

Szakmai beszámoló

„Az onkogének és funkcionális fehérjék korszerű módszerekkel történő tanulmányozása trofoblaszt betegségekben” című kutatásról

A kutatási program az elmúlt évek alatt két fő irányba haladt. Az első kutatási irány egy klinikai kutatás részeként igyekezett felmérni a visszatérő vetélő anyákban kialakuló immunválasz típusát és a trofoblaszt antigénekre adott immunreakciót. Ebből a célból vérmintákat gyűjtöttünk és igyekeztük a regulátor T sejtek előfordulási arányát megvizsgálni intravénás immunglobulinnal (IVIG) és trombocita transfúzióval kezelt visszatérő vetélőknél. Ez a kutatás természeténél fogva hosszabb időt igényel, így a vizsgálatok még nem zárultak le, de az előeredmények biztatóak.

A kutatás második és jelentősebb iránya volt a mola terhességek placenta ágyának molekuláris biológiai vizsgálata. A vizsgálatok itt is további két irányba terjedtek ki. Egyrészt vizsgáltuk a trofoblaszt betegségek placentaágyában jelenlévő immunsejtek számát és azok aktivitását, valamint meghatároztuk az immunsejtek T sejt receptorainak specificitását. A másik fő csapásirány az anyai oldal reakcióját vizsgálta a kóros terhességi szövet jelenlétére. Vizsgáltuk az extracelluláris matrix fehérjéinek kifejeződését a decidua sejtekben, valamint az angiogenezist a placentaágy területén. Minden esetben normális, azonos terhességi hétből származó placenta szövetet használtunk kontrollként.

A kutatás módszereit és eredményeit az alábbiakban részletesen ismertetjük:

A Brigham and Women's Hospital Onkológiai Laboratóriummal való együttműködés keretében a különböző típusú molaterhességek tanulmányozását végeztük el az antigenitás szempontjából. Vizsgáltuk a terhességi antigénekre adott immunválasz morfológiai és funkcionális jellemzőit. A vizsgálataink során paraffin fixált metszeteken összehasonlítottuk egészséges terhességből származó placenta, komplett és részeges mola, valamint choriocarcinoma antigénjeire adott immunválaszt. CD8, GrB, FoxP3 és CD66 antitestekkel végzett immunfestés eredményeképpen azt találtuk, hogy a normális első trimeszterből származó placenták immunvédelmében a regulátor T sejtek lokálisan nem játszanak kiemelt szerepet (nem található FoxP3 pozitív limfocita a beágyazódás területén). Megállapítottuk továbbá, hogy a T limfocita és a natural killer sejtek számának növekedése tapasztalható a beágyazódás területén a következő sorrendben: egészséges placenta, részleges mola, teljes mola és choriocarcinoma. A choriocarcinoma esetében további megfigyelés, hogy kifejezetten erős immunválaszt indukálnak (több ezres T sejt szám a tumor közvetlen környezetében), azonban az immunsejtek nem képesek a tumorszövetbe behatolni. Ez teljesen eltérő tulajdonság a munkálatokkal párhuzamosan tanulmányozott ovárium tumorokhoz képest, ahol amennyiben a T sejt aktiváció bekövetkezett, akkor azok a tumorszövet mélyébe hatoltak és ott aktivan sejt-sejt közvetített killing mechanizmussal öltek (Granzyme B pozitivitás). Ennek a jelenségnek a vizsgálata a

terhességi immunológiát új megközelítésbe helyezheti, minthogy nem feltétlenül az elválasztott immunszuppresszív anyagok játszanak elsődleges szerepet a trofoblaszt sejtek védelmében, hanem a trofoblaszt sejtek sejtfelszíni antigénjeinek hiánya, ami a coriocarcinómában látottakhoz hasonlóan egy erős immunválasz esetén is képes megakadályozni az immunsejt-trofoblaszt sejt interakciót. Az immunfestések során kiderült még, hogy a jelen lévő T sejtek aktivációs állapota (aktív GrB⁺ T sejtek aránya) nem függ a szövetben található T sejt számtól, a regulátor T sejtek számától, és a tumor genetikai tartalmától. Ez általában 80-85 % körül mozog.

A második vizsgálatsorozatunkban a T sejtek működését és klonalitását igyekeztünk tanulmányozni a T sejt receptor béta láncának vizsgálatán keresztül. Friss fagyasztott mola és egészséges placenta variábilis β lánc elemzését végeztük el RT-PCR módszerrel. Ismert tény, hogy amennyiben egy vagy két domináns lánc fejeződik ki a szövetben, az mono- vagy oligoklonális aktivációra utal. Szemben a poliklonális aktivációval, ahol mind a 25 variábilis beta lánc hasonló százalékban fejeződik ki. Ezt a hematológiában jól ismert módszert alkalmaztuk placenta, mola és nyirokcsomó szövetek összehasonlításához. Nyirokcsomó cDNS-ével ellentétben az egészséges és a mola terhességekben is két specifikus beta láncot érintő aktivációs profilt találtunk. A mola és normal terhesség között azonban nem találtunk szignifikáns különbséget. Az aktiváció tehát úgy tűnik, hogy mindkét esetben oligoklonális. A kettes és négyes T sejt receptor béta lánc jelentősen magasabb arányban fejeződik ki a terhességből és molából származó szövetekben, mint a poliklonális nyirokcsomóban, ahol ezek kifejeződése egyenletesebb, bár közel sem egyenlő. A molában és a terhességben talált hasonló profil arra enged következtetni, hogy az antigén hasonló, idegen -minden esetben azonos- apai antigén, aminek kifejeződése nyilván erőteljesebb a molák esetében. Ezt mutatják a nagyobb számban található T sejtek a mola beágyazódási helyén. Ez a kísérlet továbbá megerősíti azt a már korábban is kimutatott tényt, hogy a trofoblaszt antigének egyenlőre ismeretlen mechanizmuson keresztül ugyan, de feldolgozásra és bemutatásra kerülnek és T sejt rendszert aktiválják.

A placentaágy molekuláris biológiájának vizsgálata során egy már leközölt cikkből válogattuk ki a microarray módszerrel azonosított, molában erőteljesebben kifejezett géneket. Kiterjedt irodalomkutatás után megerősítő immunfestéseket és RT-PCR vizsgálatokat végeztünk két antigénnel. A közel 56 upregulált gén közül az extracelluláris mátrixot befolyásoló génekre koncentráltunk elsősorban, mivel úgy gondoltuk annak lehet hatása az immunsejtek, valamint a trofoblaszt sejtek invazivitására. Az upregulált gének között 2 olyat találtunk, amelyek összefüggésben állnak az extracelluláris mátrix-szal; a CEACAM-6 és a Laminin Receptor 1 (LR1). Ezen antitestekkel végzett immunfestés és a RT-PCR vizsgálatok során azt a meglepő tényt találtuk, hogy a Laminin Receptor 1 kifejeződése jelentősen erősebb a mola terhesség decíduális sejtjeiben. Az ok, hogy a fehérje miért fejeződik ki erősebben a mola terhesség decíduális (anyai módosult endometriális stroma) sejtjein egyenlőre ismeretlen, de jelentősége lehet a beágyazódás szabályozásában és a kóros és egészséges trofoblaszt sejtek inváziójában, valamint a T sejt surveillance hatékonyságának módosításában.

És végezetül vizsgáltuk az anyai endometrium angigenezisét. CD31 immunfestéssel jelöltük a placenta ágyban elhelyezkedő kapillárisok endothel sejtjeit és morfológiai azonosítással

egybekötve megszámloltuk a kapilláris keresztmetszeteket 5 nagy nagyítású látótérben. A kapott kapilláris keresztmetszet sűrűséget, továbbiakban érsűrűség (microvessel density-MVD), további klinikai adatokkal vetettük össze. Többek között anyai életkort, terhességi hetet, mola terhesség típusát, perzisztálást, kemoterápia érzékenységet, előző molaterhességet, a diagnosiskor és mola kiürítéskor mért HCG szintet, stb. vizsgáltuk. Az elemzés azt mutattatta, hogy a komplett mola szignifikánsan magasabb MVD számmal jár együtt, mint a részleges mola vagy az egészséges placenta. Továbbá megállapítást nyert, hogy az érsűrűség perszisztáló esetekben magasabb volt a nem perzisztáló esetekhez viszonyítva. A kezelés utáni HCG szint úgyszintén erős korrelációt mutatott az érkeresztmetszetek számával, ami arra utal hogy a HCG angiogenetikus tulajdonságainál fogva jelentősen hozzájárul az anyai érhalózat bővüléséhez a placentaágy területén.

A kutatási program eredményeit 5 rangos nemzetközi és számos hazai újságban publikáltuk (ld. publikációs lista). Emellett bemutatásra került 2007 márciusában San Diego-ban az Amerikai Nőgyógyász Onkológusok Társaságának éves konferenciáján (SGO meeting). Ezt követően eredményeinket egy 20 perces előadás és 4 poszter formájában mutattuk be a világ minden tájáról érkező szakértőknek a trofoblaszt betegségek világkonferenciáján (ISSTD World Congress) 2007 novemberében Japánban.

Összefoglalva tehát a következő tudományos következtetéseket vonhatjuk le a program során elvégzett vizsgálatokból:

1. Gesztációs trofoblaszt betegségekben a szövet allogenisásával 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 sejtszámmal 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

antigenitásának köszönhetően erőteljes immunsejt infiltrációt vált ki az anyai oldalról. Az immunsejtek a jelentős aktiváció ellenére sem képesek a tumorba infiltrálódni. 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 van a sejt migráció 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 betegségeiben észlelt nagyobb mértékű invázióban. 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 az 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 angiopoietin 2 molekulát. Az angiopoietin 2 molekula kifejeződése pedig mola terhesség trofoblaszt sejteiben boholyról boholyra változott.

Hisszük azt, hogy az immunológia vizsgálataink eredményei közelebb visznek bennünket a placentáris antigének megismeréséhez, valamint annak esetleges befolyásolásán keresztül egy alternatív immunterápia kidolgozásához a perzisztáló terhességi trofoblaszt betegségek kezelésére. Az itt tanult ismeretek reményeink szerint általánosíthatóak és felhasználhatóak lesznek pl. a visszatérő vetélők immunterápiájának kidolgozásához is. Bízunk abban, hogy az érsűrűség meghatározás úgyszintén klinikai szerepet játszik majd a perzisztáló trofoblaszt betegségek mielőbbi felismerésében és megelőzésében. A vizsgálatok általánosításához és alkalmazhatóságának felméréséhez azonban további megerősítő és funkcionális vizsgálatok szükségesek, melyekre már kidolgozott tervek állnak rendelkezésünkre.