

**A vaszkuláris endothelialis  
növekedési faktor izoformáinak  
szerepe a tüdő fejlődésében és az  
újszülöttkori tüdő  
betegségekben.**

Doktori tézisek

**Dr. Galambos Csaba**

Semmelweis Egyetem  
Patologiai Doktori Iskola

Témavezető: Paku Sándor, Ph.D.

Budapest  
2008

## BEVEZETŐ

Az emberi tüdő komplex, magasan strukturált szerv, amelyben a nagy kiterjedésű szerteágazó érhálózat közvetlenül érintkezik az ugyanolyan méretű epitheliummal bélelt hólyagokkal, melyeknek elsődleges célja a gázcsere. A tüdő érfejlődése többlépcsős, gondosan összehangolt folyamat, amelyet az angiogenezist stimuláló és gátló anyagok szabályoznak térben és időben. Ezen faktorok többsége három fő növekedési faktor-családba tartozik. Ezek a Vascularis Endothelialis Growth Factor (Vascular Endothelial Growth Factor - VEGF), az Angiopoetin, és az Ephrin család. Az újszülöttek és gyermekek pulmonalis vascularis fejlődési rendellenességei etiológiájának és pathogenesisének megértéséhez nélkülözhetetlen az előbbi növekedési faktor családok egyes tagjai funkcionális hatásainak megértése.

A ritka és letális alveolo-kapilláris diszplázia (ACD) egyik jellemzője az alveolo-kapilláris membrán kialakulásának defektusa, ami együtt jár az alveolaris septumok centrális részében futó diszpláziás, vékonyfalú hajszálerek megjelenésével, és a pulmonális vénák rendellenes lefutásával.

A vascularis endothelialis growth factor (VEGF) központi szerepet játszik az embryonalis fejlődés során, amit az is bizonyít, hogy egérben egyetlen allél eliminációja is letális. A tüdőfejlődés korai szakaszaiban az egér VEGF gén három izoformája (120., a 160., és 188) játszik szerepet. Az izoformák kémiai és biológiai tulajdonságai eltérőek, expressziójuk térbeli és időbeli sajátosságai és szervspecifitása is határozott különbségeket mutat. Ez arra utal, hogy a különböző izoformák eltérő funkciót tölthetnek be a tüdő érhálózatának fejlődésében, valamint, hogy az érhálózat megfelelő morfogeneziséhez a különböző VEGF izoformák koncentráció gradienseinek finom egyensúlya szükséges.

## A TÉMÁHOZ TARTOZÓ PUBLIKÁCIÓK

1. Deutsch G, Young LR, Deterding R, Fan LL, Dell SD, Bean JA, Brody A, Langston C, and the Pathology Cooperative Group: Albright E, Askin F, Baker P, Chou P, Cool C, Coventry S, Cutz E, Davis MM, Dishop MK, **Galambos C**, Patterson K, Travis WD, Wert S, White F, M.D. Diffuse Lung Disease in Young Children: Application of a Novel Classification Scheme. *Am J Respir Crit Care Med.* **2007** Sep 20, in press.
2. **Galambos C**, deMello DE: Molecular Mechanisms in Pulmonary Vascular Development. *Pediatr Dev Pathol*, **2007**; 10:1-17.
3. **Galambos C.**, Nodit L.: Identification of lymphatic endothelium in pediatric vascular tumors and malformations. *Pediatr Dev Pathol.* **2005**; 8:181-9.
4. **Galambos C.** Ng Y., Ali A., Noguchi A., Lovejoy S., D'Amore P., deMello D.E.: Defective pulmonary development in the absence of heparin binding VEGF isoforms. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **2002**; 27:194-203.

A VEGF izoformáinak a tüdő fejlődésében betöltött szerepét és az ACD pathogenezisében való lehetséges részvételét kívántuk tanulmányozni, ezért olyan egér modellt használtunk, amely kizárólag a VEGF120 izoforma expressziójára volt képes.

## CÉLKITŰZÉSEK

1. VEGF120/120 VEGF+/120 transzgén és vad típusú újszülött egerek és magzatok tüdőhajsztálér és légút hálózata morfológiai elváltozásainak vizsgálata.
2. A VEGF120/120 egér és az alveolo-kapilláris diszplázia (ACD) pulmonális fenotípusainak összehasonlítása.
3. Az ACD-s betegek tüdőszövet mintáiban található nyirokér és vérér endothelium D2-40 antitest segítségével való elkülöníthetőségének tanulmányozása.
4. A VEGF120/120 egér az ACD állatkísérletes modelljeként való felhasználhatóságának elemzése.

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### *Kísérleti állatok*

A VEGF120 izoforma-specifikus egérmodellt embrionális stem sejtekben (stem cells - ES) található VEGF gén 6. és 7. exonjának Cre/LoxP rendszer segítségével történő helyspecifikus eltávolításával hozták létre. A transzgén jelenlétét kvantitatív PCR analízissel igazoltuk.

VEGF120/120-at expresszáló, VEGF+/120 szülőktől származó, valamint VEGF+/120 és vad típusú embriók és újszülött egereket vizsgáltunk.

### *Fény-és elektron mikroszkópia*

A gestációs kor szerinti E9 és E10 valamint E15-PN 1 (első postnatalis nap) korú magzatok és újszülöttek tüdejét eltávolítottuk 2%-os glutaraldehydben fixáltuk, amit osmium tetroxid (OsO<sub>4</sub>) utófixálás követett. A minták felszálló acetonsorban történő dehidráció után blokkokat Spurr műgyantába ágyasztuk be. Félvékony metszetek vizsgálata a lapján kiválasztottuk a túlnyomóan perifériás tüdőszövetet (respirációs zónát) tartalmazó területeket. Az ultravékony metszeteket JEOL 100 CX elektron mikroszkóppal vizsgáltuk. A fénymikroszkópos vizsgálathoz a szövetmintákat 10%-os formaldehyd, vagy 4%-os paraformaldehyd segítségével fixáltuk, felszálló alkoholsorban dehidráltuk és paraffinba ágyasztuk be. A 6 µm vastagságú metszeteket hematoxin-eozinnal festettük.

### *Immunhisztokémia*

Az I típusú (T1) pneumocyták azonosítása T1 protein elleni monoklonális antitest (T1α) segítségével történt. Az

## KÖVETKEZTETÉSEK

1. A VEGF120/120 transzgén egér a tüdő érhalózata kialakulásának vizsgálatára alkalmas modell.
2. A VEGF164 és 188 izoforma kulcsfontosságú az egér tüdő fejlődésében.
3. A VEGF164 és/vagy 188 szerepe elhanyagolható a pulmonalis preacinalis érfejlődésben.
4. Egér magzatokban és a fiatal állatokban a heparán szulfáthoz kötődő VEGF164 és 188 izoforma hiánya a tüdő microvascularis hálózatának fejlődési zavarát okozza, és késlelteti a légterek érését.
5. A VEGF 164 és/vagy 188 izoformának koncentrációfüggő hatása van az alveolo-kapillaris membrán kialakulására, és a tüdő hajszálerek fejlődésére.
6. A D2-40 antitest megbízhatóan elkülöníti a nyirokereket a rendellenes lefutású vénák endotheliumától, ezért hasznos marker lehet az ACD szövettani diagnózisában.
7. A VEGF izoformák expressziós zavara szerepet játszhat az ACD pathogenezisében.
8. VEGF120/120 egér egy potenciális, új állatkísérletes modell lehet az alveolo-kapillaris diszplázia tanulmányozására.

### ***D2-40 festődés alveolo-kapilláris diszpláziában***

A D2-40 antitest pontosan és megbízhatóan jelölte a bronchoarterialis egységek nyirokereit, a rendellenes lefutású vénák endotheliuma mindvégig D2-40 negatív maradt.

A panendothelialis CD31 antitesttel az ACD-re jellemző rendellenes lefutású vénák endotheliuma, és a nyirokereik endothel sejtei is egyaránt pozitívan festődtek.

immunhisztokémiai vizsgálatot Tyramide Signal Amplification technikával egészítettük ki.

A tüdő perifériás hajszálér denzitásának meghatározására mindhárom genotípusba tartozó E18.5 korú magzatok fagyasztott tüdőmetszeteit PECAM/CD31 (platelet-endothelial cell adhesion molecule) elleni antitesttel festettük a következő módon: a tüdőket 4°C-on éjszakán át 4%-os paraformaldehiddel fixáltuk, amit 24-24 órás, 15 illetve 30%-os szaharóz oldatban történő inkubálás követett. A tüdőkből fagyasztás követően 10 µm-os metszeteket készítettünk.

A metszeteket antigén feltárás céljából 36%-os urea oldattal kezeltük 95 ± 50°C-os mikrohullámú sütőben 10 percig.

A metszeteket ezután 90 percig CD 31 ellenes antitesttel inkubáltuk majd PBS-es mosás után 1:250-es hígítású biotinált anti-patkány antitesttel illetve 1:100 hígítású avidin-biotin-komplexxel (ABC Kit) inkubáltuk. A detektáláshoz 0.1% 3.3'-diaminobenzidin szubsztrátot használtunk, háttérfestésként Fast Greent. CD 31 pozitívnak tekintettük a metszetek érlumeneiben barnán festődő endotélsejteket.

### ***A Légtér – Parenchima Arány meghatározása***

A légtér - parenchima arányt a Chalkley-féle módszerrel határoztuk meg.

Az E15, E16, illetve PN1 korú magzatok és újszülöttek perifériás tüdőszövetet tartalmazó toluidin kézzel festett félvékony metszeteiről digitális felvételeket készítettünk. Ezután egy 315 rácspontú háló segítségével, meghatároztuk légtér és tüdő parenchima területének arányát.

### ***Az alveolo-kapilláris membrán egységek kvantitatív meghatározása***

Az egy alveolusra jutó alveolo-kapilláris membrán méretét 10 véletlenszerűen kiválasztott perifériás tüdőszövetetből származó

metszet elektronmikroszkópos vizsgálatával határoztuk meg. A metszetek valamennyi genotípusból származó öt-öt PN1 korú újszülött egérből származtak. A vizsgáló személyek számára ismeretlen volt, hogy a minták mely genotípusú állatból származtak. Alveolo-kapilláris membrán egységnek értékeltünk minden kerek vagy ovális, üres vagy vörösvértesteket tartalmazó teret, amelyet endotélium borított és légtérrel volt határos.

#### ***A perifériás tüdőkapillárisok mennyiségének meghatározása***

A perifériás tüdőkapillárisok endotélsejtjeit PECAM/CD31 jelöléssel azonosítottuk. Fénymikroszkópos vizsgálat során 11 nagy nagyítású látótérben jegyeztük fel a PECAM/CD31-el festődő sejtek számát. Genotípusonként 5-5 E15, E16 és PN1 korú állatot vizsgáltunk.

#### ***Érpreparátumok és pásztázó elektron mikroszkópos vizsgálat.***

Tüdő érpreparátumok (korróziós készítmények E15–18, és PN1 korú magzatokból és újszülöttekből) előállításához az elülső mellkasfal eltávolítása után, egy 30 G-s tű segítségével, frissen készített Mercox : catalyst gyanta 50:1 arányú keveréket fecskendeztünk a jobb kamrába sztereó mikroszkóp alatt. A műgyanta polimerizációját követően a szövetek eltávolítása céljából magzatokat és újszülötteket naponta cserélt 20% KOH oldatba helyeztük 7–10 napra. A szárított preparátumokat JEOL JSM-5800 típusú pásztázó elektron mikroszkóppal vizsgáltuk.

#### ***A preacinalis erekből kilépő perifériás érszám meghatározása***

A vizsgált E15 korú magzatokban a preacinalis erekből kilépő perifériás erek számát alacsony (43x) nagyítású elektron

genotípusok között a trachea és főhörgők méretének tekintetében nem találtunk különbséget.

#### ***A D2-40 antitest lymphás endothelium iránti szenzitivitása és specificitása***

A vizsgált szövettani elváltozások 14 nyirokér malformatioból és 11 vascularis laesioból származtak. A betegek életkora 2 hét és 16 év között volt, a laesiók lokalizációja a bőrtől a belső szervekig változott. A patológiai vizsgálat eredménye nagyrészt megegyezett a klinikai diagnózissal. A D2-40 antitest minden (25/25) esetben csak a morfológiai szempontból nyirokérnek tekintett vékonyfalú csatornák endotheliumához kötődött.

A nem nyirokér jellegű érrelváltozások endotheliuma, és a nem – laesios jellegű arteriák és vénák endotheliuma nem festődött meg (0/25).

A megvizsgált nyirokérelváltozásokból 5 esetben találtunk több mint 75% D2-40 pozitív festődésű csatornát (A kategória), öt szövettani elváltozásban körülbelül 50%-ot (B kategória), és négy elváltozásban kevesebb, mint 25% D2-40– pozitív csatornát (C kategória). Minden nyirokér laesióban találtunk D2-40 pozitív ereket. Néhány esettől eltekintve, amelyben minden nagyobb nyirokér megfestődött, a nagy, dilatált nyirokerek, általában részleges D2-40 pozitivitást mutattak.

Ezzel ellentétben a kis nyirokerek és a limfoid szövet nyirok-kapillárisai egyenletesen jól festődtek D2-40-el. A CD31 antitest minden laesióban egyformán jelölte az artériák, vénák, kapillárisok és (kis és nagy) nyirokerek endotheliumát, és a vascularis laesiókban látható endothelsejtjeiket is.

A D2-40 antitest specificitása a nyirokér endothelsejtekre 100 % volt (0% álpozitív festődéssel), szenzitivitása 60-65%-osnak becsülhető (34-40% álnegatív eredmény).

A CD31 antitest szenzitivitása minden endothelialis sejtre nagyon magasnak (100%) bizonyult, de egyáltalán nem specifikus a nyirokendothelre.

társaikhoz képest (488/11 nagyfelbontású mikroszkópiás terület;  $P < 0.03$ ). A heterozigóta magzatok érdenzitása nem különbözött szignifikánsan a vad-típusúakétól (488 vs. 499/11 nagyfelbontású mikroszkópiás terület;  $P < 0.4$ ).

#### ***Az érpreparátumok pásztázó elektron mikroszkópos vizsgálata***

A VEGF120 homozigóta magzatok teljes pulmonalis vascularis érhálózatának műgyantával való feltöltés utáni kipreparálása legkorábban az E15 életkorban sikerült. A VEGF120 homozigóta magzatok érpreparátumai minden vizsgált időpontban (E15, 17, 18, és P1) kisebb méretűek és denzitásúak voltak, mint a heterozigóta és a vad-típusú állatok preparátumai. Pásztázó elektron mikroszkópos vizsgálattal a proximális érágak (preacinalis erek) tekintetében nem volt szignifikáns számbeli vagy átmérőkülönbség, de a VEGF120 homozigóta magzatok perifériás érhálózata minden életkorban feltűnően gyérebb volt, mint heterozigóta és vad-típusú társaiké.

A VEGF120 homozigóta magzatok perifériás vég-hajszálereinek belső átmérője nagyobb volt, szerkezete pedig durvább, mint a heterozigóta és vad-típusú állatoké.

A heterozigóta magzatok érpreparátumainak átlag méretei nem különböztek jelentősen a vad-típusú magzatokétól, ez arra utal, hogy a nagyerek mérete nem szenvedett változást, de a perifériás érhálózat sűrűsége csökkent. A fenti különbségek minden vizsgált magzatban kimutathatóak voltak, a legidősebb, PNI korban vizsgált tüdőérpreparátumokkal bezárólag. Az érpreparátumok dimenziói a tüdők átlagos méretét tükrözik. A gestatio során a vad-típusú és a heterozigóta állatok tüdő méretei hasonlóak volt. Ezzel szemben a homozigóták tüdeje a tüdőcsúcs-bázis távolságot tekintve 0,5-1 cm-rel kisebbnek bizonyult. Mindemellett az E18,5 korú homozigóta állatok tüdeje relatíve kevesebb vért tartalmazott, mint vad-típusú és heterozigóta társaiké, ez az érpreparátumokon látott csökkent perifériás érdenzitással függ össze. Mindezek ellenére a vizsgált

mikroszkópos felvételeken határoztuk meg. Ebben életkorban a distalis (perifériás) érhálózat még nem annyira sűrű hogy elfedje a proximális ereket, ezért az érszám még könnyen meghatározható volt.

#### ***A D2-40 antitest lymphás endothelium iránti szenzitivitása és specificitása***

14 gyermekkori nyirok- és 11 vascularis elváltozásban szenvedő betegből származó véletlenszerűen kiválasztott szöveti mintákat D2-40 illetve CD31 antitesttel festettük. A nyirokereket gold standard morfológiai kritériumok alapján azonosítottuk, azaz a vékony falú, endothel sejtekkel határolt, billentyűs vagy billentyű nélküli, intraluminalisan proteinszerű anyagot tartalmazó, társult nyirokszövetrel rendelkező csatornácskákat azonosítottuk nyirokérként.

A specificitás meghatározásához valamennyi kórszöveti minta artériás és vénás endothelium sejtjeinek D2-40-el való festődését értékeltük, kihagyva a nem-endotheliális sejt típusokat. A szenzitivitás meghatározása érdekében a nyirokér elváltozást tartalmazó mintákat a D2-40 pozitív nyirokér tartalom függvényében osztályoztuk. A-osztályú szövettani eltérésnek tekintettük a több mint 75%-ban festődött ereket tartalmazó mintát, B-osztályúnak a kb. 50%-os, C-osztályúnak pedig a kevesebb mint 25%-ban D2-40 pozitívan festődött nyirokereket tartalmazó mintát. A részleges D2-40 pozitív festődésű ereket nem számítottuk be. A D2-40 festődés százalékos arányát két egymástól független vizsgáló, 90%-os egyezéssel határozta meg.

Minden szövettani elváltozásban összehasonlítottuk a D2-40-pozitív csatornák festődési jellemzőit a CD31-pozitív csatornákéval. ACD-s betegekből származó paraffinos tüdő metszetekben levő broncho-arterialis szövetegységekben is elemeztük az erek endothel sejtjeinek D2-40 és CD31 pozitív festődését.

Az egyes genotípusok közti különbségek statisztikai szignifikanciáját Student féle t-próbával vizsgáltuk.

## EREDMÉNYEK

### *Az állatok genotípusa*

Valamennyi magzat és újszülött állat genotípusát genomialis DNS felhasználásával, PCR-al azonosítottuk. A PCR vizsgálat eredményét Southern Blot erősítette meg. A VEGF magzatok genotípus előfordulási aránya normál Mendeli eloszlást mutatott.

### *A légter – parenchima arány és az alveolo-kapilláris membrán egységek számának vizsgálata*

Az E15 és E16 korú magzatok és PN1 korú újszülöttek alveolusainak érése VEGF 120 homozigóta állatokban késleltetett volt. A VEGF 120 E 15 korú magzatok egy fejlődési szakasszal az maradtak el (pseudoglanduláris vs. canaliculáris) a vad-típusú, ugyanazon alomból származó állatokhoz képest. A légutak és az alveolusok fejlettségi szintjének megállapításához a légter és a parenchima egymáshoz viszonyított arányát határoztuk meg. Ez az arány az E15 VEGF120 homozigóta állatokban szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult, (0,05 vs. 0,1;  $P < 0.007$ ), mint a vad-típusú társaikban. A heterozigóta állatok légtartó terei nagyobb méretűek voltak, mint a homozigótáké, a légtartó tér/parenchima arányuk 0,0858-nak adódott ( $P < 0.08$ ). A heterozigóták és vad-típusú társaik közti különbség nem volt szignifikáns ( $P < 0.19$ ). A VEGF120 homozigóták légter/parenchima arányának vad-típusú társaikhoz

viszonyított csökkenése az E16 korú magzatokban is kimutatható volt, (0.175 vs. 0.322;  $P < 0.006$ ), csakúgy, mint a PN1 korú újszülöttekben (1.359 vs. 2.478;  $P < 0.016$ ). Az idősebb, E16 és PN1 korú heterozigóta magzatokban és újszülöttekben is alacsonyabb légter/parenchima arány adódott vad-típusú társaikhoz viszonyítva.

Az E9 és E10 korú állatok tüdejének transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálata mindhárom genotípusba tartozó példányok esetében haematopoeticus sejteket tartalmazó kapillárisokat igazolt. A PN1 korú VEGF120 homozigóta állatokban a normális szerkezetű alveolo-kapilláris (levegő-vér gát) egységek száma kisebb volt, mint vad-típusú társaikban. A vad-típusú egereknél alveolaris epithelium sejtek és kapilláris endothel sejtek szorosan illeszkedtek. Ezzel szemben a VEGF120/120 egerek legperifériásabb ereit is 2-3 sejtréteg választotta el az alveolus lumenétől.

Megvizsgálva a VEGF120 homozigóták egy alveolusra jutó alveolo-kapilláris membránjainak számát (1,15), az szignifikánsan kisebb volt, mint vad-típusú társaiké (4,65,  $P < 0.0001$ ). A heterozigóta állatok alveolo-kapilláris membránjainak száma alveolusonként (3,45) szignifikánsan nagyobb volt, mint a VEGF120 homozigótáké ( $P < 0.001$ ), de a vad típusú állatokhoz viszonyítva ( $P < 0.009$ ) még mindig szignifikánsan kisebb értéket mutatott.

### *Az I típusú alveoláris sejtek vizsgálata*

A PN1 egerek I típusú sejtjei (T1<sub>er</sub> immunhisztokémia) mennyiségében és eloszlásában nem volt különbség a három genotípus között.

### *A perifériás tüdő erek kvantitatív meghatározása*

Az E18,5 korú magzatok perifériás érdenzitása szignifikánsan alacsony volt mind a vad-típusú (384 vs. 499/11 nagyfelbontású mikroszkópiás terület;  $P < 0.03$ ), mind pedig heterozigóta