

**A mannóz-kötő lektin szerepe gyermekkori hemato-onkológiai kórképek
fertőzéses szövődményeiben**

Ph.D. Tézis

Dr. Fekete Ferenc

Témavezető:

Dr. med. habil Berezcki Csaba Ph.D.

Prof. Dr. Kovács Gábor Ph.D.



Szegedi Tudományegyetem, Szeged

Általános Orvostudományi Kar

Klinikai Orvostudományi Doktori Iskola

2021.

PUBLIKÁCIÓK

- I.** **Fekete F**, Fadgyas B, Papp É, Szilágyi Á, Prohászka Z, Müller B, Kovács G. The role of mannose binding lectin on fever episodes in pediatric oncology patients. *Pathol Oncol Res.* 2016 Jan;22(1):139-43. doi: 10.1007/s12253-015-9992-x. Epub 2015 Oct 3. PMID: 26433879.

- II.** Dobi M, Szilágyi Á, Csuka D, Varga L, Prohászka Z, Bereczki C, Kovács G, **Fekete F**. The Role of Mannose-binding Lectin in Infectious Complications of Pediatric Hemato-Oncologic Diseases. *Pediatr Infect Dis J.* 2021 Feb 1;40(2):154-158. doi: 10.1097/INF.0000000000002919. PMID: 33433161.

1. BEVEZETÉS

A malignus vérképzőszervi daganatok a rosszindulatú betegségek több mint harmadát teszik ki gyermekkorban. A gyermekkori daganatok kezelési lehetőségei jelentős változásokon mentek át az utóbbi években, ennek eredményeképpen javultak e betegcsoport életkilátásai. Mára a gyermekkori tumorok öt éves túlélése elérte a 70-80%-ot. Azonban még így is számottevő a halálozás, melynek egyik fő oka az infekciók megjelenése, ami jelentősen rontja a mortalitást és morbiditást. A magas mortalitást részben a kemoterápia okozta immunszuppresszió okozza, mely növeli az infekcióra való fogékonyságot. A daganatban szenvedő gyermekek kb. 10-20 %-nak halálát fertőzőeses szövődmény okozza.

A kemoterápia gyakran okoz leukopéniát és neutropéniát, ezzel károsítja a szerzett immunitás sejtjes funkcióját. A szerzett immunitás nagyfokú sérülése miatt a veleszületett immunitás szerepe felértékelődik. A humorális immunválasz, melynek fontos eleme a komplement rendszer, megfelelő működése elengedhetetlen a fertőzések elenni védelemben a hematológiai betegekben is.

1.1. Komplement rendszer és a lektin út

A komplement rendszer fontos része a veleszületett immunitásnak, mely első vonalbeli védelmet nyújt az az idegen elemek és a megváltozott saját sejtek ellen. Elengedhetetlen eleme a legkülönbözőbb kórokozók által okozott fertőzésekkel szembeni gyors, szinte azonnali immunválasznak.

A komplement rendszert több mint 50 protein alkotja, melynek egyik része a plazmában és más testnedvekben szabad állapotban, másik része pedig a sejtek felszínéhez kötve található. Komponensei inaktív formában vannak jelen, megfelelő trigger hatására kaszkádszerű reakció indul be és szabályozott proteolízissel aktiválódnak a rendszer elemei.

A komplement rendszer aktiválódása három különböző útvonalon történhet: a klasszikus, az alternatív vagy a lektin úton. A három aktivációs útvonal végül a C3 konvertázt, vagyis a komplement kaszkád központi elemét aktiválja. A C3 konvertáz beindítja a C5 hasítást, mely a C5 konvertáz, végső soron a terminális fázis aktivációjához és a membránkárosító komplex (membrane attack complex – MAC) kialakulásához vezet (C6, C7, C8 és C9).

A komplement aktiváció az immunrendszer működését befolyásolja, mely az opszonizáció segítségével a patogének eliminációjához vezet. A fagocitózis során a makrofágok és a neutrofil

granulociták segítségével aktiválódik a membránkárosító komplex és fokozódik a gyulladási válasz. A komplement rendszer elemeinek fontos szerepe van a B és T sejtekkel való interakciók útján a humorális és a sejt mediált immunitás szabályozásában.

1.2. Mannóz-kötő lektin

A lektin út elindításában a mannóz-kötő lektin (MBL), valamint a nemrégiben felfedezett fikolinok és kollektin 11 játszanak szerepet. Az MBL a mikrobák felszínén lévő szénhidrát molekulákat, az úgynevezett patogén asszociált felszíni mintázatot (PAMP) ismeri fel, majd komplexet képez a mannóz-kötő lektin asszociált fehérjékkel (MASP1, MASP2).

A mannóz-kötő lektin számos olyan kórokozóhoz mutat erős affinitást, amelyek gyakori patogénjei a hematológiai osztályoknak, nem ritkán okozva súlyos fertőzést vagy szepszist. Ezek közül kiemelt jelentőségű a Gram-negatív *Enterobacteriaceae*, a *Staphylococcus aureus*, a *Streptococcusok* és a *Candida albicans*.

Az MBL fehérjét a 10-es kromoszómán elhelyezkedő MBL2 gén kódolja (10q11.2-q21), mely négy exont tartalmaz. A promotor régió a -221-es pozícióban tartalmaz egy polimorfizmust (SNP), amit az irodalomban X/Y allélnak neveznek. A gén első exonjának három gyakori, egy bázist érintő polimorfizmusa (single nucleotid polymorphism SNP) a nemzetközi irodalomban B, C és D allélként ismert. A normál, vad allélt, vagyis amikor nincs egyetlen polimorfizmus sem a kromoszómán A-val jelölik. Mivel a variáns allélok hatása hasonló, ezért a nemzetközi irodalomban sokszor összevonva jelenítik meg és „0” allélként jelölik bármelyik allél polimorfizmusát. Mindhárom polimorfizmusnak jelentős hatása van a szérumban MBL koncentrációjára – aktivitására. A variáns allél a kollagén régió szerkezetében okoz eltérést, ennek következtében nem alakulnak ki a megfelelő fehérje oligomerek, amelyek a lektin út aktiválásához szükségesek, így csökken a szérumban funkcionális MBL aktivitása.

Az MBL szerepét hemato-onkológiai malignitás miatt kemoterápiával kezelt felnőttekben számos tanulmány vizsgálta. Ezek alapján egyre inkább elfogadott, hogy a kemoterápiát követő csontvelőgátlás következtében kialakuló immunszuppresszió miatt az MBL polimorfizmusok hordozása gyakoribb és súlyosabb infekciók kialakulására hajlamosíthat. Gyermeket érintő immunszuppresszív állapotokban az MBL szerepét illetően ellentmondó publikációk jelentek meg. Az, hogy a különböző polimorfizmusok milyen szerepet játszhatnak, még most sem tisztázott, annak ellenére, hogy a kilencvenes évek vége óta folynak az intenzív kutatások.

2. CÉLKITŰZÉS

2.1. A Semmelweis Egyetem II. sz. Gyermekgyógyászati Klinikán 2001 és 2008 között malignus betegség miatt kezelt gyermekeket vizsgáltuk egy retrospektív vizsgálat keretében:

2.1.1. megvizsgáltuk az MBL szintet legnagyobb mértékben befolyásoló polimorfizmusok eloszlását,

2.1.2. összehasonlítottuk az MBL2 gén allélljainak előfordulását a malignus daganatban szenvedő gyermekek körében és a kontroll csoportban,

2.1.3. vizsgáltuk az MBL szintet meghatározó polimorfizmusok hatását a lázas neutropeniás időszakok előfordulására, frekvenciájára, valamint hosszára hematológiai betegségben szenvedő gyermekekben.

2.2. A Semmelweis Egyetem II. sz. Gyermekgyógyászati Klinikáján és Heim Pál Gyermekkorházban 2009 és 2012 között malignus hemato-onkológiai betegség miatt kezelt gyermekeket vizsgáltuk egy prospektív kutatás keretében. A vizsgálat célkitűzései a következők voltak:

2.2.1. vizsgáltuk van-e összefüggés a különböző szérum MBL koncentrációt meghatározó genotípusok és a kemoterápia megkezdését követően előforduló fertőzések gyakorisága között,

2.2.2. befolyásolja-e az MBL genotípusa a kemoterápia megkezdését követően előforduló fertőzések súlyosságát,

2.2.3. milyen összefüggés van az MBL-MASP2 komplex aktivitása és az MBL genotípusa között,

2.2.4. hogyan függ össze a kemoterápia megkezdését követő fertőzés-mentes túlélési idő hossza az MBL genotípusával,

2.2.5. összefüggést kerestünk az alacsony MBL szintet eredményező polimorfizmusok és az MBL-MASP2 komplex aktivációja között,

2.5.6. vizsgáltuk a lázas neutropeniás epizódok jellemzőit a terápia megkezdését követő 8 hónapban.

3. MÓDSZEREK

3.1. Betegek

3.1.1. Retrospektív klinikai vizsgálat

Ötvennégy (24 lány, 30 fiú) malignus onkológiai betegség miatt, 2001-2008 között a Semmelweis Egyetem II. sz. Gyermekgyógyászati Klinikáján kezelt gyermek került bevonásra retrospektív vizsgálatunkba.

A vizsgálatba bevont betegek diagnózisa: akut lymphoid leukémia (ALL) (N = 30); akut myeloid leukémia (AML) (N = 2); Hodgkin lymphoma (HL) (N = 7); non-Hodgkin lymphoma (NHL) (N = 9), és osteosarcoma (N = 6) volt. Az összes bevont gyermek a protokoll szerinti kemoterápiás kezelésben részesült (ALL (IC) BFM 95/2002, AML BFM 98, COSS 96, Interfant 98, NHL BFM 95 és HD 95). Az MBL2 gén polymorphismusok előfordulását egy kontroll csoportban is megvizsgáltuk, ahol a bevont betegek diagnózisai a következők voltak: phimosis, celluláris adhézió, sérvek (lágycék-, köldök- és hasfali sérv), pectus excavatum, labialis adhézió, akut appendicitis, akut gastroenteritis, cöliákia, carpalis ganglion, törések, szemölcs, varikokele vagy hydrokele.

3.1.2. Prospektív klinikai vizsgálat

Prospektív vizsgálatunkba 97 gyermeket (54 fiú, 37 lány) vontunk be, akik a Semmelweis Egyetem II. sz. Gyermekgyógyászati Klinikáján, illetve a Heim Pál Gyermekkorházban álltak kezelés alatt malignus hemato-onkológiai betegség miatt, 2009 és 2012 között. A tanulmányban szereplőknél 76 esetben akut lymphoid leukémiát (ALL), 10 esetben akut myeloid leukémiát (AML), míg 11 esetben non-Hodgkin limphomát (NHL) diagnosztizáltak. Az összes bevont gyermek a protokoll szerinti kemoterápiás kezelésben részesült.

Vizsgálatunkat a Semmelweis Egyetem Regionális Intézményi és Kutatásetikai Bizottsága engedélyezte (TUKEB 180/2007). A résztvevő gyermekek családját tájékoztattuk a kutatás menetéről, a vizsgálat megkezdése előtt a szülők minden esetben beleegyező nyilatkozatot írtak alá.

3.2 A vizsgálat menete

3.2.1. Retrospektív tanulmány

Lázás epizódok gyakoriak a kemoterápia alatt, ezért a malignus hemato-onkológiai betegségben szenvedő gyermekeket a diagnózis megállapítását követő két évben követtük.

Lázás neutropeniás epizódnak (febrile neutropenia, FN) definiáltunk minden olyan periódust, amelynek kezdetekor az axillárisan mért hőmérséklet meghaladta a 38,0°C-ot és a neutrofil szám kisebb volt, mint 0,5 g/L. Számos jellemzőt rögzítettünk minden epizód alatt, a lázas időszak első és utolsó napja, klinikai jellemzők (fehérvérsejt szám, neutrophil szám, CRP), a lázas epizód kezdetekor, a normál testhőmérséklet visszatértekor. Pozitív hemokultúra esetén, az identifikált kórokozót és antimikrobiális kezelést is rögzítettük.

3.2.2. Prospektív vizsgálat

A betegeket a diagnózis megállapításától számított minimum 8 hónapon keresztül követtük. A diagnózis időpontjának a csontvelő kórszövetteni eredményének megismerését tekintettük. Rögzítettük a betegek nemét, születési idejét, a diagnózist, a diagnózis megállapításának időpontját, az alkalmazott terápiát, valamint a túlélési adatokat. A követési idő alatt regisztráltuk a fertőzéses epizódok előfordulását valamint az adott időszakra jellemező paramétereket, mint a lázas neutropeniás időszakok kezdete és hossza, fehérvérsejt szám, neutrofil szám, CRP, hemokultúra eredménye, kórokozók és antimikrobiális kezelés. Az adatgyűjtést a betegek kórházi dokumentációjából végeztük.

Lázás neutropeniás epizódnak (febrile neutropenia, FN) definiáltunk minden olyan periódust, amelynek kezdetekor az axillárisan mért hőmérséklet meghaladta a 38,0°C-ot és a neutrofil szám kisebb volt, mint 0,5 g/L.

3.3. Genotipizálás

Mindkét genetikai vizsgálatokhoz szükséges tiszta DNS-t klasszikus kisózásos módszerrel nyertük. EDTA-val antikoagulált vérből. Az MBL2 C (rs1800451), D (rs5030737) and Y/X (rs7096206) polymorphizmusainak genotipizálása real-time PCR módszerrel történt a kereskedelmi forgalomban kapható TaqMan® SNP Genotyping Assay-vel (Applied Biosystems, CA, USA), míg a B allél (rs1800450) meghatározását PCR-RFLP módszerrel végeztük.

3.4. MBL-MASP2 komplex aktivitás

Az MBL-MASP2 komplex aktivitást natív vérmintából határoztuk meg. A komplex aktivitását enzimhez kötött immunszorbens vizsgálattal (ELISA) végeztük a diagnózis időpontjában, és ezt megismételtük a lázas neutropeniás időszak alatt. Az MBL-MASP2 komplex aktiválhatóságának mértékét *Presanis* és munkatársai C4-depozíció alapultó módszere alapján határoztuk meg, módosításokkal (*Csuka et al.* 2010). Ez a módszer csak az MBL-MASP2 aktivitásáról ad információt, mert minden egyéb olyan befolyásoló tényezőt kiiktat (pl. egyénekenként különböző C4 szint), amely bizonytalanságot jelentene a komplex működését illetően.

3.5. Statisztikai analízis

A statisztikai analízist az SPSS 13.0 (SPSS Inc., Chicago IL) illetve a GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) programokkal végeztük. A vizsgált változók többsége eltért a normál eloszlástól, így főként nem-paraméteres statisztikai tesztek alkalmaztunk. Két független minta folytonos változóinak összehasonlításakor Mann-Whitney U-tesztet és Kruskal-Wallis tesztet, a kategorikus változók összehasonlításakor Pearson χ^2 próbát használtuk. A fertőzésmentes túlélés vizsgálata során Kaplan-Meier görbét vettünk fel, valamint Cox regressziós analízist végeztünk. A diagnóziskori és fertőzéskori mintákban mért MBL-MASP2 aktivitás mértékét párosított t-teszttel hasonlítottuk össze. Minden próba esetén a $p < 0,05$ értéket tekintettük szignifikánsnak. A folytonos változók esetében a medián (interkvartilis tartomány) tüntettük fel.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Restropektív vizsgálat

Az 54 bevont beteg (24 lány, 30 fiú) átlagéletkora a bevonás időpontjában 9.4 év (tartomány 3 hónap-17 év). A daganatos és a nem daganatos gyermekek MBL2 alléljeinek előfordulását hasonlítottuk össze. Megállapítottuk, hogy nem volt különbség a két csoport között az allél frekvenciák előfordulását illetően sem a promoter régióban, sem az exon 1 polimorfizmusában (Y, X, exon-1 A, B, C, D allélek).

Retrospektív vizsgálatunkban a betegeket három csoportra osztottuk a várható szérumban MBL szintet kódoló genotípusok alapján, melyet *Garred* és munkatársai munkája nyomán határoztunk meg. Az első csoportba tartozó betegek genotípusa várhatóan normál MBL szintet

(YA/YA és YA/XA), míg a második csoportba tartozók genotípusa alacsony MBL szintet kódol (XA/XA és YA/0), továbbá a harmadik csoportba az MBL deficiens betegek kerültek (XA/0 and 0/0).

A kezelés a különböző gyermekkori daganatokban eltérő, ezért értékeltük a különböző betegségek előfordulásának arányát a három genotípus által meghatározott csoportban, a különbség nem volt szignifikáns ($p = 0.85$), így a különböző betegek bevonása nem torzította az eredményeinket, a tendencia egyértelmű volt.

Elemeztük lázas neutropéniás időszakok jellemzőit a diagnózist követő két évben, a három genotípus csoportban mely során azt kaptuk, hogy az alacsony MBL szintet kódoló genotípus csoportban, valamint az MBL deficiens csoportban rövidebb idő telik el a diagnózis és az első fertőzőes időszak között, mint a normál MBL szintet kódoló genotípus csoportban. Habár ez a különbség nem volt szignifikáns ($p = 0.196$), a tendencia megfigyelhető volt.

Hasonló összefüggés látszott a lázas neutropéniás időszakok átlagos hosszát illetően is. A várhatóan alacsony MBL szintet kódoló genotípussal rendelkező betegekben hosszabb volt a lázas neutropéniás időszakok átlagos időtartama ($p = 0.052$), mely fordított kapcsolatot mutatott az MBL szint és a lázas időszakok hossza között.

Az alacsony MBL szintet kódoló genotípussal rendelkező betegeknél több volt a lázas neutropéniás napok száma a kemoterápiás kezelés alatt az első két évben, mint a normál MBL szintet kódolóknál, bár ez az összefüggés sem volt szignifikáns ($p = 0.690$). A lázas neutropéniás időszakok előfordulása hasonló volt az eltérő genotípusú csoportokban (medián 1–1.25 FN/év).

A következő analízisben összevontuk a várhatóan alacsony MBL szinttel rendelkező betegcsoportokat (2-es és 3-as csoport), azokat, akik az első exonban polimorfizmust hordoznak (A/0, 0/0), valamint azokat, akik homozigóták a promoter régiót illetően (XA/XA).

A lázas neutropéniás időszakok átlagos hossza szignifikánsan rövidebb volt ($p = 0.035$), azokban a betegeknél, akik AA genotípussal rendelkeznek, illetve legfeljebb egy X allélt hordoznak a promoter régióban (YA/YA and YA/XA), mint azokban, akik várhatóan alacsony MBL szinttel rendelkeznek (2-es, 3-as csoport). A medián (IQ tartomány) a neutropéniás időszakok átlagos hosszára 3.7 nap (0–5.4) az első csoportban és 5.0 nap (3.8–6.6) az összevont második és harmadik csoportban.

Végül többszörös logisztikus regressziós analízist végeztünk az MBL2 genotípus csoportok és a lázas neutropéniás időszakok átlagos hossza közötti kapcsolat erősségének felmérésére

(dichotomizálva a mediánál: ≤ 4 nap vs. >4 nap). Az alacsony MBL szintet kódoló, illetve MBL deficiens genotípusú csoportban szignifikánsan nagyobbak találtuk az esélyt arra, hogy a lázas neutropeniás időszakok átlagos időtartama hosszabb legyen (>4 nap). Ezt megvizsgáltuk a lehetséges befolyásoló változókra is, mint a diagnózis (OR (95 % konfidencia intervallum), (1.84 (1.04– 3.25), $p = 0.037$), az alkalmazott kemoterápiás protokoll (OR: 1.86 (1.05–3.28), $p = 0.033$), illetve a kemoterápiás kezelés hossza (napok) (OR: 3.34 (1.06–10.56), $p = 0.040$).

4.2. Prospektív vizsgálat

A vizsgálatba 97 gyermeket vontunk be (54 fiú, 37 lány), akiknek az átlagéletkoruk $8,03 \pm 4,43$ év volt. A betegeket a kemoterápia megkezdését követő 8 hónapon át követtük. A kezelés alatt 12 beteg halt meg, közülük hatan 8 hónapon belül, így összesen 91 beteg adatait elemeztük.

A 91 gyermekben meghatároztuk az MBL2 polimorfizmusokat. Ezek megfeleltek a kaukázusi populációban korábban leírt allél frekvenciának. A genotípus gyakoriság egyik polimorfizmus esetén (B, C, D, Y/X) sem tért el a Hardy-Weinberg egyensúlytól.

A további vizsgálatokhoz a betegeket két csoportra osztottuk, aszerint, hogy milyen funkcionális MBL szintet meghatározó genotípussal rendelkeznek. A csoportosítás során a *Frakking* és munkatársai által használt beosztást alkalmaztuk. Az első csoportba kerültek a normál MBL szintet meghatározó genotípussal rendelkező betegek, akiknek a genotípusa YA/YA vagy YA/XA volt, míg a második csoportba az alacsony MBL szintet meghatározó genotípust hordozó betegek (XA/XA, A/0, 0/0) kerültek.

Megvizsgáltuk, hogy az egyes betegségek azonos arányban fordulnak-e elő a két csoportban. Nem találtunk szignifikáns különbséget, így a háromféle betegségcsoport bevonása feltehetően nem torzította a további vizsgálatok eredményét.

A betegek 8 hónapos követése során mindkét csoportban vizsgáltuk a lázas neutropeniás periódusok (FN) karakterisztikáit. Megállapítottuk, hogy szignifikáns különbség van a lázas neutropeniás epizódok esetszáma, a lázas neutropeniás epizódok összesített hossza és az első FN-ig eltelt idő tekintetében. A 8 hónapos követés alatt az alacsony MBL szintet jelentő genotípusba tartozó gyermekeknek szignifikánsan több lázas epizódjuk volt ($p=0,0016$) és az összes lázas neutropeniás napok száma szignifikánsan ($p=0,0112$) magasabb volt, mint a normál MBL szintű csoportban. Hasonlóan jelentős eltérés volt megfigyelhető az első lázas epizódig eltelt napok tekintetében. Az alacsony MBL szintet meghatározó genotípusba tartozó

gyermekeknél az első lázas epizódig eltelt napok száma szignifikánsan alacsonyabb ($p=0,0018$) volt a normál MBL szintet meghatározó csoportba tartozókhoz képest. A megfigyeléseinkkel összhangban azt találtuk, hogy a lázas neutropeniás epizódok átlagos időtartama is hosszabb volt az alacsony MBL szintet kódoló genotípusú csoportban, habár ez az összefüggés nem volt szignifikáns.

Az egyéb vizsgált paraméter tekintetében, úgy, mint a fehérvérsejt szám, C-reaktív protein és az identifikált kórokozó sem találtunk szignifikáns különbséget a két csoportban.

A továbbiakban meghatároztuk a fertőzés kialakulásának valószínűségét a követési időszak alatt, valamint hogy a különböző genotípusú betegek esetében milyen hosszú a lázas neutropeniás epizód mentes időszak a kemoterápia kezdetétől számítva.

A Kaplan-Meier-féle túlélési analízis szerint a normál MBL szintet meghatározó genotípusúak körében később következik be az első fertőzés, illetve kisebb arányban esnek át fertőzésen a követési idő alatt. Az ő esélyeik a hosszabb fertőzésmentes időszakra, jobbak, mint az alacsonyabb MBL szintet kódoló genotípussal rendelkező társaiknak (Logrank teszt $p=0,0029$).

A lázas neutropenia relatív kockázatának vizsgálatára egyváltozós Cox regressziós analízist végeztünk, a diagnózisra, életkorra az alkalmazott kezelésre korrigálva. Ennek alapján az alacsony MBL szintet kódoló genotípusúaknak 1.649 szer (95% CI 1.014-2.681) nagyobb volt az esélye fertőzésre a 8 hónapos követési idő alatt, mint a normál MBL szintet reprezentáló gyermekeknek ($p=0.044$).

Végül elemeztük, hogy az MBL-MASP2 komplex aktivitása eltér-e a vizsgált csoportokban. Hatvannégy gyermektől rendelkezünk a terápia megkezdését megelőző vérvételből származó szérummal. A vizsgálatban résztvevő többi beteg esetében az első vérvételre a terápia megkezdését követően került sor. A 64 gyermek diagnóziskori mintájában a várakozásunknak megfelelő összefüggést kaptuk, miszerint az MBL polimorfizmusok jelentős mértékben befolyásolják az MBL-MASP2 aktivitást. Az alacsony MBL szintet meghatározó genotípusok szignifikánsan alacsonyabb MBL-MASP2 aktivitást eredményeztek ($p < 0,00001$).

Vizsgáltuk továbbá, hogy a lázas periódus alatt hogyan változik a komplex aktivitása a diagnóziskorihoz képest. Negyvenkét gyermek esetében rendelkezünk mindkét mintával. A két csoportba tartozó betegeket külön vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a variáns allélt hordozókban szignifikáns az MBL-MASP2 szint csökkenése a fertőzés alatt vett mintában ($p = 0,006$). Ebben a csoportban a betegek 81%-ában csökkent vagy nem változott a komplex aktivitása, míg a másik genotípus csoportban ugyanez az arány csak 60%-os volt.

5. DISSZKUSZIÓ

A nemzetközi irodalomban egyre több eredmény igazolta az MBL jelentőségét a felnőtteket érintő immunszuppresszív állapotokban, míg gyermekek malignus betegségeinek vonatkozásában ezek az adatok ellentmondásosak. 2007-ben egy retrospektív vizsgálat keretében kerestünk összefüggést az MBL polimorfizmusok és a lázas neutropéniával járó fertőzések között malignus betegségben szenvedő gyermekek körében.

Értékeljük az MBL2 gén polimorfizmusainak hatását a lázas neutropéniás időszakok előfordulására, frekvenciájára és hosszára hemato-onkológiai betegségben szenvedő gyermekekben. Eredményeink azt mutatták, hogy a várhatóan magasabb MBL szintet kódoló genotípusú csoportba tartozó gyermekek körében a lázas neutropéniás napok száma rövidebb a diagnózist követő első két évben.

A variáns allél előfordulása a mi beteg populációnkban is hasonló volt az átlag populációhoz viszonyítva. Vizsgálatunkban hemato-onkológiai betegségben szenvedő gyermekeket hasonlítottunk össze, nem hemato-onkológiai betegségben szenvedő, életkorban hasonló gyermekekkel. Az allélek eloszlásban nem találtunk különbséget két csoport között.

Megvizsgáltuk, a lázas neutropéniás időszakok jellemzőit a diagnózist követő két évben, azt találtuk, hogy a normál MBL szintet kódoló genotípussal (YA/YA és YA/XA) rendelkező betegeknek rövidebb a lázas neutropéniás időszakok átlagos hossza, mint azoknak, akik alacsonyabb MBL szintet kódoló genotípussal rendelkeznek (XA/XA, XA/0, YA/0 and 0/0).

Különbséget találtunk a diagnózis és az első lázas neutropéniás epizód megjelenése, valamint a kemoterápia alatt az összes lázas neutropéniás napok száma között a különböző genotípusú csoportokban, de ezek nem voltak szignifikáns különbségek. Az eredmények pontos tisztázására prospektív vizsgálatot végeztünk.

Prospektív vizsgálatunkban összefüggést találtunk az MBL polimorfizmusok, valamint az MBL-MASP2 komplex aktivitás és a fertőzések kialakulása között malignus hemato-onkológiai kórképben szenvedő gyermekek körében. Vizsgáltuk az összefüggést a lázas neutropéniás időszakok gyakorisága, valamint hossza, a lázas neutropéniás napok száma és a genotípus meghatározáson alapuló várható MBL koncentráció és MBL-MASP2 komplex aktivitás között.

Az alacsony MBL szintet kódoló genotípust hordozó gyermekeknek több lázas neutropéniával járó fertőzése volt a kemoterápiát követő nyolc hónapban, így a követési idő alatti lázas

neutropeniás napok száma is magasabb volt. A fertőzések átlagos hossza azonban nem különbözött a két csoportban, ez alapján az MBL szintje nem befolyásolja számottevő mértékben a kialakuló fertőzések súlyosságát. Egy hosszabb fertőzésmentes időszak esélye is kedvezőbben alakult a normál MBL szintű gyermekek esetében. Náluk kisebb volt az esély, hogy fertőzést kapjanak a követési idő alatt, illetve, ha fertőzésen estek át, akkor is jellemzően később, mint az alacsony MBL szintű gyermekek. Az immunválasz életkori sajátosságai és az alkalmazott terápia intenzitása közötti különbségek figyelembe vételére többváltozós Cox regressziós analízist végeztük, ami szintén alátámasztotta az MBL genotípus szignifikáns prediktív értékét a fertőzések tekintetében.

Vizsgálva az MBL-MASP2 aktivitást a várt eredményt kaptuk, miszerint az MBL polimorfizmusok genotípusa jelentős mértékben befolyásolja a komplex aktivitását. Az alacsony MBL szintet meghatározó genotípust hordozók körében alacsonyabb volt az MBL-MASP2 komplex aktivitása. Összefüggést találtunk a lázas neutropéniával járó fertőzés alatt mért MBL-MASP2 aktivitás diagnóziskorhoz viszonyított változása és a genotípus csoportok között. A komplex aktivitásának fertőzés alatti csökkenése, mely feltehetően a konzumpció következménye, kifejezettebb volt a variáns allélt hordozókban. Ennek szerepe lehet a kemoterápiát követő időszakban észlelt gyakoribb fertőzések kialakulásában.

A nemzetközi irodalomban számos tanulmány foglalkozik az MBL immunszuppresszív állapotokban betöltött szerepével. Bár a kilencvenes évek óta folynak a kutatások, mégsem sikerült egyértelmű konszenzusra jutni az MBL jelentőségét illetően. 1999 óta tíz olyan publikációt találtunk, ami valamilyen formában a fenti kérdésre keresi a választ. A vizsgálatok felében született olyan diszkusszió, ami feltételezi az MBL infekciókra gyakorolt hatását, míg a másik fele ennek ellentmond és elveti annak a lehetőségét, hogy az MBL-nek bármilyen szerepe is lehetne.

Frakking és munkatársai 2011-ben egy átfogó metaanalízis keretében próbáltak magyarázatot találni az ellentmondásos eredményekre. Elemezték a nagy adatbázisokban talált publikációkat 1966 és 2010 között (Embase, Medline, Cochrane Central Register) melyek az MBL szerepével foglalkoznak a hemato-onkológiai betegségben szenvedő gyermekek körében. Véleményük szerint az ellentmondásos eredmények oka a különböző tanulmányok klinikai és metodikai különbségeiben rejlik.

A vizsgálatok heterogenitása mellett az ellentmondásokat magyarázhatja, hogy egyik tanulmány sem kereste a választ a többváltozós kockázatelemzés módszerével. Véleményünk szerint ugyanis az MBL nem tekinthető független kockázati tényezőnek a fertőzésre való

fogékonyságot, és a fertőzés súlyosságát tekintve. Számos már eddig is ismert és még ismeretlen tényező további vizsgálata és kutatása szükséges ahhoz, hogy megértsük és hogy befolyásolhassuk e bonyolult immunológiai szabályozó és védekező rendszer működését.

Bár az eredmények nem egybehangzóak, mégis a genetikai vizsgálatokkal párhuzamosan elindultak a mannóz-kötő lektin szubsztitúciós terápia biztonságosságát, hatásosságát és eredményességét elemző vizsgálatok. Jelenleg kétfajta készítmény ismert, melyekkel klinikai fázis vizsgálatok folynak. Az egyik plazmából izolált, a másik pedig a humán rekombináns MBL. A szerek biztonságosságát és farmakokinetikáját elemző klinikai fázis I. vizsgálatok eredményei szerint sem klinikai, sem laboratóriumi eltérések nem voltak megfigyelhetők a páciensekben. Az eddigi eredmények ígéretesek, az MBL szubsztitúciós terápia klinikai hatásosságának meghatározására fázis II/III randomizált placebo kontrollált, dupla-vak vizsgálatokra van szükség.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy eredményeink alapján érdemes a mannóz-kötő lektin szerepét tovább vizsgálni, valamint a lektin út egyéb komponenseit elemezni, illetve kutatni olyan befolyásoló faktorok meghatározása céljából, amelyeknek funkciója ma még nem ismert, de szerepet játszhatnak a fertőzések kialakulásában és magyarázhatják a korábbi ellentmondásos eredményeket.

Az összes rendelkezésre álló adat körültekintő értékelése rendkívül fontos a komplement faktorok szerepének elemzésében az immunszuppresszált betegeknél. Az egyének közötti különbség, ami befolyásolhatja a fertőzés kockázatát, nem korlátozódik egyetlen gén eltérésére, hanem sokkal inkább a genetikailag meghatározott hajlam kombinációjának az eredménye, amit még a kemoterápiás gyógyszerek is befolyásolnak. Az egyéni jellemzők meghatározása vezethet a személyre szabott terápiai rezsimek bevezetéséhez. Ebből a szempontból is ígéretesnek tűnik az MBL mellett a ficolinok és a collectinek kutatása, valamint ma még nem ismert molekulák keresése.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani mindenkinek, aki segített és inspirált a Ph.D tanulmányaim alatt.

Mindenekelőtt köszönettel tartozom Professzor Kovács Gábor, Ph.D-nak, a Semmelweis Egyetem II. sz. Gyermekklinika vezetőjének, aki lehetőséget biztosított a klinikán a kutató munkám folytatásához és mindvégig támogatott és bátorított munkám során.

Továbbá köszönettel tartozom másik témavezetőmnek dr. med. habil Berecz Csaba Ph.D-nak, a Szegedi Tudományegyetem, Gyermekklinika vezetőjének a támogatásáért, illetve tudományos munkám felügyeletéért.

Szeretném kifejezni hálámat a Füst György Kutatólaboratórium minden dolgozójának, köszönöm segítségüket és támogatásukat.

Külön köszönetet szeretnék mondani Prof. Dr. Zoltán Prohászka Ph.D, DSc-nak, a Füst György Kutatólaboratórium vezetőjének, értékes útmutatásaiért Ph.D tanulmányaim során.

Örök hálával tartozom Szilágy Ágnesnek, soha nem csillapodó lelkesedéséért, valamint, a laboratóriumi és elméleti munkában nyújtott segítségéért.

Továbbá szeretnék köszönetet mondani a Heim Pál Gyermekkórház és a Semmelweis Egyetem II. sz. Gyermekklinika kutatásban résztvevő minden dolgozójának.

Külön köszönettel tartozom két közvetlen munkatársam Dr. Dobi Marianna és Dr. Fadgyas Balázs fáradhatatlan lelkesedéssel végzett munkájáért és folyamatos támogatásáért.

Végül, de nem utolsó sorban különösen hálás vagyok, családomnak és barátaimnak segítségükért és támogatásukért.