

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A női kismencedei süllyedékes kórképek és a stressz
inkontinencia hátterének vizsgálata**

Dr. Kozma Bence

Témavezető: Prof. Dr. Takács Péter



DEBRECENI EGYETEM

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2019

A női kismedencei süllyedékes kórképek és a stressz inkontinencia hátterének vizsgálata

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

Írta: Dr. Kozma Bence okleveles általános orvos

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

Témavezető: Dr. Takács Péter, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Szűcs Gabriella, az MTA doktora
tagok: Dr. Nagy Sándor, PhD
Dr. Valent Sándor, PhD

A doktori szigorlat időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK,
Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika, Könyvtár
2019. március 20. 12:00 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Ács Nándor, PhD
Dr. Bodor Miklós, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szűcs Gabriella, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Ács Nándor, PhD
Dr. Bodor Miklós, PhD
Dr. Nagy Sándor, PhD
Dr. Valent Sándor, PhD

Az értekezés védésének időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK,
Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika,
Tanterem
2019. március 20. 14:00 óra

1. A DOKTORI ÉRTEKEZÉS ELŐZMÉNYEI ÉS CÉLKITŰZÉSEI

Magyarországon, hasonlóan a fejlett országok mutatóihoz, felgyorsult a népesség előregedési folyamata. A KSH adatai szerint 2018. január 1-jén száz gyermekre 130 időskorú (65 éves és idősebb) lakos jutott. Ezzel összhangban nő a medencefeneket érintő kórképek prevalenciája. A medencefenék diszfunkciói magukban foglalják az alsó húgyútak működési zavarait, a kismedencei süllyedést (Pelvic Organ Prolapse – POP), a székletürítés zavarait, valamint a medencefenék funkcionális zavaraihoz köthető kismedencei fájdalmat és szexuális diszfunkciót. Ezen kórképek összesített élettartam prevalenciája a női populációban meghaladja az 50 százalékot. A tartósan magas egészséggel összefüggő életminőség iránti igény és az a tény, hogy a felsorolt kórképek jelentős negatív hatással bírnak az életminőség tekintetében ellentétes folyamatok, amely azt eredményezi, hogy az érintett nők növekvő számban fordulnak szakellátáshoz medencefenéssel összefüggő kórképek miatt.

Vizsgálataink tervezése során a női kismedencei süllyedéses kórképek és a stressz inkontinencia hátterének vizsgálatát tűztük ki célul.

A stressz inkontinencia kezelése során szerepet kapnak a lézer és az alacsony energiájú rádiófrekvenciás kezelések is, melyek közös jellemzője és fontos támadáspontja a hüvelyfalra gyakorolt hőhatás. Hipotézisünk szerint az átadott hő hatással lehet a hüvelyfalban és a periurethrális szövetekben elhelyezkedő simaizomsejtek azon képességére, hogy megváltoztassák az extracelluláris mátrix összetételét. Ennek érdekében célunk volt a simaizomsejtek proliferációjának, valamint az elasztin és kollagén szintek mérése hőhatás (65 °C) után.

A kismedencei süllyedéses kórképek vizsgálata során célunk a m. levator ani egy- vagy kétoldali avulziója és az egyes hüvelyi kompartmenteket érintő prolapszus, valamint a POPQ státusz közötti lehetséges összefüggések feltárása volt. Hipotézisünk szerint azon betegeknél, akiknél több kompartmentet érintő süllyedés és magasabb POPQ stádium igazolható nagyobb eséllyel mutatható ki szélesebb LUG és kétoldali levator ani avulzió.

2. BETEGADATOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. Hőhatás vizsgálata a hüvelyfali simaizomsejtek elasztin és kollagén termelésére

2.1.1. A hüvelyi simaizomsejtek izolálása és karakterizálása

Az elülső hüvelyfal teljes vastagságából történt mintavétel négy, POP és/vagy SUI által nem érintett nőnél, akik hasi méheltávolításon estek át jóindulatú nőgyógyászati elváltozás miatt. A mintaadó páciensek előzményében nem szerepelt immunológiai vagy kötőszöveti betegség, endometriosis, és a mintavételt megelőző időszakban nem részesültek hormonterápiában, illetve nem használtak pesszáriumot. A mintavételt minden esetben megelőzte írásbeli beleegyezés. Az uterus eltávolítása után mintegy 5x5 mm-es teljes vastagságú hüvelyfal darabok kerültek eltávolításra a hüvelycsonk területéről steril körülmények között, majd primer simaizom sejt kultúrákat hoztunk létre az irodalomban már leírt módszert követve. A mintákat hideg DMEM/F12 oldatban (Invitrogen, Carlsbad, CA) tároltuk, melyet előzőleg 10% FBS-sel (Fetal Bovine Serum), 1mM glutaminnal, 0,075% Na₂HCO₃ és 100 µg/ml penicillin-streptomycin kombinációjával egészítettünk ki. Legfeljebb 4 órával a gyűjtést követően a minták a hideg tenyésztő médiumba kerültek. A fragmentumokat PBS (phosphate-buffered saline) oldatban háromszor átmostuk, majd fibronectin bevonatú műanyag edényekre (Thermo Fischer Scientific, Rochester, NY) vittük fel. A kezdeti növekedést követően a simaizomsejtek fenotípusához hasonló morfológiájú sejteket klónoztunk és szaporítottunk a sejtenyésztésben.

Nyolcilyukú fibronectinnel bevont lemezt használtunk a sejtek karakterizálására, lyukanként 5000 sejttel. A sejteket 80%-os konfluenciánál kétszer átmostuk PBS oldattal, majd 4%-os PBA oldatban fixáltuk 37°C-on 30 percig. Az F-aktin rostok citoplazmán belüli eloszlásának igazolására a fixált sejteket Tryton X100 0,1%-os és Rhodamine Phalloidin oldatába helyeztük 37 °C-on 45 percen keresztül. Ezt követően a nukleinsavak festésére DAPI tartalmú közegben kezeltük a sejteket (Vectashield, Vector Laboratories, Burlingame, CA), és glicerinbe merítve konfokális mikroszkóppal végeztük a képalkotást. Emellett a 8 lyukú lemezen az immuncitokémiai festést is elvégeztük. Hidrogén-peroxid és metanol elegyével blokkoltuk az endogén peroxidáz aktivitást, majd a sejteket előbb elsődleges egér antitestekkel, majd biotinilált anti-egér immunglobulinnal és streptavidin-biotin-peroxidáz komplexszel (LSABTM

+/HRP kit, Dako, Carpinteria, CA) kezeltük. A hidrogén-peroxid jelenlétében diamino-benzidint használtunk kromogénként. A reakciókat követően hematoxylin festékekkel festettük meg a tenyészeteket. Mindegyik művelet szobahőmérsékleten (22 °C) zajlott. A simaizomsejtek azonosítására simaizomsejt elleni aktin ellenanyagokat használtunk (monoklonális egér AT, 1:250, 30 perc inkubáció, 1A4-es klón, katalógusszám: #0851, Dako, Carpinteria, CA). A caldesmon (egy kalmodulin-kötő fehérje) expressziót monoklonális egér antitesttel vizsgáltuk, 1:100, 30 percig inkubálva (h-CD klón, katalógusszám: #M3557, Dako, Carpinteria, CA). A citokémiai festés citrát pufferben ment végbe. Negatív kontrollként egér szérumot alkalmaztunk az egér antitest helyett.

2.1.2. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay

Az MTT assay elvégzéséhez a simaizomsejt kultúráink egy részét (negyediktől hatodik lyukig) az eredeti lemezről 96 lyukú lemezre (Costar, Cambridge, MA) vittük át 5 000 sejt/lyuk mennyiségben, 200 µl-re kiegészítve DMEM/F-12 10% FBS-sel vegyített oldattal. Majd 65 °C-on 30 vagy 60 másodpercig inkubáltuk modellezve a lézerkezelés termikus hatását. Ezt követően a sejtprolifерáció értékelése 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-yl]-2,5-difenil tetrazolium-bromid (MTT) assay segítségével történt 24 és 48 óránál, a piacon elérhető MTT assay kit (American Type Culture Collection, katalógusszám: #30-1010K, Manassas, VA) segítségével. A kezelt és a kontroll csoport mintáinak vizsgálatát összesen a lemez 6 lyukában ismételtük. Az életképes sejtek számát 24 és 48 óránál határoztuk meg, a sejteket 1mg/ml MTT-ben inkubáltuk 4 órán át. Az MTT-t hasznosított élő sejtek formában kristályok formájában akkumulálódtak, melyet 90% izopropil-alkohol, 2,5% SDS és 0.004 N sósav oldatában oldottunk, majd az oldat optikai denzitását 570 nm-nek mértük.

2.1.3. Fastin Assay Elastin kimutatásához

A vizsgálat elvégzéséhez a simaizomsejt kultúra egy részét 96 lyukú lemezre (5000 sejt/lyuk) (Costar, Cambridge, MA) vittük át, a sejtek 200 µl 10% FBS tartalmú DMEM/F-12 oldatban kerültek felvételre és közel 100 százalékos konfluenciáig folytattuk a tenyésztést. A felhasználandó médiumot előmelegítettük 65 °C-ra, majd a sejtekre rámerve 30 vagy 60 másodpercig termosztátba helyeztük. A kezelt és a kontroll csoport mintáinak vizsgálatát

összesen a lemez 6 lyukában ismételtük. A felülúszó és a sejtlizátumok gyűjtése a Fastin Elastin assay kezelés megkezdését követő 48 óra múlva történt. A kezelést Fastin Elastin assay kit (Biocolor Ltd, UK) végeztük a gyártó utasításainak megfelelően. A Fastin Elastin assay egy kvantitatív festékkötődési eljárás, ami az elasztin kimutatására szolgál biológiai mintákban. Az alkalmazott festék négyszeresen telített 5, 10, 15, 20-tetrafenil-21,23-porfirin (TPPS). A festék az emlős elasztinban található bázikus és nem poláros aminosav szekvenciákhoz kötődik. A festék-kötött elasztint minden mintából és sztenderdből egyaránt 513 nm-en mértük. Minden mérést négyszer ismételtünk. A minták összehasonlításához az elasztin mennyiségét sejtszámra normalizáltuk.

2.1.4. Sircol Kollagén Assay

A Sircol Assay (Biocolor Ltd., UK) is festékkötődési eljárás, melynek célja a sav- és pepszin-oldékony kollagén molekulák kimutatása. Az assay segítségével megbecsülhető a gyors növekedési és fejlődési fázisában a kollagén szintézis sebessége. A Sircol assay in vitro sejtkultúrában és in vitro extracelluláris mátrixban termelődött kollagén mennyiségét is képes mérni. A simaizomsejteket 96 lyukú lemezen (5000 sejt/lyuk) (Costar, Cambridge, MA) tenyésztettük, a sejtek 200 µl 10% FBS tartalmú DMEM/F-12 oldatban kerültek felvételre és közel 100 százalékos konfluenciáig folytattuk a tenyésztést. A felhasználandó médiumot előmelegítettük 65 °C-ra, majd a sejtekre rámerve 30 vagy 60 másodpercig termosztátba helyeztük. A kezelt és a kontroll csoport mintáinak vizsgálatát összesen a lemez 6 lyukában ismételtük. A felülúszó és a sejtlizátumok gyűjtése az assay kezelés megkezdését követő 48 óra múlva történt. A kollagén mennyiségének meghatározása Sircol kollagén assay segítségével történt, a gyártó utasításainak megfelelően. Az elhasznált médium eltávolítását követően a sejtekhez 0,5M hideg ecetsav és 0,1 mg/ml pepszin elegyét adtuk hozzá. A kivonatokat Sirius vörös festékkel inkubáltuk, majd detektáltuk az abszorbanciát 555 nm-en, spektrofotométer segítségével.

2.1.5. Speciális számítások és statisztikai feldolgozás

Az adatok feldolgozását többszemponos varianciaanalízissel végeztük (ANOVA). Szignifikánsnak tekintettük, ha $p < 0.05$. A statisztikai számításokat SigmaStat software-rel végeztük el (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

2.2. Levator-urethra távolság (LUG) meghatározása transperinealis 3D ultrahanggal és a különböző típusú kismedencei prolapszusok összefüggésének vizsgálata

2.2.1. Betegcsoport

Retrospektív kohort vizsgálatunkban 98 női páciens vett részt. A beválogatási kritériumok alapján minden páciensnek kismedencei süllyedéses panaszai voltak. Kizárásra kerültek azon esetek, ahol a dokumentáció kitöltése nem megfelelően történt és ahol a rögzített ultrahang volumen adatok pontos feldolgozásra nem voltak alkalmasak. A vizsgálat etikai engedéllyel rendelkezett. Minden páciens esetében megtörtént a demográfiai alapadatok, a szülészeti és sebészeti előzmények felvétele, valamint a POPQ vizsgálat és a LUG mérése.

2.2.2. A kismedencei süllyedés mértékének megállapítása

A kismedencei süllyedés mértékének megállapítása a POPQ pontrendszer felvételével történt. Azon betegek kerültek a vizsgálatra bevonásra, ahol a süllyedéses panaszok mellett (pl.: kidudorodás vagy csomó érzése, ill. „valami mintha kicsúszna a hüvelyemből”) a POPQ vizsgálat szerint dokumentálhatóan II. vagy ennél nagyobb stádiumú anterior vagy posterior kompartmentet érintő prolapszus VAGY a hüvely teljes hosszának legalább felét meghaladó apikális süllyedés volt jelen. Az apikális prolapszus tekintetében figyelembe vettük a korábbi vizsgálatok során alkalmazott beválogatási mértéket is. Vizsgálatunk céljainak megfelelően a prolapszusokat a POPQ vizsgálat alapján enyhe (II. stádium) és súlyos (III. és IV. stádium) csoportokra osztottuk, valamint felosztást végeztünk aszerint is, hogy mely kompartmenteket érinti. Ezek alapján: 1-es típus: csak a mellső kompartmentet érintő prolapszus, 2-es típus: csak a hátsó kompartmentet érintő prolapszus, 3-as típus: a mellső és a hátsó kompartmentet érintő prolapszus, 4-es típus az apikális kompartmentet, vagy apikális kompartmentet is érintő prolapszus. A vizsgálat elsődleges célja a levator avulsio vizsgálata volt, melyet három kategóriába soroltunk: nincs sérülés, egyoldali avulzió, ill. kétoldali avulzió.

2.2.3. A LUG mérése 3D Transperineális Tomografikus Ultrahang vizsgálattal

A páciensek vizsgálata hátsó kőmetező helyzetben történt. A transzdúcet (hasi vagy hüvelyi vizsgálófej (GE Healthcare, Voluson E8, Ausztria) a hüvelybemenethez és a külső húgycsőnyíláshoz illesztve történt a leképezés, olyan módon, hogy a vizsgálófej hossz tengelye a páciens testének hossz tengelyéhez illeszkedett és a leképezés során nem gyakoroltunk nyomást a test illeszkedő területére. A volumen felvétele nyugalmi állapotban történt, mentésre került és feldolgozása később történt meg a 4D View software segítségével (Ver. 5.0 GE Medical Systems). A volumenek feldolgozása az irodalomban elfogadott módon történt. Azonosításra került az a mid-sagittális axiális sík, ahol a hiátus mérete a legkisebb és ezt a síkot használtuk a további mérések elvégzésére. Tomografikus képeket hoztunk létre ebben a síkban, valamint fölötté 2.5 ill. 5 mm-rel. A LUG mérése során a kalipert az urethra közepén helyeztük el, majd onnan mértünk a ramus pubis inferioron lévő izomtapadás legmediálisabb pontjáig. A mérést mindkét oldalon elvégeztük és rögzítettük. Bár az LUG mérésének eredeti Dietz általi leírása a mérést az izomkontrakció állapotában javasolta, az azóta megjelent közlemények szerint azonban a nyugalmi és a kontrakció során mért LUG nem különbözik egymástól.

2.2.4. Speciális számítások és statisztikai feldolgozás

A statisztikai számításokat minden lényeges változó esetén elvégeztük. A folyamatos változók eseteiben megtörtént az átlagok és a standard deviációk számítása. A kategorikus változók eseteiben frekvencia és százalékos arány kiszámítását végeztük el. Student-féle t-próbát használtunk két csoport közötti átlagértékek összehasonlítására. Multinominális logisztikus regressziós algoritmust (generalized logit model) használtunk a prolapszus stádiuma és típusa, valamint a levator sérülés összefüggésének vizsgálatára. A statisztikai számításokat az SAS software-rel végeztük (Ver. 9.4, SAS Institute Inc, Cary, NC, USA). A szignifikancia szintet $\alpha=0.05$ határoztuk meg.

3. EREDMÉNYEK

3.1. Hőhatás vizsgálata a hüvelyfali simaizomsejtek elasztin és kollagén termelésére

A hőhatás (65 °C, 30 vagy 60 másodpercig, 48 óránál mérve) nem okozott jelentős változást a hüvelyfali simaizom sejt proliferáció tekintetében (relatív sejtszám, átlag $\pm$ SD, 0.34 $\pm$ 0.01 vs. 0.34 $\pm$ 0.01 vs. 0.35 $\pm$ 0.01, P=NS).

Szignifikáns emelkedés volt mérhető a sejtfelszíni elasztin mennyiségét tekintve a hőhatás után 48 órával [átlag $\pm$ SD, 30 sec 155 $\pm$ 5% a kontrollhoz képest (p<0.01), illetve 60 sec 516 $\pm$ 40% a kontrollhoz képest (p<0.01)].

Ugyanakkor a 60 másodperces hőhatásnak kitett sejtek esetében a kontrollhoz képest szignifikánsan kevesebb tropoelasztin volt mérhető a tenyésztő médiumban 48 óra múlva a kontrollhoz képest. 30 másodperces hőhatás esetén nem tapasztaltunk szignifikáns változást [átlag $\pm$ SD, 30 sec 102 $\pm$ 5% a kontrollhoz képest (P=NS), illetve 60 sec 70 $\pm$ 2% a kontrollhoz képest (P=0.04)].

Szignifikáns emelkedés volt mérhető a sejtfelszíni kollagén termelést tekintve a hőhatás után 48 órával [átlag $\pm$ SD, 30 sec 170 $\pm$ 6% a kontrollhoz képest (P<0.01), illetve 60 sec 123 $\pm$ 6% a kontrollhoz képest (P<0.01)].

Hőhatást követően a sejttenyésztő médiumba szekretált kollagén szintjében nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést [átlag $\pm$ SD, 30 sec 120 $\pm$ 20% a kontrollhoz képest (P=NS), illetve 60 sec 100 $\pm$ 20% a kontrollhoz képest (P=NS)].

3.2. Levator-urethra távolság (LUG) meghatározása transperinealis 3D ultrahanggal és a különböző típusú kismencedei prolapszusok összefüggésének vizsgálata

A vizsgálatba 98 páciens került bevonásra, akiknek prolapszussal összefüggő panaszai voltak. Átlagos életkoruk 63 év volt ($\pm$ SD, $\pm$ 13), átlagosan három előzményi terhességet ($\pm$ SD, $\pm$ 1) és három előzményi szülést ($\pm$ SD, $\pm$ 1) regisztráltunk. Az átlagos BMI 30-nak adódott ($\pm$ SD, $\pm$ 7). A beválogatott páciensek átlagos POP stádiuma 2 volt és 40 esetben szerepelt az előzményben prolapszus ellenes műtét vagy hysterectomia. Mind a 98 páciens klinikai vizsgálata során felvételre kerültek a POP Q statusz koordináta pontjai.

Az prolapszusok átlagos stádiuma 2 volt. 56 páciens esetében a prolapszus csak egy hüvelyi kompartmentet érintett. 23 esetben találtunk két és 19 esetben három kompartmentet érintő süllyedést. A vizsgált mintában a leggyakrabban érintett kompartment az anterior volt. 34 nő esetében csak az anterior, míg 19 páciensnél csak a posterior kompartmentet érintette a süllyedés. 13 nőnél anterior és posterior prolapszus egyaránt jelen volt. A LUG szignifikánsan nagyobbak adódtak a több kompartmentet érintő prolapszusban szenvedő páciensekben, mint az egy kompartmentre korlátozódó prolapszus esetén ($28.9 \pm 4.1 \text{ mm}$ vs. $22.7 \pm 4.1 \text{ mm}$, $p < 0.01$). Hasonlóan, súlyosabb stádiumú (3-4. stádium) prolapszus esetén az LUG szintén szignifikánsan nagyobbak adódtak, mint enyhe fokú (II. stádium) esetben ($28.8 \pm 4.7 \text{ mm}$ vs. $23.3 \pm 4.5 \text{ mm}$, $p < 0.01$). A súlyos fokú prolapszusban szenvedő páciensek esetében 32x gyakrabban fordult elő kétoldali levator avulzió mint azoknál, akinél a prolapszus enyhe stádiumú volt.

Azon pácienseknél, akiknél a prolapszus két kompartmentet is érint 6.6x nagyobb eséllyel mutatható ki kétoldali károsodás, mint azoknál, akiknél a prolapszus csak egy kompartmentre korlátozódik. Azon betegeknél, ahol a prolapszus mindhárom vaginális kompartmentet érinti, 75.8x gyakrabban fordul elő levator avulzió, mint azoknál ahol a prolapszus csak egy területet érint.

Ahogy a Betegadatok és módszerek fejezetben kifejtésre került a vizsgálat céljainak megfelelően felosztást végeztünk aszerint, hogy a prolapszus mely kompartmenteket érinti. Ezek alapján: 1-es típus: csak a mellső kompartmentet érintő prolapszus, 2-es típus: csak a hátsó kompartmentet érintő prolapszus, 3-as típus: a mellső és a hátsó kompartmentet érintő prolapszus, 4-es típus az apikális kompartmentet, vagy apikális kompartmentet is érintő prolapszus.

Azt találtuk, hogy az apikális régiót is érintő (4-es típus) POP-ban 8x nagyobb eséllyel találunk unilaterális avulziót és 57x nagyobb eséllyel találunk bilaterális avulziót mint mint azon esetekben ahol a POP csak a posterior kompartmentet érinti (2-es típus).

4. MEGBESZÉLÉS

A stressz inkontinencia a leggyakoribb típusú vizelet inkontinencia, melynek oka a hasüreg átmeneti nyomásfokozódása és a kontinenciáért felelős struktúrák, úgymint a hólyagnyak, az urethra és más kismencedei struktúrák meggyengülése. A kontinens állapot megőrzéséhez elengedhetetlenül fontos a kollagén, az elasztikus kötőszövetek és az izomstruktúrák megléte és megfelelő működése, mely struktúrák az életkor előrehaladtával meggyengülnek. Az urethra kontinenciában betöltött szerepét erősíthetik a különböző energia közlésen alapuló, szöveti feszességet elősegítő terápiák. Vizsgálatunk során azt találtuk, hogy a hőhatás nem okoz simaizomsejt proliferációt, de pozitív hatással bír a kollagén és elasztin szintézisre.

Számos közlemény foglalkozik a non-ablatív, alacsony energiájú rádiófrekvenciás kezelésekkel, a stressz inkontinencia kezelési lehetőségeiként. Ezen kezelési modalitásokat az FDA a SUI kezelésére befogadta (Renessa/Lyrette, Novasys Medical Inc., Newark, CA). A proximális urethrára gyakorolt alacsony energiájú hőhatás a periurethrális tér kis régióiban kollagén denaturációt okoz, mely a szöveti compliance változásához vezet, funkciójavulást eredményezve. A kezelés során a periurethrális szövetek hőmérséklete 65 °C-ra emelkedik. Számos más olyan kezelési lehetőség került már leírásra, amelyek szintén a hüvelyfal szöveti remodellációját célozzák, úgymint az Er:YAG lézer, a CO₂ lézer, illetve más, rádiófrekvenciával működő kezelési megoldások. Ezek mindegyike végső soron termikus hatást vált ki mintegy 0.5 mm mélyen a hüvelyfalban.

Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a szövetet 65 °C-ra melegítő 30 ill. 60 másodpercig tartó hőhatás nem okoz proliferációt a hüvelyfali simaizom sejtekben. Az MTT assay-t 48 órával a hőhatás után végezve azt tapasztaltuk, hogy nem volt szignifikáns különbség a hőhatásnak kitett és a kontroll sejtek életképessége között. Eredményeink azt sugallják, hogy a hüvelyfali szövetek egy percre, vagy kevesebb ideig tartó, 65 °C-ra történő melegítésének nincs negatív hatása a sejtek életképességére. Ugyanakkor megjegyzendő, hogy a simaizomtól eltérő sejtek, mint pl. az idegsejtek, sokkal szenzitívebbek lehetnek a hőhatásra. Megvizsgáltuk a hőhatásnak kitett simaizomsejtek kollagén és elasztin szintézisét is. Mindkét sejt kultúrában vizsgálva a sejtfelszíni és a médiumban lévő elasztin és kollagén mennyiségét megállapítottuk, hogy a hő hatására az elasztin szintje mindkét esetben szignifikánsan emelkedik. Hatvan másodperccel a hőhatás után már mintegy ötszörös elasztin termelődést mértünk (sejtszámra normalizálva). Ezzel ellentétben a tropoelasztin esetén nem láttunk hasonló emelkedést a

médiumban a hőhatás után: a tropoelasztin produkció 30 százalékkal csökkent. Ez valószínűleg azzal a ténnyel magyarázható, hogy a simaizomsejtek elasztin termelése inkább sejtfelszíni elasztinban valósul meg. A kollagén termelés vizsgálata során a hőhatás után szignifikánsan magasabb értékeket találtunk a hüvelyfali simaizomsejt lizátumokban a kontrollhoz képest. Mind 30, mind 60 másodperces hőkezelés után szignifikánsan magasabb kollagén tartalmat mértünk. A hőhatás ugyanakkor nem befolyásolta a szekretált kollagén mértékét a kontrollhoz képest.

Ismereteink szerint munkacsoportunk elsőként vizsgálta a hőkezelés hatását a hüvelyfali simaizom sejtekre. Eredményeink alátámasztják a hipotézist, miszerint a hüvelyfal hőkezelése pozitív hatással bír a hüvelyfal szöveti remodellációjára, az elasztin és a kollagén termelés fokozása, így a kötőszövet strukturális változásán keresztül. A hőhatás leginkább a sejtfelszíni elasztin és kollagén termelésre van hatással, mely azt sugallja, hogy az újonnan képződő extracelluláris mátrix molekulák a hüvelyfali simaizomsejtek közvetlen környezetében maradnak.

Vizsgálatunk korlátai között említendő a kutatás in vitro természete és a kis mintaszám. A statikus környezet és az egyszerűsített laboratóriumi modell természetszerűen nem képes pontosan modellezni a hüvelyfal és urethra komplex in vivo környezetét. Emellett vizsgálatunkban a tropoelasztin mérése történt (az érett insolubilis elasztin indirekt meghatározásaként) és nem vizsgáltunk más degradációs folyamatokat a különböző mátrix metalloproteáz expressziók mérése által. Az érett elasztin és kollagén meghatározása az extracelluláris mátrixba szekretált tropoelasztin és tropokollagén vizsgálatokból retrospektíven történt. Ebben a sejt kultúrában az újonnan képződött tropoelasztin és tropokollagén gyűjtése a tápoldatból történt, ugyanakkor az érett formák a tenyésztőlemezen találhatóak. A hőmérséklet pontos beállítása és a két expozíciós idő kiválasztásánál a korábban az FDA által is elfogadott kezelési modalitást vettük figyelembe.

A hüvelyfali simaizomsejtekre gyakorolt hőkezelés vizsgálatát követően megállapíthatjuk, hogy a hőkezelés egyértelműen változást okoz a hüvelyfal és a periurethrális régió extracelluláris mátrixában, mely felelős lehet számos innovatív kezelési lehetőség hatásáért. A kezelés hosszú távú hatásai nem ismertek. További in vitro és in vivo vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy teljesen megértsük a hőhatásra alapozott újabb kezelési lehetőségek hatásmechanizmusát és lehetséges mellékhatásait.

A vizeletinkontinenciához hasonlóan a kismedencei süllyedéssel járó kórképek szintén gyakoriak és az életminőség jelentős romlását eredményezhetik az érintett páciensek körében. A sebészeti kezelést igénylő prolapszusok élettartam prevalenciája 11 % körüli, míg a prolapszus ellenes műtétek utáni kiújulás valószínűsége eléri a 30%-ot. A magas kiújulási ráta szükségessé teszi olyan új diagnosztikus eljárások bevezetését, amelyek növelhetik a műtétes korrekciók tartósságának esélyét.

Vizsgálatunk célja a levator-urethra távolság (Levator-urethra gap - LUG) meghatározása volt transperinealis 3D ultrahang segítségével különböző típusú kismedencei prolapszusokban, valamint a prolapszus és a levator avulzió esetleges összefüggéseinek feltárása. Azt találtuk, hogy súlyosabb prolapszus esetén nagyobb eséllyel mutatható ki kétoldali levator avulzió, mint enyhébb prolapszus esetén. Emellett bizonyítottuk, hogy azon betegeknél, ahol a prolapszus mindhárom vaginális kompartmentet érinti, szintén gyakrabban fordul elő kétoldali levator avulzió, mint azoknál ahol a prolapszus csak egy területet érint. Hasonlóan gyakrabban fordult elő kétoldali levator izom avulzió azon prolapszusoknál, amelyek az apikális kompartmentet érintik mint azoknál, ahol a prolapszus csak a hátsó kompartmentet érinti. Eredményeink arra engednek következtetni, hogy a súlyos, több kompartmentet érintő vagy az apikális kompartmentet érintő prolapszusban szenvedő nők körében a leggyakoribb a kétoldali levator avulzió. Klinikailag ezen prolapszusok megoldása gyakran a legnehezebb, ugyanakkor még adekvát terápia után is ezen prolapszusok kiújulása történik meg legnagyobb eséllyel. Ezen prolapszusok operatív megoldásai utáni ismételt kiújulásában –véleményünk szerint– nagy szerepe van annak, hogy a primer műtét előtt a levator avulzió nem kerül felismerésre és a primer műtét során annak korrekciója nem történik meg. A levator izomkomplexen táguló szélesebb nyílás miatt a műtéti területet ellenállás nélküli nyomás éri a hasüreg felől, mely komoly szerepet játszhat a rosszabb műtéti eredményekben. Hasonlóan a mi eredményeinkhez, más munkacsoportok arra a következtetésre jutottak, hogy azon nőknél, akiknél levator avulzió kimutatható kétszer nagyobb eséllyel diagnosztizálható 2. vagy magasabb stádiumú prolapszus mint azoknál, akiknél nincs avulzió. Az avulzió eredményeképpen megnő a cystokele és az uterovaginalis prolapszus esélye is. Az MR- vagy ultrahangvizsgálat során felismert pubovisceralis avulziók nem csak magasabb stádiumú prolapszussal hozhatóak összefüggésbe, de ezen esetekben gyakoribb a prolapszus kiújulása a prolapszus ellenes műtétek után is. A kismedencei süllyedés műtét utáni kiújulásának esélye akkor a legkisebb (mintegy 11%), ha a betegség és így a műtétes megoldás is csak a hátsó

kompartmentet érintette. Ugyanakkor a legnagyobb eséllyel (mintegy 52 %-ban) azon esetekben újul ki a kórkép a műtét után, ha a süllyedés levator avulzióval is társult. Ezzel egybecsengően vizsgálatunk során megállapítottuk, hogy az izolált hátsó kompartment süllyedésekkel jár együtt legkisebb eséllyel a levator avulzió. Valószínűsíthető, hogy a hátsó kompartment műtétei után észlelt alacsony kiújulási ráta részben a levator avulzió meglétének alacsony esélyével magyarázható.

Vizsgálatunk interpretációjánál számos korlátozó tényezővel néztünk szembe. A viszonylag kis mintaszám mellett megjegyzendő, hogy a fizikális vizsgálatot nyugalmi helyzetben végeztük, míg a POPQ státusz eredeti leírásában a koordináták felvétele maximális Valsalva maneuver mellett történt. Ugyanakkor Dietz és mtsai. mértékadó közleményükben bizonyították, hogy a nyugalmi helyzet nem befolyásolja a levator defektusok diagnosztizálásának esélyét, így a LUG mérése céljából történő volumen felvétele nyugalmi helyzetben is történhet. Fontos körülmény, hogy vizsgálatunkba csak olyan páciensek kerültek bevonásra, akik süllyedéses tüneteket panaszoltak és a kismedencei süllyedés a fizikális vizsgálat során is megerősítést nyert. Nem kerültek bevonásra tehát azok az esetek, akik bár tünetekkel bírtak, de a vizsgálat során a süllyedéses kórkép nem került igazolásra. Fentiek miatt fontosnak tartjuk, hogy nagyobb esetszámmal történő vizsgálatokkal kerüljenek igazolásra a POP és a LUG között feltárt összefüggések. Összefoglalásként megállapítottuk, hogy a nyugalmi helyzetben történt LUG mérésével igazolt kétoldali levator ani avulzió több kompartmentet érintő súlyosabb prolapszussal járhat együtt.

A medencefenék diszfunkciói, elsősorban a vizelet inkontinencia és a kismedencei süllyedéses kórképek magas prevalenciája a fejlett világ előregedő típusú társadalmaiban mindinkább nagyobb kihívást jelentenek úgy a pácienseknek, mind az ellátást végző orvosoknak és az egészségügyi ellátó rendszereknek egyaránt. A tartósan magas egészséggel összefüggő életminőség iránti igény a fentiek tükrében újabb kutatásokra, újabb diagnosztikus és terápiás technikák bevezetésére sarkallja a területen dolgozó kutatókat. Jelen munka ezen kihívások területén kívánja elősegíteni az orvostudomány fejlődését.

5. AZ ÉRTEKEZÉS ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEI

Ismereteink szerint munkacsoportunk elsőként vizsgálta a hőkezelés hatását a hüvelyfali simaizom sejtekre.

1. Vizsgálataink során azt találtuk, hogy a szövetet 65 °C-ra melegítő 30 ill. 60 másodpercig tartó hőhatás nem okoz proliferációt a hüvelyfali simaizom sejtekben.
2. Eredményeink azt sugallják, hogy a hüvelyfali szövetek egy percig, vagy kevesebb ideig tartó, 65 °C-ra történő melegítésének nincs negatív hatása a sejtek életképességére.
3. A sejtfelszíni és a médiumban lévő elasztin és kollagén mennyiségét vizsgálva megállapítottuk, hogy a hő hatására az elasztin szintje mindkét esetben szignifikánsan emelkedik.
4. A kollagén termelés vizsgálata során a hőhatás után szignifikánsan magasabb értékeket találtunk a hüvelyfali simaizomsejt lizátumokban a kontrollhoz képest.

Eredményeink alátámasztják a hipotézist, miszerint a hüvelyfal hőkezelése pozitív hatással bír a hüvelyfal szöveti remodelációjára, az elasztin és a kollagén termelés fokozása, így a kötőszövet strukturális változásán keresztül.

Különböző típusú kismedencei prolapszusokban vizsgálva a levator-uretra távolságot

5. Azt találtuk, hogy súlyosabb prolapszus esetén nagyobb eséllyel mutatható ki kétoldali levator avulzió, mint enyhébb prolapszus esetén.
6. Emellett bizonyítottuk, hogy azon betegeknél, ahol a prolapszus mindhárom vaginális kompartmentet érinti, szintén gyakrabban fordul elő kétoldali levator avulzió, mint azoknál ahol a prolapszus csak egy területet érint.
7. Hasonlóan gyakrabban fordult elő kétoldali levator izom avulzió azon prolapszusoknál, amelyek az apikális kompartmentet érintik mint azoknál, ahol a prolapszus csak a hátsó kompartmentet érinti.

Összefoglalásként megállapítottuk, hogy a nyugalmi helyzetben történt LUG mérésével igazolt kétoldali levator ani avulzió több kompartmentet érintő súlyosabb prolapszussal járhat együtt.

6. A JELÖLTNEK AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁBAN SZÜLETETT PUBLIKÁCIÓINAK A KENÉZY
KÖNYVTÁR ÁLTAL HITELESÍTETT LISTÁJA



DEBRECENI
EGYETEM

DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR

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

Nyilvántartási szám: DEENK/342/2018.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kozma Bence
Neptun kód: ZCPGUU
Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kozma, B.**, Larson, K., Scott, L., Cunningham, T. D., Abuhamad, A., Póka, R., Takács, P.:
Association between pelvic organ prolapse types and levator-urethra gap as measured by 3D
transperineal ultrasound.
J. Ultrasound Med. [Epub ahead of print], 1-6, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jum.14644>
IF: 1.53 (2017)
2. **Kozma, B.**, Candiotti, K., Póka, R., Takács, P.: The Effects of Heat Exposure on Vaginal Smooth
Muscle Cells: elastin and Collagen Production.
Gynecol.Obstet.Invest. 83 (3), 247-251, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000486785>
IF: 1.183 (2017)





További közlemények

3. **Kozma, B.**, Majoros, A., Pytel, Á., Póka, R., Takács, P.: A percutan nervus tibialis stimuláció szerepe egyes kismedencei kórképek kezelésében.
Orv. hetil. 159 (43), 1735-1740, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/650.2018.31228>
IF: 0.322 (2017)
4. Ujhelyi, Z., Kalantari, A., Vecsernyés, M., Róka, E., Fenyvesi, F., Póka, R., **Kozma, B.**, Bácskay, I.: The Enhanced Inhibitory Effect of Different Antitumor Agents in Self-Microemulsifying Drug Delivery Systems on Human Cervical Cancer HeLa Cells.
Molecules. 20 (7), 13226-13239, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules200713226>
IF: 2.465
5. Aranyosi, J., Deli, T., Bettembuk, P., **Kozma, B.**, Kovács, T., Török, O., Tóth, Z.: Fetal aortic-cerebral Doppler resistance index ratio: an indicator of physiologic blood flow distribution.
J. Ultrasound Obstet. Gynecol. 3 (3), 91-95, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.5005/jp-journals-10009-1025>

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 5,5

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
2,713**

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

Debrecen, 2018.10.31.

