

A 8.1-es ősi haplotípus és a *PAI-1* 4G/5G polimorfizmus vizsgálata pneumónia eredetű szepszises betegek körében

Doktori tézisek

Aladzsity István

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományi Doktori Iskola
Elméleti és klinikai immunológia program



Témavezető: Dr. Prohászka Zoltán

Hivatalos bírálók: Dr. Bobek Ilona
Dr. Erdélyi Dániel

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Ligeti Erzsébet
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Tóth Sára,
Dr. Prechl József

Budapest
2012

1. Bevezetés

A kaukázusi populációban a fő hisztokompatibilitási komplex leggyakoribb haplotípusa a 8.1-es ősi kiterjesztett haplotípus (AH8.1). Gyakorisága ellenére a 8.1-es haplotípust eddig főként csak immunpatológiai eltérésekkel (antitestek, autoantitestek, keringő immunkomplexek, TNF- α magas szintje), valamint bizonyos autoimmun betegségek (szisztémás lupus erythematosus, myasthenia gravis, Sjögren-szindróma) kialakulásával hozták összefüggésbe. Laki J. és munkatársai ezzel szemben, mint lehetséges pozitív szelekciós tényezőt azonosította az AH8.1-et. Megfigyelésük szerint cisztás fibrózisban a 8.1-es ősi haplotípus hordozása a tüdőt érintő bakteriális kolonizáció ritkább előfordulásával valamint ezen kolonizációk késleltetett kialakulásával mutatott összefüggést. Ezeket az eredményeket valószínűleg a bakteriális infekciók elleni hatékonyabb immunválasznak köszönhetően lehetett megfigyelni.

A 8.1-es haplotípus infekciókban játszott szerepének további tanulmányozására egy olyan modellrendszert igyekeztünk választani, amely bakteriális fertőzést követően alakul ki, gyakori hospitalizációval rendelkezik és elsődlegesen a tüdőt érinti. A felvázolt kritériumok figyelembevételével a pneumónia eredetű súlyos szepszisre esett a választás. A vizsgálat tervezése a haplotípus azonosítása során genotipizált polimorfizmusok elemzését is figyelembe vette, mivel közülük egyeseknek - funkcionális polimorfizmus révén - önmagukban is jelentős hatásuk lehet a szepszis lefolyására.

Az 1-es típusú plazminogén-aktivátor inhibitor (PAI-1) akut fázis fehérjeként a fibrinolízis és az aktivált protein C gátlásának egyik kulcs enzime. A megemelkedett PAI-1 szintet már több vizsgálat is összekapcsolta az akut légzési elégtelenség (ALI) és a súlyos pneumónia rosszabb kimenetével. A PAI-1 szérumszintjét leginkább befolyásoló genetikai tényező a gén promóter régiójában található 4G/5G inzerciós/deléciós polimorfizmus pedig az egyik legígéretesebb genetikai prediktornak bizonyult nem csak a fertőzőes tüdőbetegségek, de a meningococcalis szepszis és trauma eredetű szepszis súlyosabb kimeneteivel is.

2. Célkitűzés

- Összefüggésbe hozható-e a 8.1-es ősi haplotípus hordozása a pneumónia eredetű súlyos szepszis kedvezőtlen kimeneteivel? Amennyiben igen, akkor ez az AH8.1 hatása vagy pedig a meghatározása során genotipizált egyik funkcionális polimorfizmusé?
- Befolyásolhatja-e a krónikus obstruktív pulmonális betegség (COPD), mint az egyik gyakori pulmonális társbetegség az AH8.1 hatását szepszisben?
- Az AH8.1 hordozása mutat-e összefüggést valamelyik klinikai paraméterrel?

- Az alacsonyabb PAI-1 szinttel jellemzett 5G allél és az 5G/5G genotípus jelenléte összeköthető-e a légúti eredetű szepszis kedvezőbb kimeneteivel?
- Ha igen, akkor ez a genetikai faktor hogyan befolyásolja a 8.1-es haplotípus és a súlyos szepszis kimenetele közötti kapcsolatot?

3. Módszerek

3.1. A vizsgált csoport

A vizsgálatba 207 - tüdőgyulladás következtében kialakult - a Semmelweis Egyetem Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Klinikáján kezelt súlyos szepszises betegeket vontunk be.

3.2. Gén-polimorfizmusok meghatározása

A genomiális DNS-t a Miller és munkatársai által közölt kisozásos módszernek megfelelően perifériás vérből származó mononukleáris sejtekből nyertem ki. Az *LTA* 252A/G (rs909253), a *HSP70-2* 1267A/G (rs1061581) és a *PAI-1* 4G/5G (rs1799768) SNP-k (Single Nukleotide Polimorphism) kimutatása korábban közölt polimeráz láncreakció - restrikciós fragmenthossz-polimorfizmus (PCR-RFLP) módszerek alapján történt kisebb módosításokkal. A

TNF- α -308G/A (rs1800629) és az *AGER* -429T/C (rs1800625) egy pontos nukleotid polimorfizmusokat 5' nukleáz (TaqMan) alapú real-time PCR módszerrel határoztam meg. A *C4A* gén kópiaszámának meghatározását munkacsoportunk által kifejlesztett real-time PCR módszerrel végeztem ABI 7300 Real Time PCR rendszerben

3.3. A HLA-B, HLA-DQB1 és HLA-DRB1 allélek vizsgálata

A HLA-B, HLA-DQB1 és HLA-DRB1 allélek vizsgálatát szekvencia specifikus primer-PCR (SSP-PCR) módszerrel kollaborációs partnereink végezték.

3.4. Az AH8.1 meghatározása

Azokat az egyéneket tekintettük AH8.1 hordozóknak, akikben a következő allélek együttesen fordultak elő: HLA-DQB1*0201 (DQ2), HLA-DRB1*0301 (DR3), *AGER* -429C, *C4A**Q0, *HSP70-2* 1267G, *TNF- α* -308A, *LTA* 252G, HLA-B*0801 (B8)

4. Eredmények

A vizsgálat során sikeresen meghatároztam 207 pneumónia eredetű súlyos szepszises beteg *AGER* -429T/C, *HSP70-2* 1267A/G, *TNF- α* -308G/A, *LTA* 252A/G polimorfizmusainak genotípusait és a

C4A gének számát. A ritka allélek és a *C4A*Q0* együttes előfordulása valamint a HLA tipizálás alapján 25 (12.1%) feltételezett 8.1-es ősi haplotípus hordozót sikerült azonosítani.

A meghatározott 8.1-es ősi haplotípus frekvenciája nem mutatott eltérést a korábban a magyar populációban megállapított gyakorisághoz képest. Emellett sem a haplotípus azonosítására használt polimorfizmusok, sem a *C4A*Q0* allél frekvenciái nem különböztek a kaukázusi eredetű egészséges egyének allél frekvenciáitól.

A 8.1-es ősi haplotípussal történt vizsgálatok során a pneumónia eredetű súlyos szepszisben szenvedő, nem COPD-s betegek csoportjában a haplotípus hordozása védőfaktornak tűnt a szeptikus sokkal szemben. A szeptikus sokk többszemponos logisztikus regressziós analízise során – mely tartalmazta többek között a COPD-t is – a haplotípus az egész betegcsoportra nézve is független védőfaktornak bizonyult a szeptikus sokkal szemben. Ezt a védőhatást ki lehetett mutatni a COPD-ben nem szenvedő betegek regressziós analízise során is. A klinikai paraméterek elemzésével kimutattam, hogy az AH8.1 az enyhébb szepszis jó prognosztikai jelének számító magasabb fehérvérsejt-számmal, vérnyomás értékekkel valamint kevésbé agresszív lélegeztetési paraméterrel mutatott összefüggést a nem-COPD-s pneumónia eredetű súlyos szepszises csoportban.

A haplotípus azonosítása során meghatározott *AGER* -429T/C, *HSP70-2* 1267A/G, *TNF- α* -308G/A, *LTA* 252A/G polimorfizmusok genotípus és allél frekvenciáinak eloszlása valamint a *C4A*Q0*

hordozás a szeptikus sokkal összefüggést nem mutatott. Az intenzív osztályos halálozás vizsgálatakor egyedül az *LTA 252A/G* polimorfizmus genotípus eloszlásával mutattam ki szignifikáns különbséget a túlélők és az elhunytak között, de a vizsgálat független prediktoraira adjusztálva ezt az összefüggést már nem tudtam megerősíteni.

A *PAI-1* 4G/5G-vel végzett vizsgálatok során 207 pneumónia eredetű súlyos szepszises beteg esetében sikeresen meghatároztam a polimorfizmus genotípus és allél frekvenciáit. Az irodalomban fellelhető kaukázusi eredetű egészséges egyének allél frekvenciáitól a *PAI-1* 4G/5G polimorfizmus allél frekvenciája különbséget nem mutatott.

A pneumónia szepszis főbb kimeneteivel végzett egyszempontos analízis során az alacsonyabb *PAI-1* szinttel jellemzett 5G/5G genotípus védőfaktornak bizonyult a szeptikus sokkal szemben. A COPD-ben nem szenvedő betegeknél szintén megfigyelhető volt ez a védőhatás. Ezeket az összefüggéseket a betegcsoport többszempontos logisztikus regressziós analízise után is meg tudtam erősíteni. Emellett a klinikai paraméterek elemzésével megfigyeltem, hogy a *PAI-1* 5G/5G genotípus az alacsonyabb felvételtkor DIC pontszámmal, a magasabb vérnyomás értékekkel valamint a stabilabb légzőrendszerrel is asszociációt mutatott.

A 8.1-es ősi haplotípus és a *PAI-1* 4G/5G polimorfizmus együttes vizsgálata során az 5G/5G genotípust hordozók kizárásakor

az AH8.1-el kapott eredmények megegyeztek a vizsgálat elején tapasztaltakkal, vagyis a haplotípus hordozása védőfaktornak tűnt a szeptikus sokkal szemben. Az öt személy, akik egyszerre hordozták a szeptikus sokkal szemben védőfaktorként ható haplotípust és az 5G/5G genotípust, nem rendelkeztek szignifikánsan alacsonyabb esélyhányadossal azokhoz képest, akik valamelyik védőhatású genetikai faktorból legalább egyvel rendelkeztek. A szeptikus sokk logisztikus regressziós analíziseiben a két védőhatású genetikai faktort egy modellbe építve csak a 8.1-es ősi haplotípussal tapasztaltam független védőhatást a nem COPD-s betegek körében.

5. Következtetés

A fenti eredményből arra következtetünk, hogy az azonosított AH8.1 mellett a meghatározott polimorfizmusok genotípusai és a C4A*Q0 sem hajlamosítanak a pneumónia eredetű súlyos szepszis kialakulására. Viszont az AH8.1-re jellemző módosult immunválasz, melyet eddig főként csak immunpatológia eltérésekkel hoztak összefüggésbe, hatékonyabb lehet a pneumónia eredetű szepszis során fellépő sokkal szemben. Hogy a 8.1-es ősi haplotípus védő hatása a COPD-ben szenvedő betegeket is tartalmazó teljes vizsgálati populációban statisztikailag nem volt kimutatható az valószínűleg a COPD szepsziszre gyakorolt negatív hatásának köszönhető. Megfigyelésünk illeszkedik az ún. kétélű kard hipotézisbe, mely szerint az AH8.1 genetikailag meghatározott módosult

immunválasza magasabb kockázatot jelent bizonyos autoimmun és tumoros betegségekre, viszont előnyösebb lehet más fertőzéssel kapcsolatos megbetegedéseknél, mint például a cisztás fibrózisnál és most már a pneumónia eredetű súlyos szepszisnél is.

Emellett vizsgálatunk ráirányítja a figyelmet az MHC régióban található polimorfizmusok haplotípus elemzésének a fontosságára is. Ez különösen érvényes az asszociációs vizsgálatokban gyakran előforduló *HSP70-2* 1267A/G, *TNF- α* -308G/A, *LTA* 252A/G polimorfizmusokra. A haplotípusokkal történő elemzések az egyéni SNP vizsgálatokkal szemben pontosabban tükrözik a biológiai funkció szempontjából egységet képző génszakaszt és az olyan összetett betegség esetén, mint a szepszis a hatékonyabb genetikai elemzést teszik lehetővé.

A *PAI-1* 4G/5G polimorfizmussal megfigyelt eredményeink arra engednek következtetni, hogy a polimorfizmusnak az alvadási rendszerre kifejtett hatása jelentősen befolyásolja a pneumónia eredetű szepszis kimenetét. Ebben szerepet játszhat egyrészt a *PAI-1* szint szisztémás egész szervezetet érintő hatása, másrészt fontos tényezőnek bizonyulhat a fehérje tüdőben kifejtett lokális szerepe is. Ezen eredmények tovább erősítik azon megfigyelések sorozatát miszerint az alvadási rendszer zavara a súlyosabb szepszis és a súlyosabb tüdőbetegség negatív prediktora.

A 8.1-es ősi haplotípus és a *PAI-1* 4G/5G polimorfizmus együttes vizsgálata arra enged következtetni, hogy a 8.1-es ősi

haplotípussal kapott eredmények nem az 5G/5G védőhatásának köszönhetően alakultak ki. A két genetikai faktor együtt hordozásakor nem tudtunk additív hatást megfigyelni a szeptikus sokkal szemben. Valószínűleg ebben az alacsony esetszám is közrejátszhatott. A 8.1-es ősi haplotípus a COPD-ben nem szenvedő betegek körében erősebb védőfaktornak tűnt a sokkal szemben, mint a *PAI-1* 5G/5G genotípus.

6. Saját publikációk jegyzéke

6.1. A dolgozat anyagát képező publikációk

Aladzsity I, Madách K, Szilágyi Á, Gál J, Péntes I, Prohászka Z, Füst G, *Analysis of the 8.1 ancestral MHC haplotype in severe, pneumonia-related sepsis*. Clin Immunol. 2011 Jun;139(3):282-9

Madách K, **Aladzsity I**, Szilágyi A, Füst G, Gál J, Péntes I, Prohászka Z, *4G/5G polymorphism of PAI-1 gene is associated with multiple organ dysfunction and septic shock in pneumonia induced severe sepsis: prospective, observational, genetic study*. Crit Care. 2010 Apr 29;14(2):R79

6.2. Egyéb közlemények

Aladzsity I, Tóth ML, Sigmond T, Szabó E, Bicsák B, Barna J, Regos A, Orosz L, Kovács AL, Vellai T, *Autophagy genes unc-51 and bec-1 are required for normal cell size in Caenorhabditis elegans.*; Genetics. 2007 Sep; 177 (1): 655-60.

Aladzsity I, Kovács M, Semsei A, Falus A, Szilágyi A, Karádi I, Varga G, Füst G, Várkonyi J, *Comparative analysis of IL6 promoter and receptor polymorphisms in myelodysplasia and multiple myeloma*. Leuk Res. 2009 Nov; 33 (11): 1570-3. Epub 2009 Apr 29.