

A retrobulbaris kötőszövet proliferációjának okai és következményei endokrin orbitopathiában

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

Írta: Aranyosi János okleveles orvosdoktor

Készült a Debreceni Egyetem Klinikai Orvostudományok Doktori Iskolája (Konzervatív
Orvostudományok és Klinikai Vizsgálatok programja) keretében

Témavezető: Dr. Ujhelyi Bernadett

Az értekezés bírálói:

Dr. Bodor Miklós PhD
Dr. Szalai Eszter PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Illés Árpád, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Molnár Csilla, PhD
Dr. Orosz Zsuzsanna Zita, PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2023. május 2., 13 óra

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A retrobulbaris kötőszövet proliferációjának okai és
következményei endokrin orbitopathiában**

Dr. Aranyosi János

Témavezető: Dr. Ujhelyi Bernadett



DEBRECENI EGYETEM
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2023

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

Az endokrin orbitopathia (EOP) az autoimmun pajzsmirigybetegekhez leggyakrabban társuló szemészeti kórkép. Az EOP etiopathogenezeise jelenleg még nem teljesen tisztázott, a pontos mechanizmus intenzív kutatások tárgyát képezi. Nők körében ötször gyakrabban fordul elő, a fogamzóképes korosztályú hölgyeket nagyobb eséllyel érinti. A retrobulbáris térben lezajló folyamatban az orbita fibroblastoknak (OF) kiemelt szerep jut. A lymphocita infiltráció, valamint a cytokin felszabadulás által kiváltott fibroblast aktiváció a retrobulbáris kötőszöveti tér átalakulásához vezet. Az aktivált OF-ok fontos szerepet töltenek be az extracelluláris matrix (ECM) elemeinek megváltozott szintézisében és lebontásában, ezáltal az EOP pathogenezisében. Az OF-k prostaglandin E₂-t (PGE₂), glükózaminoglikánt (GAG) és nagy mennyiségű hyaluronsavat (HA) termelnek. A felhalmozódó HA hidrofíl jellegének köszönhetően tovább gyorsítja az orbita kötőszövet expanszióját.

Az EOP klinikai megjelenését tekintve jellemző az exophthalmus, a gyulladt, oedemas, szemhéjak, valamint a szemhéjak retrakciója. Az autoimmun gyulladás a szemizmok- és az orbita kötőszöveti állományának megnövekedését okozza. A szemizmok funkciózavara kettőslátáshoz vezethet. A nem megfelelő szemhéjzáródás miatt a könnyfilm elégtelenné válhat, minden esetben száraz szem betegséget, súlyosabb esetben szaruhártyafekélyt okozva. A legsúlyosabb forma a dysthyroid opticus neuropathia (DON), amely a látásélesség fokozatos romlásával és tartós látásvesztéssel fenyeget.

A dohányzás az EOP legjelentősebb befolyásolható rizikófaktor, emellett jelentős hajlamostó tényezőként szerepel mind a légzőszervi-, mind a nem légzőszervi daganatos betegségek kialakulásában. A dohányzás káros hatásai a betegségre az alábbiakból tevődnek össze: reaktív oxigéngyökök (ROS) képződése, az oxidatív stressz hatásainak fokozódása, megnövekedett adipogenesis és kifejezettebb HA termelés. Amellett, hogy a dohányosok körében gyakrabban fordul elő az EOP, a betegség súlyossága egyenes arányban nő az elszívott cigaretták számával.

Napjainkban a hagyományos cigaretták (CIG) mellett elterjedőben vannak az alternatív dohányzási formák, úgymint a hevített dohánytermékek (HTP), vagy az e-cigaretták (ECIG). Ezen új eszközök dohányfüstmentes alternatívát kínálnak, valamint kevesebb mellékáramú füstöt termelnek beltéri körülmények között, így társadalmilag is elfogadhatóbbnak tartják őket.

Szerepük az EOP pathogenezisében szempontjából jelenleg még nem ismert. Klinikai tapasztalataink azt mutatják, hogy a dohányzásról lemondani képtelen páciensek körében a

hagyományos cigarettáról a dohányzás HTP formájára történő váltás kis mértékben a klinikai tünetek javulását eredményezte. Kutatásunkban a fenti jelenséget szeretnénk volna in vitro körülmények között megvizsgálni.

Vizsgálatunk újdonsága a Real Time Cell Electronic Sensing technika (RT-CES). Ez a módszer impedancia változás mérésével határozza meg a letapadó kultúrában növekvő sejtek kinetikáját. A vizsgálathoz használt 16 lyukú sejttenyésztő lemez alján arany elektródák találhatók, melyekre a készülék váltakozó feszültséget kapcsol. Sejtek nélkül a sejttenyésztő folyadék ionjai szabadon áramlanak. A letapadó sejtek az elektródákat lefedve megváltoztatják az ionok áramlását. Mivel a rendszer váltó áramot használ, ezért nem ellenállást hanem impedancia változást mér. Kinetikusan, az idő függvényében képes vizsgálni a sejtek aktivitását, így rendkívül pontos meghatározást tesz lehetővé.

Ismert, hogy terhesség során a fiziológiás immunszuppresszió hatására az autoimmun kórképek aktivitása legtöbbször csökken. Ritkán, az esetek kevesebb mint egy százalékában, az EOP fellángolhat a várandósság során is. Ezen ritka esetekben spontán javulás figyelhető meg a második trimeszterben és szülés után 4-8 hónappal gyakran relapszus alakul ki. Munkánk során egy olyan irodalomban egyedülálló esetet dolgozunk fel, melyben terhesség során alakult ki endokrin orbitopathia és a páciens anamnézisében nem szerepelt korábbi pajzsmirigybetege. A jelenség magyarázata a terhesség során jelentkező számos élettani változás fényében rendkívül összetett, azonban egyértelmű összefüggés látszik a várandósság alatti dohányzás jelenlétével.

2. Célkitűzések

- Korábban már több kutatás foglalkozott a hagyományos dohánytermékek orbita fibroblastokra gyakorolt hatásával. Ezzel ellentétben az ECIG és HTP füstökkel ismereteink szerint hasonló vizsgálatok még nem történtek. Célunk ezen dohánytermékek hatásának vizsgálata volt EOP és egészséges orbita fibroblastokon.
- A hagyományos laboratóriumi tesztek mellett egy új, jelölésmentes in vitro mérési módszerrel, az RT-CES technikával is vizsgáltuk az OF-k viselkedését, amely egy érzékenyebb eszközként szolgálhat a sejtek vizsgálatára.
- Vizsgálni kívántuk az irodalomban ritkaságnak számító várandós hölgy esetét, aki harmadik terhessége során újonnan kialakult EOP miatt jelentkezett Klinikánkon. Anamnézisében pajzsmirigybetege nem szerepelt és korábbi két terhessége során hasonló panaszok nem jelentkeztek, egészséges újszülötteleket hozott a világra.

3. Betegek és módszerek

3.1. A dohányzás újabb típusai hatásának vizsgálata endokrin orbitopathiában

Betegadatok

Az EOP OF tenyészeteket négy, EOP-ban szenvedő beteg dekompressziós műtét során eltávolított kötőszövetéből, a kontroll OF tenyészeteket pedig négy intraocularis daganat miatt végzett enucleatio műtét során eltávolított kötőszövetből hoztuk létre, ezen betegek anamnézisében nem szerepelt korábbi pajzsmirigybetegség. Az intraocularis daganat egyik esetben sem terjedt a szemgolyón kívülre, sclerális beszűrtség sem volt jelen. Az extraocularis tér, beleértve az orbita szöveteket is, intaktak voltak. Minden beteg írásos beleegyezést adott, valamint a vizsgálatot a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága hagyta jóvá, azokat a Helsinki Deklarációnak megfelelően végeztük el. Etikai engedély szám: 5913/2012/EKU (84/13.).

Sejtkultúrák

A sejtkultúrákat Bahn és munkatársai leírása alapján hoztuk létre. Röviden, a műtéti szövetmintákat apró darabokra vágtuk, majd 199-es médiumot (M199) tartalmazó tenyésztőedényekbe helyeztük, 20% (v/v) FBS-szel és penicillin-streptomocinnal, és 37°C-on, 5% CO₂ mellett és a tápfolyadékot 3-4 naponta cseréltük. A fibroblastok kinövése után a szövetdarabokat eltávolítottuk, és a sejtkultúrákat 10% (v/v) FBS-t tartalmazó M199-ben tartottuk fenn. Ezután a sejteket folyékony nitrogénben tároltuk a kísérletek kivitelezéséig. A primer orbita fibroblastokat alacsony passzázsszámnál (2-8) vizsgáltuk.

Dohányfüstelegyek

A füstelegyeket (FE) korábbi közlemények alapján készítettük el. Négy darab referencia IR6F cigaretta használtunk a CIG füstelegy készítéséhez, melyek szálanként 8,6 mg kátrányt és 0,7 mg nikotint tartalmaznak. A szálak 75%-a lett elégetve, a füst egy speciális pumpa segítségével (MILLIPORE XF54 230-50) 30 ml puffer oldaton lett átvezetve. Az oldatot egy 0,2 µm-es membrán szűrőn keresztül sterilre szűrtük. A 12,5%-os CIG füst oldat megfelel napi 100 szál elszívott cigaretta-nak. Kísérletünkhöz egy alacsonyabb 1%-os, valamint egy magasabb 50%-os CIG füst oldatot használtunk.

Az új típusú dohánytermékek füstjét is teszteltük. A forgalomban lévő HTP eszköz (iQOS, Philip Morris International Global Services Inc., New York, NY, USA) esetén négy darab ízesítésmentes dohánytöltetet használtunk a FE elkészítéséhez. Töltetenként 12 szippantást végeztünk a pumpával, összesen 48-at, korábbi közlemények alapján. Az általunk használt elektromos cigaretta (Eleaf iStick Pico, Shenzhen, Kína) szintén kereskedelmi forgalomban kapható eszköz volt. A készülék teljesítményét 16 Watra állítottuk, és az ECIG folyadékot (e-liquid) amelyből a készülék a porlasztott füstöt állítja elő korábbi közlések alapján 49,4% propilén-glikol, 49,4% glicerol és 1,2% nikotin arányban töltöttük be a készülékbe. A hígításhoz M199 mediumot használtunk.

Először a magas koncentrációjú (50%) CIG kivonatot adtunk a sejtekhez, hogy megvizsgáljuk létrejön-e RT-CES készülékkel mérhető változás a sejteken és hogy összehasonlíthassuk ezt a HA szintézis vizsgálata során és metabolikus aktivitás méréséhez használt MTT teszttel mért eredményekkel. Majd a következő mérési sorozatban már mindhárom termékből származó (CIG, ECIG, HTP) alacsonyabb koncentrációjú (1%) füst kivonatokot használtunk. Mindegyik mérés időfüggő volt, az RT-CES 168 órán keresztül folyamatos méréseket biztosított, a HA és MTT vizsgálatokat 24, 48 és 72 óra elteltével végeztük el. Mindegyik mérést háromszor végeztük el, a végeredmények a három mérés átlagai.

Real-Time Cell Electronic Sensing (RT-CES) technika

A fentiek alapján elkészített három füstelegy orbita fibroblastokra gyakorolt hatásának vizsgálatára az ún. RT-CES technikát alkalmaztuk. Ez egy viszonylag új jelölésmentes in vitro mérési módszer, melynek megbízhatóságát korábban már több alkalommal leírták. Ismereteink szerint elsőként alkalmaztuk OF sejtek vizsgálatára.

A készülék elektromos impedancia változás mérésén alapuló valós idejű impedancia meghatározást tesz lehetővé. A 16 lyukú sejtenyésző lemez alján arany elektródák találhatók, melyeken sejtek nélkül a tápfolyadék ionjai szabadon áramolhatnak. Ahogy a sejtek kitapadnak az elektródákhoz megváltozik az ionáramlás, melyet a készülék érzékel és rögzíti. A készülék váltóáramot használ, így elektromos impedanciát mér, nem ellenállást. A sejteket M199-ben szélesztettük, valamint az FE-kezelt vonalak esetén a háromféle FE hozzáadása is megtörtént a vizsgálat indításakor. Valós idejű adatot gyűjtöttünk, a készülék 15 percenként végzett mérést, és az adatok kiértékeléséhez a Cell-Index/sejt-indexet (CI) használtuk, amely egy mértékegységek nélküli arányszám és a kiindulási impedancia értékhez viszonyított impedancia változást adja meg. A méréseket 72 órán át végeztük.

Metabolikus aktivitás mérése

A sejtek metabolikus aktivitásának meghatározására MTT assay-t használtunk, amely egy kolorimetriás teszt a sejtek metabolikus aktivitásának értékelésére. A sejteket 96 lyukú lemezre szélesztettük, 10^4 sejt/lyuk sűrűségben és CO₂ inkubátorban 37°C-on 7 napig M199 mediumban tartottunk fenn, a dohányfüstelegyeket ehhez az oldathoz adtuk hozzá a mérés elkezdése előtt. A felülúszókat eltávolítottuk és -20°C-on tároltuk, a mérések elvégzéséig. Az első három napban az MTT-t a 21. 45. és 69. óra után adtuk a sejtekhez. 10 μ l (5mg/ml) MTT/ 100 μ l tápfolyadék arányt használtunk. Ezt követően a sejteket 3 órán át inkubáltuk 37°C-on. A sejtek anyagcsere-aktivitásuktól függően a sárga MTT-t vízben nem oldódó kék formazánná alakították. A kék formazán kristályokat dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldottuk fel. Az 595 nm-en mért abszorbanciát egy Beckman Coulter, DTX 880 Multimode Detector (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) készülék segítségével mutattuk ki. A sejtek metabolikus aktivitását a kezeletlen arányában fejeztük ki.

A hialuronsav szintjének meghatározása

A felülúszóban lévő HA mennyiségét, ELISA módszerrel, DuoSet Hyaluronan Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) felhasználásával mértük le a gyártó utasításainak megfelelően. Az eredményeket minden esetben a tápfolyadék HA tartalmához viszonyítva adtuk meg. A HA termelést a FE-vel nem kezelt sejtekhez viszonyítva, azok arányában adtuk meg.

Statisztikai elemzés

Az eredmények statisztikai elemzését ismételt méréses ANOVA-val végeztük, amelyet Tukey többszörös összehasonlító post hoc teszt követett (GraphPad Prism 8.0.1, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A statisztikai szignifikancia szintet $p < 0,05$ -nak fogadtuk el.

3.2. Betegadatok – Terhesség hatása az endokrin orbitopathia kialakulására

A tanulmányozott beteg klinikai jellemzői

Graves-Basedow-kórral szövődött terhesség vizsgálata, mely során endokrin orbitopathia alakult ki. A vizsgált, irodalmi ritkaságként leírt várandós páciens esetén EOP alakult ki a terhesség során. Anamnézisében nem szerepelt korábbi pajzsmirigybetege, és szemészeti panaszai sem voltak ezt megelőzően, korábbi két terhessége során egyáltalán nem észlelt hasonló tüneteket.

Laboratóriumi vizsgálatok:

Az alábbi betegségspecifikus laboratóriumi vizsgálatokat végeztük el:

TSH szint meghatározás: A TSH stimuláló hatással bír a pajzsmirigy hormonok termelésére és szekréciójára. A TSH egy nagyon érzékeny és specifikus paraméterként szolgálhat a pajzsmirigy működésének mérésére, és különösen alkalmas a pajzsmirigybetegségek korai felismerésére vagy kizárására. A TSH szint meghatározása Elecsys TSH kit segítségével történt (Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim).

T3 és T4 meghatározás: A pajzsmirigy által termelt és szekretált trijód-thyronin (T3), valamint thyroxin (T4) a keringésbe kerülve fontos szerepet játszanak az anyagcsere szabályzásában, befolyásolják a szív- és érrendszer működését, a növekedést és a csontanyagcserét, és fontosak az ivarmirigy-funkciók és az idegrendszer normális fejlődéséhez. Mindkét hormon legnagyobb részben fehérjékhez kötődve szállítódik a véráramban, ilyenek például a thyroxin-binding globulin (TBG), pre-albumin, albumin. A T4 mindössze 0.03%-a, a T3 0,2-0,4%-a van jelen biológiailag aktív, szabad formában (fT3, fT4). Ezen szabad hormonok szintjének meghatározása fontos szereppel bír a pajzsmirigybetegségek állapotának követésében. Mérésükhöz az Elecsys FT3 III, valamint Elecsys FT4 III kit-et használtuk (Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim).

TSH receptor elleni autoantitest meghatározás: GD-ben a pajzsmirigy túlműködést jellemzően a TSH receptor (TSHR) elleni autoantitestek okozzák, és ezeknek a TSHR-antitesteknek (TRAb) a mérése fontos eszköz a betegség diagnózisában és kezelésében. Mérését Elecsys Anti-TSHR kit segítségével végeztük (Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim).

Tiroglobulin elleni antitest meghatározás: A tiroglobulin nagyméretű glikoprotein, melynek szintézisét és felszabadulását a TSH szabályozza. A tiroglobulin elleni antitestek meghatározását főként autoimmun pajzsmirigybetegségek gyanúja esetén alkalmazzák. Méréséhez a LIAISON® Anti-Tg kit-et használtuk (DiaSorin S.p.A. Via Crescentino snc - 13040 Saluggia (VC) – Italy).

Szemészeti vizsgálatok

Az exophthalmus az EOP egyik legismertebb tünete, mely a betegek akár 70%-ban is előfordulhat. Megjelenése legtöbbször kétoldali, de az esetek 10-20%-ban aszimmetrikus formában is előfordulhat. Az exophthalmus mértékének meghatározására a Hertel-féle

exophthalmometert használjuk. Az eszköz a cornea és a csontos orbita lateralis pereme közötti távolságot adja meg milliméterben kifejezve. A kaukázusi populációban 20 mm a felső határ. A protrusio mértéke nagy egyéni változatosságot mutathat, ezért figyelembe kell vennünk az adott beteg kezdeti Hertel értékét, és amennyiben nem rendelkezünk ilyen adattal, a populációs átlagtól való 2 mm-es eltérést javasolt a diagnózis felállításához.

Az EOP aktivitásának megítéléséhez a Clinical Activity Score besorolást alkalmaztuk, melynek felméréséhez réslámpás vizsgálatot végeztünk. A pontok meghatározása a négy klasszikus gyulladásos jel szemészeti tüneti alapján történik: fájdalom, duzzanat, vörösség és funkciókiesés. Orbitánként vizsgáljuk, hogy a tünetek közül mennyi van jelen. Ha a beteg CAS pontszáma 4 vagy annál nagyobb, akkor az immunológiailag aktív betegségre utal.

Perinatológiai vizsgálatok

A megjelenést követően elvégzett fizikális- és ultrahangvizsgálatok során a magzat nem mutatta fejlődési rendellenesség, tachcardia, vagy golyva jeleit, továbbá megnyugtató növekedési ütemet mutatott a kontroll ultrahang vizsgálatok során.

4. Eredmények

4.1. A dohányzás újabb típusai hatásának vizsgálata endokrin orbitopathiában

Magasabb (50%) koncentrációjú CIG füstelegy hatása az orbita fibroblastokra

RT-CES mérések magasabb (50%) koncentrációjú CIG füstelegy mellett

Kezdetben magas CIG-koncentrációt (50%) használtunk. Kísérleteinkben annak megfigyelésére törekedtünk, hogy a HA szekréciója és az OF-ok metabolikus aktivitása összefügg-e a RT-CES módszerrel mért CI értékkel. Az optimális sejtsűrűség azonosítását követően lyukanként 10 000 sejtben határoztuk meg a sejtszámot és 200ul-ben szélesztettük a sejteket. Az EOP sejtek alap CI értékei jelentősen különböztek a kontroll sejtektől ($p < 0,0001$). Az EOP OF-k maximális CI értéke a mérés alapján itt 3,3 volt, míg a kontroll OF-k CI értéke 2,79-nál tetőzött. A sejtek eredete meghatározta a viselkedésüket, a mérés során az EOP OF-k a kezdeti 10 óra elteltével végig magasabb CI értékeket vettek fel. ($p < 0,0001$).

A kontroll OF-k nem reagáltak az 50%-os CIG-re ($p = 0,46$); nem okozott növekedést a CI-szintekben. A maximális CI-t ($CI = 3,00$) 29 óránál érték el a sejtek. Az EOP OF-k másképp viselkedtek, a FE-vel kezelt EOP OF-ok CI-értéke jelentősen megnőtt a kezeletlen EOP OF-okéhoz képest ($p < 0,0001$). A maximumot 6 óránál érték el ($CI = 5,53$). Ezt követően, gyors csökkenést tapasztaltunk, a CI-értékek a 60. órára a kezeletlen EOP OF-ok szintjére csökkentek.

A metabolikus aktivitás mérése (50%) koncentrációjú CIG füstelegy mellett

A metabolikus aktivitás tekintetében az EOP és a kontroll sejtek eltérő módon viselkedtek. A kezelés 24. és 48. órájában a CIG-vel kezelt sejtek metabolikus aktivitása szignifikánsan alacsonyabb volt a FE-vel kezeletlen sejtekhez képest (EOP OF 24 óra: $p < 0,03$; 48 óra $p < 0,01$; kontroll OF 24 óra $p < 0,01$; 48 óra $p < 0,01$). A 60. órában a kezeletlen és CIG-el kezelt sejtek metabolikus aktivitása közötti különbség eltűnt minden vizsgált sejtvonal esetében (EOP $p = 0,66$, kontroll $p = 0,89$). 72 óra elteltével a CIG kezelt vonalak már szignifikánsan magasabb aktivitási rátát mutattak, mint a kezeletlen sejtek (EOP $p = 0,001$; kontroll $p = 0,004$).

Hialuronsav termelés (50%) koncentrációjú CIG füstelegy mellett

A CIG kezelés mind a kontroll, mind az EOP sejtek HA-termelésének növekedését okozta az összes vonalon, minden mért időpontban (EOP $p < 0,002$; kontroll $p < 0,04$). Az EOP és kontroll sejtek az 50 %-os koncentrációjú CIG kezelésre állandó, kétszeres HA-termeléssel reagáltak. A HA-termelés nem különbözött az EOP és a kontroll fibroblastoknál, sem a kezeletlen, sem a FE-vel kezelt kultúrákban (kezeletlen $p = 0,99$, 24 óra $p = 0,95$, 48 óra $p = 0,87$, 72 h $p = 0,67$).

Alacsony koncentrációjú (1%) füstelegyek hatása az orbita fibroblastokra

RT-CES mérések alacsony koncentrációjú (1%) füstelegyek mellett

A következő kísérletsorozatban az összes EOP és kontroll OF-ot alacsony koncentrációjú (1%-os) FE-nek tettük ki, amely körülbelül napi 8 szál elszívott cigarettának felel meg. Ebben a koncentrációban mind a CIG, a HTP, valamint az ECIG kivonatokat megvizsgáltuk az összes OF kultúrában.

Az EOP OF-k esetében az ECIG okozta a legnagyobb eltérést a CI értékekben (CI = 6,33). Ezt szorosan követték a HTP-kezelt EOP OF-k értékei (CI = 6,25). A CIG-kezelt EOP OF-k mutatták a legkisebb CI eltérést jelen mérésnél (CI = 5,38).

A FE-vel nem kezelt EOP sejtek CI-értékei alacsonyabbak voltak, mint dohányfüsteleggyel kezelt társaiké. A CIG-el kezelt EOP sejtek CI-értékei csúcspontjukat 9 óránál érték el (CI = 5,38); a HTP és ECIG kezelt EOP sejtek hasonló viselkedést mutattak, görbájük platószerű volt. Az ECIG kezelt EOP sejtek csúcserőértéke CI = 6,33, a HTP kezelt EOP csúcserőértéke CI = 6,25 volt. A CIG-re, HTP-re és ECIG-re adott sejt indexben kifejezhető válaszok különbözőek voltak ($p < 0,0001$).

A FE-vel nem kezelt kontroll sejtek gyors növekedést mutattak, majd 8 óra elteltével elérték a csúcserőértéküket (CI = 2,79).

A CIG füsteleggyel kezelt kontroll sejtek hasonló értékeket mutattak, mint a kezeletlen kontroll OF-k, a legmagasabb CI érték 2,62 volt és a CI értékeik görbéje hasonló lefutást mutatott. Ehhez képest a HTP-vel és ECIG-el kezelt kontroll sejtek szignifikáns különbséget mutattak a CI-ben ($p < 0,0001$); mind a HTP-vel, mind az ECIG-vel kezelt kontroll fibroblastok hasonlóan viselkedtek a 22. óráig, amikor a CI mindkét sorban növekedni kezdett. A HTP kezelt kontroll vonal a 32. órában érte el a maximumot (CI = 3,32), az ECIG vonal pedig az 52. órában. (CI = 3,41).

Metabolikus aktivitás mérése alacsony koncentrációjú (1%) füstelegyek mellett

Az 1%-os HTP-vel, ECIG-vel és CIG-vel végzett kezelésnél 24, 48 és 72 óra után sem tapasztaltunk szignifikáns különbséget az anyagcsere-aktivitásban a FE-kezelt OF vonalakon összehasonlítva a FE-kezeletlen sejtekkel. Az FE-kezeletlen EOP és kontroll sejtek metabolikus alapaktivitása szintén nem különbözött. Az 50%-os CIG-kezeléssel ellentétben, az 1%-os HTP, ECIG és CIG nem volt hatással a metabolikus aktivitásra ($p=0,9$)

Hialuronsav termelés alacsony koncentrációjú (1%) füstelegyek mellett

Nem találtunk különbséget az EOP és kontroll OF a hialuronsav termelésében sem 1%-os FE kezelést követően a kezeletlen OF-k értékeihez viszonyítva. Minden sejtvonal hasonlóan viselkedett ebben a tekintetben, függetlenül hogy beteg vagy kontroll orbitából származtak-e ($p = 0,83$). Az 1%-os FE nem volt hatással a vizsgált sejtek HA termelésére sem 24 órával, sem 48 órával a kezelés után ($p = 0,14$).

4.2.1 A terhesség hatása az endokrin orbitopathia kialakulására

Vizsgálatunk során GD-vel, majd EOP-val szövődött terhességet követtünk, mely során a vártnál ellentétes klinikai kép hátterének, pathogenesisének tisztázására törekedtünk.

Az irodalomban elsőként írunk le egy 19 éves nő harmadik terhessége során, a második trimeszterben újonnan kialakult EOP betegséget.

A páciens anamnézisében nem szerepelt korábban pajzsmirigybetege. A hyperthyreosist háziorvosa diagnosztizálta a terhesség 20. hetében.

Laborleletei ekkor a következőképp alakultak: TSH 0,01 mU/L; FT4: 78,4 pmol/L (referencia tartomány: 12–22 pmol/L), FT3: 37,4 pmol/L (referencia tartomány: 3,1–6,8 pmol/L).

Ismeretlen okok miatt csak a 30. terhességi héten jelentkezett legközelebb területileg illetékes endokrin szakrendelésen, a laboreredményekben továbbra is hyperthyreosis jelei mutatkoztak, mely miatt thyreostatikus terápiát (thiamazole) indítottak. Egyéb ismert betegségről nem számolt be, korábban nem voltak pajzsmirigy problémái és terhesség előtti laboreredmények nem álltak rendelkezésre. Mindhárom terhessége természetes úton fogant, előző két gyermekét császármetszéssel hozta világra téraránytalanság miatt. Anamnéziséből kiemelendő, hogy naponta 20 szál cigarettát szívott, melyet a terhesség alatt sem hagyott el.

Klinikánkon először a 33. terhességi héten jelentkezett, főbb panaszai a jobb oldali exophthalmus, csökkent és fájdalmas szemmozgások, valamint a csökkent vízus voltak. Elmondása szerint az első tünete, az exophthalmus a terhesség 14. hetén jelentkezett jobb szemén. Felvételnél a TSH és pajzsmirigyhormon szintek még továbbra is a hyperthyreoid tartományban voltak. A TRAb érték 2,4 U/L (referencia tartomány:< 1 U/L), az anti-thyreoglobulin antitest szint 1324,0 IU/ml (referencia tartomány <60 IU/ml) voltak. Az aktuális ajánlások ellenére metimazol indult 50 mg/nap dózisban, mivel a súlyos hyperthyreosis jelentősen növelte a koraszülés kockázatát, emellett a harmadik trimeszterben a metimazol már nem bírt magzatkárosító kockázattal. Három nap után a metimazol dózisát 30 mg/napra csökkentettük. A szemészeti vizsgálatok ekkor továbbra is jelentős jobb oldali exophthalmust mutattak, beszűkült és fájdalmas szemmozgásokkal. A látásélesség 0,6 volt a jobb szemén és szemhéj oedema is jelen volt ezen az oldalon. Az exophthalmus mértéke 28/21 mm volt 90 mm-es alap mellett Hertel vizsgálattal (a populációs normál határérték 20 mm). Az EOP állapotát súlyosnak ítéltük meg az EUGOGO osztályozás alapján, a Clinical Activity Score (CAS) érték jobb oldalt 6/7 és bal oldalt 0/7 volt. A magzat folyamatos monitorozás mellett megfelelő növekedési ütemet mutatott, golyvát és tachycardiát sem láttunk az ultrahangos vizsgálatokkal. A 34. terhességi héttől kezdve a metimazol terápiát 2x15 mg/napra módosítottuk. A 38. héten végzett szemészeti vizsgálatokon a vízus, a CAS érték és az exophthalmus javuló tendenciát mutatott, habár a szem mögötti fájdalom, valamint a szemmozgáskor jelentkező fájdalom és a szemhéjoedema még jelen voltak. Mivel nem alakult ki látást veszélyeztető EOP, így a magas dózisú kortikoszteroid terápiától eltekintettünk.

Betegünk a 39. héten egészséges, 3170 grammos leány újszülöttet hozott a világra császármetszéssel. A természetes szülés az EOP és a téraránytalanság miatt is ellenjavallt volt. Az újszülött nem mutatta a pajzsmirigy-alulműködés klinikai jeleit, és a 3. napi TSH szintje is az újszülött referencia tartományban volt. Az anya pajzsmirigyhormonszintjei a szülés után emelkedni kezdtek; a tiamazol adagját ennek megfelelően módosítottuk, bisoprolollal

kiegészítve. Szempanaszai a császármetszést követő napon lényegesen javultak, a CAS csökkent, és a látásélesség normalizálódott. Az exophthalmus, a szemhéj- és kötőhártya-vörösség, valamint a szemhéj- és a caruncula duzzanata a szülés utáni 3. napon is jelen voltak. A továbbiakban MRI vizsgálatot terveztünk, melybe a páciens nem egyezett bele. Továbbá előjegyeztük thyreoidectomia műtétre is, melyre azonban nem jelent meg, ahogy a későbbi kontroll vizsgálatkora sem, így az újszülött és az anya későbbi állapotáról információ nem volt nyerhető.

5. Főbb eredmények és következtetések

5.1. A dohányzás újabb típusai hatásának vizsgálata endokrin orbitopathiában

- Az RT-CES módszer alkalmasnak bizonyult a különböző környezeti tényezők orbita fibroblastokon történő tanulmányozására. Kellően érzékeny módszernek bizonyult ahhoz, hogy detektálni tudja az alacsonyabb koncentrációjú FE okozta hatásokat a sejteken, így alkalmas lehet a kötőszövetben lejátszódó folyamatok pontosabb vizsgálatára.
- A módszer alkalmas arra, hogy különbséget tudjunk kimutatni az EOP és kontroll orbita fibroblastok viselkedésében.
- Igazoltuk, hogy magas CIG füstelegy hozzáadása esetén az EOP és kontroll fibroblastok viselkedése eltérő. A magasabb koncentrációjú CIG füstelegy mellett az EOP OF-k magasabb CI értékeket mutatnak. Ez alátámasztja a dohányfüst szerepét az EOP pathogenezisében.
- Az 50%-os CIG füstelegy kezelésre mind az EOP, mind a kontroll fibroblastok fokozott HA termeléssel reagáltak, amely összhangban van a betegség feltételezett pathomechanizmusával és a klinikai kép következményes romlásával.
- Kutatásunk elsőként igazolta, hogy az új típusú dohánytermékek hatására (ECIG, HTP) az EOP fibroblastok viselkedése eltérő, mely alátámasztja a feltételezést, hogy az alternatív dohányzási formák különbözően hatnak a betegség lefolyására, mint a hagyományos cigaretta füst.

5.2. Terhesség hatása az endokrin orbitopathia kialakulására

- A terhesség második és harmadik trimeszterében számítani kell a fennálló EOP súlyosbodására, annak ellenére hogy a Graves-Basedow kóros hyperthyreosis melynek szövődményeként az EOP fellépett általában javulást mutat.
- A terhesség alatt kialakuló vagy romló EOP esetén a dohányzás elhagyása önmagában a szemészeti eltérés gyors és jelentős javulásához vezethet.



Nyilvántartási szám: DEENK/501/2022.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Aranyosi János K.

Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Aranyosi, J. K.**, Galgóczi, E., Erdei, A., Katkó, M., Fodor, M., Ujhelyi, Z., Bácskay, I., Nagy, E. V., Ujhelyi, B.: Different Effects of Cigarette Smoke, Heated Tobacco Product and E-Cigarette Vapour on Orbital Fibroblasts in Graves' Orbitopathy; a Study by Real Time Cell Electronic Sensing.
Molecules. 27 (9), 1-14, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules27093001>
IF: 4.927 (2021)
2. **Aranyosi, J. K.**, Deli, T., Erdei, A., Tóth, G., Jakab, A., Fodor, M., Nagy, E. V., Ujhelyi, B.: Unusual onset of thyroid associated orbitopathy during pregnancy: case report and review of literature.
BMC Endocr. Disord. 20 (1), 1-5, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12902-020-00663-9>
IF: 2.763

További közlemények

3. Ujhelyi, B., **Aranyosi, J. K.**, Módos, L.: A szemfelszín betegségeinek sebészi kezelése amnionmembrán-transzplantációval.
Szemészet. 157 (2), 82-88, 2020.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 7,69

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 7,69

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

Debrecen, 2022.12.15.

