

EGYETEMI DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**VASZKULÁRIS ENDOTHELIÁLIS NÖVEKEDÉSI FAKTOR
ÉS CITOKINEK VIZSGÁLATA
SZISZTÉMÁS SCLEROSISBAN SZENVEDŐ BETEGEK
KÖNNYMINTÁIBAN**

Dr. Rentka Anikó

Témavezető: Dr. Kemény-Beke Ádám, PhD



DEBRECENI EGYETEM
KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2016

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Rentka Anikó, okleveles általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Klinikai Orvostudományok doktori iskolája
(Klinikai vizsgálatok programja) keretében

Témavezető: Dr. Kemény-Beke Ádám, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Hernádi Zoltán, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Erdődi Ferenc, az MTA doktora
Dr. Végh Mihály, kandidátus

A doktori szigorlat időpontja: 2016. április 29. 11.00
DE ÁOK Szülészeti és Nőgyógyászati Intézet könyvtára

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Dankó Katalin, az MTA doktora
Dr. Dégi Rózsa, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Hernádi Zoltán, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Dankó Katalin, az MTA doktora
Prof. Dr. Erdődi Ferenc, az MTA doktora
Dr. Dégi Rózsa, PhD

Dr. Végh Mihály, kandidátus

Az értekezés védésének időpontja: 2016. április 29. 13.30
DE ÁOK Belgyógyászati Intézet "A" épület tanterme

RÖVIDÍTÉSEK

BCA: biciklonsav

CD: cluster of differentiation

CFD: komplement faktor D

CHI3L1: kitináz-3-szerű protein 1

CRP: C-reaktív protein

KCS: keratoconjunctivitis sicca

IFN- γ : interferon-gamma

IL: interleukin

IP-10: interferon gamma-indukált protein-10

MCP: monocita kemoattraktáns protein

MIG: interferon-gamma indukált monokin

MMP: mátrix metalloproteináz

RNA: ribonukleinsav

RNP: ribonukleoprotein

sIgA: szekretórikus immunoglobulin A

SSc: szisztémás sclerosis

TGF- β : transzformáló növekedési faktor-béta

TNF- α : tumor nekrozis faktor-alfa

VDBP: vitamin D kötő protein

VEGF: vaszkuláris endotheliális növekedési faktor

1 BEVEZETÉS, IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1 A szisztémás sclerosis

A szisztémás sclerosis (SSc) krónikus autoimmun kötőszöveti betegség, amely a bőr, a perifériás- és a visceralis erek, valamint számos belső szerv fibrózisával és degenerációjával jár. A kórkép elsősorban nőkben jelentkezik, általában a 4. életévtized után. Ritka betegségnek számít mivel a prevalenciája 4-126/1 000 000, az incidenciája pedig 1.2-19.1/1 000 000/év. Az SSc egyike az életet veszélyeztető immun-mediált reumatológiai kórképeknek. A bőr megvastagodásán és az ujjperceken kialakuló fekélyeken kívül a belső szervek progresszív károsodása, valamint a polyarthrititis felelős a magas morbiditási és mortalitási arányokért. Legsúlyosabbak a tüdő-, a szív- és a vese érintettséggel járó formák.

1.1.1 Az SSc szemészeti szövődményei

Kevés tanulmány foglalkozik az SSc szemészeti szövődményeivel, ezek is inkább eset riportok. Mindössze két átfogó tanulmány található az irodalomban, de a kórkép ritka mivoltából adódóan ezek is alacsony betegszámúak. A szemészeti tünetek a betegség bármely szakaszában jelentkezhetnek és a szem számos szövetét érinthetik. A lágyszövet-fibrózis és gyulladás klinikailag a szemhéjak bőrének feszülése és teleangiectasiája formájában jelenik meg. A leggyakrabban megfigyelt szemészeti elváltozások a periorbitális oedema, az ectropium, és a ciliaris madarosis. SSc-ben szenvedő betegekkel kapcsolatos vizsgálataink során legtöbbször a száraz szem, keratoconjunctivitis sicca (KCS) okozta panaszokkal találkoztunk.

A KCS az életminőséget jelentősen befolyásoló tényező, amely vagy a praecornealis könnyfilm csökkent termelődése, vagy fokozott párolgása következtében alakul ki. SSc esetében előbbi jelenség a könnymirigy fibrózis- okozta károsodásával, utóbbi a szemhéjak korlátozott mozgásából adódó gyengült pislogással hozható összefüggésbe. Molekuláris szinten a könnyben lévő gyulladásos citokinek szintjének emelkedése jellemzi a KCS-t.

Azért, hogy az SSc-ben előforduló szemtüneteket jobban megérthessük, röviden bemutatom a kórkép pathomechanizmusának három alappilléret, amelyek a kiterjedt kísér-vaszkulopátia, az autoantitest termeléssel járó immunregulációs zavar és a progresszív fibrózis.

1.1.2 Az SSc pathomechanizmusa

SSc-ben az elsőként megjelenő kóros elváltozás a kapillárisok endotheliális sérülése, amelynek háttérében ischaemiás-reperfúziós folyamatok károsodása zajlik. A mikrovaszkulátúra strukturális eltéréseit a kompenzatórikus angiogenezis, illetve vaszkulogenezis nem tudja helyreállítani, mivel ezek a folyamatok kapillármikroszkópos vizsgálattal igazoltan zavart szenvednek SSc-ben. A kapillárisok érlumen szűkülete és fibrotikus átalakulása szisztémás és progresszív folyamat.

Mind a celluláris, mind a humorális immunitás szerepet játszik az SSc pathomechanizmusában. A kezdeti szakaszban főként CD4+ T-sejtek, illetve makrofágok kóros aktivációja és szöveti infiltrációja figyelhető meg. Ezek a sejtek limfokinek és növekedési faktorokat termelnek, amelyek fibrotikus folyamatokat indítanak be.

Ezen kívül a kóros B-sejt aktiváció következtében számos autoantitest emelkedett szintjét kimutatták SSc-ben szenvedő betegek szérumában, amelyek közül a legjelentősebbek az antinukleáris antitest, az Scl-70/DNS topoizomeráz ellenes antitest, az anti-U3-ribonukleoprotein/fibrillarin, az anti Th/To és az anti-RNS-polimeráz I-II. A B-sejtek az autoantitesteken kívül az IL-6 termeléssel a fibrotikus folyamatokhoz is kapcsolódnak.

A fibroblasztok túlzott termelődése és az extracellularis matrix fehérjék – például az I-es típusú kollagén – lerakódása vezet fibrózishoz és végső soron az adott szerv szerkezetének károsodásához. A trombociták, az endotheliális és epitheliális sejtek által termelt mediátorok hatására kialakult mikrokörnyezet a fibroblasztok kollagén termelésén kívül növekedési faktorok és citokinek szekrécióját is elősegítik.

1.1.2.1 A vaszkuláris endotheliális növekedési faktor szerepe SSc-ben

A vaszkuláris endotheliális növekedési faktor (VEGF) az egyik legfontosabb pro-angiogenetikus faktorként jelentős szereppel bír az érújdonképzésben, az angiogenezis különböző lépéseiben – úgymint a vazodilatáció, az endothelium permeabilitás fokozása, a perivaszkuláris matrix újraépítése és az endothelsejtek proliferációjának és migrációjának indukálása. A VEGF szerepe a különböző szemészeti betegségekben is jól ismert. Összefüggésbe hozták a retina számos megbetegedésével, többek között az időskori maculadegenerációval, a diabeteses retinopathiával, a retinopathia prematurorummal, a sarlósejtes retinopathiával, és a szemfenéki érelzáródásokkal. Közvetetten befolyásolja a másodlagos glaucoma és az öröklődő retina disztrófiák kialakulását is.

Bár SSc-ben hiányzik a krónikus szöveti ischaemiára adott megfelelő angiogenetikus válasz, amely a kapillárisok elvesztését eredményezi a VEGF expresszió szintje paradox módon magasabbnak bizonyult szérumbizsgálatok során. Distler és mtsai jelentősen emelkedett VEGF értékeket mértek SSc-ben szenvedő betegek szérumban egészséges egyének szérumbmintáiban mért szintekhez viszonyítva, továbbá szignifikáns különbséget találtak a VEGF mennyiségi meghatározása során a betegség alcsoportjától és az anti-Scl-70 antigén meglététől függően. Későbbi tanulmányok megerősítették, hogy a VEGF-termelés fokozott az SSc-ben szenvedő betegek dermisének és epidermisének különböző sejtjeiben.

1.1.2.2 Gyulladásos citokinek és kemokinek SSc-ben

Az SSc-ben szenvedő betegek keringésében emelkedett a monociták, a makrofágok és a T-sejtek száma. Az általuk termelt szolúbilis mediátorok, többek között a citokinek elősegítik az endothelkárosodás és fibrózis kialakulását. A makrofágok által termelt citokinek – interleukin (IL)-1, tumor nekrosis faktor-alpha (TNF- α), interferon-gamma (IFN- γ), IL-6, transzformáló növekedési faktor-beta (TGF- β), vérlemezke eredetű növekedési faktor – a gyulladás és a szöveti fibrózis szabályozásában vesznek részt. A különböző kemokinek közül a monocita kemoattraktáns protein (MCP)-1 bír kulcsfontosságú szereppel a szöveti fibrózis kialakulásában SSc esetében. A T-sejtek szintén fontos molekuláris szereplői a betegség pathomechanizmusában a makrofágok aktiválása, valamint a gyulladásos- és pro-fibrogenetikus citokinek direkt felszabadítása révén. Ennek megfelelően az infiltráló leukociták által szekretált citokinek valószínűleg részt vesznek az SSc során kialakuló szöveti fibrózisban, mivel stimulálják a fibroblasztok kollagén termelését.

1.1.3 Terápia

Bár immunszuppresszív és szövődmény-specifikus kezeléseket általánosan alkalmaznak SSc-ben standardizált módszer nem létezik a kezelésben. Szenzitívebb és specifikusabb biomarkerek segíthetnének az optimális terápiás megközelítések kiválasztásában.

Az SSc-ben szenvedő betegek szemészeti elváltozásait gyakran alábecsülik és nem vagy nem helyesen kezelik. Érdeklődésünk egyrészt azért irányult a könnyvizsgálatokra, hogy jobban megérthessük a szemészeti eltéréseket ebben a kórképben, másrészt azért, hogy a fontos biomarkereket egy szérumtól eltérő testfolyadékban monitorozhassuk.

1.2 Könnyvizsgálat

A könnyben lévő fehérjék mennyiségi meghatározása növekvő érdeklődésre tart számot a szemészetben, de gyakran technikai akadályba ütközik egyrészt a kis elérhető könny mennyiség, másrészt a könny összetételének komplexitása miatt. Könnyből végzett vizsgálatok során a fő kihívást a könny mintavétel jelenti, hiszen jelentősen befolyásolja az analitikai eredmények precizitását és reprodukálhatóságát. A könny mintavétel alapvetően két módon történhet. A direkt módszer során kapilláriscsőbe történik a mintavétel, amelyhez sok esetben előzetes stimulációra vagy különböző mennyiségű sóoldat szemrésbe juttatására lehet szükség a könny felhígításához és ezáltal a szemfelszínen lévő könny térfogatának növeléséhez.

Az indirekt módszerek esetén a könny minta gyűjtése adszorbens eszközök segítségével – pl. Schirmer tesztsík, szűrőpapír lemez, poliészter rúd vagy cellulóz szivacs – történik.

Ezek közül a legáltalánosabban használt könny mintavételi eszköz a kapilláriscső, mivel ennek van a legkisebb irritáló hatása, továbbá gyógyszer szint monitorozással kapcsolatos vizsgálatokban is ez a módszer bizonyult a legpontosabbnak a vérben lévő gyógyszer koncentráció könnyből történő meghatározásában. Legfőbb hátránya, hogy kisebb mennyiségű könny gyűjthető (2-3 μ l) a többi mintavételi technikával összehasonlítva. A Schirmer tesztsíkot széleskörűen alkalmazzák, mivel nagyobb mennyiségű könny nyerhető segítségével, viszont irritálja a szemfelszínt, így növeli a reflexes könnyezést, ezáltal a meghatározni kívánt molekulák koncentrációjának alulbecslését okozva.

2 CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataink során a következő célokat tűztük ki:

1. A megfelelő könnymintavételi módszer kiválasztása VEGF és citokinek vizsgálatára SSc-ben szenvedő betegeknél.
2. SSc-s betegek könnymintáiban a VEGF kimutatása.
3. SSc-s beteges könnymintáiban a VEGF koncentráció meghatározása és összehasonlítása az egészséges kontrollok könnymintáinak VEGF koncentrációjával.
4. Az immunpathogenezisben és a gyulladáshoz vezető folyamatokban szereplő citokinek minél szélesebb skálájának meghatározása SSc-ben szenvedő betegek könnymintáiban.
5. A beteg és kontroll könnyminták citokin eredményeinek összehasonlítása, majd a szignifikáns különbséget mutató molekulák kiválasztása további vizsgálatokra.
6. A kiválasztott mediátorok koncentrációjának egy nagyobb szenzitivitású és specificitású módszerrel történő kimutatása mind a betegek mind az egészségesek könnymintáiban.

3 BETEGEK ÉS MÓDSZEREK

3.1 Betegek és egészséges kontrollok

Az első tanulmányunkba 43 SSc-ben szenvedő beteget (40 nő és 3 férfi) és 27 egészséges kontrollt, a másodikba pedig 9 beteget (9 nő) és 12 kontrollt vontunk be. A betegek átlagéletkora 61.85 (48-74) év volt. Az SSc diagnózis felállítása nemzetközi kritériumrendszer alapján történt. A DE ÁOK Reumatológiai Tanszék járóbeteg szakrendelésen megjelent és osztályon bent fekvő SSc-ben szenvedő betegeket válogattunk be vizsgálatainkba. Egyik beteg sem szenvedett másodlagos Sjögren-szindrómában. Az egészséges kontroll csoportot korban és nemből megegyező egyének alkották, akiknek kórelőzményükben sem autoimmun betegség, sem szemészeti megbetegedés nem szerepelt. A betegek nem részesültek immunszuppresszív terápiában a mintavétel idején.

Írásos beleegyező nyilatkozat kitöltése után került sor a mintavételre a Helsink Deklaráció szerint.

3.2 Könnymintavétel

Üveg kapilláriscső segítségével (Haematokritkapillare, 75 μ L, L 75 mm, Hirschmann Laborgerate, Germany) stimulálás nélküli könnymintát gyűjtöttünk az alsó könnymeniscus temporalis részéről, amennyire csak lehetséges kerülve a szemfelszín és a szemhéj irritálását.

Első tanulmányunk során a könnymintákat 11 és 16 óra között gyűjtötte ugyanaz a vizsgáló. A könnysekreációs sebességet a könnymennyiség és a könnymintavételi

idő hányadosából kaptuk meg. A könny mennyiség a kapilláriscsőben lévő folyadékoszlop hosszából és a cső ismert átmérőjéből volt kiszámítható. A könny mintavételi időt stopperórával mértük.

A második tanulmány során 9 és 11 óra között történt a könny mintavétel.

A könny mintákat alacsony kötőkapacitású Eppendorf csövekbe juttattuk egy üres injekciós tű és egy steril szérum 1-es tű segítségével, ezután szárazjégen szállítottuk a laboratóriumba, ahol $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk feldolgozásig. Minden esetben mindkét szemből gyűjtöttünk könny mintát, amelyeket az alacsony könny mennyiség miatt összevegyítettünk.

3.3 Összfehérje és VEGF tartalom meghatározása SSc-ben szenvedő betegek könny mintáiban

Ahhoz, hogy a VEGF-et értékelni tudjuk elsőként a könny minták összfehérje tartalmát határoztuk meg a biuret módszeren alapuló BCA protein assay kit (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) alkalmazásával, a kis könny minta térfogat miatt 384 lyukú mikrolemezre adaptálva. Ez egy két-komponensű, nagy precizitású, detergens kompatibilis módszer. A fehérje koncentráció meghatározásának alapja, hogy cisztein, cisztin, triptofán, tirozin és a peptid kötések alkalikus közegben a Cu^{2+} ionokat Cu^{1+} -ra redukálják. Az oldat fényelnyelése a Cu^{1+} koncentráció függvénye, amelyet $A=562\text{nm}$ -en, kalibrációs oldatsorral párhuzamosan mértünk.

A VEGF könny mintából történő meghatározására human VEGF kitet használtunk a gyártó utasításai szerint (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN USA), amely kvantitatív szendvics immunoassay technikán alapul.

3.4 Könnyben lévő citokinek membránon és mikro-gyöngyökön rögzített antitestek alkalmazásával történő meghatározása (membran array és multiplex bead) SSc-ben szenvedő betegeknél

A sejtek, sejtörmelék és a szennyező anyagok eltávolítása céljából a könnymintákat 10 percig, percenként 1500 fordulatszámon, 4 °C-on centrifugáltuk felhasználás előtt.

A kontrollok és a betegek könnymintáin citokin profilozást végeztünk. Egyidejűleg 102 citokin relatív szintjét határoztuk meg a Proteome Profiler Human XL Cytokine Array Kit (R&D Systems) segítségével 50 µl mintamennyiségből a gyártó utasításai szerint. A membránon megjelenő jelek pixel denzitásának meghatározása Image J szoftverrel történt.

További analízisre a citokin array eredmények alapján azokat a molekulákat válogattuk ki, amelyek a legjelentősebb eltérést mutatták az egészségesek és az SSc-ben szenvedő betegek könnymintáiban. Így az MCP-1, a komplement faktor D (CFD), az interferon gamma-indukált protein-10 (IP-10) és a C-reaktív protein (CRP) szintjét mértük a hígított könnymintákban (CFD, MCP-1 és CRP 1:10; IP-10 1:40) a Human Luminex Performance Assays (R&D Systems) kittel, a gyártó utasítása szerint, Bio-Plex 200 mérőműszerrel (Bio-Rad).

3.5 Statisztikai analízis

A statisztikai analízishez a Prism 5 statisztikai szoftvert (GraphPad Software Inc.) használtuk. Az értékek összehasonlítását Mann-Whitney U-teszttel végeztük. A 0.005-nél alacsonyabb p értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

A citokin array eredményei 4 kontroll és 4 SSc-s beteg mintáiból származnak. A denzitometria integrált denzitás értékeit a háttér értékekkel korrigáltuk, majd a pozitív kontroll jelekhez és a minták összfehérje tartalmához normalizáltuk.

4 EREDMÉNYEK

4.1 VEGF mennyiségi meghatározása SSc-ben szenvedő betegek könnymintáiban

Az átlagos könny szekréción sebesség 4.53 $\mu\text{l}/\text{perc}$, median érték 3.8 $\mu\text{l}/\text{min}$ (1.5-25.6) volt.

A könny mintavétel időtartama 20 és 313 másodperc között változott, amíg a vizsgálathoz minimálisan szükséges mintamennyiséget elértük.

A könny minta mennyisége betegek esetén átlagosan 10.4 μl (1.6-31.2)–nek, egészséges kontrollok esetén pedig 15.63 μl (3.68-34.5)–nek adódott.

Az SSc-ben szenvedő betegek könny mintáiban az átlagos összfehérje szint 6.9 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (1.8-12.3), az átlagos VEGF mennyiség pedig 4.9 $\text{pg}/\mu\text{l}$ (3.5-8.1) volt stimulálás nélküli könny szekréción esetén.

Az egészséges kontrollok könny mintái átlagosan 4.132 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (0.1-14.1) fehérjét és 6.15 $\text{pg}/\mu\text{l}$ (3.84-12.3) VEGF-et tartalmaztak.

4.2 Könnyben lévő citokinek membran array és multiplex bead analízise SSc-ben

4.2.1 Eredmények a citokin array vizsgálatok során

Stimulálás nélküli könnyminták citokin profilozását végeztük egy 102 citokin detektálására képes citokin array segítségével a kontrollok és az SSc-ben szenvedő betegek esetén. Az array vizsgálattal a gyulladáshoz mediátorok irányába eltolt képet kaptunk. A 102 vizsgált molekula közül a következő 9 szintje volt szignifikánsan emelkedett a betegek könnymintáiban a kontrollokhöz képest: CFD, kitináz-3-szerű protein 1 (CHI3L1), CRP, epidermalis növekedési faktor (EGF), IP-10, MCP-1, IFN- γ által indukált monokin (MIG), matrix metallopeptidáz 9 (MMP-9), vitamin D-kötő fehérje (VDBP).

Citokin vagy kemokin neve	Normalizált denzitás – SSc-ben szenvedő betegek	Normalizált denzitás – egészséges kontrollok	A különbség szignifikanciája (p)
CFD	50.35 (23.17-53.76)	22.33 (18.39-24.75)	0.002072
CHI3L1	94.41 (31.9-95.98)	31.06 (20.37-45.85)	0.000000
CRP	25.98 (15.28-53.16)	4.55 (4.35-4.66)	0.018250
EGF	53.42 (34.86-70.23)	34.04 (20.42-47.61)	0.032818
IP-10	123.42 (93.81-152.35)	21.99 (12.12-29.01)	0.000000
MCP-1	19.93 (5.38-42.44)	1.72 (1.44-2.27)	0.044726
MIG	22.85 (5.6-64.14)	3.58 (3.29-3.88)	0.033787
MMP-9	49.10 (4.24-129.04)	12.74 (10.29-17.56)	0.000068
VDBP	31.35 (11.87-64.68)	10.18 (8.3-13.84)	0.019733

1. Táblázat. Citokin és kemokin normalizált denzitás értékek SSc-ben szenvedő betegek és egészséges kontrollok könnymintáiban

Az integrált denzitás értékek pozitív kontroll jelekre és összproteinre voltak normalizálva. Az átlagos összfehérje érték 40.9239 $\mu\text{g/ml}$ volt SSc-ben szenvedő betegek könnymintáiban és 42.536 $\mu\text{g/ml}$ az egészségesek könnymintáiban, a különbség ebben a tanulmányban nem volt szignifikáns ($p=0.863604$).

4.2.2 A multiplex citokin bead assay eredményei

A magasabb szenzitivitású és specificitású Luminex bead assay-vel a 4 általunk kiválasztott molekula szintjét határoztuk meg 9 SSc-ben szenvedő beteg és 12 egészséges kontroll könnymintáiban.

A mérések során a következő eredményeket kaptuk:

Átlagosan a CRP koncentráció 103.44 (3.57-359.02) $\mu\text{g/mg}$ protein volt az SSc-ben szenvedő betegek könnymintáiban és 7.41 (0.87-18.03) $\mu\text{g/mg}$ protein az egészségesekében. Az átlagos IP-10 mennyiség 564.78 (252.62-1107.2) $\mu\text{g/mg}$ proteinnek adódott a betegek esetén és 196.118 (101.66-514.37) $\mu\text{g/mg}$ proteinnek az egészségesek esetén. Átlagosan 2626.83 (457.84-5619.4) $\mu\text{g/mg}$ protein MCP-1-et mértünk a betegek könnymintáiban, míg 661.27 (397.87-1171.4) $\mu\text{g/mg}$ proteint a kontrollokéban. Az átlagos CFD szint 15.27 (5.00-35.28) $\mu\text{g/mg}$ proteinnek adódott SSc-ben és 23.31 (5.18-106.63) $\mu\text{g/mg}$ proteinnek a kontroll könnymintákban.

A CFD kivételével ($p=0.34224$) minden eredmény szignifikánsnak mutatkozott. A szignifikancia CRP esetén $p=0.0138773$, IP-10 esetén $p=0.00115$, MCP-1 esetén $p=0.1187$ volt. Mind a citokin array, mind a multiplex bead assay eredmények alapján az IP-10 mennyiségében mutatkozott a legjelentősebb különbség a két vizsgálati csoport között.

5 MEGBESZÉLÉS

Bár jól ismert, hogy szisztémás autoimmun kórképekben gyakoriak a szemészeti szövődmények, könnyvizsgálatot mégsem végeznek rutinszerűen ilyen megbetegedésekben. A citokinek kétféle módon juthatnak a praecornealis könnyfilmbe. Egyes citokinek lokálisan termelődnek és diffúzióval jutnak a szemfelszínre a cornealis és conjunctivális epithelsejtekből, mások a conjunctivális erekből szivárognak a könnybe. Könnyvizsgálat során a kihívás abban rejlik, hogy bár a mintavétel noninvazív, mintamennyiség azonban csak korlátozottan gyűjthető. Több szisztémás- és szemészeti kórképben is végeztek már könnyvizsgálatot, Leonardi és mtsai például több mediátort, köztük citokineket, MMP-okat, egyéb angiogenetikus- és növekedési faktorokat mutattak ki vernalis keratoconjunctivitisben szenvedő betegek könnymintáiból. A cornealis érújdonképződés kialakulása során fontos szerepet játszó molekulákat szintén vizsgálták korábban könnyben és párhuzamosan szérumban. Azt tapasztalták, hogy a pro-angiogenetikus citokinek szintje, úgymint az IL-6, az IL-8, a VEGF és a MCP-1, szignifikánsan magasabb volt könnyben, mint szérumban. Ezek a megállapítások is alátámasztják vizsgálataink jelentőségét.

A direkt és az indirekt könnymintavételi módszerek irodalmi áttekintése után a kapilláriscsővel történő mintavételi technikát választottuk SSc-ben szenvedő betegek könnymintavételéhez. A mintát a kapilláriscsőből egy üres injekciós tű és egy steril szérum 1-es tű segítségével juttattuk az Eppendorf csőbe. Ez a mintavételi módszer megfelelőnek bizonyult a könnyben lévő citokinek analíziséhez.

5.1 VEGF mennyiségi meghatározása SSc-ben szenvedő betegek könnymintáiban

A VEGF az egészséges könny alkotóeleme. Ezt Vesaluoma vizsgálatai támasztják alá, aki megállapította, hogy a könny átlagos VEGF koncentrációja 5 pg/μl (4-11), ami megfelel a mi vizsgálati eredményeinknek is, miszerint az egészséges kontrollok könnymintái átlagosan 6.15 pg/μl (3.84-12.3) VEGF-et tartalmaztak.

A könnysekréció sebességét 8.1 μl/min (0.7-20.8)-nek találták azzal a könnymintavételi technikával, amelyet mi is alkalmaztunk vizsgálataink során.

Az SSc-ben szenvedő betegek könnysekréciós sebessége szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a kontroll csoporthoz képest, amelynek hátterében a KCS állhat. A KCS lehet magának az SSc-nak is, vagy akár a kezelés mellékhatásainak következménye is.

A könnysekréciós sebesség 67%-kal alacsonyabb volt SSc-ben szenvedő betegek esetén az egészséges kontrollokhoz képest. A különbség szignifikáns volt ($p < 0.01$). A jelenség hátterében a betegség pathofiziológiája, nevezetesen a könnymirigy fibrotikus elváltozása állhat.

Az összfehérje mennyisége SSc-ben szenvedő betegek könnymintáiban 42%-kal magasabb volt a kontroll csoporthoz képest. Ennek az is lehet a magyarázata, hogy az összfehérje koncentráció csupán relatív emelkedést mutat a csökkent könnytermelés miatt. Bár a várt eredményekkel ellentétben a VEGF koncentráció SSc-ben szenvedő betegek könnymintáiban mintegy 20%-kal csökkent, ez szintén lehet a betegek csökkent könnytermelésének következménye. További vizsgálatok szükségesek a jelenség megértéséhez, például párhuzamosan szérum és könnyvizsgálatok elvégzése ugyanazon betegeknél.

5.2 Könnyben lévő citokinek membran array és multiplex bead analízise SSc-ben

SSc-ben szenvedő betegek könnyében egy 102 citokin egyidejű meghatározására alkalmas citokin array segítségével az immunpathogenezisben és a gyulladásos folyamatokban szereplő citokinek széles skáláját határoztuk meg.

A citokinek profilozása során a 102 citokinből 9 szintje mutatkozott szignifikánsan magasabbnak SSc-ben szenvedő betegek könnyemintáiban. Közülük mindegyik a gyulladásos- és az immun-mediált folyamatok résztvevője, amely egyrészt igazolja az SSc-ben szenvedő betegeknél gyakran előforduló KCS következtében kialakuló szemfelszíni gyulladás jelenlétét, másrészt korábbi vizsgálati eredményekkel is összhangban van az SSc pathomechanizmusát illetően.

Négy molekulát választottunk ki további vizsgálatokra. A kiválasztott citokinek szintjét a nagyobb szenzitivitású és specificitású mikro-gyöngy technika segítségével határoztuk meg, noha korábban ezt a módszert sejtkultúrákra, szérumra és plazmára hitelesítették. Közülük az IP-10, az MCP-1 és a CRP volt szignifikánsan magasabb az SSc-ben szenvedő betegek könnyemintáiban. Korábban szérumból már kimutatták ezeknek a mediátoroknak az emelkedett koncentrációját, emiatt felvetődik a könnyvizsgálat, mint lehetséges alternatíva, az SSc diagnosztikai, prognosztikai és terápiás vonatkozásaiban.

Az IP-10 egy 10 kDa nagyságú fehérje, amely gyulladásos kemokinként funkcionál. Továbbá, angiosztatikus tulajdonságából kifolyólag gátolja az érújdonképződést, valamint az immunrendszer szabályozásában is részt vesz. Egyes tanulmányok magasabb szérum- és szöveti IP-10 értékeket igazoltak különböző bakteriális-, vírusos-, gombás- és protozoális fertőzésben, csakúgy, mint autoimmun kórképekben, köztük SSc-ben is.

A CRP akut fázis fehérjeként a fertőzések és a gyulladásos folyamatok legfőbb markere. A CRP koncentráció emelkedettnek bizonyult SSc-ben szenvedő betegek szérumában, továbbá a rossz prognózissal is korrelál, így az SSc aktivitásának és súlyosságának megítélésére is használható.

Az MCP-1 egyike az SSc gyulladásos- és fibrotikus folyamataiban szereplő nagy pathogenitású kemokineknek. Azon kívül, hogy kemoattraktáns tulajdonságokkal bír a monociták és a T-sejtek irányába, a fibroblasztok kollagéntermelését is stimulálja. Hasegawa és mtsai a bőr- és tüdőérintettséggel járó SSc-ben szenvedő betegek szérumában mutatták ki emelkedett szintjét. Ezen kívül igazolták in vitro dermális fibroblasztokban MCP-1 mRNS fokozott termelődését is.

Biokémiai tulajdonságaik alapján az utóbbi három molekula közül az IP-10 és az MCP-1 lehet alkalmas célpont egy olyan pathomechanizmusú kórkép terápiás vonatkozásaiban, mint az SSc.

Ezeknek a faktoroknak könnyben történő meghatározása egy non-invazív alternatívája lehet a szérumvizsgálatoknak SSc-ben szenvedő betegek esetén. Továbbá azoknál a betegeknél, akiknél az SSc szemészeti következményeként KCS alakul ki, a könnyvizsgálat sokkal informatívabb lehet a szemfelszíni eltérések tekintetében, ezáltal segíthet a megfelelő műköny, vagy gyulladáscsökkentő szemcsepp kiválasztásában.

6 ÚJ EREDMÉNYEK

1. A könnymintavételi módszerek irodalmi áttekintése után kidolgoztuk a könnymintavétel megfelelő methodikáját és kapilláriscsővel gyűjtöttünk könnyet VEGF és citokinek vizsgálatára SSc-ben szenvedő betegektől.
2. Elsőként határoztuk meg SSc-s betegek könnymintáiban a kórkép pathogenezisének fő vaszkuláris szereplőjeként ismert VEGF koncentrációját kvantitatív szendvics immunoassay technikán alapuló VEGF kit segítségével.
3. Kvantitatív szendvics immunoassay technikán alapuló vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy a VEGF koncentráció mintegy 20%-kal alacsonyabb volt SSc-ben szenvedő betegek könnymintáiban az egészséges kontrollok könnymintáiban mért értékekhez viszonyítva.
4. Elsőként végeztünk citokin profilozást SSc-ben szenvedő betegek könnymintáiban egy 102 citokin egyidejű meghatározására alkalmas citokin array segítségével.
5. Kimutattuk, hogy a citokinek profilozása során a 102 citokinből 9 szintje mutatkozott szignifikánsan magasabbnak SSc-s betegek könnymintáiban. Közülük mindegyik a gyulladásos- és az immun-mediált folyamatok résztvevője, amely egyrészt igazolja az SSc-ben szenvedő betegeknél gyakran előforduló KCS következtében kialakuló szemfelszíni gyulladás jelenlétét, másrészt korábbi vizsgálati eredményekkel is összhangban van az SSc pathomechanizmusát illetően.

6. A magasabb szenzitívású és specificitású mikro-gyöngy technika segítségével először mutattuk ki könnymintákban, hogy SSc-ben szignifikánsan magasabb az IP-10, az MCP-1 és a CRP szintje. Korábban szérumban már igazolták ezeknek a mediátoroknak az emelkedett koncentrációját, emiatt felvetődik a könnyvizsgálat, mint lehetséges alternatíva az SSc diagnosztikai, prognosztikai és terápiás vonatkozásaiban.

7 KULCSSZAVAK

Szisztémás sclerosis, keratoconjunctivitis sicca, könny, vaszkuláris endotheliális növekedési faktor, citokin, könnymintavétel, összfehérje, citokin array, multiplex bead assay

8 ÖSSZEFOGLALÁS

Az SSc egy krónikus autoimmun betegség, kiterjedt kisér-vaszkulopátiával, immun diszregulációval, autoantitest termeléssel és progresszív fibrózissal.

Kevés tanulmány foglalkozik az SSc szemészeti manifesztációival, habár ezek a betegek gyakran szenvednek az életminőségüket kedvezőtlenül befolyásoló szemészeti tünetektől, pl. száraz szem szindrómában.

A VEGF, mint a fő pro-angiogén faktor, kulcsfontosságú szerepet játszik az SSc pathomechanizmusában. Bár a VEGF emelkedett szintjét szérumban már igazolták, SSc-ban szenvedő betegek esetében korábban könnyvizsgálatot még nem végeztek ennek tanulmányozására. A VEGF mennyiségi kimutatásán kívül szeretnénk volna meghatározni ezeknek a betegeknek a könnyében citokinek és kemokinek széles skáláját egy szemikvantitatív módszerrel, majd az egészséges kontroll személyek könnymintáihoz képest szignifikáns különbséget mutató molekulákat egy nagyobb szenzitivitású és specificitású kvantitatív módszerrel tovább vizsgálni.

A könnymintavétel módja meghatározó lehet a vizsgálat hatékonyságának és az eredmények minőségének szempontjából, ezért az irodalmi adatok áttekintése után a kapilláriscsővel történő könnymintavételi módszert választottuk a stimulálás nélküli könnymintavételhez.

Az SSc-s betegek könnymintáiban mintegy 20%-kal alacsonyabb VEGF szintet mértünk az egészséges kontrollokhoz viszonyítva. Annak magyarázata, hogy miért nem emelkedett a VEGF mennyisége SSc-s betegek könnymintáiban további vizsgálatokat igényel, például egyidejű szérum analízist ugyanazon betegek esetén, akiktől könnymintát gyűjtöttünk. Citokin array eredményeink a gyulladással járó folyamatok irányába eltolódott citokin profilt mutattak SSc-ben szenvedő betegek könnyében. Vizsgálataink alapján a citokineknek és a kemokineknek egy olyan csoportját írtuk le, amelyek fontos szerepet játszanak az SSc szemészeti

folyamatainak pathogenezisében, továbbá kiváló célpontok lehetnek a jövőben a szemészeti manifesztációkkal bíró SSc kezelésében.

9 FÜGGELÉK



DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR



Nyilvántartási szám: DEENK/42/2016.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Rentka Anikó
Neptun kód: KEMU6K
Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Rentka, A.**, Hársfalvi, J., Szűcs, G., Szekanecz, Z., Szodoray, P., Kóroskényi, K., Kemény-Beke, Á.: Membrane array and multiplex bead analysis of tear cytokines in systemic sclerosis. *Immunol. Res. Epub ahead of print (2015)*
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12026-015-8763-9>
IF:3.098 (2014)
2. **Rentka, A.**, Hársfalvi, J., Berta, A., Kóroskényi, K., Szekanecz, Z., Szűcs, G., Szodoray, P., Kemény-Beke, Á.: Vascular Endothelial Growth Factor in Tear Samples of Patients with Systemic Sclerosis. *Mediat. Inflamm. 2015 (Article ID 573681), 2015.*
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/573681>
IF:3.236 (2014)

A közzétett folyóiratok összesített impact faktora: 6,334

A közzétett folyóiratok összesített impact faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 6,334

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2016.02.19.



10 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként megköszönöm témavezetőmnek, Kemény-Beke Ádámnak a folyamatos iránymutatást, bátorítást, valamint a kutatás és a disszertáció megírása során nyújtott mérhetetlen segítségét.

Köszönetemet szeretném kifejezni Berta András Professzor Úrnak, a Szemklinika Igazgatójának, hogy lehetőséget biztosított számomra PhD munkám elvégzéséhez.

Nagyon hálás vagyok Hársfalvi Jolán Tanárnőnek a laboratóriumi útmutatásaiért a munkacsoportjában eltöltött idő alatt, és a cikkek, valamint a disszertáció megírása során tett javaslataiért. Szintén hálával tartozom munkacsoportjának és tanítványainak a vizsgálatok kivitelezésében nyújtott közreműködésükért.

Szeretnék köszönetet mondani Köröskényi Krisztina Tanársegédnőnek azért a nélkülözhetetlen segítségért, amit a közös munka során nyújtott a Biokémiai- és Molekuláris Biológiai Intézetben, és azt követően is.

Hálával tartozom Szekanecz Zoltán Professzor Úrnak, a Reumatológiai Tanszék vezetőjének és Szűcs Gabriella Professzornőnek, valamint a Reumatológiai Tanszék összes munkatársának, akik munkámat segítették az elmúlt évek során.

Köszönöm az összes SSc-ben szenvedő betegnek és a kontrollcsoport tagjainak, hogy könnyemintájukkal hozzájárultak ahhoz, hogy ez a kutatás megvalósuljon.

Végül, de nem utolsósorban, köszönöm családomnak és barátaimnak, hogy szeretetükkel és türelmükkel támogattak a kutatás éveit és a disszertáció megírása során.