

A celluláris immunválasz és egyéb funkcionális  
fehérjék vizsgálata gesztációs trofoblaszt  
betegségekben

Doktori tézisek

**Dr. Nagymányoki Zoltán**

Semmelweis Egyetem  
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Fülöp Vilmos Ph.D., egyetemi magán tanár, az MTA doktora

Hivatalos bírálók:

Dr. Tóth Péter egyetemi docens, Ph.D.  
Dr. Póka Róbert egyetemi docens, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Búzás Edit egyetemi docens, Ph.D.  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Füst György egyetemi tanár, Ph.D.  
Dr. Uher Ferenc, Ph.D.

Boston  
2008

## ***Bevezetés***

A gesztációs trofoblaszt betegségek az esetek többségében multispermiás fogamzás eredményeképpen jönnek létre. A rendkívül heterogén főként apai genetikai tartalommal rendelkező mola terhesség a placenta és azon belül is a trofoblaszt sejtek proliferációjával jellemezhető. A mola terhességeken belül a teljes mola, mely csak allogén apai kromoszómákat tartalmaz, jelentős invazív tulajdonsággal rendelkezik, és az esetek egy ötödében a méh kiürítését követően is perzisztál. A perzisztáló esetek szakszerű kemoterápia nélkül a beteg életét veszélyeztetik. Az utánkövetés és egy esetleges kemoterápia a beteg számára jelentős megterhelést jelent mind a mellékhatások, mind szociális, pszichés és anyagi tekintetben. A klinikusok és a betegek részéről éppen ezért jelentős igény van egy a jelenleginél kevesebb mellékhatással járó terápiára, mely a méh kiürítésével egyidejűleg alkalmazva megelőzné a perzisztáló esetek kialakulását. Amennyiben egy kemoterápiához hasonló hatékonyságú alternatív terápia kifejlesztése nem járna sikerrel, abban az esetben is szükség volna egy megbízható biológiai vagy szövettani markerre, mely kellő biztonsággal képes előre jelezni a perzisztáló eseteket. Ez a marker, amennyiben kellő specificitással és szenzitivitással rendelkezne, idővel biztosan felváltaná a jelenlegi hCG utánkövetés gyakorlatát.

Jelenlegi elképzelésünk szerint az anya oldaláról 3 mechanizmus szabályozza a terhességi szövet invázióját és annak fennmaradását az endometriumban, illetve a méh üregében: az anyai immunválasz, a decidua sejtek fehérje profilja és az endometrium vérellátása. A terhességben az anyai immunválasz jelentős átalakuláson megy keresztül, melynek egészséges

terhességekben kiemelt szerepe van a félig apai eredetű magzat befogadásában. A terhesség során a sejtes immunválasz erőssége csökken ugyanakkor a fokozott humorális immunválasz igyekszik fenntartani az anya homeosztázisát. A terhességi immunszuppresszió elsődleges forrása a trofoblaszt szövet, mely hCG elválasztásával fenntartja a corpus luteumot serkentve ezáltal a progeszteron termelést. A progeszteron a Progeszteron Indukálta Blokkoló Faktoron keresztül (PIBF) alakítja ki a Th2-es citokinek túlsúlyát és a sejtes immunszuppressziót. A trofoblaszt sejtek ezen túlmenően számos más immunmechanizmuson keresztül is igyekeznek a T sejtes immunválaszt lecsillapítani, illetve azt elkerülni. Trofoblaszt sejtek módosult sejt felszíni molekulái mellett (HLA-G, HLA-E) számos immunszuppresszív hatású anyagot választanak el, melyek a T sejtek aktivációját gátolják, ugyanakkor lehetővé teszik az uterinális NK sejtek átalakulását regulátor típusú NK (NKr1, NK1, NK3) sejtekké. Gestációs trofoblaszt betegségek esetén nem tisztázott azonban még az sem, hogy az idegen apai antigéneket erőteljesebben kifejező trofoblaszt sejtek fennmaradásáért a mola szövet proliferációs potenciálja vagy a trofoblaszt sejtek által kiváltott fokozott immunszuppresszió a felelős. Azt korábbi vizsgálatokban már leírták, hogy trofoblaszt betegségek esetében a placenta ágyban a T sejtek száma megnövekszik, ugyanakkor az NK sejtek száma csökken. Az immunsejtek fenotípusa (aktivált-inaktivált) illetve a T sejtek T sejt receptor profilja ezidáig nem volt ismert.

A második mechanizmus, mely befolyásolja a trofoblaszt sejtek invázióját, a deciduális sejtek fehérje profilja, mely jelenleg is reprodukív biológiai kutatások középpontjában áll. A deciduális sejtek az extracelluláris mátrixot befolyásoló fehérjék, valamint sejtadhéziós molekulák kifejezésével szabályozzák a trofoblaszt inváziót. Mola terhességben microarray

vizsgálatok kimutatták, hogy egészséges placentához képest a laminin receptor 1 nevű molekula kifejeződése jelentősen fokozott, de megerősítése RT-PCR vizsgálatokban, illetve annak szövettani jellemzése mindezidáig még nem történt meg.

A harmadik mechanizmus, mely feltételezetően hatással lehet a trofoblaszt proliferációra és a perzisztáló trofoblaszt tumorok kialakulására, az az angiogenezis. Gestációs trofoblaszt betegségek esetén a növekvő trofoblaszt tömegnek a normál terhességhez és egyéb szolid tumorokhoz hasonlóan folyamatosan növekvő vérellátásra van szüksége a további proliferációhoz. Tekintve, hogy sok más premalignus elváltozásban is a tumorban, illetve annak környezetében található érsűrűség mértéke képes volt előre jelezni a rosszindulatú elfajulás esélyét, felmerül a kérdés, hogy a trofoblaszt szövet esetében a placenta ágyban található érsűrűség vajon prediktív-e egy esetleges perzisztáló trofoblaszt tumor kialakulásának tekintetében.

### ***Célkitűzések***

Munkám középpontjában a placenta ágy vizsgálata állt. Igyekeztem mind a három fent említett területet széleskörűen vizsgálni, hogy jobban megértsem a trofoblaszt inváziót szabályozó mechanizmusokat. A celluláris immunválasz vizsgálatával próbáltam választ adni arra a kérdésre, hogy a fokozott allogenitású trofoblaszt szövet anyagában való fennmaradásának hátterében vajon a sejtes immunválasz elégtelensége, (kórosan fokozott terhességi immunszuppresszió) vagy esetleg a trofoblaszt proliferáció játssza az elsődleges szerepet. Igyekeztem továbbá a normál és mola terhességek

placenta ágyában található T sejtek aktivációjának specificitását, és ezáltal az aktiváló antigének repertoárját meghatározni.

Célom volt továbbá, hogy a jelenlegi hCG követésnél alkalmasabb markert találjak a perzisztáló esetek előrejelzésére. Az angiogenezis vizsgálatokkal egyrészt egy hisztológiai marker (érsűrűség) után kutattam, másrészt pedig egy már jelenleg is forgalomban lévő anti-VEGF terápia (Avastin) esetleges alkalmazásának elméleti alapjait igyekeztem felderíteni gesztációs trofoblaszt betegségekben.

## ***Módszerek***

Hisztológiai metszeteken immunfluoreszcens módszerrel vizsgáltam a placenta ágyban jelen lévő immunsejtek számát és funkcióját. Meghatároztam a regulátor és effektor citotoxikus T sejtek valamint a Granzyme B-t termelő citotoxikus NK sejtek számát egészséges és mola terhesség placenta ágyában. Ezen túl vizsgáltam az immunsejtek eloszlását intraplacentáris és posztmoláris choriocarcinoma környezetében. Friss fagyasztott normál placenta és mola szövetekből meghatároztam a placenta ágyban jelen lévő T sejtek T sejt receptor variábilis béta lánc profilját.

Úgyszintén parafin blokkból készített szövettani metszeteken és friss fagyasztott szövetekben RT-PCR módszerrel vizsgáltam a laminin receptor 1 kifejeződésének mértékét és lokalizációját.

Egészséges és mola terhesség placenta ágyában immunfluoreszcens módszerrel és automatizált szövettani analízissel meghatároztam az érképződés mértékét (érsűrűség) valamint az ezzel összefüggésben álló

angiogenetikus faktorok (VEGF, Angiopoietin 1 és 2) kifejeződését valamint regressziós analízist végeztem a vizsgált értékekkel és egyéb klinikai adatokkal (poszt-evakuációs hCG, életkor, áttétek száma, szükséges kemoterápia fajtája, stb.).

## ***Eredmények***

A mola szövet antigenitásának és agresszivitásának növekedésével párhuzamosan növekedett az immunsejtek által infiltrált területek nagysága a különböző terhességi szövetek placenta ágyában. Mind az effektor, mind a Granzyme B-t termelő NK sejtek száma szignifikánsan emelkedett volt teljes mola terhesség placenta ágyában ( $p < 0,05$ ). A placenta ágyban jelenlévő CD8 pozitív sejtek 92-96%-ban termeltek Granzyme B-t, vagyis a citotoxikus T sejtek többsége effektor T sejt volt mind normál, mind részleges és teljes mola terhességben valamint a choriocarcinóma környezetében is. Mola terhességben a fokozott T sejt aktiváció eredményeképpen megjelentek a szövetben a regulátor T sejtek, és számuk a placenta ágyban található citotoxikus T sejtekkel korrelált ( $p = 0,032$ ). A regulátor T sejt szám azonban nem állt összefüggésben az úgynevezett effektor hányadossal (GrB+/CD8+ effektor sejtek/összes CD8+ sejt). Meglepő módon nem találtunk regulátor T sejteket az egészséges placenta ágyában.

Az intraplacentáris choriocarcinóma közvetlen környezetében nem találtunk immunsejt infiltrációt, és a placenta ágyba pedig a normál terhességre jellemző immunsejt profil volt látható. Ezzel ellentétben posztmoláris choriocarcinómában a tumor szövet körül igen erős citotoxikus és regulátor T sejt beszűrődést észleltünk, azonban a metszetek többségében

az immunsejtek nem infiltrálták a tumort, hanem éles „infiltrációs határt” alkottak a tumor szélén.

A placenta ágy T sejtjeinek T sejt receptor analízise normál terhességben a 2-es és 4-es variábilis béta láncok dominanciáját mutatta. Teljes mola terhességből származó T sejteken a 4-es variábilis béta lánc szignifikánsan magasabb kifejeződését észleltük. Az aktiválódási profilok teljes mola esetében igen homogének voltak, nem mutattak jelentős variabilitást.

Mind normál mind mola terhesség decíduális sejtjei kifejezik a laminin receptor 1 nevű molekulát. Részleges mola terhességek placenta ágyában a decíduális sejtek azonban jelentősen fokozott mértékben expresszálják a laminin receptor 1-t, melynek szerepe lehet a megnövekedett trofoblaszt invázióban.

Perzisztáló részleges és teljes molák esetében magasabb érsűrűséget találtunk, mint normál terhességek placenta ágyában. Regressziós analízisben az MVD erősen korrelált a poszt-evakuációs hCG értékekkel, azonban az érsűrűség a mola terhességekben általában nem mutatott összefüggést a perzisztáló esetekkel. Teljes mola esetében azonban a perzisztáló csoportban a nem perzisztáló molákhoz képest az érsűrűség magasabb volt, habár a különbség nem ért el kellő szignifikancia szintet feltehetően az alacsony esetszám miatt ( $p=0,118$ ). A trofoblaszt sejtek VEGF termelése nem mutatott jelentős eltérést a különböző diagnosztikai csoportok között. Az angiopoietin 1 nem fejeződött ki a terhességi szöveteken, az angiopoietin 2 pedig amellet, hogy mola terhességeken általában alacsonyabb expressziót mutatott, a festődési intenzitása boholyról boholyra változott.

## ***Következtetések***

1. Gesztációs trofoblaszt betegségekben a szövet allogénitásával és agresszivitással párhuzamosan a T sejt immunválasz egyre jelentősebb szerepet játszik a szövet elleni reakcióban. Ezzel párhuzamosan az NK sejtek száma csökken ugyan, de a szövetben megtalálható NK sejtek egyre inkább citotoxikus típusú, Granzyme B-t termelő sejtekké alakulnak. A regulátor T sejtek, melyek normál terhességben nem találhatók meg a placenta ágyban, gesztációs trofoblaszt betegségek esetében a T sejt immunválasz erősödésével egyidejűleg megjelennek a szövetben és számuk a citotoxikus T sejt számmal együtt növekszik.
2. A placenta ágyban jelen lévő T sejtek variábilis béta lánc használata arra utal, hogy egészséges és főleg mola terhességben a T sejtek specifikusan aktiválódnak egy vagy néhány antigén ellen, melyeknek felismerése a 4-es vagy a 2-es variábilis béta lánc kifejezését igényli a T sejt receptorokban. Mivel a variábilis béta lánc profilok nem mutattak jelentős variációt az esetek között, ezért arra következtethetünk, hogy az aktiváló antigén feltehetően egy konzervatív placentáris antigén,
3. Az intraplacentáris choriocarcinómát az anyai immunrendszer nem ismeri fel, így nem észlelhető fokozott tumorelles immunsejt infiltráció sem a tumor környezetében, sem a placenta ágyban. Ezzel szemben a posztmoláris choriocarcinoma valószínűleg a fokozott antigénitásának köszönhetően erőteljes immunsejt infiltrációt vált ki az anyai oldalról. Az immunsejtek a jelentős aktiváció ellenére sem képesek a tumorba infiltrálni. Éles immunsejt infiltrációs határ látható a tumor szélén, melynek oka egyelőre nem tisztázott, de arra utal, hogy a trofoblaszt sejt-



sejt interakció elkerülésének nagyobb jelentősége van a trofoblaszt túlélése szempontjából, mint az elválasztott immunszuppresszív faktoroknak.

4. A decidua sejtek kifejezik a laminin receptor 1 molekulát, melynek szerepe lehet a trophoblast sejtek beágyazódásában. A laminin receptor 1 molekulának kiemelt jelentősége sejtmigráció szabályozásában, melyet az extracelluláris mátrixban található laminin konformációjának megváltoztatásával ér el. Mola terhességekben (különösen részleges molákban) a decidua sejtek fokozott mértékben fejezik ki a laminin receptor 1 molekulát, melynek szerepe lehet a trofoblaszt betegségeken észlelt nagyobb mértékű invázióval. Az immortalizált humán endometriális stróma sejtek hormonkezelése (ösztrogén (E), progeszteron (P), E+P és hCG) nem befolyásolta a sejtek laminin receptor 1 termelését, így a fenti jelenség oka továbbra is ismeretlen marad.
  
5. A perzisztáló részleges és teljes molák placenta ágyában az érsűrűség magasabb, mint egészséges placentában. A megemelkedett érsűrűség és a festődési mintázat aktívabb angiogenezisre utal mola terhességek esetében. Teljes mola esetén a placenta ágyban mért érsűrűség megnövekedett értéke a szövet perzisztálását tekintve az alacsony esetszám ellenére is közel prediktív volt. Regressziós analízisben a poszt-evakuációs hCG értékek erősen korreláltak a placenta ágyban talált érsűrűséggel, ami arra utal, hogy a terhesség alatt a hCG angiogenetikus képességénél fogva feltehetően hozzájárul a placenta ágy vérellátásának bővüléséhez. A trofoblaszt sejtek elválasztják mind a VEGF, mind az angiopietin 2 molekulát. Az angiopietin 2 molekula kifejeződése pedig mola terhesség trofoblaszt sejteiben boholyról boholyra változott.

### Saját közlemények jegyzéke

A dolgozat alapjául szolgáló közlemények:

1. Fülöp V, Végh G, Bátorfi J, Nagymányoki Z, Berkowitz RS, Dancsó J. (2006) A terhességi trofoblaszt daganatok molekuláris biológiája. Magyar Nőorvosok Lapja, 69(4):297-306.
2. Nagymányoki Z, Callahan MJ, Parast MM, Berkowitz RS, Mok SC, Fulop V. (2008) Overexpression of laminin receptor 1 on decidual cells in partial and complete mole. Gynecol Oncol, 108(1):121-5.
3. Nagymányoki Z, Callahan MJ, Parast MM, Fulop V, Mok SC, Berkowitz RS. (2007) Immune cell profiling in normal pregnancy, partial and complete molar pregnancy. Gynecol Oncol, 107(2):292-7.
4. Nagymányoki Z, Callahan MJ, Parast MM, Fulop V, Mok SC, Berkowitz RS. (2008) Immune cell profiling in intraplacental and postmolar choriocarcinomas. J Reprod Med, (accepted in 2008)
5. Nagymányoki Z, Growdon W, Sarno J, Callahan MJ, Parast MM, Fulop V, Horowitz N, Mok SC, Berkowitz RS. (2008) Vascularization and expression of angiogenic factors in partial and complete molar pregnancies. J Reprod Med, (accepted in 2008)
6. Nagymányoki Z, Callahan MJ, Parast MM, Fulop V, Mok SC, Berkowitz RS. (2008) Antigen specific T cell immune response detected by skewed T cell receptor usage in normal placenta and complete molar pregnancy. Gynecol Oncol, (accepted in 2008)

Egyéb közlemények:

7. Padányi Á, Kotlán B, Fülöp V, Bátorfi J, Réti M, Gyódi É, Rajczy K, Nagymányoki Z, Doszpod J, Petrányi Gy. (2004) Rekurrens spontán vetélők immunterápiájával elért eredményeink. *Transzfúzió* 37:71-78
8. Fülöp V, Kotlán B., Padányi Á, Bátorfi J, Nagymányoki Z, Vályi-Nagy I, Dancsó J, Petrányi Gy. (2006) Az immunpatológiai háttérű visszatérő spontán vetélések és sikertelen IVF beültetések korszerű diagnosztikája és kezelési lehetőségei. *Magyar Nőorvosok Lapja* 69(4):95-113
9. Szigetvári I, Szepesi J, Végh Gy, Bátorfi J, Nagymányoki Z, Arató G, Gáti I, Fülöp V. (2006) Negyedszázados tapasztalat a hazai terhességi trofoblaszttbetegségek ellátásában. *Magyar Nőorvosok Lapja* 69(6):543-554.
10. Callahan M, Nagymányoki Z, Bonome T, Johnson EJ, Lithkouhi B, Sullivan EH, Hirsh MS, Matulonis UA, Liu J, Birrer M, Berkowitz RS, Mok S. Increased HLA-DMB expression in the tumor epithelium is associated with increased cytotoxic lymphocyte infiltration and improved prognosis in advanced serous ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, (submitted)