

Szegedi Tudományegyetem
Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

**Biokémiai és genetikai vizsgálatok a diagnosztikában és betegek
követésében gyermekgyógyászati kórképekben**

PhD tézis

Dr. Ökrös Zsuzsanna



Témavezetők:

Dr. Endreffy Emőke PharmD. Ph.D.

Prof. Dr. Novák Zoltán MD, med. habil.

Szeged, Magyarország

2023

Tartalomjegyzék

A tézishoz felhasznált közlemények listája	3
Rövidítések	4
Bevezetés	5
<i>Redox-egyensúly és oxidatív stressz a patológiás állapotok hátterében</i>	5
<i>Oxidatív stressz asztma bronchiale-ban</i>	7
<i>Az Alport-szindróma genetikai háttere</i>	8
Célkitűzések	9
Anyagok és módszerek	10
<i>Betegcsoport</i>	10
<i>Biokémiai vizsgálatok</i>	10
<i>Real-time PCR módszerrel történő relatív génexpresszió mérés</i>	11
<i>High-Resolution Melting Curve Analysis</i>	11
<i>Statisztikai analízis</i>	11
Eredmények	12
<i>Oxidatív stressz vizsgálata asztma bronhiale-ban szenvedő gyermekekben</i>	12
<i>NADPH oxidáz gp91phox alegység (CYBB gén) és a HMOX-1 transzkripciójának vizsgálata asztmás és egészséges fiatalok vérében</i>	13
<i>Mutáció pre-screening X-hez kötött Alport-szindrómás betegek családjában High-Resolution Melting Curve analízis módszerével</i>	14
Konklúzió és eredeti felismerések	15
Köszönetnyilvánítás	17

A tézishez felhasznált közlemények listája

I. Zsuzsanna Ökrös, Emoke Endreffy, Zoltan Novak, Zoltan Maroti, Peter Monostori, Ilona Sz. Varga, Agnes Király, Sandor Turi: Changes in NADPH oxidase mRNA level can be detected in blood at inhaled corticosteroid treated asthmatic children

Life Sciences (2012) 91: 907-911

doi:10.1016/j.lfs.2012.08.039

IF: 2.555

II. Emőke Endreffy, Zoltán Ondrik, Béla Iványi, Zoltán Maróti, Csaba Bereczki, Ibolya Haszon, Zsuzsanna Györke, Endre Worum, Krisztina Németh, Csaba Rikker, Zsuzsanna Ökrös, Sándor Túri: Collagen type IV nephropathy: Genetic heterogeneity examinations

in affected Hungarian families

Molecular and Cellular Probes (2011) 25:28-34

doi:10.1016/j.mcp.2010.10.001

IF: 2.078

Rövidítések

BU	Bergmeyer unit
bp	bázispár
CAT	kataláz
cDNA	komplementer deoxiribonukleinsav
Ct	threshold ciklus szám
2,4-DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazin
FRAP	plazma vas redukáló képesség
GPx	glutation-peroxidáz
GR	glutation-reduktáz
GSH	redukált glutation
GSSG	oxidált glutation
HO	heme-oxigenáz
h-PBGD	human porphobilinogén deamináz
ICS	inhalatív kortikoszteroid
IL-1 β	interleukin-1 β
LABA	hosszú hatású β 2-adrenoreceptor agonista
MDA	malondialdehid
mRNA	messenger ribonukleinsav
NADPH	nikotinamid-adenin dinukleotid foszfát (redukált)
NEM	N-ethylmaleimid
NOX	NADPH oxidáz
O ₂ ⁻	szuperoxid anion szabadgyök
RT-PCR	valós idejű polimeráz láncreakció
RI	reaktív intermedierek
ROI	reaktív oxigén intermedierek
RNI	reaktív nitrogén intermedierek
SOD	szuperoxid-dizmutáz
STR marker	short tandem repeat marker
TBA	tiobarbitursav
TBARS	tiobarbitursav reaktív anyagok
TNF- α	tumor nekrozis faktor- α
U	enzim unit (egység)

Bevezetés

Az elmúlt, közel két évtized során, a genomika és proteomika nagymértékű fejlődésével hatalmas ismeretanyagra tehattünk szert. A humán genom részletesebb ismerete és az ehhez szorosan kapcsolódó, folyamatosan fejlődő tudományterületek révén több betegség patogeneziséről, patomechanizmusáról pontosabb információkat szereztünk, ezek orvos-gyakorlati jelentőségük miatt gyorsan a mindennapi munkánk részévé váltak: a diagnosztika és a terápia területén egyaránt új, módszerek eljárásrendek születtek. Példaként említhetjük a kiterjesztett spektrumú újszülöttkori szűrővizsgálatok bevezetését vagy a DNS-szekvenálást, melyek szélesebb körű alkalmazásával egyes ritka genetikai és anyagcsere betegségek pontos azonosítása, egyértelmű diagnózisok felállítása is lehetővé vált.

A növekvő tudományos információs anyag a diagnosztika, a betegkövetés és a terápia területeit egyaránt érinti: főként igaz ez a gyermekkori, krónikus betegségekre. Továbbra is fontos szempont maradt, főként gyermekek esetében, hogy a minél kevesebb fájdalommal és pszichés terheléssel járó, nem- vagy minimálisan invazív eljárások kerüljenek előtérbe, melyek elvégzéshez a gyermekeket és a szülőket is könnyedén meg tudjuk nyerni.

Célunk az alább bemutatott kutatási munkánk során, hogy a fenti szempontok figyelembe vételével, két, gyermekekben gyakorta előforduló betegség esetén vizsgáljunk eddig még nem alkalmazott laboratóriumi eljárásokat, azoknak a betegellátásban történő alkalmazási lehetőségét és a rutin diagnosztikában való helyét.

1. Elsőként a gyermekkori asztma bronchiale-t kísérő oxidatív stresszt vizsgáltuk. Célunk volt, hogy biokémiai analízissel valamint génexpressziós módszerekkel a kislégúti gyulladásokhoz köthető pro-és antioxidáns folyamatokat ebben a betegpopulációban is jobban megismerjük. A méréseket vérből végeztük, azt feltételezve, hogy a gyulladás szisztémás hatásai a keringésben is detektálhatóak. A mért eredményeket a gyermekek asztma súlyossági állapotával vetettük össze, az aktuális guideline útmutatásait követve.

2. Vizsgálataink másik része az SZTE Gyermekgyógyászati Klinika és Gyermekek Egészségügyi Központ Nefrológiai munkacsoportja által Alport-szindróma miatt gondozott betegek körében történt. Egy szövettanilag és klinikailag jól definiált, Alport-szindrómaként diagnosztizált csoportban kíséreltük meg a még ki nem mutatott genetikai eltéréseket további, a mutáció analízisben használható metodikák segítségével azonosítani.

Redox-egyensúly és oxidatív stressz a patológiás állapotok hátterében

A szabadgyökök külső elektronpályáikon párosítatlan spinnel rendelkező elektronokat tartalmazó atomok, molekulák, s mint ilyenek, igyekeznek azon adott pályán párosan elhelyezkedni, energetikailag stabilná téve az adott orbitált. Ez a magyarázata rendkívüli reaktivitásuknak és igen rövid élettartamuknak: a környező molekulákkal szinte azonnal reakcióba lépnek, de a folyamat gyakran így is még további, szintén reaktív molekuláris intermedierek képződéséhez vezet. Bár ezen intermedierek elemek már nem sorolhatóak a „klasszikus”

értelemben vett szabad gyökök közé, reaktivitásuk, reakciótermészetük a szabadgyökökéhez hasonló. „Reaktív intermedierek” (RI) néven említendőek, összetételük alapján több nagy csoportba sorolhatóak: jelenleg a legtöbb tudományos ismeret a ROI (reaktív oxigén intermedierek) és RNI (reaktív nitrogén intermedierek) körében gyűlt össze. A szabadgyökök és RI-ek az aerob élet során mind endogén, mind exogén úton keletkeznek, a sejtek, élő szervezetek mindennapi működéséhez nélkülözhetetlenek.

Az élettani folyamatok során a ROI termelődése az aerob élet metabolikus folyamataihoz kötöten, a mitokondriális légzési lánc enzimein, az oxidatív foszforiláció során történik, de szabadgyökök jönnek létre a xantin-oxidáz és NADPH-oxidáz enzimek, a citokróm P450, a ciklooxigenázok, a lipoxigenázok, a nitrogén-monoxid-szintázok működése révén is. Már a fent felsoroltakból látható, hogy a reaktív vegyületek élettani folyamataink szerves részét képezik, mindezeket túlmenően ne feledjük, hogy az immunrendszer normál működéséhez, a jelátviteli folyamatokhoz, protein-foldinghoz, az apoptózishoz is szükségesek, tehát jelenlétük celluláris, szervrendszeri és szervezeti szinten is elengedhetetlen. Az élő szervezet nem a szabadgyökök és a gyökös reakciók eliminálására, hanem a fokozott gyökképződéssel járó folyamatok egyensúlyban tartására törekszik. Ezt az egyensúlyi állapotot az antioxidáns rendszer hivatott fenntartani. A rendkívül komplex rendszer az első szintjét képviselik azon antioxidáns enzimek, melyek a reaktív intermedierek semlegesítésére képesek, így módon közvetlenül kontrollálják a szabadgyökök által elindított láncreakciókat, mint például a kataláz, szuper-oxid dizmutáz, stb. A kis molekulású antioxidánsok, mint az aszkorbinsav vagy a glutathion, szintén a gyökös láncreakciókat hivatottak terminálni. Ha a károsodás már megtörtént, a szervezet igyekszik a hibás részeket, a tőle telhető legnagyobb mértékben kijavítani, ekkor kapnak szerepet a különféle hősokk-fehérjék, DNS-repair enzimek, stb. Mindezen komplex folyamatokhoz feltétlenül szükségesek, és így, bár nem szoros értelemben, de szintén az antioxidáns rendszer részét képezik a nyomelemek (pl. Cu, Zn, Mn), melyek kofaktorként ezen enzimek működését biztosítják.

Amennyiben ez a rendkívül összetett, érzékeny egyensúly a pro-és antioxidánsok között felborul, létrejön az oxidatív stressz állapota, mely számos betegség patogenezisében, patomechanizmusában kulcsszerepet játszik: az ateroszklerózis, krónikus veseelégtelenség, IRDS, rheumatoid arthritis és még egyéb más, krónikus gyulladással kísért folyamat esetében szerepe már minden kétséget kizáróan bizonyított.

Az egyik fő O_2^- -forrásnak tekinthető enzim, a NADPH-oxidáz (NOX), mely szerepe több folyamat, betegség tekintetében is élen vizsgált. A NOX egy membránhoz-asszociált fehérje komplexként működik, ám ennek a komplex molekularendszernek is számos izoformája ismert, működésük és regulációjuk az adott sejttypustól függően változik. A gyulladásban részt vevő monocita és fagocita funkcióval rendelkező sejtek a NOX2 izoformát expresszálják. Minden NOX-izoenzim esetén igaz, hogy egy transzmembrán komplexen keresztül valósul meg az elektron-transzfer a NADPH és a molekuláris O_2 között: a NOX2 izoformában ezt a két alegységből álló flavocitokrome b558 (gp91^{phox} and p22^{phox} fehérje) alkotja. Ehhez izoforma-asszociáltan egyéb katalitikus alegységek is csatlakoznak. A gp91^{phox} and p22^{phox} fehérjék transzkripcióját illetve működését maguk a ROI-k, illetve proinflammatorikus citokinek (TNF- α and IL-1 β) is befolyásolják, in vitro körülmények között az aktivált mononucleáris sejtekben fokozott O_2^- - képzést idéznek elő.

A hem-oxigenáz enzim (HO), mint szervezetünk egyik fő antioxidáns enzime, a citotoxikus szabad HEM lebontásért felelős: a reakció eredményeként biliverdin, szén-monoxid (CO), Fe^{2+} keletkezik. Bár maga a HEM prooxidáns tulajdonságokkal rendelkezik, a biliverdin és a belőle keletkező bilirubin, csakúgy, mint a CO, antioxidáns sajátosságú. Három izoformája közül a HO-1, mint indukálható forma szerepe az oxidatív stressz korai

szakaszában már eddig is ismert volt, s mint ilyen, a kutatások kapcsán gyakorta használt markere a redox-egyensúly felborulásának, az adaptív mechanizmusok jellemzésének. Környezeti tényezők és gyulladásoos citokinek hatására a HO-1 antioxidáns szerepét, expresszióját magukban a légutakban, légúti sejtekben gyulladás kapcsán, egyes kórállapotokhoz rendelten már vizsgálták.

Az oxidatív stressz hatására sérült biomolekulák, így a károsodott fehérjék (karbonilált fehérjék), lipidek (pl. malondialdehid, lipidperoxidok), az antioxidáns rendszer enzimatis és nem-enzimatis résztvevőinek vizsgálata mind a mai napig a kutatások része, kulcsfontosságúak a krónikus gyulladással járó kórképek patomechanizmusának megértésében.

Oxidatív stressz asztma bronchiale-ban

A gyulladás és az azt kísérő oxidatív stressz jelenléte már ismert az asztma bronchiale patomechanizmusában: fokozott ROI képződést mutattak ki az epitél sejtekben, a légúti makrofágokban, illetve a gyulladás és szövetkárosodás helyén jelen lévő neutrofil és eozinofil sejtekben. Az oxidatív stressz maga, iniciálni és propagálni is képes a gyulladást és annak következményeit, így a kislégúti szöveti remodelling és az obstrukció kialakulását egyaránt befolyásolja. Főként az állatmodellekből származó adatok támasztják alá az antioxidánsok megváltozott szintjét és aktivitását, a ROI-ek magasabb értékeit. Ezen fenti eredmények a légúti símaizom kontraktilitással és a kislégúti hyperreaktivitás mértékével nagymértékű korrelációt mutattak. Az előbbieken túl a ROI-ekkel összefüggésben a fokozott légúti nyák produkciót, a ciliaris diszfunkciót, a megváltozott β -adrenerg receptor funkciót, az epitél réteg sérülését és a már említett szöveti remodellinget is igazolták.

A humán, főként a gyermekekből származó adatok a kislégúti gyulladás helyéről továbbra is korlátozottan állnak rendelkezésre a mintavétel és eszközös vizsgálatok invazív jellege miatt, ezen felül elvégzésüket etikai dilemmák tovább szűkítik. A meglévő eredmények főként már fennálló betegségek kapcsán végzett vizsgálatokkal váltak elérhetővé, az egészségese egyénekből származó adatok pedig továbbra is hiányosak. Az utóbbi években széleskörű kutatások tárgyát képezték azon non-invazív módszerek, melyekkel légúti mintát, pl. köpetet vagy kilélegzett levegőben fellelhető, részben a gyulladás, részben az oxidatív stressz kapcsán keletkező molekulákat vizsgáltak. Ezen módszerek hátrányai, hogy maga a vizsgálat, vagy a vizsgálatához szükséges előkészületek, - a magas költségek és eszköz-igény mellett-, igen nagyfokú kooperációt igényeltek a beteg részéről, emiatt a mérések a gyermekek esetében még nehezebben kivitelezhetőek, az eredmények reprodukálhatósága kétséges, bizonyos életkor alatt pedig továbbra sem elvégezhetőek. Az utóbbi években, feltehetően a fenti hátráltató tényezők miatt, egyre több adat jelent meg a vérmintából származó vizsgálatokból, ezek száma azonban még igen limitált, az eredmények pedig gyakorta egymásnak ellentmondónak bizonyultak.

Az Alport-szindróma genetikai háttere

Az Alport-szindróma és a vékony bazál membrán nefropátia a IV típusú kollagén betegségei: a kollagén szerkezet egyes elemeit kódoló génekben bekövetkező mutációk eredményeként az „embriónális típusú” $\alpha 1:\alpha 1:\alpha 2$ heterotrimer szerkezet $\alpha 3:\alpha 4:\alpha 5$, ún. „adult típusú” történő átalakulása szenved zavart. A betegség hátterében leggyakrabban az X-kromoszómához kötött COL4A5 (Xq22.3) gén mutációja (~85%) áll, ritkábban a COL4A3 és COL4A4 gének tehetőek felelőssé a kialakulásáért. A legsúlyosabb klinikai tünetek a X-kromoszómához köthető esetekben alakulnak ki, az érintett fiatal férfiaknál gyakran már életük 2. évtizedében számolhatunk a végstádiumú veseelégtelenség létrejöttével. A hordozó női családtagok, illetve az autoszomális recesszív formát homozigóta vagy compound heterozigóta kombinációban hordozó egyének tünetei általában kevésbé súlyosak.

A vékony bazál membrán nefropátia általában a COL4A3 és COL4A4 (2q36.3) gének heterozigóta formában jelenlévő mutációi következtében jön létre, ritkán azonban egyértelműen egyik fenti génhez sem kapcsolható a betegség. A súlyosság tekintetében is lehetségesek eltérések, még azonos mutáció hordozás esetén is, így felvetődik a klinikai képet befolyásoló módosító faktorok szerepe. Az öröklődés menete általában autoszomális domináns.

A kezdetben gyakran átfedő klinikai tünetek miatt a gyermeket gondozó orvos felelőssége igen nagy: nem csak a diagnózis, de prognózis és a későbbi családtervezés szempontjából is szükséges a pontos mutáció és az öröklődés ismerete.

Bár a családfa-analízis sok esetben segít a diagnózis felállításában, olykor ez mégsem elegendő. Jelen dolgozatban klinikai és szövettani diagnózis birtokában, Alport- illetve vékony bazál membrán szindrómában szenvedő betegek esetében, előzetesen kapcsoltsági markerek segítségével szegregációs analízis történt, majd az X-hez kötött domináns öröklődés menet igazolását követően, de még a DNS-szekvenálást megelőzően, ún. mutáció prescreening eljárást végeztünk. 9 család hordozónak tartott nő tagjaiban illetve a betegekben high resolution melting curve (HRMC) analízis történt, melyet alkalmas módszernek gondoltunk arra, hogy olyan igen nagy, - jelen esetben összesen 51 exont tartalmazó- génekben, mint a COL4A5, genetikai variációkat keresve azonosítsuk, vajon az adott exon tartalmaz-e a betegség létrejöttéért felelős mutációt vagy genetikai variánst. Ezen eljárással reményeink szerint elegendő lesz kizárólag az eltérést mutató exonokat a pontos mutáció analízis végett szekvenálás alá vetni, jelentős idő-és költségmentesítést elérve ezzel.

Célkitűzések

1. Mint a legtöbb krónikus betegségben, így asztmában is, a tünetek és patológiás elváltozások főként az érintett szervre, jelen esetben a tüdőre, főként a kislégutakra lokalizálódnak. Ugyanakkor az asztma kapcsán a légutakat vizsgáló módszerek lehetőségei korlátozottak. Felmerül a kérdés, vajon a krónikusan fennálló gyulladás következtében lokálisan létrejött változások szisztémásan okoznak-e eltéréseket, és ezeket hogyan tudnánk tanulmányozni akár kutatási, akár klinikai céllal úgy, hogy a gyermekkorban különösen fontos minimál/non-invazivitást és fájdalommentességet is szem előtt tartunk. Irodalmi adatok és előzetes tanulmányok arra utaltak, hogy a vérben az asztmás gyulladás valamint az azt kísérő oxidatív stressz biokémiai jelei fellelhetőek. Gyermekkorban ebben a vonatkozásban kevés adat állt rendelkezésre. Célunk volt, hogy megvizsgáljuk, vajon a vérből a gyermekkorban asztmás gyulladáshoz köthető pro- és antioxidáns folyamatok által előidézett változások mérhetőek-e, és meghatározzuk, esetleg mely paraméterek reflektálhatnak a gyulladásra, adnak-e információt annak intenzitásáról. A vérvételeket egyéb okból szükséges laborvizsgálatokhoz igazítottuk, extra megjelenés a beteg részéről nem volt szükséges.

2. Az oxidatív stresszt az antioxidáns oldalról megközelítve biokémiai módszerekkel kívántuk vizsgálni a plazma össz-antioxidáns kapacitására reflektáló vas-redukáló képességet (FRAP), a glutation redox-rendszer egyes elemeit (redukált és oxidált glutationt (GSH, GSSG), ezek arányát, illetve a ciklus fenntartásában részt vevő glutation-reduktáz (GR) és glutation-peroxidáz (GPx) enzimeket), a szuperoxid-dizmutáz (SOD) és kataláz (CAT) enzimek aktivitását. A prooxidáns túlsúlyra az oxidatív stressz miatt károsodott biomolekulák szintje engedhet következtetni, így a karbonilált fehérjék és a lipid károsodást jelző, -leginkább a malondialdehid (MDA) szinttel korreláló, de egyéb lipid eredetű elemeket is tartalmazó tiobarbitursav-reaktív szubsztrátok (TBARS) koncentrációit határoztuk meg.

3. Arra szeretnénk volna választ kapni, hogy a NADPH-oxidáz enzim komplex NOX2 izoformájának gp91^{phox} alegységét kódoló CYBB gén, - mint az egyik ismert fő $O_2^{\cdot -}$ forrás a gyulladáshoz vezető folyamatokban-, valamint a HMOX1 gén, - az egyik legpotensebb, indukálható antioxidáns-, transzkripció szintjén mutatnak-e változást az asztmás gyermekek vérében. Ezen eljárással lehetőség nyílt klinikánkon egy eddig még nem alkalmazott real-time PCR alapú, génexpressziót vizsgáló módszer bevezetésére is.

4. A kapott eredményeket a klinikummal összevetve szeretnénk volna vizsgálni, hogy vajon az asztma kontrolláltsági foka és alkalmazott antiasztmatikus terápia hatása, - melyet az aktuálisan érvényben lévő GINA ajánlás szerint határoztunk meg-, tükröződik-e a redox-homeosztázis egyes általunk mért, fentiekben felsorolt elemein?

5. Az igazoltan a COL4A5 génhez köthető mutációkat hordozó, Alport-szindrómában szenvedő családok egyes tagjainál high-resolution melting curve analízis segítségével megkíséreltük azonosítani a gén 51. exonjában a mutációk/genetikai variációk „megközelítő” helyét, szűkítendő a majdan szekvenálendő DNS szakasz hosszát. Egyúttal kerestük azon kérdésre is a választ, hogy a HRMC módszer, mint a szekvenálást megelőző pre-analitikai lépés, a jövő diagnosztikájában alkalmazható lesz-e?

Anyagok és módszerek

Betegcsoport

Vizsgálatunk első felében 58 igazolt asztmás és 30 egészséges kontroll vérmintáját és klinikai adatait elemeztük. Valamennyi beteg az SZTE Szentgyörgyi-Albert Klinikai Központ Gyermekgyógyászati Klinika és Gyermek Egészségügyi Központ Pulmonológiai munkacsoportjának gondozásában állt. Az egészséges kontrollok a klinika sebészeti osztályán és ambulanciáján egyéb ok miatt ellátásra került, illetve kontroll vizsgálaton megjelent betegek közül kerültek ki, valamennyiük esetében a vérvételt megelőző egy hónapban akut betegség fennállása, atópiás, légúti vagy egyéb krónikus betegség, - mint a redox-homeosztázist befolyásoló állapot-, kizáró tényező volt. Az asztmás betegcsoportba 36 fiú és 22 leány (átlag életkor: 14.55 év és 16.29 év), a kontroll csoportba 16 fiú és 14 leány (átlag életkor 14.94 év és 16.03 év) került bevonásra. Az asztmás gyermekek kezelése, gondozása az aktuális GINA guideline és a hazai ajánlás szerint történt: az elemzések során az asztma kontrolláltságára és a gyógyszerhasználatra fektettük a hangsúlyt, különös tekintettel az inhalációs kortikoszteroid (ICS) igényre. Ennek megfelelően asztmás beteginket négy csoportba soroltuk: ICS fenntartó terápiát nem igénylő betegek (n=22), alacsony dóziszú ICS-t (< 200 µg/day) (n=20), közepes dóziszú ICS-t (200-400 µg/day) (n=6), és közepes/magas ICS + LABA (ICS (≥200-400 µg/day)) kezelést (n=10), mint fenntartó terápiát igénylő csoportokat határoztunk meg. A különböző ICS hatóanyagú és kiszerezési készítmények a korrekt összehasonlíthatóság okán budesonide ekvivalens dóziszra történő konvertálást követően kerültek interpretálásra, a tartós fenntartó kezelési igény miatt a gyógyszer beállítására már legalább 6 hónappal korábban sor került. Valamennyi beteg esetében a rövid hatású β₂-adrenerg receptor agonista, mint rescue terápia lehetősége adott volt. Emellett néhány beteg kezelésében a klinikumnak megfelelően histamine 2-receptor antagonist és leukotrién receptor antagonist használata is szükséges volt. A vizsgálat elvégzéséhez szükséges etikai engedélyt a Szegedi Tudományegyetem Etikai Bizottsága biztosította (No. 2466/2008). A vizsgálatot megelőzően a gyermekek és szülei szóbeli és írásbeli tájékoztatást kaptak, írásos gondviselői beleegyezést követően került sor a vérvételre valamint a betegadatok elemzésére.

Biokémiai vizsgálatok

A vérvétel EDTA-s csövekbe történt. A GSH és GSSG meghatározását teljes vérből végeztük, ezt követően a centrifugálással elkülönített plazmából mértük a plazma összantioxidáns kapacitást jelző FRAP értéket. A SOD, CAT, GPx, GR enzimaktivitások, a TBARS és karbonilált fehérjék koncentrációinak meghatározása három ciklus mosási eljárást követően a vörösvérsejt frakciók hemolizátumaiból történtek. A teljes vér GSSG és GSH mérését spektrofotometriás enzimikus módszerrel végeztük, a mért értékeket a hemoglobin tartalomra vonatkoztattuk. A vörösvérsejt GR, GPx, SOD és CAT aktivitásokat szintén spektrofotometriás módszerrel határoztuk meg; az enzim aktivitásokat a minta spektrofotometriásan mért fehérje tartalmához viszonyítottuk, az egyes enzim aktivitásokat U/mg protein, illetve a CAT esetében BU/mg protein egységekben határoztuk meg. A vörösvérsejtekben végbemenő lipidperoxidációra utaló TBARS szintet TBA-reagens segítségével mértük, az eredményeket nmol/mg protein formában közöltük. A karbonilált fehérje meghatározás spektrofotometriás úton, 2,4-DNPH reagenssel történt, az eredményeket a vörösvérsejtek összfehérje mennyiségére vonatkoztatva mmol/mg protein mértékegységben interpretáltuk.

Real-time PCR módszerrel történő relatív génexpresszió mérés

A CYBB és HMOX1 gének transzkripciójának meghatározása valós-idejű PCR módszerrel történt. Teljes EDTA-s vér leukocytákból történő mRNS izolálást követően (Roche Blood/Bone Marrow mRNA Isolation kit), a reverz transzkripciót speciális cDNS átíró kit segítségével (First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas) végeztünk, valamennyi lépést a gyártók ajánlásainak megfelelően. A real-time PCR amplifikálás és minták detektálása a FastStart Hybprobe Kit (Roche) reagenssel, LightCycler Software Version 3.5 segítségével, LightCycler Carousel-based system 1.5 (Roche) készülékekkel történt. A detektáláshoz szekvencia specifikus hibridizációs próbákat alkalmaztunk: valamennyi szekvencia specifikus primer és hibridizációs próba tervezéséhez a LightCycler Probe Design szoftvert használtuk. Előzetes power-analízist követően minden mérést két technikai párhuzamos segítségével végeztünk el, melyekből a génexpresszió változását a komparatív $\Delta\Delta C_t$ módszerrel állapítottuk meg, a h-PBGD háztartási gének mRNS-éhez, mint normalizáló kontrollhoz viszonyítva.

High-Resolution Melting Curve Analysis

Vizsgálataink második részében Alport szindrómás betegekben és családtagjaikban tervezett mutáció analízis kapcsán ún. pre-screening vizsgálatok történtek. Húsz érintett család bevonásával, klinikai és szövettani vizsgálatot követően, STR markerek segítségével a 2-, 13-, és X-kromoszómákhoz köthető öröklésment megállapítása céljából szegregáció analízis történt a COL4A3, COL4A4 és COL4A5 génekre vonatkozóan. Kilenc család esetében sikerült azonosítani az X-kromoszóma COL4A5 génjéhez köthető öröklődést. A fenti elemzés a jelen dolgozatnak nem tárgya, a vizsgálati alanyok pontos kiválasztását volt hivatott biztosítani.

DNS izolálást követően a COL4A5 gén 51 exonjára történt mutáció előszűrés. Az 56 primer pár tervezéséhez Primer 3 Software-t használtunk, közös, 60°C annealing hőmérséklet megállapításával. A primerek tervezésénél és az amplifikátumok elemzésénél a szomszédos splice site-okat is figyelembe vettük. Az átlagos amplicon hossz 250 bp nagyságú volt. A polimeráz láncreakciót követően a HRM analízis 65°C-95°C közötti hőmérsékleti intervallumon történt, 1°C/sec melegítési sebességet alkalmazva. A vizsgálatot LightCycler 480 (Roche) System készülékkel végeztük Resolight festéket tartalmazó LC High-Resolution Melting Master gyári kit segítségével. Az eltérő olvadási görbét mutató ampliconok Sanger típusú DNS szekvenáláson estek át. A fenti vizsgálat a diagnosztikai vizsgálatok részét képezte, melynek elvégzésébe a betegek és családtagjai előzetesen írásban beleegyeztek, a kapott eredményről genetikai tanácsadás keretében tájékoztatást nyertek.

Statisztikai analízis

Statisztikai analízisre az asztmás fiatalok körében végzett vizsgálat keretében volt szükség: az eredményeket medián (range), illetve átlag \pm SD formában közöltük. A statisztikai elemzéseket GraphPad Prism 4.00 szoftver (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) segítségével végeztük. Az alkalmazott módszerek a következők voltak: kétmintás t-próba, nem paraméteres Mann-Whitney teszt, egy szempontos variancia-analízis Bonferroni-féle *post hoc* tesztel, Kruskal-Wallis teszt Dunn-féle többszörös összehasonlítási tesztel. Mindegyik vizsgálat esetén a 0.05-nél kisebb *p* értéket tekintettük szignifikánsnak.

Eredmények

Oxidatív stressz vizsgálata asztma bronhiale-ban szenvedő gyermekekben

A GSH és a GSSG koncentrációkban illetve a GSSG/2GSH arányban nem volt változás az asztmás betegekben az egészségesekhez viszonyítva. Az asztma kontrolláltsága és az ICS terápia igénye sem okozott mérhető különbséget a redukált/oxidált glutation mennyiségében illetve a két forma arányában. A glutation rendszert fenntartó antioxidáns enzimek közül sem a GPx, sem a GR aktivitásban nem volt szignifikáns mértékű változás az általunk vizsgált betegekben és egészségesekben, ugyanakkor említést érdemlő azon megfigyelés, hogy abban az asztmás betegcsoportban, ahol a klinikum már indokolta az ICS fenntartó terápia bevezetését, mérhetően magasabb GPx aktivitást észleltünk, mint egészségesekben, utalva az oxidatív folyamatok túlsúlyra. (1. táblázat)

A SOD aktivitás szignifikánsan magasabbnak mutatkozott az ICS-t nem igénylő asztmás betegekben, mint egészségesekben és az ICS-al kezelt betegcsoportban. CAT aktivitás tekintetében a SOD-hoz szintén hasonló tendenciájú, de értékében nem szignifikáns változást tapasztaltunk. (1. táblázat)

A FRAP érték az általunk vizsgált asztmás betegekben alacsonyabb volt, mint az egészségesekben: (median (25-75 percentil) ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ fehérje) *asztmás*: 6.29×10^{-3} (5.14×10^{-3} - 8.15×10^{-3}) vs. *egészséges*: 8.55×10^{-3} (6.81×10^{-3} – 13.6×10^{-3})*; * $p < 0.05$). Az ICS kezelés hatására ugyan számottevően csökkent a FRAP érték az egészséges fiatalokhoz képest, de hasonló, bár nem szignifikáns mértékű tendencia megfigyelhető volt az ICS kezelésben nem részesülő betegcsoportban is (*egészséges*: 8.55×10^{-3} (6.81×10^{-3} – 13.6×10^{-3}), *ICS-kezelt betegek*: 6.06×10^{-3} (5.00×10^{-3} – 7.31×10^{-3})*, *ICS-ot nem igénylő betegek*: 7.75×10^{-3} (5.58×10^{-3} - 8.86×10^{-3}); * $p < 0.05$). (Korábban nem publikált eredmény.)

A vörösvérsejtekben a lipid károsodást jelző TBARS és a fehérjék oxidatív károsodására utaló karbonilált fehérje koncentrációk is szignifikánsan emelkedettnek bizonyultak a vizsgált asztmás betegcsoportban az egészséges fiatalokban mért értékekhez képest: (* $p < 0.05$) (TBARS ((median, 25-75 pc: nmol/mg protein): *egészséges*: 0.56 (0.44-0.65) vs. *asztmás*: 0.77 (0.66-0.90))*; karbonilált protein (átlag \pm SD ($\times 10^{-5}$ mmol/mg protein): *egészséges*: 6.77 ± 1.45 vs. *asztmás*: $7.42 \pm 1.45^*$)). Mindkét paraméter növekedését mértük azon betegek esetében, akik még nem kaptak ICS fenntartó kezelést, bár TBARS esetében maga az ICS kezelés ténye sem befolyásolta érdemben a lipid peroxidációt mértékét. (1. táblázat) Ezt támasztja alá, hogy az ICS dózisok szerint elemezve nem volt szignifikáns eltérés TBARS tekintetében az egyes alcsoportok között, tehát a kezelés jellege és a lipid peroxidáció között nem volt ok-okozati összefüggés. A legmagasabb fehérje károsodásra utaló karbonilált protein szint az ICS-kezelésben még nem részesülő asztmásokban volt jelen: markáns, szignifikánsnak jelzett különbség az egészségesekhez képest és azon ICS-kezelt betegekhez képest volt, akik alacsony dózisú ICS terápiában részesültek. Fehérje károsodásban tehát mérhető különbséget tapasztaltunk az alkalmazott ICS-ok dózisa alapján. Egyik fenti paramétert sem befolyásolta a nem, illetve az asztma tüneti kontrolláltsága. (A dolgozatban részletesen ábra formájában, ICS dózisokra szemléltetett adat.)

1. Táblázat: Az oxidatív stresszt jellemző biokémiai paraméterek asztmás serdülőkorú betegekben és az egészséges kontroll csoportban

paraméter	Egészséges	ICS-al kezelt asztmás	ICS-al nem kezelt asztmás
TBARS (nmol/mg prot.)	0.56 (0.44-0.65)	0.77 (0.66-0.89)*	0.78 (0.66-1.05)*
Karbonilált fehérje (x10 ⁻⁵ mmol/mg prot.)	6.77±1.12	7.22±1.25	8.10±1.63*
GSH (μmol/g Hb)	8.69±2.31	9.31±1.51	9.19±1.36
GSSG (μmol/g Hb)	18.50±4.35	19.63±5.28	18.95±3.51
GSSG/2GSH	0.22±0.06	0.21±0.04	0.21±0.03
GPx (x10 ⁻³ U/mg prot.)	2.41±0.45	3.18±1.57	2.63±0.45
GR ((x10 ⁻⁴ U/mg prot.)	7.68±1.84	7.44±2.28	8.28±2.78
SOD (U/mg prot.)	2.54 ±1.07	2.49 ± 0.86	3.13 ± 0.97**
CAT (x10 ⁻⁵ BU/mg prot.)	0.89± 0.22	0.86 ± 0.29	1.04 ±0.36

* $p < 0.05$ szignifikáns különbség az egészséges csoporthoz viszonyítva

** $p < 0.05$ szignifikáns különbség az egészséges csoporthoz és az ICS-al kezelt betegekhez képest

Az eredmények feltüntetése átlag \pm SD és TBARS esetében medián (25-75 percentil).

A statisztikai analízisben egy- szemponatos ANOVA és Kruskal-Wallis tesztet alkalmaztunk, Bonferroni és Dunn-féle post-hoc teszttel kiegészítve.

NADPH oxidáz gp91^{phox} alegység (CYBB gén) és a HMOX-1 transzkripciójának vizsgálata asztmás és egészséges fiatalok vérében

A CYBB mRNS-ek relatív expresszióját valamennyi alcsoportban meghatároztuk, valamint az egyes alcsoportokat egymással is összevetettük. Az inhalatív kortikoszteroid kezelés megléte szerint találtunk eltérést (ICS-al kezelt betegcsoport: $\Delta\Delta Ct = 0.819$ vs. ICS-al nem kezelt betegcsoport: $\Delta\Delta Ct = -0.363$ $p < 0.05$; a ΔCt értékek interpretálása az egészséges kontrollokhoz viszonyítva); az ICS kezelés hatására a CYBB gén transzkripció aktivitásának csökkenését mértük az ICS-el nem kezelt betegcsoporthoz képest. A további elemzések az alkalmazott ICS dózisa szerint történtek: a szignifikancia szintet elérő transzkripció visszaesést ($p < 0.05$) ($\Delta\Delta Cp = 1.445$, ICS kezelésben nem részesült csoportra vonatkoztatva) csak alacsony dózisú (~200 ug/die) ICS terápia mellett mértünk. Méréseink szerint a tünetvezérelt ICS dózis emelés a CYBB gén transzkripció aktivitásában további negatív irányú változást már nem idézett elő.

Az antioxidáns hatású, a szabadgyökök által indukálható HMOX-1 gén transzkripció aktivitásában eltérés génexpressziós módszerrel nem volt detektálható.

2. táblázat: CYBB (NADPH oxidáz gp91^{phox} alegység) mRNS relatív expressziójának vizsgálata $\Delta\Delta Ct$ eredmények feltüntetésével az alkalmazott ICS dózisokra lebontva. (Az eredmények az ICS-t nem kapó asztmás csoporthoz viszonyítva mutatják az expressziót.)

kezelés	$\Delta\Delta Ct$
alacsony dózisu ICS	1.445*
közepes dózisu ICS	1.168
közepes/magas dózisu ICS + LABA	1.034

* $p < 0.05$ az ICS kezelésben nem részesülő asztmás betegekhez képest.

Mutáció pre-screening X-hez kötött Alport-szindrómás betegek családjában High-Resolution Melting Curve analízis módszerével

Kilenc igazolt Alport-szindrómával érintett család esetében, ahol előzetesen a COL4A5 génhez köthető eltérést azonosítottuk, végeztük el a HRMC analízist az érintett gén valamennyi exonjában. A vizsgált exonok közül 6 esetben láttunk eltérő olvadásgörbét, melyek az adott amplikonban jelen lévő eltérő bázis sorrendre utaltak. Ezen amplikonok szekvenálása ABI Prism 3130 készülékkel történt, melyek során a következő mutációk igazolódtak: a 1061G→C báziscsere Gly→Arg aminosavcserét eredményezett, 1620 insC, mely frameshift mutáció a codon 458-től, Gly→Asp aminosavcserét előidéző G→A nukleotid csere 2115 pozícióban és Gly→Arg aminosavcserét okozó G→A pontmutáció 4460 pozícióban. További 2 intron-polimorfizmust találtunk: IVS4 +69T/C és IVS10 +21T/C. Az olvadásgörbék eltérései alapján valamennyi genetikai variáció azonosítható volt.

Konklúzió és eredeti felismerések

1. Bár maga az asztma és az azt kísérő gyulladás a légutakban van jelen, a vérben is detektálhatóak a gyulladást kísérő oxidatív stressz jelei. Azon célunk, miszerint a gyermekekben vizsgáljunk egy kevésbé fájdalmas, jobban tolerálható és a beteg részéről nagyobb kooperációt nem igénylő, de a betegség követése szempontjából még alkalmas vizsgálati lehetőséget és médiumot, ebben a tekintetben csak részben volt sikeres. A vizsgálat elvégzésébe, bár az extra túsúrással a vizitekhez kötötten nem járt volna, a kisebb gyermekek szülei gyakorta nem egyeztek bele, így az összehasonlíthatóság szempontjából a nagyobb, már serdülőkorú gyermekeket volt lehetőségünk megvizsgálni.

2. Az oxidatív károsodás direkt markerei, mint a lipid-peroxidációt jelző TBARS értékek és a fehérjék károsodására utaló karbonilált fehérje koncentrációk, egyaránt emelkedettek voltak a vizsgált serdülőkorú asztmások vérében. Az emelkedett karbonilált fehérje koncentráció, mely az oxidatív károsodások késői markerének tekinthető, a krónikus gyulladást kísérő oxidatív stresszre utalhat, míg a lipid peroxidációt jelző magasabb TBARS érték, már az oxidatív egyensúlyi állapotok felborulásának korai szakaszában megjelenik.

Az asztmás gyulladás tartós fennállására és így az ezzel járó oxidatív stressz szintén krónikusan fennálló jellegére utalt, hogy az indukálható HMOX-1 gén expressziójában nem volt változás. Ezen paraméterben bekövetkező változás hiányából arra is következtethetünk, hogy pácienseink körében valóban kizárható volt az akut asztmás fellángolás.

3. Az oxidatív stressz egyes általunk vérből mért markereiben az ICS kezelésnek tulajdonítható változást észleltük, habár a szérum kortizol szintekben jelentős szisztémás szteroid hatásra utaló eltérés nem volt, és a betegek sem számoltak be szteroid mellékhatásokról. Az ICS kezelés hatására a SOD, CAT és FRAP értékekben tapasztaltunk érdemi változást. Magasabb TBARS érték, karbonilált fehérje koncentráció, illetve SOD és CAT enzim aktivitás voltak mérhetőek azon betegekben akik, asztmájuk klinikai kontrolláltsága okán még nem igényeltek ICS kezelést. Ezen betegeknél a lokális légúti gyulladás potensebb antiinflammatorikus kezelése még nem történt bevezetésre, bár laboratóriumi módszerekkel kifejezettebb oxidatív stresszre utaló jelek mutatkoztak, szemben azon asztmás serdülőekkel, akiknél az ICS fenntartó terápia a tüneteik okán már szükségessé vált.

A gp91phox alegység transzkripciója ICS kezelés hatására szignifikáns változást mutatott. A CYBB gén expressziója már alacsony dózisu ICS hatásra is az egészséges kontrollok szintjére esett vissza, az ICS dózisok emelése - a vártakkal ellentétben- nagyobb mértékű transzkripció csökkenést már nem idézett elő. Ugyanakkor fontos megemlíteni, hogy a CYBB génben látott változások nem tükrözik egyértelműen a NOX2 izoforma fehérje mennyiségi és O_2^- -gyök képző aktivitásbeli változását, mivel a fenti alegység jelentős intracelluláris fehérje pool-al rendelkezik a sejtekben.

A redox-egyensúly egyes paramétereinek vizsgálatából látható, hogy bár a gyulladás fő helye a kislégutak területe, a gyulladás és az azt kísérő oxidatív stressz jelei a vérben is detektálhatóak, illetőleg az inhalatív módon adott kortikoszteroid terápia egyes jelzett, a redox-egyensúlyt érintő hatásait is mérni tudtuk.

4. Az oxidatív stresszt jellemző paramétereket nem önmagukban, sokkal inkább, mint összefüggő rendszer elemeit célszerű elemezni. A mért változásokat nagyban befolyásolja a vizsgált betegpopuláció, a betegség természetes lefolyása, illetve a vizsgálat időpontjában a betegség aktuális stádiuma, az alkalmazott terápia, és a vizsgált minta jellege, melyből a méréseket végeztük.

5. Az asztmás betegek esetében a vér egy könnyen hozzáférhető médium az oxidatív stressz tanulmányozására, de az adott esetszám mellett elvégzett méréseink végső következtetéseiként úgy véljük, hogy jelentős redox-egyensúly zavarra utaló változások kimutatására várhatóan csak akut exacerbáció esetén kerülhetne sor. Ahogy azt vizsgálataink is igazolták, kontrollált asztmában a krónikus gyulladás és a krónikus oxidatív stressz jeleivel már találkozunk, annak ellenére, hogy a beteg tünetei klinikailag egyensúlyban vannak. Jelen eredményeink alapján azt állapíthattuk meg, hogy az oxidatív károsodás tekintetében a változások tendenciáiról érdemes beszélni. Véleményünk szerint a jövőben a pontos légúti folyamatok megismerése végett célra vezetőbb lenne a légutakból származó minták további, alapos vizsgálatának kutatásait is folytatni.

6. A High-Resoluton Melting Curve analízissel a COL4A5 génben azonosított 6 eltérést szekvenálással is igazolni tudtuk, „álpozitív jelzés nem volt.

7. A HRMC analízis a DNS szekvenálást megelőző alkalmas „pre-screening” módszernek bizonyult, főként olyan gének esetében, melyek méretüknél fogva igen kiterjedtek, a szekvenálás költségei így csökkenthetőek voltak.

Köszönetnyilvánítás

Hálás szívvel köszönöm Prof. Dr. Túri Sándornak és Dr. Med. Habil. Bereczki Csabának, hogy a Gyermekgyógyászati Klinikán kutatásokat folytathattam és a kísérletekhez szükséges feltételek biztosításával segítettek munkámat,

Dr. Endreffy Emőke Ph.D. és Prof. Dr. Novák Zoltánnak, témavezetőimnek, hogy a tudományos munka területén elindítottak, utat mutattak és bátorítottak,

Dr. Szöllősiné Varga Ilonának és Balogh Katalinnak és Szécsi Ilonának az antioxidáns enzimek meghatározásában nyújtott segítségükért és tanácsaikért,

Dr. Maróti Zoltánnak, Dr. Monostori Péternek és Dr. Kalmár Tibornak, hogy türelemmel terelgettek és tanítottak a genetika világában.

Hálás szívvel köszönöm a Gyermekklinika Genetika Laborjában, illetve a Pulmonológiai munkacsoportban dolgozó összes kedves asszisztens kolléganő támogató munkáját, akik a betegek gondozásában és a tudományos életben hatalmas segítséggel és rendíthetetlen kitartással vesznek részt.

Köszönöm Dr. Farkas-Deák Beáta idegen nyelvi lektori segítségét.

Köszönet és hála illeti valamennyi, a vizsgálatokban résztvevő beteget és szüleiket, akik nélkül ezek az eredmények nem születhettek volna meg.

Köszönet szüleimnek és rokonaimnak a megnyugtató, segítő légkörért, barátaimnak és kollégáimnak barátságukért és a tudományos beszélgetésekért.