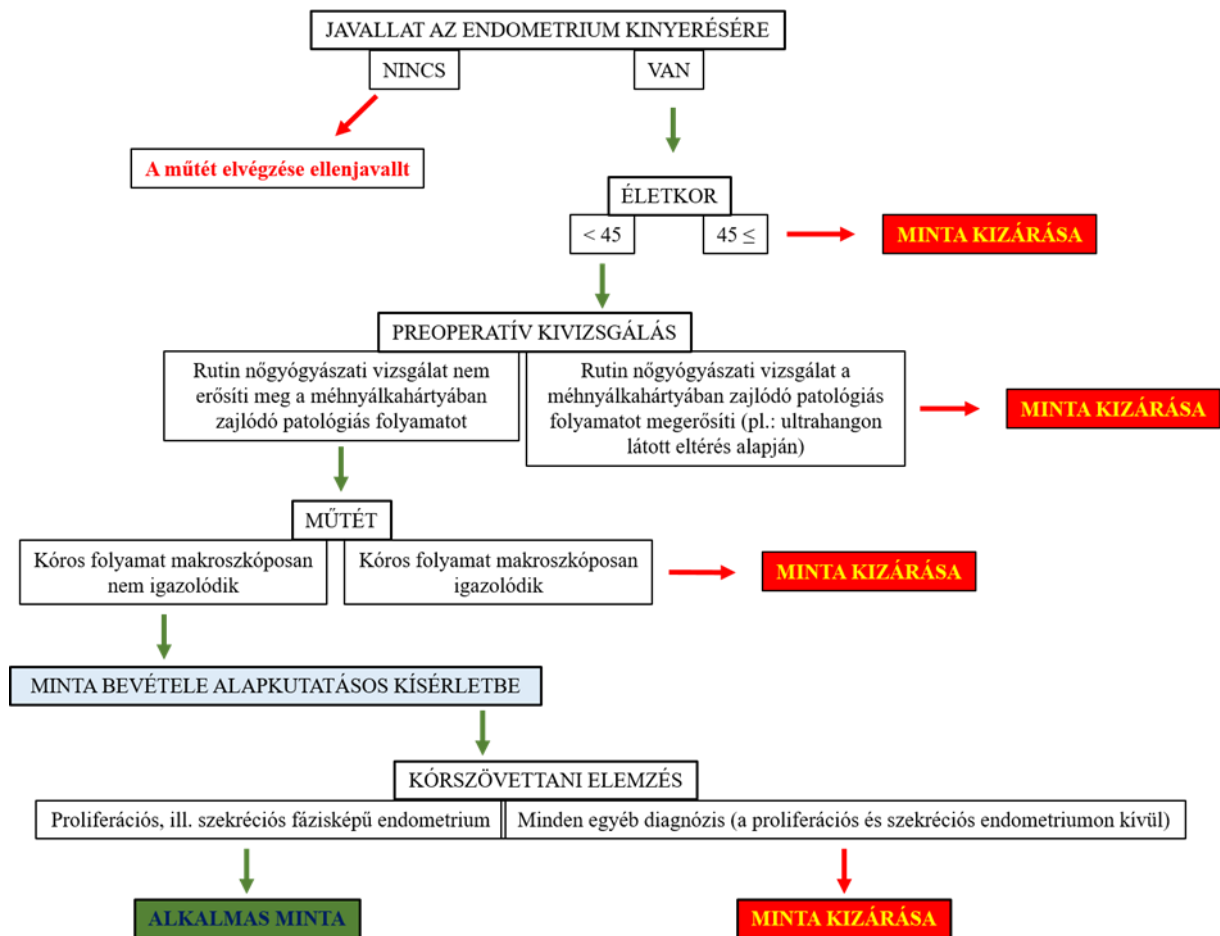
Kutatásom során ezért céltom volt annak felderítése, hogy a sebészi úton eltávolított eutopiás endometrium mintákból mekkora hányad alkalmas arra, hogy megfelelő kontrollként

szolgáljon *in vitro* kísérletekben az ectopiás szövet biokémiai folyamatainak feltárására, illetve ezáltal a két szövetféleség összehasonlítására. Ennek kiderítésére retrospektív analízissel egy három évet felölelő periódus során a DE KK Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáról DE KK Patológia Intézetbe „Szabálytalan havivérzés k.m.n.” (N9260) BNO kóddal feladott műtéti minták adatait néztük át, összesen 1126 zárójelentést és kórszövettani leletet. Mindezekből 939 műtét célozta kizárólag az endometrium méhürből való kinyerését. A fennmaradó 213 eset kizárásra került, mivel ezeknél az endometrium kinyerése csak részét képezte egy másik operációnak (pl.: cervicalis polypus ablatiójakor kiegészítő endometrium curettage), vagy a műtét során méheltávolítás történt. A három fő sebészeti eljárás, amellyel endometrium minta biztosítható: a méhkaparás (curettage, vagy abrasio), a hysteroscopia során történő mintavétel (biopszia), illetve a méheltávolítás (hysterectomia). Utóbbi műtétet akkor végzik el, amikor bizonyítottan patológiás folyamat zajlik a méhben (pl.: endometrium hyperplasia, endometrium carcinoma) (Maclean és mtsai, 2020). Emiatt jelen kutatásban csak azokat a mintákat vizsgáltuk, amelyeket méhkaparás, illetve biopszia útján távolítottak el. Bizonyított, hogy egy kórosan elváltozott endometriumban számos molekuláris eltérés lehet az ép szövethez képest (Lax, 2007; Llobet és mtsai, 2009; Yeramian és mtsai, 2013; Zauber és mtsai, 2015). Éppen ezért csak egészséges méhnyálkahártya (proliferációs és szekréciós fázisképű endometrium) lehet alkalmas molekuláris vizsgálatoknál kontroll szövetnek. Ezen túlmenően, az is igazolt, hogy a perimenopausalis méhnyálkahártya génexpressziós folyamatai számos ponton eltérhetnek a premenopausalis endometriumban megfigyelhetőhöz képest (Erikson és mtsai, 2017). Mivel a 45 éves korban, vagy az előtt bekövetkező menopausát korai menopausának nevezzük (Shuster és mtsai, 2010), ezért a 45 éves, vagy annál idősebb korban D&C és HSC során kinyert minták szintén kizárásra kerültek.

Amikor egy műtéti minta az alapkutatást végző laboratóriumba érkezik, a kórszövettani diagnózisa ismeretlen. A kutatásunk alapján, 96% annak az esélye, hogy ilyenkor patológiás endometriomot vizsgálunk. Ezért feltételeztük azt, hogy egy klinikai kizárási és beválogatási kritériumokon alapuló szűrőprotokoll növelheti az esélyét annak, hogy ép szövetmintával kezdjük meg kísérleteinket. A III.2.3-as pontban részletezett kritériumok használatával 22%-ra nőtt annak az esélye, hogy ép szövetet vizsgálunk az *in vitro* kísérletek során.

Annak oka, hogy a D&C és HSC során kinyert minták eredményeit külön is vizsgáltuk az, hogy a kétféle módszerrel rendelkezésre álló endometrium másféle kutatástípusokra alkalmas. Míg a kaparással kinyert szövet főként a méhnyálkahártya funkcionális rétegét tartalmazza, így a fertilitás és a perimenopausa folyamatai tárhatók fel, addig a biopsziával nyert minta a bazális réteget is magában foglalja, így összejtvizsgálatokra is alkalmas (Maclean

és mtsai, 2020). Klinikai szűrőkritériumok nélkül annak esélye, hogy ép endometriumot vizsgálunk, mindkét operatív módszer esetében kicsivel több, mint 3%. Ez az arány a klinikai kritériumokat használva, D&C esetén több, mint 24%-ra, HSC esetén több, mint 13%-ra növelhető. A kutatás során azt is feltártuk, hogy mekkora a különböző endometrialis kórfolyamatok előfordulásának aránya, habár korábbi publikációkkal ellentétben, jelenleg ennek megválaszolása nem szerepelt a céljaink között. Ami megkérdőjelezhetetlen, hogy egyedül a kórszövettani vizsgálat biztosíthatja azt, hogy ép méhnyálkahártyamintát vizsgáltunk a kísérletek során (22. ábra).



22. ábra

Javasolt protokoll az endometrium minták molekuláris vizsgálatokba történő bevonására. A szövet tényleges alkalmasságát a kórszövettani vizsgálat erősíti meg. A klinikai beválogatási és kizárási kritériumok a minta alkalmazhatóságának arányát növeli meg.

Égészséges endometrium kinyerésére célszerű lehet más javallattal és módszerrel elvégzett műtét is, amelyet nem menstruációs zavarok miatt indikálnak. A méhüri sövényreszekció (TCRS), illetve a meddőségi kivizsgálások részeként elvégzett diagnosztikus HSC (ahol képpalkotó vizsgálatokkal patológiás állapot nem igazolható) során eltávolított méhnyálkahártya részek alkalmasak lehetnek *in vitro* kísérletekbe való bevonásra (Wang és

mtsai, 2013; Cholkeri-Singh és mtsai, 2015), habár az így kinyert minták kórképeinek arányáról kevés irodalmi adattal rendelkezünk. Egy másik alkalmas módszer, ami szóba jöhet, az agyhalott fertilis korú nők szervdonációja során eltávolított méhből kinyert nyálkahártyaminta. Érdeemes tudni azonban, hogy a jövőben az ily módon eltávolított méh olyan szervrecipiens páciens transzplantációja során lesz felhasználható, akinél a meddőség oka a saját méh hiánya (absolute uterine factor infertility) (*Brännström, 2017*). Ezen túlmenően, komoly etikai kérdések is felmerülnek az említett módszerrel történő endometrium kinyerésével kapcsolatban. Megfontolandó továbbá a myomák miatt eltávolított méhből való nyálkahártya mintavétel is, habár feltételezhető, hogy a jóindulatú göb jelenléte hatással lehet az endometrium biokémiai folyamataira, főleg ha az a szövetet „irritáló” submucosus leiomyoma. Ráadásul a panaszokat okozó göbök miatt történő méheltávolítást dominálónan perimenopausalis korú nőknél végzik el (*Marsh és mtsai, 2018*).

Klinikai jellegű kutatásunk egyik hibája az, hogy kizárólag az N9260 BNO kóddal kórszövetteni vizsgálatra küldött eseteket néztünk át, hiszen vérzészavar miatt elvégzett műtétek során eltávolított szövetek patológiai elemzése más BNO kóddal is kérhető (pl.: N9390 – Rendellenes méh és hüvelyvérzés, k.m.n.). Ugyanakkor irodalmi adatok arra utalnak, hogy a jelenleg leírt arányok nem változnának jelentős mértékben, továbbá az általunk vizsgált esetszám is igen nagy.

A PACAP női nemi traktus működésére gyakorolt hatásairól számos irodalmi adat található (*Koppán és mtsai, 2022*). Az endometriumban, és a mikroszkóposan hasonló sejtekből felépülő endometriosisban betöltött szerepét azonban eddig még nem vizsgálták. A neuropeptid jelátvitelét 6 db ectopiás (ECT) és 3 db eutopiás (EUT) mintában tanulmányoztuk, összesen 15 gén mRNS expressziójára voltunk kíváncsiak. A fentebb említett okok miatt rendkívül nehéz megfelelő kontrollként szolgáló ép méhnyálkahártyát vizsgálni, ezért ilyen alacsony az EUT szövetek mintaszáma. Statisztikai szempontból azonban minimum 3 minta is elegendő ahhoz, hogy egy kutatás során – összefüggést mutató eredmények mellett – értékelhető következtetéseket lessen levonni. Korábbi tapasztalatokból kiindulva, főleg az EUT mintákból korlátozott mennyiségű RNS vonható ki. Éppen ezért, kutatásunk hipotézise alapján számos szóba jövő vizsgálandó molekulából irodalmi adatok alapján kiválogattuk azokat, amelyek a legfontosabbak és összefüggésbe hozhatók egymással az endometriosis biokémiai folyamatainál.

Kísérleteink során először arra voltunk kíváncsiak, hogy a két vizsgált szövetben expresszálódik-e a PACAP. A neuropeptid pre-formájának (pre-PACAP) expresszióját az EUT

és ECT minták egyharmadában detektáltuk. Joggal merül fel a kérdés, vajon ezek alapján lehet-e bármilyen szerepe a PACAP-nak az endometrialis szövetben, ha az maga nem is minden esetben expresszálja a peptidet. Tudni érdemes, hogy a PACAP-ot nem feltétlen termeli egy adott szövet, a neuropeptid mégis befolyásolja annak működését. A PACAP ugyanis a szövet ellátó (főleg szimpatikus) idegvégződésekből, illetve a környező szövetekből is felszabadulhat, így hatást gyakorolva a környező sejtekre. Az EUT minták esetében a méheltartó idegvégzések, ECT minták esetében pedig az ovarialis sejtek, illetve a petefészket ellátó idegvégzések lehetnek forrásai a PACAP felszabadulásának (*Vaudry és mtsai, 2009*). Ráadásul minden vizsgált minta esetén kifejeződnek PACAP-kötő receptorok, még azoknál a csoportoknál is, ahol a médiumhoz nem adagoltuk a neuropeptidet. EUT mintákban a PAC1R és a VPAC2R, míg ECT mintákban a VPAC1R expresszálódott minden esetben. A hormonadagolás hatására mindkétféle szövetben fokozódott a PAC1R, a VPAC2R és ahol lehetett detektálni, a prePACAP expressziója is. Egyedül az ECT mintáknál csökkent a női nemi hormonok hatására a VPAC1R expressziója. Továbbá egyetlen esetben történt ellentétes változás a PACAP adagolásnál: EUT mintáknál hormonadagolás nélkül emelkedettebb a PAC1R expressziója, míg hormonhatásra csökkent az érték.

A PACAP számos egyéb jelátviteli út működését befolyásolja crosstalk mechanizmus segítségével, köztük a TGF β -szignalizációt (*Juhász és mtsai, 2015*). E molekula nagy figyelmet kapott az elmúlt években az ectopiás endometrium kialakulásában betöltött szerepe miatt. A TGF β szignalizációnak szerepe van ugyanis a sejtek differenciálódásában, proliferációjában és migrációs kapacitásának szabályozásában (*Gordeeva, 2019*). Endometriosisban igazolták a TGF β fokozottabb expresszióját. Az általa is szabályozott, sejtpluripotenciát fenntartó molekulák fokozottabb expressziója bizonyítékként szolgál az ectopiás laesio kialakulás összejt eredetével való magyarázatának. A három fehérjemolekula (TGF β -1, TGF β -2 és TGF β -3) közül a TGF β -1 fokozottabb expresszióját igazolták ovarialis endometrioid mintákban (*Au és mtsai, 2015*). A szövetekből kinyerhető korlátozott mennyiségű mRNS miatt éppen ezért csak a TGF β -1 expresszióját vizsgáltuk. Hormonadagolás mellett a PACAP EUT mintákban növelte, ECT mintákban pedig csökkentette a TGF β -1 expresszióját. Érdekes módon, a hormonadagolás önmagában csökkentette a molekula expresszióját az EUT minták esetében, míg a PACAP hormonok nélkül kismértékben növelte az expressziót ECT minták esetében. A TGF β -1-expresszió változást tekintve, minden további molekula expresszió vizsgálata nélkül, amennyiben csak a hormonális közegben kezelt mintákat nézzük, a PACAP hajlamosíthatja az ectopiás szövetet az ectopiás szövet képzésére, míg endometriosisban gátolja azokat a folyamatokat, amik az ectopiás szövet proliferációjához vezetnek.

A TGF β ligandként való bekötődése hatására két TGF β R-II és két TGF β R-I receptor heterotetramert képez és szerin/treonin kináz aktivitása révén szignalizációs kaszkádot indít el a sejten belül (*Tzavlaki és mtsai, 2020*). A TGF β R-I expresszió hormonális és PACAP hatására is növekedett EUT mintákban, míg ECT mintákban csökkent. Hasonló változás figyelhető meg a TGF β R-II expressziójában is, kivéve, hogy a hormonális hatás önmagában a PACAP-adagolással ellentétes hatást vált ki. Kiemelendő, hogy a TGF β receptorok közül a TGF β R-II rendelkezik ligandkötő aktivitással (*Tzavlaki és mtsai, 2020*). Hormonális közegben PACAP adagolás hatására szignifikáns volt ECT mintákban a receptor expresszió csökkenése. Ez az adat is alátámaszthatja azt a feltételezést, amelyre a TGF β -1 expresszióban bekövetkezett változásból következtettünk.

Ligandkötés hatására, a TGF β receptortetramer klasszikus jelátvitel során Smad transzkripciós faktorokat foszforilál és aktivál, amelyek a sejtmagba lokalizálódva számos gén expresszióját eredményezik (*Gordeeva, 2019; Tzavlaki és mtsai, 2020*). A korlátozott számú vizsgálható molekulák közül a Smad2 és Smad3 expressziójára összpontosítottunk. Tekintve, hogy a Smad4, mint co-Smad minden esetben R-Smadhoz kötődik a sejtmagi transzlokáció során, ennek expresszióját nem vizsgáltuk. Továbbá, a Smad6 és Smad7, mint I-Smad, valamint a dominálón BMP jelátvitel által aktivált Smad1, Smad5 és Smad8 expressziójának vizsgálatától szintén eltekintettünk (*Gordeeva, 2019*). Hormonális közegben a PACAP adagolás EUT mintáknál növelte, míg ECT mintáknál csökkentette a Smad2 és Smad3 expresszióját. ECT mintáknál ráadásul a Smad expresszió csökkenés szignifikáns. Egyedül EUT mintáknál figyelhető meg ugyanaz, mint a TGF β R-II expresszió esetében is: a hormonadagolás önmagában csökkentette az expressziót.

Az endometrium a reprodukív életszakaszban egy folyamatosan megújuló szövet. A regenerációt az endometrialis őssejtek biztosítják (*Cousins és mtsai, 2018*). A pluripotencia fenntartásáért, a proliferációért, a differenciálódásért és sejt migrációért felelős őssejt transzkripciós faktorok fokozott expressziója az őssejtek ectopiás lokalizációban való megtelepedést segíthetik elő, így kialakítva az endometrioid laesiót (*Chang és mtsai, 2013; Götte és mtsai, 2011*). Ilyen transzkripciós faktorok az irodalomban legtöbbször említett Nanog, Oct4 és Sox2 (*Song és mtsai, 2014*). Mindegyik fokozott expresszióját igazolták endometriosisban, illetve mindegyik expresszióját befolyásolja a TGF β jelátviteli kaszkád (*Xu és mtsai, 2008; Au és mtsai, 2015; Song és mtsai, 2014; Götte és mtsai, 2011*). Mindhárom faktor expresszióját kimutattuk az ECT és EUT mintákban is, habár az ECT minták csupán felében detektáltuk az Oct4 expressziót. Ennek a magyarázata az lehet, hogy az Oct4 szerepe elsősorban a sejtek migrációjában van (*Chang és mtsai, 2013*). Feltételezhető, hogy egy

meglévő ectopiás szövet nem feltétlenül rendelkezik állandóan migrációs kapacitással. Hormonális közegben PACAP adagolás hatására a Nanog és a Sox2 expressziója is növekedett EUT mintákban, míg ECT mintákban csökkent. Csupán a hormonok alkalmazása EUT és ECT mintáknál is csökkentette a Sox2 és Oct4 expressziót. Míg az Oct4 expresszió PACAP adagolásra EUT és ECT mintákban is fokozódott. Mindezekből feltételezhető, hogy a PACAP EUT mintákban inkább az ectopiás szövet képzése irányába hathat, míg ECT mintáknál csökkentheti az endometrioid laesio proliferációját, annak ellenére, hogy annak migrációs kapacitását viszont növelheti. Ennek tisztázása céljából megvizsgáltunk három olyan molekulát, amelyek fokozott expresszióját szintén bizonyították endometriosis mintákban.

A p21 a sejtciklus szabályozásában fontos ciklinfüggő kináz inhibitor. Proliferációgátló hatását antiapoptotikus hatása révén fejti ki. Megnövekedett expressziója ugyanakkor onkogén hatás irányába tereli a szövet molekuláris folyamatait, tekintve, hogy az apoptózis gátlása a sejtszaporulat irányába tolja az egyensúlyi folyamatokat (*Gartel és mtsai, 2002*). A p21 expresszió zavarát szintén kimutatták endometriosisban (*Zarkadoulas és mtsai, 2019*). Ráadásul a TGF β a Smadok közvetítésével és a Smad3 PKA-hoz való kötődésével (és annak aktiválásával) is a p21 transzkripcióját eredményezi (*Karimian és mtsai, 2016; Moustakas és mtsai, 2005*). A PKA kulcseleme a PACAP kanonikus jelátviteli kaszkádjának (*Juhász és mtsai, 2015*), így a p21 expresszió egy közös pontja lehet a PACAP és a TGF β szignalizációnak. A PACAP az EUT mintákban növelte, míg ECT mintákban (hormonális közegben szignifikánsan) csökkentette a p21 expresszióját.

A VEGF a szövetek érújdonképzéséért felelős molekula (*Shibuya, 2011*). Fokozott termelődését szintén bizonyították endometriosisban, illetve expresszióját a TGF β -1 serkenti (*Fasciani és mtsai, 2000; Young és mtsai, 2015*). A p21-hez hasonlóan a PACAP adagolása fokozta a VEGF expresszióját EUT mintákban, míg ECT mintákban csökkentette azt.

Az Aromatáz kulcsenzim a szervezetben az androgén hormonok női nem hormonokká való átalakításában (*Bulun és mtsai, 2004*). A molekula nem minden szövetben expresszálódik. Az Aromatáz aktivitás kimutatható a petefészek preovulációs granulosa és lutealis sejtjeiben, a placenta syncytiotrophoblast sejtjeiben, férfiakban a here Leydig- és Sertoli-sejtjeiben, valamint a prostata luminaris és stromalis sejtjeiben, a csont- és a zsírszövetben, valamint az agyvelő számos területén belül (*Stocco, 2012*). Endometriosisban az ectopiás szövet fokozott mennyiségben expresszálja az Aromatázt (*Bulun és mtsai, 2001*). A PACAP adagolása (hormonális közegben szignifikánsan) csökkentette az enzim expresszióját ECT mintákban. Talán ez a legerősebb bizonyítéka annak, hogy a PACAP az ectopiás szövet kialakulása, illetve fenntartása ellenében hat. A kutatás során egy érdekes dolgot fedeztünk fel. A legtöbb

publikáció egyetért abban, hogy az Aromatáz egészséges eutopiás endometriumban nem termelődik, nincs aktivitása, illetve mRNA szinten sem expresszálódik, ugyanis a gén promóter régiójának metilációja blokkolja az enzim kifejeződését (*Maia és mtsai, 2012; Stocco, 2012*). Endometriosisos páciensek eutopiás méhnyálkahártyájában ugyanakkor változó mértékben expresszálódhat az Aromatáz (*Maia és mtsai, 2009*). A kísérleteink során vizsgált mindhárom EUT mintában kimutattuk az enzim mRNA expresszióját, annak ellenére, hogy a páciensek egyikének sem volt a kórtörténetében endometriosisa. A hormonadagolás és hormonális közegben a PACAP adagolása is szignifikánsan növelte az Aromatáz expresszióját. Érdekes módon a kezeletlen szövetekben is igazolható az enzim mRNA-e. Újabb kutatások igazolták, hogy az endometrialis stroma sejtek a decidualizáció során (progeszteron és cAMP stimulus hatására) elkezdenek Aromatáz enzimet expresszálni (*Piccinato és mtsai, 2018*). A hormonkezelt mintákat a progeszteronfázisban megfigyelhető hormonkoncentrációkkal, azaz a decidualizációt eredményező mennyiségekkel kezeltük a szövettenyésztés terminálásáig, így nem meglepő, hogy az enzim expressziója minden hormonkezelt minta esetében detektálható. Az endometrium endometrialis mirigy és stroma sejtekből épül fel. Az irodalmi tényt, hogy az enzim nem expresszálódik eutopiás endometriumban, megkérdőjelezheti, hogy milyen mintákban vizsgálták azt. Jelen disszertáció második kutatásrészében részleteztem, milyen nehézségekbe ütközik a kutató a méhnyálkahártya folyamatainak tanulmányozása során. Meglehet, azokat a mintákat nem tenyésztették, illetve nem tartották fenn egy teljes ciklushosszon át, amelyekben az enzim expresszióját vizsgálták. Ráadásul az eredeti kísérletben, amelynél az Aromatáz expresszióját endometriumban vizsgálták, a szöveteket hysterectomiát követően curettálták ki a méh üregéből. Bár a publikáció szerint, a méheltávolítás nem a méhnyálkahártya kórfolyamata miatt történt, a hysterectomia elvégzése is patológiás állapot miatt javallott (*Bulun és mtsai, 1993*). Bizonyos, hogy további vizsgálatokat igényel a fentebb részletezett ellentmondás tisztázása. Ugyanakkor feltűnő jelenség az is, hogy az EUT és ECT szövetekben pont ellentétes módon változott az Aromatáz enzim expressziója. Ráadásul, az alacsony EUT mintaszám ellenére, a változás szignifikánsnak bizonyult PACAP adagolásra, csak úgy, mint a csökkenés az ECT mintáknál.

Külön említést érdemelnek azok az esetek, ahol a PACAP eltérő változást okozott hormonadagolás nélkül és hormonadagolás mellett. EUT mintáknál ilyen volt a PAC1R, ECT mintáknál pedig a TGF β -1 expressziója. Megemlítendőek továbbá azok az esetek, amikor a molekula expressziója ellentétes változást mutatott a kontroll mintához képest hormonadagolásra, és hormonális közegben PACAP adagolásra. EUT mintáknál ilyen volt a

PAC1R, a TGF β -1, a TGF β R-II, a Smad3, az Oct4 és a Sox2, ECT mintáknál pedig a VPAC2R, a TGF β R-II, az Oct4 expressziója.

A női nemi hormonok EUT és ECT mintákra gyakorolt – mRNS expresszióban megnyilvánuló – hatása sok esetben nem meglepő eredmény. Az eutopiás endometrium minden ciklus elején megújul, a basalis réteg egy vastosabb funkcionális sejtréteget hoz létre. Ehhez szükséges az őssejtek proliferációja és elköteleződése a differenciálódás irányába, valamint a nagyobb térfogatú szöveti réteg megjelenésével – a tápanyagigény kielégítése miatt – az érújdonképződés folyamata (*Cousins és mtsai, 2018; Figueira és mtsai, 2011*). A TGF β jelátviteli molekulák és az őssejt markerek expressziója meglehetősen, ezért mutat a kontroll csoportéhoz közeli mértékű ingadozást. Ezen felül fokozottabb a VEGF és a p21 expressziója. A PACAP adagolása a legtöbb vizsgált molekula expresszióját ehhez képest növeli meg, így feltételezhető, hogy a méhnyálkahártya működését inkább az ectopiás szövet képzésére hajlamosító folyamatok irányába tolja el. Jelenlegi tudásunk szerint, az endometriosis egy ösztrogénfüggő szövet, fennmaradásához szükséges a női nemi hormon jelenléte (*Camboni és mtsai, 2021*). Ennek ellenére, a kísérletes eredményekből is látható, hogy a hormonadagolás mégis az ectopiás szövetet fenntartó molekuláris elváltozások ellenében hat. Ez az eredmény érdekes módon azonban nem meglepő, hiszen az endometriosis terápiájában a COCP (combined oral contraceptive pills, azaz kombinált orális fogamzásgátló készítmények) alkalmazása jótékony hatású (*Rafique és mtsai, 2017*). A PACAP a legtöbb vizsgált molekulánál potenciózza ezt a hatást, éppen ezért feltételezhető, hogy endometriosisban inkább az ectopiás szövet fennmaradását szolgáló folyamatok ellenében hat.

A molekuláris kísérletünk sok előnyös dolog mellett sajnos számos hiányosságot is magában hordoz. Első körben, az eltávolított szöveteket lényegében elválasztottuk az immunrendszerrel. Az immunfolyamatok eltérései jelentős szereppel bírnak az endometriosis kialakulásában és a laesio fennmaradásában (*Farland és mtsai, 2020*). Ugyanakkor pont ezért hasznos is lehet ez az alkalmazott tenyésztési módszer, hiszen így az EUT és ECT szövetek közti különbségek az immunrendszer által befolyásolt folyamatok nélkül tanulmányozhatók. A kísérletek másik hibája, hogy a molekuláris változásokat nem vizsgáltuk fehérjeszinten. Egy gén mRNS expressziója ugyanis önmagában nem bizonyítja azt, hogy a transzlációt követően valóban változás jön létre egy szövetben. Annak oka, hogy csak az mRNS szintű változásokat tanulmányoztuk az, hogy a nukleinsav és fehérjeexpresszió változásait egy mintából célszerű vizsgálni. Az endometrioid cystafal elég nagy méretű lehet, hogy ezt megtegyük, viszont az eutopiás endometrium minta túl kicsi ahhoz, hogy mRNS és fehérjevizsgálatokra is alkalmas mennyiségű csoportokra osszuk fel. Az mRNS expresszióban bekövetkező eltérő változások

azonban felhívják a figyelmet arra, hogy a későbbiekben érdemes foglalkozni az EUT és ECT szövetek közötti különbségek részletes feltárásával. A harmadik említhető hibája a kutatásnak, hogy nagyon alacsony az EUT mintaszám. Ennek magyarázata jelen dolgozat második kutatásrészében részletezett okokban rejlik. Kicsi az esélye, hogy a kutató ép endometriumot vizsgál a kísérletek során, ráadásul, saját tenyésztési tapasztalatunkra alapozva, az eutopiás minta jóval érzékenyebb és sérülékenyebb szövet, mint az ectopiás minta. Az alacsony EUT mintaszám ellenére, legalább három elem szükséges egy statisztikailag értékelhető következtetés levonására. Ráadásul az EUT és az ECT minták esetében a PACAP kezelésre adott expressziós változások szabályosan eltérnek egymástól. Így feltételezhető, hogy a mintaszám növelése nem befolyásolná dominánsan a jelenleg kapott eredményeket.

Kiemelendő végül, hogy a két hormonfüggő szövetnél kutatások során először igyekeztünk imitálni a női nemi ciklus hormonális változásait. Jelen kísérleteknél természetesen nem kaptunk választ arra, hogy az endometrium különböző ciklusállapotaiban ugyanezek a detektált expressziós változások figyelhetők-e meg. Ugyanakkor a minták azonos ciklusnapig való kezelése, illetve feldolgozása standardizálhatóvá tette a megfigyelt változásokat. Ráadásul a legtöbb esetben hormonális kezelés nélkül is hasonló expressziós változások detektálhatók PACAP-adagolás mellett. Így nem biztos, hogy adódnának expressziós különbségek a minta eltávolítás mindenkori ciklusállapota és a ciklusvégi állapota között.

Jelen kutatás során az ectopiás szövetek közül csak ovarialis endometrioid mintákat vizsgáltunk. A későbbi kísérletek során kérdés lehet az is, vajon van-e különbség a PACAP és TGF β jelátvitelben a peritonealis, a mélyen infiltráló és a távoli lokalizációkban megtelepedő endometriosis szövetek között.

Jelen dolgozat két, kísérletes kutatásrészéből kiemelendő az alkalmazott modellek szerepe. Tekintve, hogy az Alzheimer-kórban hasonló molekuláris eltéréseket igazoltunk a here esetében, mint ami az agyban megfigyelhető, a jövőben megfontolható, hogy bizonyos, a kórfolyamatokat kialakító jelátviteli változások feltárására egy másik szövet is alkalmas lehet, akár a kísérleti állatok terminálása nélkül is. Az endometrium és endometriosis vizsgálatok a háromdimenziós struktúra megőrzésével, valamint a hormonális ciklus imitálásával közelebb kerülhetünk az ectopiás szövet kórfolyamatainak megismeréséhez. Az általunk újonnan kidolgozott tenyésztési módszer adekvát lehetőség a molekuláris folyamatok tanulmányozására, a szövetek fenntarthatók általa, a kísérletek végén pedig az eredmények standardizálhatóságát biztosítja.

VI. Konklúzió

A PACAP nem tartozik azok közé az endogén anyagok közé, amelyek a szervezetben prominens változásokat hoznak létre. Ennek ellenére számos élettani és kóros folyamatban fontos szereppel bír: a jelenléte, illetve a hiánya is befolyásolja a szövetek biokémiai folyamatait. Jelen kutatásokban az Alzheimer-kórban és az endometriosisban betöltött szerepét vizsgáltam. Az előbbi betegségnél a PACAP jelátvitel hím gonádban megfigyelhető eltéréseit, az utóbbi kórállapotnál a neuropeptid eutopiás és ectopiás szövetre gyakorolt hatásait tanulmányoztam.

Az Alzheimer-kór egy olyan degeneratív kórkép, amely a központi idegrendszeren kívül perifériás szöveteket is érinthet, köztük a hím gonádot is. Ismert, hogy a betegségben a KIR bizonyos területein a PACAP jelátvitele sérül. Az agy és a here sejtközötti kapcsolatait (neurogliasejt és Sertoli-csírasejt) és vér-szöveti barriereit (vér-agy gát és vér-here gát) tekintve hasonlóságokat mutatnak egymással. Igazoltuk, hogy az Alzheimer-kórban romlik a hím gonád szöveti felépítése: csökken a heretubulusok sejtszáma, illetve sérül a vér-here barrier felépítése is. A mikroszkóposan igazolható károsodásokban szerepet játszik a PACAP szignalizáció alulműködése. A rendszeres fizikai aktivitás, amely a KIR-ben is lassítja a neurodegeneratív betegség progresszióját, jótékony hatással van a here működésére is: a mozgás normalizálja a PACAP jelátvitel eltéréseit a hím gonádban. A neuropeptid szignalizációja nagy valószínűséggel egyike azoknak a biokémiai folyamatoknak, amelyek a fizikai tevékenység során aktiválódnak. Feltételezhető továbbá, hogy az Alzheimer-kórt modellező egerek kísérletekbe való bevonása alkalmas lehet a here degenerációs folyamatainak tanulmányozására. Továbbá, a hím gonád megfelelő szerv lehet a fizikai aktivitás által aktivált biokémiai folyamatok és a szöveti regenerációs mechanizmusok vizsgálata során.

Az endometriosis szerkezeti és viselkedésbeni hasonlóságokat mutat az endometriummal, a legelfogadottabb elméletek szerint is az eutopiás szövetből ered. A kóros és egészséges szövet összehasonlítása biztosíthatja a molekuláris folyamataik közti különbségek feltárását. Ezek az eltérések jelenthetik az endometriosis eliminációjában alkalmazható terápiás lehetőségek megteremtését. Nehéz azonban megfelelő kontrollt találni az eutopiás szövet vizsgálatára, a sejtvonalak és az állatmodellek tanulmányozása nem fedi le a humán endometrialis szövetek biokémiai folyamatainak minden aspektusát. Komoly akadályokba ütközik ugyanakkor az a kutató is, aki a legalkalmasabbnak tűnő méhüregi nyálkahártya molekuláris mechanizmusait tanulmányozza. Ugyanis csak az egészséges endometrium jelent valódi kontroll szövetet az endometriosisal való összehasonlítás során. A

műtéti eljárásokkal kinyerhető méhnyálkahártya nagy része azonban kóros, így molekuláris folyamataik is számos ponton eltérnek az egészséges szövetétől. Nem túlzás kijelenteni azt, hogy a legtöbb korábbi kutatás eredménye, amely során az endometriumot tanulmányozták, kellő kritikával kezelendő. Retrospektív analízisünkkel bizonyítottuk, hogy a vizsgálandó endometrium minták kiválasztásánál a klinikai beválogatási és kizárási kritériumok alkalmazása növeli annak esélyét, hogy az alap kutatás során ép méhnyálkahártyával dolgozunk. Továbbá minden minta kórszövettani vizsgálata elengedhetetlen a megbízható eredmények elfogadása érdekében. A kóros szövet igazolása kizárási feltételt jelent.

A PACAP endometriumban és endometriosisban betöltött szerepét korábban még nem vizsgálták. Kutatásunk során először igazoltuk, hogy mindkétféle szövetben expresszálódnak PACAP-kötő receptorok, annak ellenére, hogy a neuropeptid maga nem expresszálódik minden esetben. Először imitáltuk továbbá a női nemi ciklus hormonális változásait, amely az eutopiás és ectopiás szövetek működésére is hat a szervezeten belül. A PACAP adagolása hormonális közegben eltérő, a kontrollhoz viszonyított ellentétes expressziós változásokat eredményez az endometrium és az ovarialis endometrioid mintákban. További vizsgálatok szükségesek természetesen ennek megerősítésére. Jelen kísérleti eredmények ismeretében úgy tűnik, a PACAP endometriosisban bizonyos mértékben gátolja azokat a mechanizmusokat, amelyek az ectopiás szövet kialakításában szerepet játszanak, míg a méhnyálkahártyában a kóros szövet képzési folyamatainak irányába hat. Utóbbi esetén kérdés, hogy mi a határ a kontrollhoz viszonyított expressziós változásoknál, amely a rendszeres időközönként differenciálódó és proliferáló szövet újraépítését elősegíti, illetve amely az ectopiás szövet létrejöttét okozza. Nem valószínű, hogy a jövőben a PACAP önmagában elegendő lesz az endometrioid szövet eliminálására, ugyanakkor kombinált terápiában való alkalmazása potenciális lehetőség lehet a kór állapot kezelésében. A PACAP adagolás által létrehozott expressziós változások bizonyítékul szolgálnak arra, hogy alapvető különbségek vannak az eutopiás és ectopiás szövetek biokémiai folyamatai között.

Discussion of Results and New Scientific Findings of the Thesis

PACAP is not one of the endogenous substances that cause prominent changes in the body. Nevertheless, it plays an important role in many physiological and pathological processes: its presence or absence influences biochemical processes in tissues. In the present research, we investigated its role in Alzheimer's disease and endometriosis. An inflammatory pathogenesis involving oxidative stress processes is thought to underlie the development of both diseases. We have studied the effects of PACAP signaling in the male gonad in Alzheimer's disease and the effects of neuropeptide on eutopic and ectopic tissue in endometriosis.

Alzheimer's disease is a degenerative disease that can affect peripheral tissues other than the central nervous system, including the male gonad. PACAP signaling is known to be impaired in certain areas of the CNS. There are similarities between the brain and testis in terms of their intercellular connections (neuron-glia cell and Sertoli-germ cell) and blood-tissue barriers (blood-brain barrier and blood-testis barrier). It is not surprising, therefore, to assume that certain neurodegenerative diseases also manifest to some extent in peripheral tissues other than the central nervous system. Abnormal production or accumulation of A β -peptide is thought to underlie the pathogenesis of Alzheimer's disease. This molecule is formed from APP, a protein produced and found not only in the central nervous system but also in the testis. In intact tissues, amyloidogenesis is a controlled process. In contrast, pathological amyloid is formed in Alzheimer's disease. It has been shown that in Alzheimer's disease the tissue structure of the male gonad is impaired: the number of cells in the seminiferous tubules is decreased and the structure of the blood-testis barrier is impaired. Underactivation of PACAP signaling plays a role in the microscopically verifiable damage. Regular physical activity, which also slows down the progression of neurodegenerative disease in CNS, also has beneficial effects on testicular function: exercise normalises abnormalities in PACAP signaling in the male gonad. Neuropeptide signaling is most likely one of the biochemical processes that are activated during physical activity. We further hypothesize that the use of mice modeling Alzheimer's disease in experiments may be suitable for studying testicular degeneration processes. Furthermore, the male gonad may be a suitable organ for studying biochemical processes and tissue regeneration mechanisms activated by physical activity.

Endometriosis shares structural and behavioural similarities with the endometrium, and is also thought to originate from eutopic tissue. Comparison of abnormal and healthy tissue may provide insight into the differences between their molecular processes. These differences may

represent therapeutic options for the elimination of endometriosis. However, it is difficult to find an appropriate control for the study of eutopic tissue, and the study of cell lines and animal models does not cover all aspects of biochemical processes in human endometrial tissue. The endometrium is a complex tissue built up by many different cell types: the stem cells and terminally differentiated cells that make up the endometrium. This diverse population creates a tissue milieu that ensures the cyclical regeneration, renewal and intact function of the mucosa through finely tuned processes based on lively intercellular communication. The ectopic and eutopic tissue is composed of microscopically (histopathologically) identical cells. The cell lines used to study the endometrium are often isolated from pathological ectopic endometrium or menstrual blood and usually contain only one type of cell from the tissue. In addition, many cell lines are immortalised. The molecular processes of these cells, and those isolated from abnormal mucosa, differ in many respects from the function of intact tissue. The uterine mucosa of most mammals, including those most commonly used for experiments, undergoes an estrous cycle instead of a menstrual cycle during the reproductive life cycle. With the exception of some species (e.g. primates), only the human endometrium has a menstrual cycle. The disadvantages of experimenting with menstruating mammals are that they are extremely difficult to 'access', expensive to keep and raise serious ethical issues. In addition, endometriosis is also a 'human-specific' condition, as ectopic endometrium develops spontaneously only in humans and menstruating species. However, there are also serious obstacles for researchers studying the molecular mechanisms of the endometrium, which appears to be the most suitable. For only healthy endometrium is a true control tissue for comparison with endometriosis. However, most of the endometrium that can be harvested by surgical procedures is abnormal, so its molecular processes differ from those of healthy tissue in many respects. It is not an exaggeration to say that the results of most previous studies of the endometrium should be treated with due criticism. Our retrospective analysis has demonstrated that the use of clinical inclusion and exclusion criteria in the selection of endometrial specimens for testing increases the chances of working with intact endometrium in experimental research. Furthermore, histopathological examination of all samples is essential to accept reliable results. Histopathological confirmation of abnormal tissue is an exclusion criterion.

The role of PACAP in endometrium and endometriosis has not been previously investigated. In our study, we have demonstrated for the first time that PACAP-binding receptors are expressed in both types of tissue, despite the fact that the neuropeptide itself is not expressed in all cases. We have also mimicked for the first time hormonal changes of the female menstrual cycle, which affects the function of both eutopic and ectopic tissues within the body.

Administration of PACAP in hormonal media results in differential expression changes in endometrial and ovarian endometrioid samples, opposite to those of controls. Further studies are of course needed to confirm this. In view of the present experimental results, it appears that PACAP in endometriosis inhibits to some extent the mechanisms involved in the formation of ectopic tissue, while in the endometrium it acts towards the formation of abnormal tissue. In the latter case, the question is what is the limit between expression changes relative to the control that promote the remodelling of tissue that periodically differentiates and proliferates and those that cause the formation of ectopic tissue. It is unlikely that PACAP alone will be sufficient to eliminate endometrioid tissue in the future, however, its use in combination therapy may be a potential option in the management of this condition. The expression changes induced by PACAP administration provide evidence that there are fundamental differences in the biochemical processes of eutopic and ectopic tissue.

Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönettel tartozom családtagjaimnak és barátaimnak, akik PhD éveim alatt végig támogattak és segítettek engem, a jó és rossz pillanatokban egyaránt. Közülük is megtisztelő és kiemelendő Dr. Pályka Zsuzsanna jó barátom, neurológus kolléganőm szakmai téren nyújtott segítsége. Köszönet illeti Dr. Antal Miklós Professzor Urat, Dr. Szücs Péter Docens Urat és Dr. Zákány Róza Docens Asszonyt, akiknek az intézetvezetése, illetve laborvezetése alatt végezhettem kísérleteimet. Megtiszteltetés volt kollaboráns kollégáimmal együtt dolgozni, akik nélkül a kutatások nem születhettek volna meg, köztük említendő Dr. Reglődi Dóra Professzor Asszony (PTE-ÁOK, Anatómiai Intézet), Dr. Jakab Attila Docens Úr és Dr. Török Péter Docens Úr (DE KK Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika), Dr. Orlik Brigitta (DE KK Patológia Intézet), valamint Dr. Radák Zsolt Professzor Úr (Magyar Testnevelési és Sporttudományi Egyetem). Kiemelendő esszenciális, szorgalmas és lelkes munkájuk korábbi TDK hallgatóimnak, immár orvos kollégáimnak, Dr. Kulcsár Máténak és Dr. Fazekas Lászlónak, akik nem elhanyagolható mértékben járultak hozzá a kísérleti eredmények megszületéséhez. Köszönettel tartozom a DE-ASZFI jelátviteli laboratóriumunk minden munkatársának, közülük kiemelendő laborasszisztensünk, Bíróné Barna Krisztina, aki a munkám során nem csak legmagasabb szintű szakmai segítségével, de anyai gondoskodásával és szeretetével is megajándékozott engem. Végül, de nem utolsó sorban, a legnagyobb és meghálálhatatlan köszönet illeti témavezetőmet, Dr. Juhász Tamást, aki jó tanácsaival, kiemelkedő szakmai hozzáértésével és tudásával, valamint atyai támogatásával és barátságával kísért végig utamon TDK és PhD éveim idején és jelenleg, klinikai orvosi pályám alatt is.

A kutatás az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-17-2, ÚNKP-19-3, ÚNKP-20-3-II és ÚNKP-21-3-II kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült. További támogatók: NKFIHK139396, valamint EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00009 „Az orvos-, egészségügyi- és gyógyszerészképzés tudományos műhelyeinek fejlesztése”.

Saját és társszerzői eredmények

Az első kutatásrészben az állatok tartását és aktív testmozgatását a Semmelweis Egyetem Testnevelési és Sporttudományi Karának munkatársai végezték. A második kutatásrészben a klinikai adatok gyűjtése a Debreceni Egyetem Egészségügyi Finanszírozási és Kontrolling Igazgatóság Betegdokumentációs Osztály által biztosított lista alapján történt. A harmadik kutatásrész esetében a mintákat a DE KK Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika munkatársai biztosították számunkra: ovarialis endometrioid cysta fal részletet (ectopiás endometrium minta), illetve HSC műtét során méhürből nyert méhnyálkahártya szövetet (eutopiás endometrium). A minták kórszövettani elemzését patológus kolléga végezte. Minden további, „Anyagok és módszerek” fejezetben részletezett kísérlet elvégzése, az adatok kiértékelése, valamint a módszerek kidolgozása és kivitelezése, a témavezetőm, a laborasszisztensünk, ill. TDK hallgatóim közreműködésével végzett saját munka eredménye.

Függelék (Irodalomjegyzék)

1. A Fasciani, G D'Ambrogio, G Bocci, M Monti, A R Genazzani, P G Artini, *High concentrations of the vascular endothelial growth factor and interleukin-8 in ovarian endometriomata*, Mol Hum Reprod. 2000 Jan;6(1):50-4.
2. A Ferenczy, C Bergeron, *Histology of the human endometrium: from birth to senescence*, Ann N Y Acad Sci. 1991;622:6-27.
3. A Tamas, K Szabadfi, A Nemeth, B Fulop, P Kiss, T Atlasz, R Gabriel, H Hashimoto, A Baba, N Shintani, Zs Helyes, D Reglodi, *Comparative Examination of Inner Ear in Wild Type and Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP)-Deficient Mice*, Neurotox Res. 2012 May;21(4):435-44.
4. A Yeramian, G Moreno-Bueno, X Dolcet, L Catasus, M Abal, E Colas, J Reventos, J Palacios, J Prat, X Matias-Guiu, *Endometrial carcinoma: molecular alterations involved in tumor development and progression*, Oncogene. 2013 Jan 24;32(4):403-13
5. Aarathi Cholkeri-Singh, Kirsten J Sasaki, *Hysteroscopy for infertile women: a review*, J Minim Invasive Gynecol. 2015 Mar-Apr;22(3):353-62.
6. Aki Oride, Haruhiko Kanasaki, Satoru Kyo, *Role of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in modulating hypothalamic-pituitary system*, Reprod Med Biol. 2018 Mar 31;17(3):234-241.
7. Aleksandra Karpiesiuk, Katarzyna Palus, *Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) in Physiological and Pathological Processes within the Gastrointestinal Tract: A Review*, Int J Mol Sci. 2021 Aug 12;22(16):8682.
8. Alessandra Camboni, Etienne Marbaix, *Ectopic Endometrium: The Pathologist's Perspective*, Int J Mol Sci. 2021 Oct 11;22(20):10974.
9. Alexander Christov, J Ottman, L Hamdheydari, Paula Grammas, *Structural changes in Alzheimer's disease brain microvessels*, Curr Alzheimer Res. 2008 Aug;5(4):392-5.
10. Alice Jo, Sahitya Denduluri, Bosi Zhang, Zhongliang Wang, Liangjun Yin, Zhengjian Yan, Richard Kang, Lewis L Shi, James Mok, Michael J Lee, Rex C Haydon, *The versatile functions of Sox9 in development, stem cells, and human diseases*, Genes Dis. 2014 Dec;1(2):149-161.
11. Alison Maclean, Areege Kamal, Meera Adishesh, Rafah Alnafakh, Nicola Tempest and Dharani K. Hapangama, *Human Uterine Biopsy: Research Value and Common Pitfalls*, Int J Reprod Med. 2020; 2020: 9275360.

12. Alistair Burns, *Diagnosis and management of Alzheimer's disease*, Dialogues Clin Neurosci. 2000 Jun; 2(2): 129–138.
13. Amir Abbas, Tahami Monfared, Michael J. Byrnes, Leigh Ann White, Quanwu Zhang, *Alzheimer's Disease: Epidemiology and Clinical Progression*, Neurol Ther. 2022 Jun;11(2):553-569.
14. Amy R Nelson, *Peripheral Pathways to Neurovascular Unit Dysfunction, Cognitive Impairment, and Alzheimer's Disease*, Front Aging Neurosci. 2022 Apr 18;14:858429.
15. Ana R Alves, Margarida F Dias, Margarida Silvestre, *Endometrial fluid biomarkers and their potential as predictors of successful embryo implantation*, Biomedicine (Taipei). 2023 Sep 1;13(3):1–8.
16. Andrei L Gartel, Angela L Tyner, *The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis*, Mol Cancer Ther. 2002 Jun;1(8):639-49.
17. Andrew W Horne, Stacey A Missmer, *Pathophysiology, diagnosis, and management of endometriosis*, BMJ. 2022 Nov 14;379:e070750.
18. Anita K Kovacs, Tamas Atlasz, Dora Werling, Edina Szabo, Dora Reglodi, Gabor K Toth, *Stability Test of PACAP in Eye Drops*, J Mol Neurosci. 2021 Aug;71(8):1567-1574.
19. Annika Eriksson, Virpi Töhönen, Anna Wedell, Katarina Nordqvist, *Isolation of the human testatin gene and analysis in patients with abnormal gonadal development*, Mol Hum Reprod. 2002 Jan;8(1):8-15.
20. Ansar Karimian, Yasin Ahmadi, Bahman Yousefi, *Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage*, DNA Repair (Amst). 2016 Jun;42:63-71.
21. Antonio Simone Laganà, Simone Garzon, Martin Götte, Paola Viganò, Massimo Franchi, Fabio Ghezzi, Dan C Martin, *The Pathogenesis of Endometriosis: Molecular and Cell Biology Insights*, Int J Mol Sci. 2019 Nov 10;20(22):5615.
22. Aristidis Moustakas, Carl-Henrik Heldin, *Non-Smad TGF-beta signals*, J Cell Sci. 2005 Aug 15;118(Pt 16):3573-84.
23. Ayodeji Folorunsho Ajayi and Roland Eghoghosoa Akhigbe, *Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update*, Fertil Res Pract. 2020 Mar 14;6:5.
24. B I Strassmann, *The evolution of endometrial cycles and menstruation*, Q Rev Biol. 1996 Jun;71(2):181-220.

25. Beata Smolarz, Krzysztof Szyłło, Hanna Romanowicz, *Endometriosis: Epidemiology, Classification, Pathogenesis, Treatment and Genetics (Review of Literature)*, Int J Mol Sci. 2021 Sep 29;22(19):10554.
26. C Yan Cheng, Dolores D Mruk, *The blood-testis barrier and its implications for male contraception*, Pharmacol Rev. 2012 Jan;64(1):16-64.
27. Carla A Piccinato, Helena Malvezzi, Douglas A Gibson, Philippa T K Saunders, *SULFATION PATHWAYS: Contribution of intracrine oestrogens to the aetiology of endometriosis*, J Mol Endocrinol. 2018 Aug;61(2):T253-T270.
28. Carlos Stocco, *Tissue physiology and pathology of aromatase*, Steroids. 2012 Jan;77(1-2):27-35.
29. Caroline E Gargett, Kjjiana E Schwab, Rachel M Zillwood, Hong P T Nguyen, Di Wu, *Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium*, Biol Reprod. 2009 Jun;80(6):1136-45.
30. Catherine Allaire, Mohamed A Bedaiwy, Paul J Yong, *Diagnosis and management of endometriosis*, CMAJ. 2023 Mar 14;195(10):E363-E371.
31. Christian Larney, Timothy L. Bailey, Peter Koopman, *Switching on sex: transcriptional regulation of the testis-determining gene Sry*, Development. 2014 Jun;141(11):2195-205.
32. Christian M Becker, Attila Bokor, Oskari Heikinheimo, Andrew Horne, Femke Jansen, Ludwig Kiesel, Kathleen King, Marina Kvaskoff, Annemiek Nap, Katrine Petersen, Ertan Saridogan, Carla Tomassetti, Nehalennia van Hanegem, Nicolas Vulliamoz, Nathalie Vermeulen; ESHRE Endometriosis Guideline Group, *ESHRE guideline: endometriosis*, Hum Reprod Open. 2022 Feb 26;2022(2):hoac009.
33. Christina Rei, Thomas Williams, Michael Feloney, *Endometriosis in a Man as a Rare Source of Abdominal Pain: A Case Report and Review of the Literature*, Case Rep Obstet Gynecol. 2018 Jan 31;2018:2083121.
34. D A Pabst, S A Rommel, W A McLellan, T M Williams, T K Rowles, *Thermoregulation of the intra-abdominal testes of the bottlenose dolphin (Tursiops truncatus) during exercise*, J Exp Biol. 1995 Jan;198(Pt 1):221-6.
35. D Llobet, J Pallares, A Yeramian, M Santacana, N Eritja, A Velasco, X Dolcet, X Matias-Guiu, *Molecular pathology of endometrial carcinoma: practical aspects from the diagnostic and therapeutic viewpoints*, J Clin Pathol. 2009 Sep;62(9):777-85.
36. D M de Kretser, K L Loveland, A Meinhardt, D Simorangkir, N Wreford, *Spermatogenesis*, Hum Reprod. 1998 Apr;13 Suppl 1:1-8.

37. D Reglodi, S Cseh, B Somoskoi, B D Fulop, E Szentleleky, V Szegeczki, A Kovacs, A Varga, P Kiss, H Hashimoto, A Tamas, A Bardosi, S Manavalan, E Bako, R Zakany, T Juhasz, *Disturbed spermatogenic signaling in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-deficient mice*, *Reproduction*. 2018 Feb;155(2):129-139.
38. D Reglodi, T Atlasz, E Szabo, A Jungling, A Tamas, T Juhasz, B D Fulop, A Bardosi, *PACAP deficiency as a model of aging*, *Geroscience*. 2018 Dec;40(5-6):437-452.
39. D Vaudry 1, B J Gonzalez, M Basille, L Yon, A Fournier, H Vaudry, *Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and Its Receptors: From Structure to Functions*, *Pharmacol Rev*. 2000 Jun;52(2):269-324.
40. David Vaudry, Anthony Falluel-Morel, Steve Bourgault, Magali Basille, Delphine Burel, Olivier Wurtz, Alain Fournier, Billy K C Chow, Hitoshi Hashimoto, Ludovic Galas, Hubert Vaudry, *Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and Its Receptors: 20 Years after the Discovery*, *Pharmacol Rev*. 2009 Sep;61(3):283-357.
41. David W Erikson, Fatima Barragan, Terhi T Piltonen, Joseph C Chen, Shaina Balayan, Juan C Irwin, Linda C Giudice, *Stromal fibroblasts from perimenopausal endometrium exhibit a different transcriptome than those from the premenopausal endometrium*, *Biol Reprod*. 2017 Sep 1;97(3):387-399.
42. Deena Emera, Roberto Romero, Günter Wagner, *The evolution of menstruation: a new model for genetic assimilation: explaining molecular origins of maternal responses to fetal invasiveness*, *Bioessays*. 2012 Jan; 34(1): 26–35.
43. Denes Toth, Edina Szabo, Andrea Tamas, Tamas Juhasz, Gabriella Horvath, Eszter Fabian, Balazs Opper, Dora Szabo, Grazia Maugeri, Agata G D'Amico, Velia D'Agata, Viktoria Vicena, Dora Reglodi, *Protective Effects of PACAP in Peripheral Organs*, *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020 Jul 14;11:377.
44. Diana Maria Chiorean, Melinda-Ildiko Mitranovici, Havva Serap Toru, Titiana Cornelia Cotoi, Alexandru Nicușor Tomuț, Sabin Gligore Turdean, Ovidiu Simion Cotoi, *New Insights into Genetics of Endometriosis—A Comprehensive Literature Review*, *Diagnostics (Basel)*. 2023 Jul 4;13(13):2265.
45. Dimitrios Rafail Kalaitzopoulos, Nicolas Samartzis, Georgios N Kolovos, Evangelia Mareti, Eleftherios Pierre Samartzis, Markus Eberhard, Kostantinos Dinas, Angelos Daniilidis, *Treatment of endometriosis: a review with comparison of 8 guidelines*, *BMC Womens Health*. 2021 Nov 29;21(1):397.
46. Dong-Bao Chen, Ronald R Magness, *Vascular smooth muscle cells during spiral artery remodeling in early human pregnancy*, *Biol Reprod*. 2020 Dec 10;104(2):252–254.

47. Dora Aczel, Bernadett Gyorgy, Peter Bakonyi, Rehan Bukhari, Ricardo Pinho, Istvan Boldogh, Gu Yaodong, Zsolt Radak, *The Systemic Effects of Exercise on the Systemic Effects of Alzheimer's Disease*, *Antioxidants* (Basel). 2022 May 23;11(5):1028.
48. Dora Reglodi, Tamas Atlasz, Adel Jungling, Edina Szabo, Petra Kovari, Sridharan Manavalan and Andrea Tamas, *Alternative Routes of Administration of the Neuroprotective Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide*, *Curr Pharm Des*. 2018;24(33):3892-3904.
49. Emmi Rotgers, Anne Jørgensen, and Humphrey Hung-Chang Yao, *At the Crossroads of Fate—Somatic Cell Lineage Specification in the Fetal Gonad*, *Endocr Rev*. 2018 Oct 1;39(5):739-759.
50. Endah Wulandari, Rr Ayu Fitri Hapsari, *Innovative Hematology Analysis Using Menstrual Blood*, *Med Devices* (Auckl). 2024 Aug 5;17:285–293.
51. Erica E Marsh, Ayman Al-Hendy, Dale Kappus, Alex Galitsky, Elizabeth A Stewart, Majid Kerolous, Burden, *Prevalence, and Treatment of Uterine Fibroids: A Survey of U.S. Women*, *J Womens Health* (Larchmt). 2018 Nov 2;27(11):1359–1367.
52. Eszter Szentléleky, Vince Szegezcki, Edina Karanyicz, Tibor Hajdú, Andrea Tamás, Gábor Tóth, Róza Zákány, Dóra Reglődi, Tamás Juhász, *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP) Reduces Oxidative and Mechanical Stress-Evoked Matrix Degradation in Chondrifying Cell Cultures*, *Int J Mol Sci*. 2019 Jan 4;20(1):168.
53. Eun Hye Lee, Su Ryeon Seo, *Neuroprotective roles of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in neurodegenerative diseases*, *BMB Rep*. 2014 Jul;47(7):369–375.
54. Evelin Patko, Edina Szabo, Denes Toth, Tamas Tornoczky, Inez Bosnyak, Alexandra Vaczy, Tamas Atlasz, Dora Reglodi, *Distribution of PACAP and PAC1 Receptor in the Human Eye*, *J Mol Neurosci*. 2022 Nov;72(11):2176-2187.
55. F A Taran, E A Stewart, S Brucker, *Adenomyosis: Epidemiology, Risk Factors, Clinical Phenotype and Surgical and Interventional Alternatives to Hysterectomy*, *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 2013 Sep;73(9):924-931.
56. Faisal Mohammad Amin, Stavroula Aristeidou, Carlo Baraldi, Ewa K Czapinska-Ciepiela, Daponte D Ariadni, Davide Di Lenola, Cheryl Fenech, Konstantinos Kampouris, Giorgos Karagiorgis, Mark Braschinsky, Mattias Linde; European Headache Federation School of Advanced Studies (EHF-SAS), *The association between migraine and physical exercise*, *J Headache Pain*. 2018 Sep 10;19(1):83.

57. Fiona L Cousins, Dorien F O, Caroline E Gargett, *Endometrial stem/progenitor cells and their role in the pathogenesis of endometriosis*, Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2018 Jul;50:27-38.
58. Fuminori Taniguchi, Hermawan Wibisono, Yin Mon Khine, Tasuku Harada, *Animal models for research on endometriosis*, Front Biosci (Elite Ed). 2021 Jan 1;13(1):37-53.
59. Gergő Józsa, Balázs Dániel Fülöp, László Kovács, Bernadett Czibere, Vince Szegeczki, Tamás Kiss, Tibor Hajdú, Andrea Tamás, Zsuzsanna Helyes, Róza Zákány, Dóra Reglődi, Tamás Juhász, *Lack of Pituitary Adenylate Cyclase–Activating Polypeptide (PACAP) Disturbs Callus Formation*, J Mol Neurosci. 2021; 71(8): 1543–1555.
60. Giulia Bonavina, Hugh S Taylor, *Endometriosis-associated infertility: From pathophysiology to tailored treatment*, Front Endocrinol (Lausanne). 2022 Oct 26;13:1020827.
61. Grzegorz Polak, Beata Banaszewska, Michał Filip, Michał Radwan, Artur Wdowiak, *Environmental Factors and Endometriosis*, Int J Environ Res Public Health. 2021 Oct 20;18(21):11025.
62. Guo-fang Chen, Ting-hai Xu, Yan Yan, Yu-ren Zhou, Yi Jiang, Karsten Melcher, H Eric Xu, *Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development*, Acta Pharmacol Sin. 2017 Sep;38(9):1205-1235.
63. Helga Perényi, Vince Szegeczki, Gabriella Horváth, Barbara Hinnah, Andrea Tamás, Zsolt Radák, Dóra Ábrahám, Róza Zákány, Dóra Reglodi, Tamás Juhász, *Physical Activity Protects the Pathological Alterations of Alzheimer’s Disease Kidneys via the Activation of PACAP and BMP Signaling Pathways*, Front Cell Neurosci. 2020 Aug 14;14:243.
64. Heng-Kien Au, Jui-Hung Chang, Yu-Chih Wu, Yung-Che Kuo, Yu-Hsi Chen, Wei-Chin Lee, Te-Sheng Chang, Pei-Chi Lan, Hung-Chih Kuo, Kha-Liang Lee, Mei-Tsu Lee, Chii-Ruey Tzeng, Yen-Hua Huang, *TGF- β 1 Regulates Cell Migration through Pluripotent Transcription Factor OCT4 in Endometriosis*, PLoS One. 2015 Dec 16;10(12):e0145256.
65. Hilary O D Critchley, Jacqueline A Maybin, Gregory M Armstrong, Alistair R W Williams, *Physiology of the Endometrium and Regulation of Menstruation*, Physiol Rev. 2020 Jul 1;100(3):1149-1179.
66. Hilary OD Critchley, Rodney W Kelly, David T Baird, Robert M Brenner, *Regulation of human endometrial function: mechanisms relevant to uterine bleeding*, Reprod Biol Endocrinol. 2006 Oct 9;4(Suppl 1):S5.

67. Hirokazu Ohtaki, Atsushi Satoh, Tomoya Nakamachi, Sachiko Yofu, Kenji Dohi, Hiroyoshi Mori, Kenji Ohara, Kazuyuki Miyamoto, Hitoshi Hashimoto, Norihito Shintani, Akemichi Baba, Masaji Matsunaga, Seiji Shioda, *Regulation of Oxidative Stress by Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) Mediated by PACAP Receptor*, J Mol Neurosci. 2010 Nov;42(3):397-403.
68. Hiromi Murata, Susumu Tanaka and Hidetaka Okada, *The Regulators of Human Endometrial Stromal Cell Decidualization*, Biomolecules. 2022 Sep; 12(9): 1275.
69. Hitoshi Nishimura, Steven W L'Hernault, *Spermatogenesis*, Curr Biol. 2017 Sep 25;27(18):R988-R994.
70. Hongjie Fan, *In-vitro models of human endometriosis*, Exp Ther Med. 2020 Mar;19(3):1617-1625.
71. Hugo Maia Jr, Clarice Haddad, Genevieve Coelho, Julio Casoy, *Role of inflammation and aromatase expression in the eutopic endometrium and its relationship with the development of endometriosis*, Womens Health (Lond). 2012 Nov;8(6):647-58.
72. Hugo Maia Jr, Julio Casoy, Jorge Valente Filho, *Is aromatase expression in the endometrium the cause of endometriosis and related infertility?*, Gynecol Endocrinol. 2009 Apr;25(4):253-7.
73. Ina Georg, Francisco Barrionuevo, Thorsten Wiech, Gerd Scherer, *Sox9 and Sox8 are required for basal lamina integrity of testis cords and for suppression of FOXL2 during embryonic testis development in mice*, Biol Reprod. 2012 Oct 25;87(4):99.
74. Ioannis Simitsidellis, Douglas A Gibson, Philippa T K Saunders, *Animal models of endometriosis: Replicating the aetiology and symptoms of the human disorder*, Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2018 Jun;32(3):257-269.
75. Irene Tirado-González, Gabriela Barrientos, Nadja Tariverdian, Petra C Arck, Mariana G García, Burghard F Klapp, Sandra M Blois, *Endometriosis research: animal models for the study of a complex disease*, J Reprod Immunol. 2010 Nov;86(2):141-7.
76. J Noumoff, S W Haydock, R Sachdeva, S Heyner, M L Pritchard, *Characteristics of cell lines derived from normal and malignant endometrial tissue*, Gynecol Oncol. 1987 Jun;27(2):141-9.
77. Jean-Marie Sontag, Estelle Sontag, *Protein phosphatase 2A dysfunction in Alzheimer's disease*, Front Mol Neurosci. 2014 Mar 11;7:16.
78. Jemma Evans, Lois A Salamonsen, Amy Winship, Ellen Menkhorst, Guiying Nie, Caroline E Gargett, Eva Dimitriadis, *Fertile ground: human endometrial programming and lessons in health and disease*, Nat Rev Endocrinol. 2016 Nov;12(11):654-667.

79. Jessica Lu, Sarah J Piper, Peishen Zhao, Laurence J Miller, Denise Wootten, Patrick M Sexton, *Targeting VIP and PACAP Receptor Signaling: New Insights into Designing Drugs for the PACAP Subfamily of Receptors*, Int J Mol Sci. 2022 Jul 22;23(15):8069.
80. Jesús Andrade-Guerrero, Alberto Santiago-Balmaseda , Paola Jeronimo-Aguilar, Isaac Vargas-Rodríguez, Ana Ruth Cadena-Suárez, Carlos Sánchez-Garibay , Glustein Pozo-Molina, Claudia Fabiola Méndez-Catalá, Maria-del-Carmen Cardenas-Aguayo, Sofia Diaz-Cintra, Mar Pacheco-Herrero, José Luna-Muñoz, Luis O. Soto-Rojas, *Alzheimer's Disease: An Updated Overview of Its Genetics*, Int J Mol Sci. 2023 Feb 13;24(4):3754.
81. Joana Vieira Silva, Sooyeon Yoon, Sara Domingues, Sofia Guimarães, Alexander V Goltsev, Edgar Figueiredo da Cruz E Silva, José Fernando F Mendes, Odete Abreu Beirão da Cruz E Silva, Margarida Fardilha, *Amyloid precursor protein interaction network in human testis: sentinel proteins for male reproduction*, BMC Bioinformatics. 2015 Jan 16;16(1):12.
82. JoAnne S Richards, *The Ovarian Cycle*, Vitam Horm. 2018;107:1-25.
83. John Jarrell, *The significance and evolution of menstruation*, Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2018 Jul;50:18-26.
84. Jonathan P Jarow, Barry R Zirkin, *The androgen microenvironment of the human testis and hormonal control of spermatogenesis*, Ann N Y Acad Sci. 2005 Dec;1061:208-20.
85. Juho-Antti Mäkelä, Jaakko J Koskenniemi, Helena E Virtanen, Jorma Toppari, *Testis Development*, Endocr Rev. 2019 Aug 1;40(4):857-905.
86. Jui-Hung Chang, Heng-Kien Au, Wei-Chin Lee, Ching-Chi Chi, Thai-Yen Ling, Le-Ming Wang, Shu-Huei Kao, Yen-Hua Huang, Chii-Ruey Tzeng, *Expression of the pluripotent transcription factor OCT4 promotes cell migration in endometriosis*, Fertil Steril. 2013 Apr;99(5):1332-1339.e5.
87. Junko Sato, Masahiro Nasu, Minoru Tsuchitani, *Comparative histopathology of the estrous or menstrual cycle in laboratory animals*, J Toxicol Pathol. 2016 May 16;29(3):155–162.
88. K M Nalaboff, J S Pellerito, E Ben-Levi, *Imaging the endometrium: disease and normal variants*, Radiographics, 2001 Nov-Dec;21(6):1409-24.
89. K Nakamura, T Nakamachi, K Endo, K Ito, T Machida, T Oka, M Hori, K Ishizaka, S Shioda, *Distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the human testis and in testicular germ cell tumors*, Andrologia. 2014 Jun;46(5):465-71.

90. Kalliopi Tzavlaki, Aristidis Moustakas, *TGF- β Signaling*, *Biomolecules*. 2020 Mar 23;10(3):487.
91. Kate M Webber, George Perry, Mark A Smith, Gemma Casadesus, *The Contribution of Luteinizing Hormone to Alzheimer Disease Pathogenesis*, *Clin Med Res*. 2007 Oct;5(3):177-83.
92. Keith A Hansen, Kathleen M Eyster, *Genetics and genomics of endometriosis*, *Clin Obstet Gynecol*. 2010 Jun;53(2):403-12.
93. Ketaki S Bhalsing, Masoom M Abbas, Louis C S Tan, *Role of Physical Activity in Parkinson's Disease*, *Ann Indian Acad Neurol*. 2018 Oct-Dec;21(4):242-249.
94. Khaleque Newaz Khan, Akira Fujishita, Michio Kitajima, Koichi Hiraki, Masahiro Nakashima, Hideaki Masuzaki, *Occult microscopic endometriosis: undetectable by laparoscopy in normal peritoneum*, *Hum Reprod*. 2014 Mar;29(3):462-72.
95. Kirstin L Parkin, Asgerally T Fazleabas, *Uterine Leukocyte Function and Dysfunction: A Hypothesis on the Impact of Endometriosis*, *Am J Reprod Immunol*. 2016 Mar;75(3):411-7.
96. Konstantina G Yiannopoulou, Sokratis G Papageorgiou, *Current and Future Treatments in Alzheimer Disease: An Update*, *J Cent Nerv Syst Dis*. 2020 Feb 29;12:1179573520907397.
97. Konstantina Nikolakopoulou, Margherita Y Turco, *Investigation of infertility using endometrial organoids*, *Reproduction*. 2021 May;161(5):R113-R127
98. Konstantinos Liapis, Nikolaos Tasis, Ioannis Tsouknidas, George Tsakotos, Panagiotis Skandalakis, Konstantinos Vlasis, Dimitrios Filippou, *Anatomic variations of the Uterine Artery. Review of the literature and their clinical significance*, *Turk J Obstet Gynecol*. 2020 Apr 6;17(1):58–62.
99. Kristen Upson, Stacey A Missmer, *Epidemiology of Adenomyosis*, *Semin Reprod Med*. 2020 May;38(2-03):89-107.
100. L A Salamonsen, L J Lathbury, *Endometrial leukocytes and menstruation*, *Hum Reprod Update*. 2000 Jan-Feb;6(1):16-27.
101. L Hagenäs, E M Ritzén, L Ploöen, V Hansson, F S French, S N Nayfeh, *Sertoli cell origin of testicular androgen-binding protein (ABP)*, *Mol Cell Endocrinol*. 1975 May;2(5):339-50.
102. Leslie V Farland, Holly R Harris, *Long-term Health Consequences of Endometriosis - Pathways and Mediation by Treatment*, *Curr Obstet Gynecol Rep*. 2020 Sep;9(3):79-88.

103. Lidia Filip, Florentina Duică, Alina Prădatu, Dragoş Creţoiu, Nicolae Suciuc, Sanda Maria Creţoiu, Dragoş-Valentin Predescu, Valentin Nicolae Varlas, Silviu-Cristian Voinea, *Endometriosis Associated Infertility: A Critical Review and Analysis on Etiopathogenesis and Therapeutic Approaches*, *Medicina* (Kaunas). 2020 Sep 9;56(9):460.
104. Lisa Story, Stephen Kennedy, *Animal studies in endometriosis: a review*, *ILAR J*. 2004;45(2):132-8.
105. Luca Fusi, Brianna Cloke, Jan J Brosens, *The uterine junctional zone*, *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2006 Aug;20(4):479-91.
106. Ludovica Imperiale, Michelle Nisolle, Jean-Christophe Noël, Maxime Fastrez, *Three Types of Endometriosis: Pathogenesis, Diagnosis and Treatment. State of the Art*, *J Clin Med*. 2023 Jan 28;12(3):994.
107. Luigi Devoto, Paulina Kohen, Alex Muñoz, Jerome F Strauss 3rd, *Human corpus luteum physiology and the luteal-phase dysfunction associated with ovarian stimulation*, *Reprod Biomed Online*. 2009;18 Suppl 2:19-24.
108. Lynne T Shuster, Deborah J Rhodes, Bobbie S Gostout, Brandon R Grossardt, Walter A Rocca, *Premature menopause or early menopause: long-term health consequences*, *Maturitas*. 2010 Feb;65(2):161-6.
109. M Hamer, Y. Chida, *Physical activity and risk of neurodegenerative disease: a systematic review of prospective evidence*, *Psychol Med*. 2009 Jan;39(1):3-11.
110. M Leonardi, C Hicks, F El-Assaad, E El-Omar, G Condous, *Endometriosis and the microbiome: a systematic review*, *BJOG*. 2020 Jan;127(2):239-249.
111. M Mihm, S Gangooly, S Muttukrishna, *The normal menstrual cycle in women*, *Anim Reprod Sci*. 2011 Apr;124(3-4):229-36.
112. M Muyltermans, F J Cornillie, P R Koninckx, *CA125 and endometriosis*, *Hum Reprod Update*. 1995 Mar;1(2):173-87.
113. M Satoh, *Histogenesis and organogenesis of the gonad in human embryos*, *J Anat*. 1991 Aug;177:85-107.
114. Manako Yamaguchi, Kosuke Yoshihara, Kazuaki Suda, Hirofumi Nakaoka, Nozomi Yachida, Haruka Ueda, Kentaro Sugino, Yutaro Mori, Kaoru Yamawaki, Ryo Tamura, Tatsuya Ishiguro, Teiichi Motoyama, Yu Watanabe, Shujiro Okuda, Kazuki Tainaka, Takayuki Enomoto, *Three-dimensional understanding of the morphological complexity of the human uterine endometrium*, *iScience*. 2021 Mar 2;24(4):102258.

115. Manako Yamaguchi, Kosuke Yoshihara, Nozomi Yachida, Kazuaki Suda, Ryo Tamura, Tatsuya Ishiguro, Takayuki Enomoto, *The New Era of Three-Dimensional Histoarchitecture of the Human Endometrium*, J Pers Med. 2021 Jul 25;11(8):713.
116. Marina P Andres, Fernanda V L Arcoverde, Carolina C C Souza, Luiz Flavio C Fernandes, Mauricio Simões Abrão, Rosanne Marie Kho, *Extrapelvic Endometriosis: A Systematic Review*, J Minim Invasive Gynecol. 2020 Feb;27(2):373-389.
117. Marina Prisco, Luigi Rosati, Eliana Morgillo, Maria Pina Mollica, Marisa Agnese, Piero Andreuccetti, Salvatore Valiante, *Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) and its receptors in Mus musculus testis*, Gen Comp Endocrinol. 2020 Jan 15;286:113297.
118. Martin Götte, Maria Wolf, Annette Staebler, Olaf Buchweitz, Ludwig Kiesel, Andreas N Schüring, *Aberrant expression of the pluripotency marker SOX-2 in endometriosis*, Fertil Steril. 2011 Jan;95(1):338-41.
119. Marwan Habiba, Rosemarie Heyn, Paola Bianchi, Ivo Brosens, Giuseppe Benagiano, *The development of the human uterus: morphogenesis to menarche*, Hum Reprod Update. 2021 Jan 4;27(1):1-26.
120. Masabumi Shibuya, *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies*, Genes Cancer. 2011 Dec;2(12):1097–1105.
121. Mats Brännström, *Uterus transplantation and beyond*, J Mater Sci Mater Med. 2017 May;28(5):70.
122. Matthew Latham Macer, Hugh S Taylor, *Endometriosis and infertility: a review of the pathogenesis and treatment of endometriosis-associated infertility*, Obstet Gynecol Clin North Am. 2012 Dec;39(4):535-49.
123. Melissa N Boucher, Victor May, Karen M Braas, Sayamwong E Hammack, *PACAP orchestration of stress-related responses in neural circuits*, Peptides. 2021 Aug;142:170554.
124. Michael D. Griswold, *The central role of Sertoli cells in spermatogenesis*, Seminars in Cell & Developmental Biology Volume 9, Issue 4, August 1998, Pages 411-416.
125. Michaela M Rogan, Katherine E Black, *Dietary energy intake across the menstrual cycle: a narrative review*, Nutr Rev. 2022 Nov 11;81(7):869–886.
126. Miklos Koppan, Zsuzsanna Nagy, Inez Bosnyakn and Dora Reglodi, *Female reproductive functions of the neuropeptide PACAP*, Front Endocrinol (Lausanne). 2022 Sep 20;13:982551.

127. Min Li, Akira Arimura, *Neuropeptides of the Pituitary Adenylate Cyclase–Activating Polypeptide/Vasoactive Intestinal Polypeptide/Growth Hormone–Releasing Hormone/Secretin Family in Testis*, *Endocrine*. 2003 Apr;20(3):201-14.
128. Min Li, Hisayuki Funahashi, Majambu Mbikay, Seiji Shioda, Akira Arimura, *Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-mediated intracrine signaling in the testicular germ cells*, *Endocrine*. 2004 Feb;23(1):59-75.
129. Mohammad Zuber, Mohammad Shoaib, Surbhi Kumari, *Magnetic resonance imaging of endometriosis: a common but often hidden, missed, and misdiagnosed entity*, *Pol J Radiol*. 2022 Aug 15;87:e448–e461.
130. Moira K O'Bryan, Shuji Takada, Claire L Kennedy, Greg Scott, Shun-ichi Harada, Manas K Ray, Qunsheng Dai, Dagmar Wilhelm, David M de Kretser, E Mitch Eddy, Peter Koopman, Yuji Mishina, *Sox8 is a critical regulator of adult Sertoli cell function and male fertility*, *Dev Biol*. 2008 Apr 15;316(2):359-70.
131. Moira Marizzoni, Peppino Mirabelli, Elisa Mombelli, Luigi Coppola, Cristina Festari, Nicola Lopizzo, Delia Luongo, Monica Mazzelli, Daniele Naviglio, Jean-Louis Blouin, Marc Abramowicz, Marco Salvatore, Michela Pievani, Annamaria Cattaneo, Giovanni B. Frisoni, *A peripheral signature of Alzheimer's disease featuring microbiota-gut-brain axis markers*, *Alzheimers Res Ther*. 2023 May 31;15(1):101.
132. Nathalie Fuentes, Patricia Silveyra, *Estrogen receptor signaling mechanisms*, *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2019 Feb 4;116:135–170.
133. Neha Agarwal, Arulselvi Subramanian, *Endometriosis - morphology, clinical presentations and molecular pathology*, *J Lab Physicians*. 2010 Jan;2(1):1-9.
134. Nikolaos Zarkadoulas, Vasilios Pergialiotis, Dimitrios Dimitroulis, Konstantinos Stefanidis, Christos Verikokos, Despina N Perrea, Konstantinos Kontzoglou, *A potential role of cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (p21/WAF1) in the pathogenesis of endometriosis: Directions for future research*, *Med Hypotheses*. 2019 Dec;133:109414.
135. Nina Maenhoudt, Amber De Moor, and Hugo Vankelecom, *Modeling Endometrium Biology and Disease*, *J Pers Med*. 2022 Jul; 12(7): 1048.
136. Olga Gordeeva, *TGFβ Family Signaling Pathways in Pluripotent and Teratocarcinoma Stem Cells' Fate Decisions: Balancing Between Self-Renewal, Differentiation, and Cancer*, *Cells*. 2019 Nov 23;8(12):1500.
137. P A Rogers, *Structure and function of endometrial blood vessels*, *Hum Reprod Update*. 1996 Jan-Feb;2(1):57-62.

138. Parveen Parasar, Pinar Ozcan, Kathryn L Terry, *Endometriosis: Epidemiology, Diagnosis and Clinical Management*, Curr Obstet Gynecol Rep. 2017 Mar;6(1):34-41.
139. Paula Gabriela Marin Figueira, Mauricio Simões Abrão, Graciela Krikun, and Hugh Taylor, *Stem Cells In Endometrium And Their Role In The Pathogenesis Of Endometriosis*, Ann N Y Acad Sci. 2011 March ; 1221(1): 10–17.
140. Payal Mital, Barry T Hinton, Jannette M Dufour, *The Blood-Testis and Blood-Epididymis Barriers Are More than Just Their Tight Junctions*, Biol Reprod. 2011 Jan 5;84(5):851–858.
141. Pengcheng Han, Zhiwei Tang, Junxiang Yin, Marwan Maalouf, Thomas G Beach, Eric M Reiman, Jiong Shi, *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects against β -amyloid toxicity*, Neurobiol Aging. 2014 Sep;35(9):2064-71.
142. Peter Zaubler, Thad R Denehy, Robert R Taylor, Emelie H Ongcapin, Stephen Marotta, Marlene Sabbath-Solitare, *Strong correlation between molecular changes in endometrial carcinomas and concomitant hyperplasia*, Int J Gynecol Cancer. 2015 Jun;25(5):863-8.
143. Petra AB Klemmt, Anna Starzinski-Powitz, *Molecular and Cellular Pathogenesis of Endometriosis*, Curr Womens Health Rev. 2018 Jun;14(2):106–116.
144. Pietro G Signorile, Alfonso Baldi, Rosa Viceconte, Andrea Ronchi, Marco Montella, *Pathogenesis of Endometriosis: Focus on Adenogenesis-related Factors*, In Vivo. 2023 Sep-Oct;37(5):1922-1930.
145. Pietro Valerio Foti, Renato Farina, Stefano Palmucci, Ilenia Anna Agata Vizzini, Norma Libertini, Maria Coronella, Saveria Spadola, Rosario Caltabiano, Marco Iraci, Antonio Basile, Pietro Milone, Antonio Cianci, Giovanni Carlo Ettore, *Endometriosis: clinical features, MR imaging findings and pathologic correlation*, Insights Imaging. 2018 Apr;9(2):149-172.
146. R A Musina, A V Belyavski, O V Tarusova, E V Solovyova, G T Sukhikh, *Endometrial mesenchymal stem cells isolated from the menstrual blood*, Bull Exp Biol Med. 2008 Apr;145(4):539-43.
147. R Brubel, P Kiss, A Vincze, A Varga, A Varnagy, J Bodis, L Mark, E Jambor, G Maasz, H Hashimoto, Zs Helyes, G Toth, A Tamas, M Koppan, D Reglodi, *Effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide on human sperm motility*, J Mol Neurosci. 2012 Nov;48(3):623-30.
148. Ren-He Xu, Tori L Barron, Feng Gu, Sierra Root, Ruthann M Peck, Guangjin Pan, Junying Yu, Jessica Antosiewicz-Bourget, Shulan Tian, Ron Stewart, James A

- Thomson, *NANOG is a Direct Target of TGF β /Activin Mediated SMAD Signaling in Human ES Cells*, Cell Stem Cell. 2008 Aug 7;3(2):196–206.
149. Reyon Dcunha, Reda S. Hussein, Hanumappa Ananda, Sandhya Kumari, Satish Kumar Adiga, Nagarajan Kannan, Yulian Zhao, Guruprasad Kalthur, *Current Insights and Latest Updates in Sperm Motility and Associated Applications in Assisted Reproduction*, Reprod Sci. 2022 Jan;29(1):7-25.
 150. Richard Ivell, *Lifestyle impact and the biology of the human scrotum*, Reprod Biol Endocrinol. 2007 Apr 20;5:15.
 151. Russell E Nicholls, Jean-Marie Sontag, Hong Zhang, Agnieszka Staniszewski, Shijun Yan, Carla Y Kim, Michael Yim, Caitlin M Woodruff, Erland Arning, Brandi Wasek, Deqi Yin, Teodoro Bottiglieri, Estelle Sontag, Eric R Kandel, Ottavio Arancio, *PP2A methylation controls sensitivity and resistance to β -amyloid-induced cognitive and electrophysiological impairments*, Proc Natl Acad Sci USA. 2016 Mar 22;113(12):3347-52.
 152. Russell H Swerdlow, *Pathogenesis of Alzheimer's disease*, Clin Interv Aging. 2007;2(3):347-59.
 153. Ruth Grümmer, *Animal models in endometriosis research*, Hum Reprod Update. 2006 Sep-Oct;12(5):641-9.
 154. S E Bulun, M S Mahendroo, E R Simpson, *Polymerase chain reaction amplification fails to detect aromatase cytochrome P450 transcripts in normal human endometrium or decidua*, J Clin Endocrinol Metab. 1993 Jun;76(6):1458-63.
 155. S E Bulun, S Yang, Z Fang, B Gurates, M Tamura, J Zhou, S Sebastian, *Role of aromatase in endometrial disease*, J Steroid Biochem Mol Biol. 2001 Dec;79(1-5):19-25.
 156. S J Holdsworth-Carson, E M Colgrave, J F Donoghue, J N Fung, M L Churchill, S Mortlock, P Paiva, M Healey, G W Montgomery, J E Girling, P A W Rogers, *Generation of immortalized human endometrial stromal cell lines with different endometriosis risk genotypes*, Mol Hum Reprod. 2019 Apr 1;25(4):194-205.
 157. Saima Rafique, Alan H Decherney, *Medical Management of Endometriosis*, Clin Obstet Gynecol. 2017 Sep;60(3):485-496.
 158. Serdar E Bulun, Zongjuan Fang, Gonca Imir, Bilgin Gurates, Mitsutoshi Tamura, Bertan Yilmaz, David Langoi, Sanober Amin, Sijun Yang, Santanu Deb, *Aromatase and endometriosis*, Semin Reprod Med. 2004 Feb;22(1):45-50.

159. Shi-Wen Liu, Hui-Tao Li, Ren-Shan Ge, C Yan Cheng, *NC1-peptide derived from collagen $\alpha 3$ (IV) chain is a blood-tissue barrier regulator: lesson from the testis*, Asian J Androl. 2021 Mar-Apr;23(2):123-128.
160. Sigurd F Lax, *Molecular genetic changes in epithelial, stromal and mixed neoplasms of the endometrium*, Pathology. 2007 Feb;39(1):46-54.
161. Sofia Makieva, Elisa Giacomini, Jessica Ottolina, Ana Maria Sanchez, Enrico Papaleo, Paola Viganò, *Inside the Endometrial Cell Signaling Subway: Mind the Gap(s)*, Int J Mol Sci. 2018 Aug 21;19(9):2477.
162. Sumin Wang, Xiaoyan Shi, Xiangdong Hua, Xiaoyan Gu, Dazhen Yang, *Hysteroscopic transcervical resection of uterine septum*, JSLS. 2013 Oct-Dec;17(4):517-20.
163. Sun-Wei Guo, *Recurrence of endometriosis and its control*, Hum Reprod Update. 2009 Jul-Aug;15(4):441-61.
164. T D Trainer, *Histology of the normal testis*, Am J Surg Pathol. 1987 Oct;11(10):797-809.
165. Takahiro Hirabayashi, Tomoya Nakamachi, Seiji Shioda, *Discovery of PACAP and its receptors in the brain*, J Headache Pain. 2018 Apr 4;19(1):28.
166. Tamás Juhász, Solveig Lind Helgadóttir, Andrea Tamás, Dóra Reglődi, Róza Zákány, *PACAP and VIP signalling in chondrogenesis and osteogenesis*, Peptides. 2015 Apr;66:51-7.
167. Tetsuo Maruyama, *Endometrial stem/progenitor cells*, J Obstet Gynaecol Res. 2014 Sep;40(9):2015-22.
168. Tetsuo Maruyama, Yasunori Yoshimura, *Stem cell theory for the pathogenesis of endometriosis*, Front Biosci (Elite Ed). 2012 Jun 1;4(8):2754-63.
169. Tetsuya Hirata, Kaori Koga, Yutaka Osuga, *Extra-pelvic endometriosis: A review*, Reprod Med Biol. 2020 Jul 16;19(4):323-333.
170. Traci A Takahashi, Kay M Johnson, *Menopause*, Med Clin North Am. 2015 May;99(3):521-34.
171. V Töhhönen, C Osterlund, K Nordqvist, *Testatin: a cystatin-related gene expressed during early testis development*, Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Nov 24;95(24):14208-13.
172. Varsha Jain, Rohan R Chodankar, Jacqueline A Maybin, Hilary O D Critchley, *Uterine bleeding: how understanding endometrial physiology underpins menstrual health*, Nat Rev Endocrinol. 2022 May;18(5):290-308.

173. Veronique Giroux, Anil K Rustgi, *Metaplasia: tissue injury adaptation and a precursor to the dysplasia-cancer sequence*, Nat Rev Cancer. 2017 Oct;17(10):594-604.
174. Vicky J Young, Syed F Ahmad, Jeremy K Brown, W Colin Duncan, Andrew W Horne, *Peritoneal VEGF-A expression is regulated by TGF- β 1 through an ID1 pathway in women with endometriosis*, Sci Rep. 2015 Nov 18;5:16859.
175. W G McCluggage, *My approach to the interpretation of endometrial biopsies and curettings*, J Clin Pathol. 2006 Aug;59(8):801-12.
176. Xin-Yi Chen, Yi-Feng Du, Lei Chen, *Neuropeptides Exert Neuroprotective Effects in Alzheimer's Disease*, Front Mol Neurosci. 2019 Jan 11;11:493.
177. Xue Du, Qing Yuan, Ye Qu, Yuan Zhou, Jia Bei, *Endometrial Mesenchymal Stem Cells Isolated from Menstrual Blood by Adherence*, Stem Cells Int. 2016;2016:3573846.
178. Yiqun Tang, Caroline Frisendahl, Terhi T Piltonen, Riikka K Arffman, Parameswaran Grace Lalitkumar, Kristina Gemzell-Danielsson, *Human Endometrial Pericytes: A Comprehensive Overview of Their Physiological Functions and Implications in Uterine Disorders*, Cells. 2024 Sep 9;13(17):1510.
179. Yoichi Kiuchi, Yoshihiko Isobe, Kiyomi Fukushima, *Type IV collagen prevents amyloid beta-protein fibril formation*, Life Sci. 2002 Feb 15;70(13):1555-64.
180. Yong Song, Li Xiao, Jing Fu, Wei Huang, Qiushi Wang, Xianghui Zhang, Shiyuan Yang, *Increased expression of the pluripotency markers sex-determining region Y-box 2 and Nanog homeobox in ovarian endometriosis*, Reprod Biol Endocrinol. 2014 May 18;12:42.
181. Zeinab Breijyeh, Rafik Karaman, *Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment*, Molecules. 2020 Dec 8;25(24):5789.
182. Zsolt Sarszegi, Dora Szabo, Balazs Gaszner, Attila Konyi, Dora Reglodi, Jozsef Nemeth, Beata Lelesz, Beata Polgar, Adel Jungling, Andrea Tamas, *Examination of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) as a Potential Biomarker in Heart Failure Patients*, J Mol Neurosci. 2019 Jul; 68(3):368-376.



Nyilvántartási szám: DEENK/147/2025.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

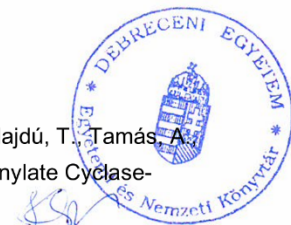
Jelölt: Szegeczki Vince
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10064876

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Szegeczki, V.**, Fazekas, L., Kulcsár, M., Reglődi, D., Török, P., Orlik, B., Laganà, A. S., Jakab, A., Juhász, T.: Endometrium as Control of Endometriosis in Experimental Research: assessment of Sample Suitability.
Diagnostics. 12 (4), 1-17, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/diagnostics12040970>
IF: 3.6
2. **Szegeczki, V.**, Horváth, G., Perényi, H., Tamás, A., Radák, Z., Ábrahám, D., Zákány, R., Reglődi, D., Juhász, T.: Alzheimer's Disease Mouse as a Model of Testis Degeneration.
Int. J. Mol. Sci. 21 (16), 1-16, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21165726>
IF: 5.924

További közlemények

3. Fazekas, L., Szabó, B., **Szegeczki, V.**, Fillér, C., Varga, Á., Godó, Z., Tóth, G., Reglődi, D., Juhász, T., Németh, N.: Impact Assessment of Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP) and Hemostatic Sponge on Vascular Anastomosis Regeneration in Rats.
Int. J. Mol. Sci. 24, 1-24, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms242316695>
IF: 4.9
4. Józsa, G., Fülöp, B. D., Kovács, L., Czibere, B., **Szegeczki, V.**, Kiss, T., Hajdú, T., Tamás, A., Helyes, Z., Zákány, R., Reglődi, D., Juhász, T.: Lack of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) Disturbs Callus Formation.
J. Mol. Neurosci. 71 (8), 1543-1555, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12031-019-01448-z>
IF: 2.866





5. **Szegeczki, V.**, Perényi, H., Horváth, G., Hinnah, B., Tamás, A., Radák, Z., Ábrahám, D., Zákány, R., Reglődi, D., Juhász, T.: Physical Training Inhibits the Fibrosis Formation in Alzheimer's Disease Kidney Influencing the TGF[béta] Signaling Pathways.
J. Alzheimers Dis. 81 (3), 1195-1209, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3233/JAD-201206>
IF: 4.16
6. Perényi, H., **Szegeczki, V.**, Horváth, G., Hinnah, B., Tamás, A., Radák, Z., Ábrahám, D., Zákány, R., Reglődi, D., Juhász, T.: Physical Activity Protects the Pathological Alterations of Alzheimer's Disease Kidneys via the Activation of PACAP and BMP Signaling Pathways.
Front. Cell. Neurosci. 14, 1-14, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fncel.2020.00243>
IF: 5.505
7. **Szegeczki, V.**, Bauer, B., Jüngling, A., Fülöp, B. D., Vágó, J., Perényi, H., Tarantini, S., Tamás, A., Zákány, R., Reglődi, D., Juhász, T.: Age-related alterations of articular cartilage in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gene-deficient mice.
GeroScience. 41 (6), 775-793, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11357-019-00097-9>
8. Szentlélek, E., **Szegeczki, V.**, Karanyicz, E., Hajdú, T., Tamás, A., Tóth, G., Zákány, R., Reglődi, D., Juhász, T.: Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP) Reduces Oxidative and Mechanical Stress-Evoked Matrix Degradation in Chondrifying Cell Cultures.
Int. J. Mol. Sci. 20 (1), 168, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20010168>
IF: 4.556
9. Reglődi, D., Cseh, S., Somoskői, B., Fülöp, B. D., Szentlélek, E., **Szegeczki, V.**, Kovács, A., Varga, A., Kiss, P., Hashimoto, H., Tamás, A., Bárdosi, A., Manavalan, S., Bakó, É., Zákány, R., Juhász, T.: Disturbed spermatogenic signaling in pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-deficient mice.
Reproduction. 155 (2), 127-137, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1530/REP-17-0470>
IF: 3.125





10. Józsa, G., **Szegeczki, V.**, Pálfi, A., Kiss, T., Helyes, Z., Fülöp, B., Cserhádi, C., Daróczi, L., Tamás, A., Zákány, R., Reglődi, D., Juhász, T.: Signalling Alterations in Bones of Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP) Gene Deficient Mice.
Int. J. Mol. Sci. 19 (9), 2538, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19092538>
IF: 4.183

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 38,819

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
9,524**

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

Debrecen, 2025.04.11.

