

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

**A neutrofil granulociták szuperoxid-anion termelése
egészséges és preeclampsziás terhességben**

Dr. Lampé Rudolf

**Témavezetők: Prof. Dr. Póka Róbert
Dr. Szűcs Sándor**



DEBRECENI EGYETEM

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2011.

A neutrofil granulociták szuperoxid-anion termelése egészséges és preeclampsias terhességben

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Lampé Rudolf okleveles általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Klinikai Orvostudományok doktori iskolája
(Klinikai vizsgálatok programja) keretében

Témavezetők: Prof. Dr. Póka Róbert, kandidátus
Dr. Szűcs Sándor, Ph.D.

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Berta András, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Fülöp Vilmos, az MTA doktora
Prof. Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja: 2011. június 8. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Nagy Bálint, Ph.D.
Dr. Szegedi Andrea, az MTA doktora

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Berta András, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Fülöp Vilmos, az MTA doktora
Dr. Nagy Bálint, Ph.D.
Prof. Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora
Dr. Szegedi Andrea, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja:

DE OEC I. sz. Belgyógyászati Klinika tanterme, 2011. június 8. 13:30

BEVEZETÉS

A preeclampsia egy terhesség-specifikus megbetegedés, aminek vezető tünete a terhesség 20. hete után újonnan kialakuló magas vérnyomás és proteinuria. Bár a betegség pontos etiológiája ismeretlen, a placenta hipoperfúziója és a diffúz endothelsejt károsodás központi szerepet tölt be. A preeclampsziának enyhe és súlyos formái lehetnek, elhanyagolt esetben pedig vese- és májelégtelenséghez, disszeminált intravaszkuláris koagulációhoz és központi idegrendszeri tünetekhez vezethet. Mivel a kórkép definitív terápiája a magzat világra segítése, a preeclampsia magas anyai és magzati morbiditással és mortalitással jár. Az Egyesült Államokban a koraszülések 15%-áért és az anyai halálozás 17,6%-áért felelős. Világszerte a preeclampsia és az eclampsia (azaz a preeclampsziás terheseknél kialakuló görcsrohamok, melyeknek más kiváltó oka nem ismert) évente az anyai halálesetek körülbelül 14%-áért felelős, ami 50000-75000 nőt érint.

Az Egyesült Államokban az egészséges, korábban nem szült terhes nők körében a preeclampsia incidenciája 2-6%. A kórkép enyhe formában jelenik meg az esetek 75%-ában, míg súlyos formában az esetek 25%-ában. Az összes preeclampsziás eset 10%-a alakul ki a 34. terhességi hét előtt. A magnézium profilaxis hiányában 200 preeclampsziás közül egynél súlyosbodik a kórkép annyira, hogy eclampsia alakul ki. Azon nőknél, akiknél az előzményben preeclampsia, többes terhesség, krónikus magasvérnyomás vagy vesebetegség szerepel nagyobb a preeclampsia kialakulásának valószínűsége. Ezen kívül az obezitás, a diabétesz, a trombofilia, a 40 év feletti életkor is a rizikófaktorok közé sorolhatók. A családi anamnézis kapcsán a kardiovaszkuláris megbetegedések érdemelnek kiemelt figyelmet.

A terhesség során előforduló magasvérnyomást 4 csoportba osztjuk, melyek közül az egyik a preeclampsia: korábban normális vérnyomású nőnél a 20. terhességi hét után kialakuló magasvérnyomás és proteinuria (24 óra alatt több, mint 0,3 g fehérje ürítése).

Az enyhe preeclampsia diagnózisa akkor állítható fel, ha a terhes vérnyomása nagyobb, mint 140/90 Hgmm, egy nap minimum kétszer mérve, legalább hat óra különbséggel, egy hetes perióduson belül. A proteinuria definíció szerint a nagyobb, vagy egyenlő, mint 1+ fehérje random módon végzett gyorstesztel, vagy a 24 óra alatt gyűjtött vizeletben az ürített fehérje mennyisége nagyobb, mint 300 mg. Az ödéma és hiperreflexia napjainkban nem tartozik a preeclampsia diagnosztikus kritériumai közé. Hasonlóan az ACOG 2001-es ajánlása szerint már nem tartozik a hipertenzió korábban elfogadott kritériumai közé a korábban mért vérnyomásokhoz képest 30 Hgmm-es szisztolés, és/vagy 15 Hgmm-es diasztolés vérnyomás emelkedés.

A preeclampsia klinikai manifesztációi változatosak lehetnek. A gesztációs hipertenzió diagnózisa például csak retrospektíve állítható fel, ám kezelést a legtöbb esetben igényel, ami általában úgy történik, mintha a páciens preeclampsias lenne. Ha egy terhesnek vese vagy kardiovaszkuláris megbetegedése van, a preeclampsia diagnózisa ugyancsak nehezített.

A betegség jelentősége miatt számos próbálkozás történt a megelőzés és előjelzés terén (úgy mint alacsony dózisú aszpirin, kalcium szuplementáció, C- és E-vitamin bevitel), ám ezek kiábrándító eredményekkel zárultak. Különösen érdekes ez azért, mivel a próbálkozások a preeclampsia pathogenezisében feltételezetten kulcsszerepet játszó folyamatok alapján történtek.

Az általánosan elfogadott konszenzus a preeclampsia pathogenezisét illetően az, hogy egy endotelsejt rendellenesség, ami az enyhétől a súlyosig terjedő mikroangiopátiához vezet a célszervekben, azaz az agyban, a vesékben, a májban és a placentában. Bár a hipertenzió tűnik a leggyakoribb tünetnek, az nem tekinthető az elsődleges pathogenetikai folyamatnak. Nem

ritka, hogy más szervek is érintetté válnak mielőtt a magasvérnyomás manifesztálódik. A kórkép tüneteinek kialakulása előtt a preeclampsias terhesekben az endothelsejt károsodás keringő markereinek emelkedett szintje mutatható ki. Ezen markerek az endotelin, a celluláris fibronectin, a plazminogén aktivátor inhibitor-1, és a megváltozott prosztaciklin/tromboxán arány.

Napjainkban tehát a preeclampsia pathogenezisének hátterében elsősorban az oxidatív stresszt, immunológiai, humorális és metabolikus rendellenességeket feltételezik, melyek mindegyike endothelsejt károsodáshoz, következményes célszerv-károsodáshoz vezethet.

A reaktív oxigéngyökök elsődleges támadási pontjai sejtmembránok és lipoproteinek. A többszörösen telítetlen zsírsavak és a koleszterin károsításával reaktív elsődleges termékek keletkeznek, amiket lipid hidroxidoknak nevezünk, a folyamatot pedig lipidperoxidációnak hívjuk. A lipid hidroxidok a szervezet fiziológias működéséhez szükségesek, ám kontrollálatlan termelődésük a sejtek diszfunkciójához és károsodásához vezethet. A preeclampsia esetében széleskörűen vizsgált jelenség a lipidperoxidáció. Kísérletes körülmények között lipidperoxidációval a preeclampsiaiban is megfigyelhető endothelsejt károsodást, illetve annak következményeit figyelték meg.

A granulociták termelte szuperoxid-anionnal (O_2^-) kapcsolatban a rendelkezésre álló szakirodalom számos ellentmondást tartalmaz. Az bizonyos, hogy az aktivált neutrofilek által termelt O_2^- a sejtmembrán lipidperoxidációját okozza, ami megnövekedett vaszkuláris permeabilitással és reaktivitással jár. Az ellentmondásokat szemléltetve megemlítjük, hogy egy munkacsoport vizsgálatai szerint n-formyl-metionyl-leucyl-fenilalanin (FMLP) stimulációval harmadik trimeszterben lévő egészséges terheseknél szignifikánsan magasabb neutrofil szabadgyök termelést mért a nem terhes kontrollokkal összehasonlítva, míg egy másik munkacsoport hasonló kísérletben a terheseknél mért szignifikánsan alacsonyabb O_2^- termelést a nem terhesekhez képest. Sacks és mtsai. normál terhességben és preeclampsiaiban

is magasabb $O_2^{\cdot -}$ termelést mértek FMLP stimuláció hatására a nem terhesek értékeihez képest, míg Crocker és mtsai. egészséges terhességben a nem terhesekhez és preeclampsias terhesekhez képest csökkent a $O_2^{\cdot -}$ termelést mértek.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során az alábbi problémák megoldását és kérdések megválaszolását tűztük ki célul:

I. Egészséges terhesek és preeclampsziás terhesek vérmintáiból szeparált perifériás neutrofil granulociták O_2^- termelésének megfigyelése, tisztázása:

1. Hogyan változik meg a granulociták O_2^- termelése egészséges terhességben és preeclampsziában a nem terhes kontrollok eredményéhez viszonyítva PDBu és FMLP stimuláció hatására?

II. Egészséges terhesek és preeclampsziás terhesek vérében a granulocita-funkciót befolyásoló plazmafaktorok jelenlétének vagy hiányának igazolása:

1. Milyen hatással van az egészséges nem terhes, egészséges terhes és preeclampsziás nők vérplazmája az egészséges terhesekből, egészséges nem terhesekből és preeclampsziás terhesekből izolált granulociták O_2^- termelésére?
2. A fenti változások hogyan alakulnak inaktivált és nem inaktivált vérplazma alkalmazása esetén?
3. Befolyásolja-e a granulociták O_2^- termelését az idegen immunológiai környezet, tehát a nem saját, de ugyanazon vizsgálati csoportból származó vérplazma?

BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

A vizsgálati alanyok

Tájékozott beleegyezést követően, terhességük harmadik trimeszterében járó 31 egészséges terhes és 39 preeclampsziás nő perifériás vérmintáit gyűjtöttük össze. A vérvételek a 26-38. terhességi héten történtek. Kontrollként 35 hasonló életkorú, egészséges nem terhes nő vérmintáit használtuk. Az egészséges terhes nők életkora 23-34 év volt, átlagosan $31,1 \pm 4,3$ év, a preeclampsziás terheseké 22-34 év, átlagosan $31,3 \pm 3,9$ év, az egészséges nem terheseké 25-33 év, átlagosan $31,6 \pm 2,8$ év. A preeclampsziát a terhesség 20. hete után kialakuló magasvérnyomás ($\geq 140/90$ Hgmm két különböző mérés eredményeként, legalább 6 óra különbséggel) és proteinuria (24 órás vizeletgyűjtésből a fehérje mennyisége több mint 300 mg/nap) együttes fennállása esetén diagnosztizáltuk. A preeclampsziások a kórkép súlyosságát illetően az enyhe ($140/90$ Hgmm – $149/99$ Hgmm) és közepesen súlyos ($150/100$ Hgmm – $159/109$ Hgmm) csoportból kerültek ki, a súlyos preeclampsziásokat nem válogattuk be. Minden vérvétel a gyógyszeres kezelés előtt történt, a beválogatott egyének nem szedtek rendszeresen gyógyszert, nem szenvedtek cukorbetegségben, vagy egyéb belgyógyászati megbetegedésben, előzményükben nem volt nagyobb sebészeti beavatkozás.

A granulociták szeparációja perifériás vérből

A perifériás vér levétele EDTA tartalmú, vákuum elven működő, zárt vérvételi csövekbe történt mindhárom vizsgálati csoport esetében. A vérmintákat egyenként Ficoll oldatra (1,077 g/ml) rétegeztük, 1g-vel centrifugáltuk 40-60 percig szobahőmérsékleten. Az így különválasztott plazmában és fehérvérsejtekben gazdag felülúszót leszívtuk és a Ficoll gradiens (1,119 g/ml és 1,077 g/ml) tetejére rétegeztük, majd 350 g-n, 20 °C-on 30 percig

centrifugáltuk. A két eltérő sűrűségű Ficoll réteg közé kivált neutrofil granulocitákat összegyűjtöttük és 7,4-es pH-ra beállított Hank's pufferben egymás után kétszer mostuk 20 °C-on. A sejtek életképességét tripánkék kizárásos teszttel ellenőriztük, ami 98%-os volt. A granulocita szuszpenzió tisztasága mikroszkópos vizsgálat alapján 94-98%-os volt. A vörösvértestek hipotóniás lízisére nem volt szükség, tekintettel az eritrocita kontamináció hiányára.

A szuperoxid-anion termelés mérése

A O_2^- termelésért felelős NADPH-oxidáz stimulálása mind az intracelluláris protein kináz-C (PK-C) útvonalon, mind a formil-peptid receptor útvonalon keresztül történt a PDBu illetve az FMLP segítségével. A O_2^- termelést a ferricitokró-m-c megkötésének szuperoxid-dizmutázzal gátolható csökkenéseként mértük (Babior és mtsai, 1975). A granulocitákat (3×10^5) Hank's oldatban (pH 7,4) inkubáltuk phorbol-12,13-dibutyráttal (PDBu) és FMLP-vel 15 percig 37°C-on. A minták végső térfogata 0,5 ml, a PDBu és FMLP koncentrációja 100-100 nmol/l, a ferricitokró-m-c koncentrációja pedig 50 μ mol/l volt. A megkötődés változását 550 nm-en mértük kettős sugarú Shimadzu UV-160A spektrofotométerrel 25°C-on. Az oldatba kiválasztott O_2^- mennyiségét a redukált ferricitokró-m-c moláris extinkciós koefficiense alapján számítottuk ki.

A plazmaminták hatásának mérése a nem terhesek, egészséges terhesek és preeclampsziás terhesek neutrofil granulocitáinak szuperoxid-anion termelésére

A plazmafrakciókat az egészséges nem terhesek, egészséges terhesek és preeclampsziás terhesek perifériás vérmintáiból nyertük azok 20 °C-on 10 percig 800 g-n történő centrifugálása után, majd minden egyes plazmamintát két egyenlő részre osztottuk. Plazmakísérleteink során 6 egészséges terhes, 6 nem terhes és 6 preeclampsziás nő

plazmamintáit izoláltuk, illetve ugyanezen vizsgálati alanyok granulocitáit szeparáltuk. A plazmaminták egyik részét 30 perc alatt 56 °C-os vízfürdőben inaktiváltuk, a komplementrendszer feltételezett granulocita funkciót befolyásoló hatásának kizárása céljából. A plazmaminták másik részét nem inaktiváltuk. A vizsgált személyektől nyert plazmamintákat nem kevertük össze, azokat felhasználásig -86 °C-on tároltuk. Minden plazmakísérletet inaktivált és nem inaktivált plazmával végeztünk el. Az egészséges nem terhes nők granulocitáit (3×10^6) egészséges terhesek és preeclampsias terhesek plazmamintáiban (1,5 ml) inkubáltuk. Ennek analógiájára az egészséges terhesek granulocitáit egészséges nem terhes nők és preeclampsias terhesek inaktivált és nem inaktivált plazmamintáival kezeltük, illetve a preeclampsias terhesek granulocitáit egészséges nem terhesek és egészséges terhesek plazmamintáiban inkubáltuk. Annak érdekében, hogy megfigyeljük az „idegen plazma” immunmediálta hatását a granulociták O_2^- termelésére, az egészséges nem terhesek, egészséges terhesek és preeclampsias terhesek véréből nyert sejteket (3×10^6) saját plazmájukkal (1,5 ml) (autológ) és saját csoportjából származó, de másik egyén plazmájával (1,5 ml) (heterológ) kezeltük. A granulociták inaktivált és nem inaktivált plazmában történő inkubációja 37 °C-on 60 percig tartott, majd Hank's oldatban mostuk és a fent leírt módon mértük a O_2^- termelésüket.

Statisztikai analízis

A minta eloszlását a Kolmogorov-Smirnov teszttel ellenőriztük, melynek során az normál eloszlásúnak bizonyult. A vizsgált populáció klinikai paramétereinek, az egészséges nem terhesekből, egészséges terhesekből és preeclampsias terhesekből származó granulociták O_2^- termelésének, csakúgy, mint az előzetesen plazmamintában inkubált neutrofilek O_2^- termelésének különbségeit egyszempontú varianciaanalízissel (ANOVA) illetve Newman-Keuls post-hoc teszttel vizsgáltuk. Szignifikánsnak a $p < 0,05$ különbséget tekintettük.

EREDMÉNYEK

Az általunk vizsgált betegeknél is megfigyelhetők a szakirodalomból ismert, preeclampsziában bekövetkező változások. Eredményeinkből látható, hogy a preeclampsziás terhesek körében a szüléskori magasabb testtömeg-index és alacsonyabb gesztációs kor, az alacsonyabb újszülött-súly illetve a magasabb szisztolés és diasztolés vérnyomás valamint proteinuria szignifikáns változást mutat az egészséges terhesek eredményeihez képest.

A neutrofil granulociták szuperoxid-anion termelése

Az egészséges terhes nőkből származó granulociták átlagos $O_2^{\cdot-}$ termelése a nem terhesek és preeclampsziás terhesek hasonló eredményéhez képest szignifikánsan csökkent PDBu stimuláció hatására. Nem volt szignifikáns különbség a nem terhes kontrollok és a preeclampsziás terhesek granulocitáinak $O_2^{\cdot-}$ termelésében. A preeclampsziások granulocitái szignifikánsan nagyobb mennyiségben termelték a $O_2^{\cdot-}$ -t, mint az egészséges terheseké. FMLP stimuláció hatására az egészséges terhesek átlagos $O_2^{\cdot-}$ termelése szignifikánsan csökkent összehasonlítva a nem terhesek és preeclampsziás terhesek eredményeivel. Nem volt szignifikáns különbség a nem terhesekből és preeclampsziás terhesekből származó granulociták átlagos $O_2^{\cdot-}$ termelése között. A preeclampsziás terhesekből származó granulociták $O_2^{\cdot-}$ termelése szignifikáns növekedést mutatott az egészséges terhesek hasonló eredményével összehasonlítva.

A plazmaminták hatása a granulociták szuperoxid-anion termelésére

Az egészséges terhesből származó inaktivált és a nem inaktivált vérplazma szignifikánsan (mindkét esetben $p < 0,001$) gátolja a nem terhesek granulocitáinak PDBu-indukálta $O_2^{\cdot-}$ termelését, összehasonlítva azzal a $O_2^{\cdot-}$ termeléssel, amikor a vizsgált sejteket az

egészséges nem terhes nők inaktivált és nem inaktivált, autológ és heterológ plazmájában vagy a preeclampsias terhes nők plazmájában inkubáljuk. Nem volt szignifikáns különbség a PDBu stimulált, nem terhes kontrollok granulocitáinak O_2^- termelésében, ha azokat autológ és nem terhes heterológ, vagy preeclampsias terhes plazmájában inkubáltuk.

Ha a nem terhesek granulocitáit inaktivált heterológ plazmamintában, egészséges terhes vagy preeclampsias terhes inaktivált plazmájában inkubáljuk, az FMLP stimulálta O_2^- termelés mértékében nincs szignifikáns különbség a csoportok között. A nem inaktivált minták esetében az egészséges terhes plazmája szignifikánsan ($p<0,01$) gátolja a nem terhesek granulocitáinak O_2^- termelését, nem terhesek autológ és heterológ valamint preeclampsias terhesek plazmájának hatásával összehasonlítva.

Az egészséges nem terhes és preeclampsias terhes nők inaktivált és nem inaktivált vérplazmája is szignifikánsan (mindkét esetben $p<0,001$) növeli az egészséges terhesek vérből izolált granulocitáinak PDBu stimulált O_2^- termelését, összehasonlítva azzal az esettel, ha a fent említett sejteket saját autológ és heterológ inaktivált és nem inaktivált plazmával kezeljük. Nem volt szignifikáns különbség az autológ és heterológ plazmakísérletek eredményeit tekintve.

Az egészséges nem terhes és preeclampsias terhes nők inaktivált vérplazmája, csakúgy, mint a heterológ egészséges terhes vérplazmája nem befolyásolja szignifikánsan az egészséges terhes nők vérből nyert neutrofil granulociták FMLP stimulálta O_2^- termelését az autológ inaktivált értékhez képest. Amennyiben az említett sejteket nem terhes és preeclampsias terhes nők nem inaktivált vérplazmájával kezeljük, azok FMLP stimulált O_2^- termelése szignifikánsan (mindkét esetben $p<0,001$) nő a nem inaktivált autológ és heterológ plazmákkal történő kezelés utáni eredményekkel összehasonlítva.

Ha egészséges terhes nők inaktivált és nem inaktivált plazmamintáival kezeljük a preeclampsias terhesek granulocitáit, a PDBu indukálta O_2^- termelésük szignifikánsan (IP:

p<0,05; NIP: p<0,001) csökken, összehasonlítva a preeclampsziások autológ és heterológ és nem terhesek inaktivált és nem inaktivált plazmájában történő inkubáció után mért eredményekkel. Nem volt szignifikáns eltérés a preeclampsziás terhesek granulocitáinak PDBu indukálta $O_2^{\cdot -}$ termelésében autológ, heterológ és nem terhes inaktivált és nem inaktivált plazmamintákban történt kezelése után.

A preeclampsziás terhesekből származó granulociták átlagos $O_2^{\cdot -}$ termelése FMLP stimuláció hatására szignifikánsan nem különbözik, ha azokat egészséges terhes, nem terhes és preeclampsziás terhes autológ és heterológ inaktivált plazmájában inkubáljuk. Ha a preeclampsziás nők granulocitáit egészséges terhes nem inaktivált plazmájával kezeljük, úgy a sejtek átlagos FMLP indukált $O_2^{\cdot -}$ termelése szignifikánsan (p<0,001) csökken összehasonlítva az egészséges nem terhesek és preeclampsziás terhesek autológ és heterológ nem inaktivált plazmájával történt kezelés utáni eredményekkel.

MEGBESZÉLÉS

A neutrofil granulociták oxidatív anyagcseréjét vizsgáló tanulmányok egészséges és preeclampsias terhesek esetében számos ellentmondást tartalmaznak. Egyes szerzők kimutatták, hogy a granulociták stimulált O_2^- termelése között nem terhesek és egészséges terhesek esetében nincs különbség. Ugyanakkor arról is vannak adatok, hogy egészséges terhességben csökkent a granulociták O_2^- termelése a nem terhesek hasonló eredményéhez viszonyítva. Ezen ellentmondásos adatok miatt vizsgáltuk a granulociták termelte szabadgyökök szerepét, és ezért mértük a neutrofilek O_2^- termelését nem terhes nőkben, egészséges terhesekben és preeclampsias terhesekben.

Eredményeink azt mutatták, hogy a granulociták egyik legfontosabb funkciója, nevezetesen a reaktív oxigén intermedierek termelése a nem terhes kontrollokhoz képest csökken egészséges terhességben mind a PDBu, mind az FMLP indukálta, a O_2^- termelést kiváltó útvonalon keresztül. Ez része lehet a sejt-mediálta immunitás általános szuppressziójának, ami egészséges terhességben ismertén bekövetkezik. A O_2^- termelés csökkenése egészséges terhességben egy védelmi mechanizmus része lehet, amely védelmi mechanizmus a magzati és anyai sejteket védi az oxidatív stressz okozta ártalmaktól. Hasonló csökkenést a O_2^- produkcióban nem figyeltünk meg preeclampsias terhesek esetében, így arra következtethetünk, hogy preeclampsias terhesek esetében az anyai immunrendszer károsodott és a granulocita funkció csökkenésének elmaradása szerepet játszhat a preeclampsiasok endothelsejt károsodásának kiváltásában.

Egészséges terhességben a csökkent O_2^- termelésen kívül más granulocita-funkció is csökken, nevezetesen a kemotaxis, a kitapadás, az ún. „killing” funkció és a fagocitózis. Ezen túl epidemiológiai tanulmányokból ismert a bakteriális és virális infekciók incidenciájának emelkedése terhes nőknél. Az epidemiológiai adatokkal összhangban vannak az általunk

ismertetett eredmények, tekintettel arra, hogy a neutrofilek termelte reaktív oxigén intermedierek elsődleges szerepet játszanak a patogén mikroorganizmusok eradikálásában. Mindezekén túl vannak adatok arra vonatkozóan, hogy az egészséges terhes nők vérplazmája a nem terhesek kontrollként használt granulocitáinak fagocitózist és „ölő” funkcióját is gátolja. Ezzel összhangban mi is kimutattuk a szupprimáló hatását az egészséges terhesek inaktivált és nem inaktivált plazmájának a nem terhesek és preeclampsias terhesek granulocitáinak PDBu stimulálta O_2^- termelésére. Ezzel szemben FMLP stimuláció hatására hasonló, O_2^- termelésbeli csökkenés nem következett be, amikor az egészséges terhesek inaktivált plazmájában inkubáltuk a preeclampsias vagy nem terhes nőkből származó granulocitákat. Ebből arra következtetünk, hogy a FMLP indukálta O_2^- termelés gátlásáért felelős plazmafaktor hőérzékeny és az inaktiválás során denaturálódik. Ezen következtetés ellenőrzésére a nem terhesek és preeclampsias terhesek granulocitáit egészséges terhes nem inaktivált vérplazmájával is kezeltük. Az így született eredmények azt mutatták, hogy az egészséges terhes nem inaktivált vérplazmája már képes arra, hogy a nem terhes és preeclampsias terhes nők granulocitáinak FMLP indukálta O_2^- termelését csökkentse. A kapott eredményekben nagy valószínűséggel nem játszik szerepet az idegen plazma, azaz az idegen immunológiai környezet, hiszen nem volt szignifikáns különbség sem a PDBu, sem a FMLP stimulálta O_2^- termelésben, amikor a nem terhesek és preeclampsias terhesek granulocitáit autológ és heterológ plazmamintákkal kezeltük. Vizsgálataink azt is kimutatták, hogy a preeclampsias nők vérplazmája nem növeli a nem terhes nők granulocitáinak O_2^- termelését sem PDBu, sem FMLP stimuláció hatására.

Fontosnak tartjuk megemlíteni, hogy a mi eredményeink ellentétesek Tsukimori és mtsainak hasonló eredményeivel, akik azt találták, hogy a preeclampsias nők vérplazmája képes a nem terhes nők granulocitáinak O_2^- termelését növelni FMLP stimuláció mellett. Úgy gondoljuk, hogy ezen ellentmondás részben a vizsgált populáció különbözőségén alapszik.

Míg az említett szerzőcsoport vizsgálati alanyai súlyos preeclampszában szenvedtek, addig az általunk vizsgáltak az enyhe és közép súlyos preeclampsziás terhesek közül kerültek ki. Ez arra enged következtetni, hogy a preeclampsziás nők plazmaösszetétele és azon keringő plazmafaktorok koncentrációja, amik a granulociták reaktív oxigén intermediér termeléséért felelősek, a megbetegedés különböző stádiumaiban változik. Feltételezésünk szerint a gátló faktor egészséges terhességben és preeclampsziás terhességben is az anyai vérkeringésbe kerül, míg a neutrofileket aktiváló faktor a preeclampsia progressziója során keletkezik. Ezen hatások egymást ellensúlyozzák, így a szupprimáló vagy stimuláló hatás a faktorok relatív koncentrációjától függ. Enyhe és közép súlyos esetekben az aktiváló faktor valószínűleg nem éri el azt a koncentrációt, hogy a gátló faktor hatását ellensúlyozza. Így alakulhat ki az, hogy a granulociták O_2^- termelése enyhe és közép súlyos esetekben szignifikánsan nem különbözik a nem terhesek hasonló értékéhez. Súlyos preeclampsia esetén a stimuláló faktor koncentrációja valószínűleg már elég ahhoz, hogy a O_2^- termelést fokozza, így mérhető az egészséges terheseknél és nem terheseknél nagyobb mennyiségben.

Annak érdekében, hogy bebizonyítsuk, hogy a O_2^- termelés csökkenését az egészséges terhesek vérplazmája okozza, egészséges terhesek granulocitáit inkubáltuk nem terhesek és preeclampsziás terhesek plazmájában. Ezen kísérleteink eredményei azt mutatták, hogy az egészséges terhesek granulocitáinak csökkent O_2^- termelését fokozza a nem terhes és preeclampsziás terhes plazma. PDBu-val történő stimuláció esetén mind az inaktivált, mind a nem inaktivált plazmaminták képesek voltak a O_2^- termelés fokozására. Az FMPL indukció hatására, amennyiben az egészséges terhesek granulocitáit a nem terhesek és a preeclampsziás terhesek nem inaktivált plazmamintáival kezeltük, úgy a O_2^- termelés emelkedett az autológ és heterológ nem inaktivált plazmával való kezeléshez hasonlítva, míg ez utóbbi két plazma hatása között nem volt szignifikáns eltérés. Azonban FMLP stimuláció hatására, ha az egészséges terhesek granulocitáit inaktivált autológ és heterológ plazmamintákkal kezeljük,

akkor nem kapunk szignifikáns eltérést azzal összehasonlítva, mikor ezeket a sejteket nem terhesek és preeclampsias terhesek inaktivált plazmaival kezeltük. Ezen eredmények arra utalnak, hogy az egészséges terhesekben az FMLP indukálta O_2^- termelés gátlásáért felelős plazmafaktor inaktiválódott a hőkezelés hatására, így a O_2^- termelést nem volt képes csökkenteni.

A szakirodalomban fellelhető ellentmondásos adatok hátterében, melyek a terhességben és a preeclampsia-ban bekövetkező granulocita működést vizsgálják, feltételezzük, hogy technikai okok is állhatnak. Nevezetesen az alkalmazott puffer, melyben a granulociták a szeparációs, stimulációs és mérési folyamatok során inkubálódnak döntően befolyásolhatja ezen sejtek működését. Számos szerző a jól ismert HEPES puffert használja, melynek 60 percnél tovább történő alkalmazása a neutrofilek számára afiziológias körülményeket teremtve módosítja azok működését. Az említett afiziológias körülmények alatt elsősorban a lúgos irányba eltolódott pH-t, illetve különböző toxikus és farmakológiai hatásokat értünk. Ezen kívül a HEPES puffer interakcióba lép és modifikálja egyes ioncsatornák, így a kalcium csatorna működését, melynek viszont esszenciális szerepe van a O_2^- termelés szabályozásában. Egyes szerzők a HEPES puffert kifejezetten károsnak nevezik, ha olyan kísérletek esetén használjuk, melyekben reaktív oxigéngyökökkel kapcsolatos megfigyeléseket végzünk. Az általunk használt, egyszerű összetételű puffer használatának a granulocita funkciót módosító voltáról jelenleg nincs adat.

Mindeddig nem volt tudományos eredmény arról, hogy az egészséges terhesek vérében keringő plazmafaktor gátolni képes a nem terhes és preeclampsias terhes nők granulocitáinak O_2^- termelését. Eredményeinkből arra lehet következtetni, hogy a kérdéses faktor a PKC aktivációját illetve a citoszolból a sejtmembránba történő transzlokációját zavarja meg. Kísérletes adatok bebizonyították, hogy a terhesség és a preeclampsia során a komplement rendszer aktiválódik, de azon eredményünk kapcsán, hogy inaktivált és nem inaktivált

plazmamintákkal is hasonló eredményeket kaptunk PDBu stimuláció esetén, valószínűtlennek tűnik, hogy a hőre inaktiválódó komplement rendszer szerepet játszana a granulocita funkció módosulásában terhesség, illetve preeclampsia esetében. Ismert, hogy a NADPH oxidáz citoszolban elhelyezkedő komponenseinek sejtmembránba történő transzlokációja és aktivációja szükséges ahhoz, hogy az így összeállt enzimrendszer $O_2^{\cdot-}$ -t termeljen. Azon indukáló szerek, amiket kísérleteinkben használtunk, a PKC-t aktiválják különböző útvonalakon keresztül. Az FMLP formil peptid receptoraihoz kapcsolódása után a foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát hidrolízisét indukálva inozitol-1,4,5-trifoszfát és diacilglicerol (DAG) képződéshez vezet, ami a PKC-t aktiválja. A PDBu-nak nincs sejtfelszíni receptora, hanem átjutva a sejtmembránon a DAG hatásmechanizmusát utánózva direkt módon aktiválja a PKC-t. Azt feltételezzük, hogy a nem inaktivált plazmafaktorok a formil-peptid receptorokkal lépnek interakcióba és azok ligand kötő kapacitását csökkentik, ami ahhoz vezet, hogy ezen receptorok kevésbé lesznek képesek a $O_2^{\cdot-}$ termeléshez vezető útvonal aktiválására. Hőkezelés hatására ez a plazmafaktor olyan konformációbeli átalakuláson mehet keresztül, hogy elveszíti a képességét arra, hogy a receptor mediálta útvonalat befolyásolni tudja. A PDBu esetében a hőkezelés hatására bekövetkező, PKC útvonalon ható plazmafaktor konformációváltozása nem befolyásolja a $O_2^{\cdot-}$ termelés csökkentését. Egy lehetséges magyarázata a PDBu-stimulálta $O_2^{\cdot-}$ termelés egészséges terhesekben bekövetkező csökkenésének az, hogy mind az inaktivált, mind a nem inaktivált plazmafaktorok képesek gátolni a PKC aktivációját vagy annak transzlokációját a sejtmembránba.

Új eredményeinket összefoglalva megállapíthatjuk, hogy egészséges terhességben a neutrofil granulociták $O_2^{\cdot-}$ termelése csökken nem terhesek hasonló eredményeihez képest, ami a hemiallograft magzat érdekében egy protektív mechanizmus lehet. Az említett csökkenés nem következik be preeclampsias terhességben, amit valószínűleg az immunreguláció károsodása okoz. Preeclampsias terhességben a $O_2^{\cdot-}$ termelés csökkenésének

elmaradása endothel károsodáshoz vezethet. Az egészséges terhességben megfigyelhető $O_2^{\cdot-}$ termelés csökkenését a vérplazmában keringő, egyelőre ismeretlen, anyai vagy magzati sejtek által termelt, granulocita-funkciót csökkentő faktor okozhatja, mely faktor hiányzik a preeclampsias terhességben. Eredményeink tehát nem támasztják alá a korábban preeclampsiaiban megfigyelt, $O_2^{\cdot-}$ termelést stimuláló plazmafaktor létezését. A plazmakísérleteink kapcsán megállapíthatjuk, hogy valószínűtlen a komplement rendszer granulociták $O_2^{\cdot-}$ termelését befolyásoló hatása.

Az említett plazmafaktor azonosítása, illetve koraterhességben a $O_2^{\cdot-}$ termelés csökkenés elmaradásának kimutatása kiegészítő vizsgálatok esetén alkalmas lehet a preeclampsia előrejelzésére, ezzel a terhesgondozás költséghatékonyabbá tételére egy magas rizikójú csoport kiszűrésével, esetleg farmakológiai prevencióban történő előrelépésre.

ÖSSZEFOGLALÁS

Egészséges és preeclampsias terhességben a neutrofil granulociták reaktív oxigéngyökök termeléséről szóló, szakirodalomban található adatok ellentmondásosak. Célunk volt a granulociták által termelt $O_2^{\cdot-}$ -nak a preeclampsia etiológiájában betöltött szerepét tovább vizsgálni, ezért forbol-dibutiráttal és n-formil-metionil-leucil-fenilalaninnal stimuláltuk az egészséges nem terhesekből, egészséges terhesekből és preeclampsias terhesekből származó granulocitákat. Vizsgáltuk továbbá a nem terhes, egészséges terhes és preeclampsias terhes hő által inaktivált és nem inaktivált vérplazmájának hatását a három vizsgálati csoportból származó granulociták $O_2^{\cdot-}$ termelésére. A $O_2^{\cdot-}$ termelődését a ferricitokróm c redukciójaként mértük spektrofotometriás módszerrel. Mind a forbol-dibutirát, mind az n-formil-metionil-leucil-fenilalanin indukálta $O_2^{\cdot-}$ termelés szignifikánsan csökkent egészséges terhesekből származó granulociták esetében. A nem terhesekből és preeclampsias terhesekből származó granulociták forbol-dibutirát stimulálta $O_2^{\cdot-}$ termelődését az egészséges terhesektől nyert inaktivált és nem inaktivált vérplazma is gátolta. Az n-formil-metionil-leucil-fenilalaninnal stimulált nem terhesek és preeclampsias terhesek granulocitáinak $O_2^{\cdot-}$ termelését csak az egészséges terhesek nem inaktivált vérplazmája tudta gátolni. Az egészséges terhesek granulocitáinak forbol-dibutirát stimulálta $O_2^{\cdot-}$ termelését szignifikánsan növelte mind a nem terhesek, mind a preeclampsias terhesek plazmája inaktivált és nem inaktivált formában is. Az egészséges terhesek neutrofiljeinek n-formil-metionil-leucil-fenilalaninnal indukált $O_2^{\cdot-}$ termelése szignifikánsan növekedett a nem terhesek és preeclampsiasok nem inaktivált plazmáinak hatására. Feltételezzük, hogy az egészséges terhességben megfigyelhető csökkent $O_2^{\cdot-}$ termelés anyai immunszuppresszív faktoroknak köszönhető. Ezen faktorok hiánya valószínűsíthető preeclampsiaiban, így magyarázható az egészséges terhességben bekövetkező $O_2^{\cdot-}$ termelődés csökkenésének elmaradása, ami a preeclampsiaiban megfigyelhető

endothelsejt károsodásért is felelős lehet. A preeclampsia pathogenezisében feltételezzük az elégtelen anyai immunszuppressziót.

Összefoglalva megállapításainkat, a neutrofilek O_2^- produkciója egészséges terhességben valószínűleg immunszuppresszív faktorok hatására lecsökken, ami egy védekező funkció lehet, melynek célja a magzati- és anyai sejtek védelme a granulociták mediálta oxidatív stressz károsító hatásaitól. A preeclampszában megfigyelhető endothelsejt károsodásért a O_2^- termelés elégtelen csökkenése is felelőssé tehető, így a neutrofil granulociták nagy valószínűséggel fontos szerepet játszanak a preeclampsia pathogenezisében.

KÖZLEMÉNYEK

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények, előadások és poszterek:

KÖZLEMÉNYEK:

Lampé R, Ormos M, Szűcs S, Ádány R, Póka R (2008) Granulociták szuperoxid-anion termelésének vizsgálata egészséges és preeclampsziás terhesekben. *Magy Nőorv L* 71: 209-213.

Lampé R, Szűcs S, Ormos M, Ádány R, Póka R (2008) Effect of normal and preeclamptic plasma on superoxide-anion production of neutrophils from healthy non-pregnant women. *J Reprod Immunol* 79: 63-69. [IF: 2,778]

Lampé R, Szűcs S, Ádány R, Póka R (2009) A vérplazma hatása egészséges- és preeclampsziás terhesek granulocytáinak szuperoxid-anion termelésére. *Magy Nőorv L* 72: 245-249.

Lampé R, Szűcs S, Ádány R, Póka R (2011) Granulocyte superoxide anion production and regulation by plasma factors in normal and preeclamptic pregnancy. *J Reprod Immunol* (közlésre elfogadva). [IF: 2,519]

ELŐADÁSOK:

Lampé R, Szűcs S, Ormos M, Ádány R, Póka R (2008) Egészséges és preeclampsziás terhesek plasmáinak hatása a granulocyták szuperoxid-anion termelésére. *Fiatal Nőorvosok IV. Országos Fóruma*, Tapolca.

Lampé R (2009) Egészséges és preeclampsziás terhesek plasmáinak hatása a granulocyták szuperoxid-anion termelésére. *A Debreceni Egyetem Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola (KODI) 2009. évi Ph.D. szimpóziuma*, Debrecen.

Lampé R, Szűcs S, Ádány R, Póka R (2009) Inaktivált vérplazma hatása a nem terhes, egészséges- és preeclampsias terhes nők granulocytáinak szuperoxid-anion termelésére. *Fiatal Nőorvosok V. Kongresszusa*, Balatonfüred.

Lampé R, Szűcs S, Ádány R, Póka R (2010) A neutrophil granulocyták szuperoxid-anion termelése egészséges és preeclampsias terhességben. *A Magyar Nőorvos Társaság XXIX. Nagygyűlése*, Debrecen.

POSZTER:

Lampé R, Szűcs S, Ormos M, Ádány R, Póka R (2008) Effect of normal and preeclamptic plasma on superoxide-anion production of neutrophils from healthy non-pregnant women. *A DE OEC és a MTA DAB Orvostudományi és Biológiai Szakbizottságának tudományos ülése*, Debrecen.

Az értekezésben felhasznált közlemények impakt faktora: 5,297

Az értekezésben fel nem használt közlemények, előadások, posztterek:

KÖZLEMÉNYEK:

Lampé R, Ormos M, Szűcs S, Ádány R, Szikszay E, Póka R (2007) Superoxide anion production of granulocytes in patients with endometrial cancer at presentation and after treatment. *Eur J Obs Gyn R B* 131: 231-234. [IF: 1,273]

Lampé R, Szűcs S, Ádány R, Póka R (2007) Preeclamptic superoxide anion production: Is there an increase or failure of reduction? *Hypertension* 50: e167. [IF: 7,194]

Csorba R, **Lampé R**, Simó D, Bacskó G, Póka R (2007) A trans-obturator tape műtéttel szerzett tapasztalataink másfél száz eset kapcsán. *Orv Hetil* 148: 1649-1655.

Csorba R, **Lampé R**, Póka R (2009) A fiatalkorúakkal szemben elkövetett szexuális bántalmazás elkülönítő diagnosztikája. *Orv Hetil* 49: 2222-2227.

Csorba R, **Lampé R**, Balla L (2010) A fiatalkorúakkal szemben elkövetett szexuális bántalmazás meghatározása és gyakorisága. *Gyermekegyógyászat* 61: 11-15.

Auriel E, Bornstien NM, Berenyi E, Varkonyi I, Gabor M, Majtenyi K, Szepesi R, Goldberg I, **Lampé R**, Csiba L (2010) Clinical, radiological and pathological correlates of leukoaraiosis. *Acta Neurol Scand* 123: 41-47. [IF: 2,324]

Csorba R, **Lampé R** (2010) Fiatalkorú lányokkal szemben elkövetett szexuális bántalmazás felismerése és kezelése. *Magy Nőorv L* 73: 189-194.

Csorba R, **Lampé R**, Póka R (2010) Surgical repair of blunt force penetrating anogenital trauma in a 18-month-old sexually abused girl. *Eur J Obs Gyn R B* 153: 231. [IF: 1,582]

ELŐADÁSOK:

Daragó P, **Lampé R**, Demeter M, Bacskó Gy (2009) Nőgyógyászati laparoscopia során végzett appendectomia. *Magyar Nőgyógyászok Endoszkópos Társaságának XIII. Kongresszusa*, Debrecen.

Csorba R, **Lampé R**, Bacskó Gy (2009) A trans-obturator tape műtéttel szerzett tapasztalataink. *Fiatal Nőorvosok V. Kongresszusa*, Balatonfüred.

Csorba R, **Lampé R**, Daragó P (2010) A trans-obturator tape műtétek szövődményei. *Fiatal Nőorvosok VI. Kongresszusa*, Várgesztes.

POSZTER:

Daragó P, **Lampé R**, Jenei K, Óvári L, Hernádi Z (2010) Fiatalkorban kialakult ovariális psammocarcinoma ritka esete. *A Magyar Nőorvos Társaság XXIX. Nagygyűlése*, Debrecen.

Csorba R, **Lampé R**, Bacskó Gy, Póka R (2010) Experiences in trans-obturator tape surgery after performing 150 cases. *21st European Congress of Obstetrics and Gynaecology*, Antwerp, Belgium.

Összesített impakt faktor: 17,671

Iktatószám: DEENKÉTK /52/2011.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Lampé Rudolf

Neptun kód: CD53Z9

Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Lampé, R.**, Szűcs, S., Ádány, R., Póka, R.: Granulocyte superoxide anion production and regulation by plasma factors in normal and preeclamptic pregnancy.
J. Reprod. Immunol. Közlésre elfogadva, 2011.
IF:2.519 (2009)
2. **Lampé R.**, Szűcs S., Ádány R., Póka R.: A vérplazma hatása egészséges- és preeclampsziás terhesek granulocytáinak szuperoxid-anion termelésére.
Magyar Nőorv. L. 72 (5), 245-249, 2009.
3. **Lampé, R.**, Szűcs, S., Ormos, M., Ádány, R., Póka, R.: Effect of normal and preeclamptic plasma on superoxide-anion production of neutrophils from healthy non-pregnant women.
J. Reprod. Immunol. 79 (1), 63-69, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jri.2008.04.001>
IF:2.778
4. **Lampé R.**, Ormos M., Szűcs S., Ádány R., Póka R.: Granulocyták szuperoxid-anion termelésének vizsgálata egészséges és preeclampsziás terhesekben.
Magyar Nőorv. L. 71 (5), 209-213, 2008.



További Közlemények

5. Csorba R., **Lampé R.**, Simó D., Bacskó G., Póka R.: A transobturator tape műtéttel szerzett tapasztalataink másfél száz eset kapcsán.
Orv. Hetil. 148 (35), 1649-1655, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2007.28147>
6. **Lampé, R.**, Ormos, M., Szűcs, S., Ádány, R., Szikszay, E., Póka, R.: Superoxide anion production of granulocytes in patients with endometrial cancer at presentation and after treatment.
Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 131 (2), 231-234, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejogrb.2006.03.018>
IF: 1.432
7. **Lampé, R.**, Szűcs, S., Ádány, R., Póka, R.: Preeclamptic superoxide-anion production: Is there an increase or a failure of reduction?
Hypertension. 50 (5), e167, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.100107>
IF: 7.194

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2011.05.10

