

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Vesebetegségek háttérében álló genetikai eltérések
vizsgálata**

Dr. Orosz Petronella Éva

Témavezető: Dr. Szabó Tamás



DEBRECENI EGYETEM
Laki Kálmán Doktori Iskola

Debrecen, 2024

Vesebetegségek hátterében álló genetikai eltérések vizsgálata

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

Írta: Dr. Orosz Petronella Éva, gyermekgyógyász szakorvos

Készült a Debreceni Egyetem Laki Kálmán doktori iskolája
(Trombózis, hemosztázis és vaszkuláris biológia doktori programja) keretében

Témavezető: Dr. Szabó Tamás, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla József, MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Tislér András, PhD
Dr. Flaskó Tibor, PhD

A doktori szigorlat időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület
könyvtár

2024. március 22. 12 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Fekete Andrea, MTA doktora
Dr. Ujfalusi Anikó, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Balla József MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Fekete Andrea, MTA doktora
Dr. Ujfalusi Anikó, PhD
Prof. Dr. Tislér András, PhD
Dr. Flaskó Tibor, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Sürgősségi Tanszék előadóterem
2024. március 22. 13:30 óra

Bevezetés

Az öröklődő, genetikailag meghatározott vesebetegségek nagy csoportja számos embert érint szerte a világban. A felnőttkorú krónikus veseelégtelen betegeknél gyakori az „ismeretlen etiológiájú krónikus vesebetegség” diagnózis, ami számos esetben rejthet fel nem ismert, genetikai háttérű kórképet. A vesefunkció romlása ugyanis alattomosan, tünetek nélkül zajlik mindaddig, míg a közepesen beszűkült vesefunkció előidézte renovaszkuláris hipertónia, vagy a végstádiumú veseelégtelenség, urémia tünetei fel nem hívják rá a figyelmet. A diagnosztikát nehezítő tényezők a nem típusos formában megjelenő kórkép, a családi anamnézis hiánya, vagy negativitása (de novo mutációk esetén), a genotípus-fenotípus összefüggések ismeretének hiánya és az észlelt tünetek nem megfelelő értékelése. Mindezek miatt különösen fontos, hogy már gyermekkorban figyeljünk az alarmírozó tünetekre.

A genetikai vizsgálmódszerek fejlődésével egyre pontosabban lehet meghatározni a kóroki mutációt. Ezek költséges vizsgáló eljárások, emiatt megfontoltan, a lehetőségekhez mérten célzottan kell alkalmazni őket. Kiemelten fontos tehát a klinikum, a fenotípus megfigyelése, szükség szerint időszakos újraértékelése.

Az örökletes vesebetegségek közül talán a policisztás vesebetegségek a legjelentősebbek. Az ide sorolt entitások a ciliopátiák nagy csoportjába tartoznak, amik a primer ciliumokat (csillókat) felépítő, azokkal kapcsolatban álló fehérjék mutációival magyarázhatóak. Jelenleg több, mint 950 gént azonosítottak ciliopátiák háttérében, köztük a policisztás vesebetegségért felelős géneket is.

A mindkét vesében kialakuló, számukban és méretükben akár élethosszig növekvő ciszták az autoszomális domináns policisztás vesebetegségre (ADPKD), és az autoszomális recesszív policisztás vesebetegségre (ARPKD) jellemzőek, de egyéb ciliopátiákban is előfordul a vese cisztás elváltozása. Differenciáldiagnosztikai szempontból felmerülhet a nephronophthisis (NPHP), az autoszomális domináns tubulointersticiális vesebetegségek (ADTKD) körébe tartozó megbetegedések és a sclerosis tuberosa (TSC) is. Az elkülönítésben segíthet a veseérintettség felfedezésének időpontja, a képalkotó vizsgálat során leírt eltérések (hiperreflektivitás, ciszták jelenléte, elhelyezkedése, mérete), a vesék hosszanti (kranio-kaudális) átmérője, az üregrendszer megjelenése, a vesefunkció időbeli változása. A renális hipertónia megjelenése általános tünet, gyakran korrelál a vesefunkció károsodásának mértékével, ám bizonyos kórképek esetén akár első tünet is lehet. Fontos az extrarenális tünetek keresése és nyomon követése, ciszták előfordulása májban, lépben, hasnyálmirigyben,

intrakraniális aneurizmák azonosítása, májfibrózis, idegrendszeri érintettség, mentális elmaradottság, retina elváltozások, avagy diabetesre utaló jelek, illetve a bőrtünetek.

Célkitűzések

Doktori munkám során a gyermekkori policisztás vesebetegségek klinikai tünetei és a kórképek háttérében álló genetikai eltérések közötti genotípus-fenotípus összefüggések vizsgálata volt a fókuszpont. Mindez differenciáldiagnosztikai támpontok alapját képezheti a mindennapi gyermeknefrológiai gyakorlatban.

További célom volt a nem típusos megjelenésű esetekben szükséges komplex gondolkodásmód, a kiterjesztett vizsgálati rendszerek felkutatása, egy célzott vizsgálati stratégia kialakítása, valamint annak megjelölése, hogy az adott kórképben mikor szükséges ettől eltérve kiterjesztett vizsgálatot végezni.

Az autoszomális recesszív policisztás vesebetegség háttérében a *PKHD1* gén kóroki szerepe elsődleges, ennek ellenére a fenotípusosan ARPKD-nek megfelelő betegek 13-20%-ánál nem azonosítható mutáció a gén szekvenálásával. Munkám során arra a kérdésre kerestem a választ, hogy ilyen esetekben nem detektálható pozícióban lévő mutációk, esetleg kópiaszám változások állnak a háttérben, és a genetikai vizsgálómódszerek ilyen irányú kiterjesztése szükséges, vagy „second locus” mutációk, fenokópiák kutatása a célszerű következő lépés? Ezáltal az autoszomális recesszív policisztás vesebetegséggel született gyermekek kivizsgálása során jól alkalmazható algoritmus kialakítása volt a további cél. Kerestem továbbá azokat a fenotípusos jegyeket, melyek kimondottan erősítik az ARPKD diagnózist.

A vizsgálataim másik középpontja a sclerosis tuberosával, ezen belül *TSC2-PKD1*-folyamatos géndeléciós szindrómával élő betegek csoportja. Mind a sclerosis tuberosa, mind az autoszomális domináns policisztás vesebetegség diagnózisa kimondható a klinikai tünetek, hivatalos kritériumrendszerek, illetve családfa elemzés alapján. A két gént érintő nagy deléción gyanúja a klinikum alapján szintén felmerülhet, de erre teljes megerősítést csak a genetikai vizsgálat adhat. A humángenetikai törvény értelmében nem végezhető humángenetikai vizsgálat 14 éves kor alatt, hacsak nincs terápiás vagy gondozást érintő stratégiai következménye. Azonban *TSC2-PKD1* folyamatos géndeléciós szindróma esetén jogosan merül fel annak igénye, hogy a gyermekek és családjuk tájékoztatást kaphassanak az akár 3 évtizeddel korábban kialakuló végstádiumú veseelégtelenséggel járó betegségről. Tekintettel arra, hogy gyógyító eljárás nem áll rendelkezésre a kórképben (megoldást csak a

vesetranszplantáció jelent) arra a kérdésre kerestem a választ, mikor javasolt mégis genetikai vizsgálatot indítványozni? Az elsődleges vizsgálat módjának meghatározása, illetve a vizsgált beteganyagban észlelték alapján a célzott genetikai vizsgálat kiterjesztésének indikációja is igen fontos kérdés.

Összefoglalva, az alábbi kérdések megválaszolása munkám célja:

1. Melyek azok a fenotípusos jegyek, amik ARPKD diagnózisát nagyban valószínűsítik?
2. A fenotípusosan ARPKD-vel diagnosztizált gyermekeknél mutációt nem azonosító PKHD1 gén szekvenálást követően a gén kópiaszám változásainak vizsgálata, vagy fenokópiák keresése a javasolható következő eljárás?
3. Mikor és milyen genetikai vizsgálómódszer elsődleges alkalmazása javasolt *TSC2-PKD1* folyamatos géndeléciós szindróma gyanúja esetén?
4. Mikor javasolt a *TSC2-PKD1* folyamatos géndeléciós szindróma esetén végzett genetikai vizsgálat kiterjesztése?

Betegek és módszerek

ARPKD betegek vizsgálata

36 gyermek került beválasztásra ARPKD feltételezett diagnózisával az alábbi kritériumok alapján:

1. Hiperreflektív vesék mikrocisztákkal
2. A renális ciszták átmérője nem haladja meg a 2 cm-t
3. Legalább az egyik oldali vese kranio-kaudális átmérője meghaladja az 50 percentilis értéket
4. A családfa analízis alapján autoszomális receszív öröklésmenet valószínűsíthető
5. Nem észlelhető urogenitális malformáció
6. Nincs olyan jellegzetes extrarenális tünet az elsődleges diagnózis idején, ami egyéb ciliopátiára jellemző

A vesék kranio-kaudális átmérőjének percentilis meghatározása a <https://radiology-universe.org/calculator/pediatric-kidney-sizes/calculator.php> online kalkulátor segítségével történt.

A betegeket 4 nagy magyarországi gyermeknefrológiai centrum beteganyagából választottuk.

A betegektől nyert vérmintából kivont DNS mintákat a Debreceni Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézetének Klinikai Genetikai laboratóriumában vizsgálták, elsőként a *PKHD1* gén Sanger szekvenálása történt. Amennyiben ennek eredménye mindkét allélon patogén mutációt igazolt, a szülők vérmintájából célzott vizsgálat történt a transz-heterozigótaság igazolására. Amennyiben a Sanger szekvenálással nem sikerült biallélikus mutációt igazolni, a *PKHD1* gén MLPA vizsgálatával szűrték a kópiaszám változásokat. Ennek negatív eredménye esetén a betegek fenotípusos jegyeit újraértékeltük, és a felmerülő egyéb ciliopátiáknak megfelelő második gén (*NPHP1*, *HNF1B*, *TMEM67*, *PKD1*, *PKD2*, *TSC2*) vizsgálata történt. Ezen vizsgálatok részben a Debreceni Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézet Klinikai Genetikai laboratóriumában, részben az MTA-SE Lendület Nephrogenetikai laboratóriumban, részben a Szegedi Tudományegyetem Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ Gyermekgyógyászati Klinika és Gyermekegészségügyi Központ Genetikai Diagnosztika Laboratóriumában történtek. A kapott genetikai eredményeket az érintett betegek és hozzátartozók tájékoztatását követően, a jelen tudományos vizsgálathoz rendelkezésemre bocsátották.

TSC2-PKD1 folyamatos géndeléciós szindrómával élő betegek vizsgálata

4 beteg került beválasztásra az alábbi kritériumok alapján:

1. A Nemzetközi Tuberous Sclerosis Complex Konszenzus Munkacsoport irányelve alapján megfogalmazott kritériumtünetek szerint a sclerosis tuberosa klinikai diagnózisa kimondható (2 major kritériumtünet, vagy 1 major+2 minor kritériumtünet hordozása szükséges)
2. A vesékben a ciszták dominálnak, AML-ek száma alacsony
3. A ciszták méretbeli vagy számbeli növekedése az első 3 életévben a klasszikus sclerosis tuberosához viszonyítva fokozott (>10 ciszta legalább 1 cm átmérővel 3 éves kor előtt)
4. A veseciszták mérete a követés során meghaladja a 2 cm-es méretet
5. A vesék kranio-kaudális átmérője meghaladja az 50 percentilis értéket vagy az életkorhoz viszonyított +2SD-t

A betegek genetikai vizsgálata a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ Orvosi Genetikai Intézetének laboratóriumában zajlott. Két esetben a *TSC1* és *TSC2* gének szekvenálásával indult, majd patogén mutációt nem detektálva, továbbá a progrediáló klinikai tüneteket is figyelembe véve MLPA vizsgálat történt első körben ugyanezen gének, majd a *PKD1* gént is érintő nagy delécio vizsgálatára. Két esetben már célzottan, a *TSC2* és *PKD1* gének MLPA

vizsgálata történt. Egy beteg esetében láttuk indokoltnak az MLPA vizsgálat további kiterjesztését, és az *NTHL1* gén vizsgálata is megtörtént. A szülők célzott vizsgálata két beteg esetében valósult meg. Az érintett betegek és szüleik tájékoztatását követően rendelkezéseimre bocsátották a kapott eredményeket jelen tudományos vizsgálatához.

Mind az ARPKD, mind a *TSC2-PKD1*-FGDS betegpopulációban a betegek nefrológiai követése, gondozása során az alábbi rendszeres klinikai vizsgálatok történtek:

- Képkalkuló vizsgálatok: hasi ultrahang illetve hasi MRI, utóbbi szükség szerint rövid általános anesztéziában.
- Vérnyomásmérés a gyermekek testméretéhez igazított felkaros vérnyomásmérő mandzsettával. (A hipertóniát jelentő 95 percentilis fölötti vérnyomásértékeket a Magyar Hypertonia Társaság egészségügyi szakemberek, gyermekgyógyászok részére alkotott online kalkulátorának segítségével határoztam meg: <https://www.merckmanuals.com/medical-calculators/BloodPressurePercentBoys.htm> és <https://www.merckmanuals.com/medical-calculators/BloodPressurePercentGirls.htm>).
- Laboratóriumi vérvizsgálat többek között a vesefunkciós értékek monitorozására. A kapott szérum kreatinin eredményből Schwartz szerint kalkulált GFR megállapítás történt. Két beteg esetén rendszeres everolimus gyógyszer szint vizsgálat.
- Vizelet vizsgálat proteinuria szűrésére, illetve potenciális húgyúti fertőzés esetén alkalomszerűen.

Genetikai vizsgálatok

ARPKD betegek genetikai vizsgálatai

A genomiális DNS-t a véralvadásgátolt perifériás vérmintából standardizált módszerekkel nyerték. A *PKHD1* gén Sanger szekvenálását végezték elsőként a betegeknél. A biallélikus pontmutációval nem rendelkező betegeknél ezt követően a mintát kópiaszám változások irányába vizsgálták MLPA-val. Szülői mintákat célzottan, az azonosított mutációkra szűrték a szegregáció és a transz-heterozigótaság megerősítésére. Újraértékelve azon betegek fenotípusát, akiknél ezen vizsgálatokkal sem sikerült biallélikus *PKHD1* mutációt igazolni, a

továbbiakban célzottan kerestük egyéb ciliopátia génekben a lehetséges mutációt. A “second locus” mutációk irányában célzottan az *NPHP1*, *HNF1B*, *TMEM67*, *PKD1* és *TSC2* gének vizsgálata történt különböző metodikával.

A TSC2-PKD1 folyamatos géndeléciós szindrómával élő betegek genetikai vizsgálatai

Két beteg esetén a *TSC1* és *TSC2* gének multiplex PCR vizsgálata történt első ízben, ami mutációt nem azonosított. Ezt követően készült MLPA vizsgálat, amit a *PKD1* gén vizsgálatára is kiterjesztettek. Két beteg esetén célzottan a *TSC2* és *PKD1* gének MLPA vizsgálata készült. Egy betegnél a klinikum alapján *NTHL1* gén vizsgálatának irányába terjesztették ki a genetikai vizsgálatot.

Eredmények

ARPKD betegek vizsgálatának eredményei

A 36 ARPKD betegnél végzett *PKHD1* gén Sanger szekvenálás eredménye 27 betegnél (75%) igazolt biallélikus patogén mutációt. Közülük 25 beteg mindkét allélon pontmutációt hordoz, további két beteg heterozigóta pontmutációt, másik allélon pedig kópiaszám változást eredményező 33-35 exont érintő duplikációt, illetve nagy kiterjedésű deléciót (1-55 exon) hordoz. Egy beteg heterozigóta kereteltolást eredményező (frameshift) mutációt hordoz, nála a másik allélon kóroki eltérést azonosítani nem tudtunk. 8 beteg esetén a *PKHD1* génben sem szekvenálással, sem MLPA vizsgálattal nem tudtunk mutációt azonosítani. Biallélikus kópiaszám változást nem detektáltunk. Gyakori mutáció a vizsgálati populációban a p.Thr36Met és a p.Ser2639*, előbbi 15/54 (28%), utóbbi 8/54 (15%) az észlelt mutációs allélok arányában. Összesen 7 új mutációt azonosítottunk, köztük a 33-35 exon duplikációt és a nagy kiterjedésű, 1-55 exont érintő deléciót, 3 trunkáns fehérjét okozó mutációt (c.5_8delCTGC, p.Ala3Glyfs*2; c.5088delTG, p.Gly1696fs*1; c.12036delA, p.Gly4013Alafs*24), és két misszensz mutációt (c.4328G>A, p.Cys1443Tyr és c.10621A > T, p.Asn3541Tyr). Utóbbi kettőt patogénnek minősítettük, mivel az emlősökben konzervált szakaszon lévő aminosavakat érintő mutációk.

Mind a 8, *PKHD1* negatív betegnél „second locus” mutációt találtunk a fenotípus újraértékelését követően. Két betegnél a vesékben lévő ciszták megjelenése, száma alapján 2-4

éves életkorban már inkább ADPKD-nak megfelelő fenotípusra gondoltunk, mindkettőjüknel de novo *PKD1* mutáció igazolódott. Egy betegnél a policisztás vesék mellett megjelenő jellegzetes tünetek, majd a további célzott vizsgálatokkal igazolt klinikum sclerosis tuberosa gyanúját vetették fel. Nála *TSC2-PKD1* folyamatos géndeléciós szindróma igazolódott. Három beteg esetében a teljes *HNF1B* gént érintő, de novo deléciót észleltünk, jellemzően a kezdetben enyhén nagyobb, hiperechogén veseméretük a későbbi életkorukban nem haladta meg az átlagot. Egy betegnél *NPHP1* deléció igazolódott, 11 éves életkorban végstádiumú veseelégtelen állapotban diagnosztizálva a kórképet. Egy testvérpárnál, akiknél hiperechogén vesék és fokozott májfibrózis jelei domináltak, neurológiai tünetek nélkül, homozigóta misszensz *TMEM67* mutáció, a gyakori p.Cys615Arg aminosavcsere igazolódott. A homozigóta kereteltolást okozó (frameshift) mutációt hordozó betegnél nem azonosítottunk „second locus” mutációt. A 27 biallélikus *PKHD1* mutációt hordozó gyermekből 19-nél (70%) lépett fel légzéstámogatási igény a perinatális időszakban, és közülük 9 gyermek (33%) perinatálisan (3 hónapos kor előtt) exitált. Összehasonlításképp a „second locus” mutációt hordozó betegek közül csupán egy igényelt perinatális légzéstámogatást, ő is újszülöttkori infekció miatt. A *PKHD1* mutációt hordozó kohorszban a légzéstámogatást igénylő, perinatális időszakot túlélő 10 gyermek közül 9-nél még 1 éves kor előtt hipertónia alakult ki. Ezzel szemben a „second locus” mutációt hordozók között csupán egy gyermeknél észleltünk hipertóniát, mely a végstádiumú veseelégtelenséggel párhuzamosan lépett fel. A diagnózis idején észlelt +4 SD fölötti vese méret (kranio-kaudális átmérő) specifikusnak mondható ARPKD-ra, mivel a 27 biallélikus *PKHD1* mutációt hordozó beteg 70%-ánál (19 gyermek) észlelhető volt, míg a „second locus” mutációt hordozó betegek közül senkinél sem. Vese túlélés szempontjából nem volt szignifikáns különbség a *PKHD1* mutációt hordozó, perinatális időszakot túlélő betegek és a „second locus” mutációt hordozó betegek között.

A TSC2-PKD folyamatos géndeléciós szindrómával élő betegek vizsgálatának eredményei

A genetikai eredmények értelmezéséhez elengedhetetlen a 4 beteg klinikai adatainak, fenotípusos jellemzőinek rövid ismertetése. Az első beteg jelenleg 15 éves fiú, akinél a posztnatális szűrő hasi ultrahang vizsgálat mindkét vesében kis méretű cisztákat jelzett, ami policisztás vesebetegség diagnózisát vetett fel. A rendszeresen végzett hasi ultrahang, illetve MRI vizsgálat során a vesékben mérsékelten növekvő cisztákat írtak le, de a vesék mérete,

térfogata kifejezetten meghaladta az életkori normákat. A legutóbbi MR vizsgálat során angiomyolipoma gyanús echogén gócot észleltek. Ötéves korában kialakult bőrelváltozásai hívták fel a figyelmet szklerózis tuberosa lehetőségére, ami egyebekben „tünetszegény” megjelenéssel társult policisztás vesebetegségéhez. A TSC gének szekvenálásával végzett genetikai elemzés nem azonosított patogén mutációkat. Az MLPA vizsgálat azonban megerősítette a *TSC2* gén 17–42. exonjainak nagymértékű delécióját és a *PKD1* gén teljes delécióját heterozigóta formában.

A második és harmadik beteg esetében a sclerosis tuberosa tünetei típusos megjelenést mutattak, a policisztás vesebetegség társulása később mutatkozott meg.

A második beteg jelenleg 5 éves leány. Már az intrauterin ultrahang vizsgálat multiplex kardiális rhabdomyoma jelenlétét igazolta, mely felvetette sclerosis tuberosa lehetőségét. Posztnatális hasi ultrahangvizsgálat során mindkét vesében számos, 3-14 mm átmérőjű cisztát fedeztek fel. A szoros követés a ciszták gyors növekedését jelezte. Két éves korában angiomyolipoma gyanús elváltozások jelentek meg mindkét vesében. A főként neurológiai indikációval kezdett everolimusz terápia két éves korban indult, melynek hatására a ciszták növekedési üteme lelassult, az AML-ek száma és mérete változatlan maradt, azonban a hatás átmeneti volt. A *TSC1* és *TSC2* gének szekvenálása nem igazolt genetikai rendellenességet. MLPA vizsgálat azonban a *TSC2* gén 14-42. exonjait, és a *PKD1* gén 11-46. exonjait érintő heterozigóta deléciót igazolt.

A harmadik betegnél, egy jelenleg 13 éves fiúnál is a kardiális rhabdomyoma jelenléte valószínűsítette sclerosis tuberosa diagnózisát. Neonatális hasi ultrahang vizsgálata 7 mm átmérőjű cisztát írt le a jobb vesében. Hat hónapos korában már mindkét vesében 1,5-3,5 cm-es ciszták mutatkoztak, amelyek számukban és méretükben folyamatos növekedést mutattak. 2,5 éves kora óta neurológiai indikációval everolimusz terápiában részesül, talán ezzel magyarázható, hogy eddigi gondozása során sem MRI-vel, sem ultrahanggal nem lehetett igazolni angiomyolipomák jelenlétét. A célzott genetikai (MLPA) vizsgálat igazolta a *TSC2* gén 22-42. exonjának és a *PKD1* gén minden exonját érintő heterozigóta delécióját.

A negyedik betegnél, a jelenleg 17 éves fiúnál prenatálisan diagnosztizáltak kardiális rhabdomyomát. Ugyanakkor már újszülött korban mindkét oldalon megnagyobbodott, policisztás vesék ábrázolódtak a hasi ultrahang vizsgálata során, melyek rapid méretbeli növekedést mutattak. Mindez korán felvetette a kettős géndelécio lehetőségét. 8 évesen a jobb vese alsó pólusában egy 35 mm átmérőjű, képzőképző vizsgálattal történő követése során jelentős méretbeli növekedést mutató, malignitást sejtető képlet került leírásra. Jobb oldali nefrektómia történt, a szövettani vizsgálat nefroblasztomát (Wilms tumort) igazolt. A sebészeti beavatkozást

követő kemoterápia és sugárterápia után remisszióban volt. Veseműködése a normál tartományban maradt, de 14 éves korban mérsékelt proteinuria (1 g/nap) jelentkezett. Sajnos egy évvel később az eGFR 64 ml/perc/1,73 m²-re csökkent, a proteinuria fokozódott (2,5 g/nap) és magas vérnyomás alakult ki, amelyre ACE-gátló kezelést kapott. 16 éves korában a kontroll hasi MRI számos ciszta mellett egy korábban angiomyolipomának vélt, de nem specifikus megjelenést és növekedést mutató elváltozást jelzett. A szoros követés lassan növekvő vesesejtes karcinómát és a májban lévő metasztázist igazolta. A további terápia folyamatban van. Most, 17 évesen a CKD3b stádiumban van (GFR-je 30 ml/perc/1,73 m²). A célzott MLPA vizsgálat meglepően nagy kiterjedésű heterozigóta deléciót igazolt, mely érinti a teljes *TSC2* gént és a teljes *PKD1* gént, továbbá az *NTHL1* gén 1. exonját.

Megbeszélés

ARPKD betegek megbeszélése

A vizsgált betegpopulációban tapasztalt 78%-os mutációs találati hatékonyság összecseng az irodalomban található adatokkal, ahogyan a *PKHD1* kópiaszám változásainak alacsony prevalenciája is egyeztethető egyéb kohorszban észlelt adatokkal. Két ilyen mutációt tudtunk igazolni, egy 3 exon méretű szakaszt érintő duplikációt és egy nagy kiterjedésű deléciót, melyek pontmutációkhoz társultak. Biallélikus kópiaszám változást nem detektáltunk. Ennek alapján a kópiaszám változások keresése MLPA vizsgálattal akkor javasolható, ha hagyományos szekvenálási módszerekkel heterozigóta pontmutáció azonosítható az egyik allélon, és a fenotípusos jegyek alapján ARPKD a legvalószínűbb diagnózis. Ha egyik allélon sem találunk pontmutációt, akkor a fenotípusos jegyek újraértékelése, fenokópiák keresése a következő racionális lépés. A *PKHD1* génben nem érintett betegek mindegyikénél sikerült megtalálni a valódi kóroki mutációt, igazolva, hogy a betegek 22%-ánál téves volt a kezdeti klinikai tünetek alapján felállított ARPKD diagnózis. Ez hangsúlyozza, hogy a klinikai tünetek, a fenotípus rendszeres újraértékelése a sarokköve a célzott genetikai vizsgálatoknak. Csupán egyetlen beteg volt, akinél nem sikerült kóroki eltérést azonosítani. Az ő esete is hangsúlyozza tehát, hogy sokszor még a szekvenálás és az MLPA kombinációja sem vezet eredményre, ami felveti intron mutációnak vagy *PKHD1* regulátor szakasz érintettségnek a lehetőségét.

Az általunk vizsgált betegpopulációban úgy találtuk, hogy az extrém mértékben megnagyobbodott vesék (a kranio-kaudális hossz +4 SD fölött) specifikusak ARPKD-re, a diagnózis valószínűségét növelik. Az első életévben megjelenő hipertónia ebben a vizsgálati

kohorszban specifikusnak mondható ARPKD-re. Irodalmi adatokkal egybevágó, hogy az érintett betegek mintegy 2/3-ában leírták a korai hipertónia kialakulását. Az egyes szerzők által ezzel összefüggésbe hozott hiponatrémiát nem volt módomban konzekvensen vizsgálni ebben a betegcsoportban.

A mutáció típusa nagyban meghatározza a betegség progresszióját, súlyosságát: a biallélikus funkcióvesztéssel járó („loss-of-function”) mutáció hordozók perinatálisan elhaláloznak, ahogyan ez korábbi közleményekben is megállapítást nyert. Azonban úgy tűnik, hogy a vizsgálati csoportban talált utolsó exont érintő p.Gly4013Alafs*24 mutáció feltehetően nem jár a teljes fehérje funkció elvesztésével, a beteg fenotípusának elemzése alapján. A fibrocisztin intracelluláris C-terminális része 192 aminosavból áll, és ismert, hogy az mTOR útvonal modulálásában játszik szerepet. Ugyancsak tartalmazza a ciliáris target szekvenciát (p.3876_3893CLVCCWLKRSKSRKTKPE), ami érintetlen marad a Gly4013Alafs*24 fibrocisztinben is.

Az ARPKD betegek körében a súlyos megjelenésű formáknál jellemző az újszülöttkori respirációs nehezítettség, melynek háttérében leginkább az extrém mértékben megnagyobbodott vesék okozta pulmonális hipoplázia áll. Irodalmi adatok alapján a betegek mintegy 31-41%-ánál lép fel légzéstámogatás igénye. Az általunk vizsgált betegek között 70%-ban vált szükségessé a perinatális időszakban invazív vagy non-invazív lélegeztetés, majd az érintett betegek csaknem fele (19 betegből 9) perinatálisan exitált.

A *PKHD1* mutáció negatív betegek fenotípusának értékelése során az alábbi megfigyelések vezettek a végső diagnózis felállításához: a *PKD1* mutációt hordozó betegek veséinek ultrahang képe már intrauterin vizsgálatok során hiperechogénnek mutatkozott, melyet postnatális vizsgálatok is megerősítettek, az ekkor pontosan mért vesehossz jócskán meghaladta az átlagot, majd a gyermekek növekedésével a vesék átlagoshoz viszonyított mérete kevéssé, ám a ciszták átmérője rapidan növekedett. Így összességében a kezdeti számos, 2-3 mm-es ciszta 25-27 mm nagyságúra növekedése jelezte, hogy korán megmutatkozó, domináns forma fennállása valószínű. Hangsúlyozandó, hogy mindkét ADPKD betegnél de novo alakult ki a mutáció, ami a megszokott gyakorlati diagnosztikát nehezíti. A *PKD1-TSC2* folyamatos géndeléciót hordozó gyermek esetén ehhez hasonló volt a renális fenotípus időbeni változása, ami a *PKD1* érintettséget önmagában is felvetette, azonban az egyéb szervi érintettség, úgymint a kültakaró típusos eltérései (bőr- és köröm léziók), a központi idegrendszeri tünetek sclerosis tuberosa egyidejű fennállását, vagyis a kettős gén érintettséget jelezték. A *HNF1B* deléciót hordozó betegek esetén a perinatálisan gyanított kezdeti diagnózis megcáfolása valamelyest nehezebb volt, hiszen a vesék méretének átlagoshoz viszonyított csökkenése csak későbbi

életkorban mutatkozott meg, és egyéb jellegzetes tünet, mint a genitális malformációk, az ioneltérések, hiperurikémia, szénhidrát anyagcserezavar kialakulása sokáig nem segítette a diagnózist. Mégis, mintegy kizárásos diagnózisként gondolnunk kell a kórképre. A nephronophthisis tipikus klinikai megjelenése, hogy az adolescens korú beteg „hirtelen krónikus veseelégtelen” állapotban érkezik, noha korábban tünete, panasza egyáltalán nem volt. A vese megjelenése kezdetben aligha karakteres, ebben a periódusban pedig már nem csupán az alapbetegség jegyeit, hanem a krónikus károsodás következtében kialakuló és a kórképre egyebekben kevésbé jellemző cisztákat is magában hordozza. Mindez egyfelől a diagnózis felállítását nehezíti, másfelől fontos különbség, hogy a ciszták alacsonyabb száma, illetve corticalis-corticomedullaris elhelyezkedése a klinikummal együtt értékelve inkább NPHP mutáció irányába mutat. Továbbá éppen az adhat választ a differenciáldiagnosztikai kérdésre, hogy korábbi képalkotó vizsgálat semmilyen jellegzetes renális eltérést nem említ. A *TMEM67* mutáció következtében kialakuló, Boichis szindrómával élő testvérpár esetén a tünetszegény májérintettség sokáig elrejtette a valós diagnózist. Azonban az idő előrehaladtával egyre markánsabban mutatkozott meg a kórképre jellegzetes veseméret csökkenés, hiszen az utolsó képalkotó vizsgálat alkalmával már -2.8, illetve -4.7 SD volt a vesék hossza az átlagoshoz képest.

TSC2-PKD1 folyamatos géndeléciós szindrómával élő betegek megbeszélése

A *TSC2-PKD1* folyamatos géndeléciós szindrómát elsőként Brook-Carter és munkatársai jegyezték le. Az általunk vizsgált betegeknél a renális fenotípus az általuk közölthöz hasonló jellegzetességet mutatott, azaz a korai ciszta megjelenés (mindkét vesében több, mint 10 ciszta, a legnagyobb átmérő 2 cm fölötti), és a vesék megnagyobbodása. Emellett azonban a 4-ből 3 beteg esetében a kardiális rhabdomyoma megjelenése volt a betegség első alarmírozó tünete. Emiatt az első beteg eleinte policisztás vesebetegség diagnózisával került nefrológiai gondozásba, míg a többi három beteg sclerosis tuberosa diagnózisát kapta. Az első betegnél 5 éves korban felfedezhető hipopigmentált foltok vetették fel sclerosis tuberosa társulásának lehetőségét, a többi beteg esetében a követés során egyre nagyobb mértékben képződő ciszták terelték a gondolatot a kettős générintettség felé. Noha a sclerosis tuberosa kritériumrendszerében a veseciszták csupán minor kritériumtünetként szerepelnek, a differenciáldiagnosztika során kiemelt jelentőséggel bírnak. Összehasonlítva a TSC betegeket

a *TSC2-PKD1*-FGDS betegekkel utóbbiaknál a számukban és méretükben rapidan növekvő ciszták dominálnak lényegesen kisebb számú és méretű AML mellett. Az első és a harmadik páciensnél az AML-k megjelenése a *TSC2* érintettségnek ellentmondóan nagyon késői. A második betegnél látott, korán megjelenő, fokozott növekedést mutató AML-k mondhatóak típusosnak a *TSC2* gén érintettsége esetén. Azonban a látott renális tünetek feltehetőleg módosultak a neurológiai indikációval kezdett everolimusz terápiának köszönhetően. Jelenlegi ajánlások szerint az elsőként választandó kezelés 3 cm-t elérő, vagy azt meghaladó, illetve rapidan növekvő AML-k esetén az mTOR inhibitor everolimusz vagy sziirolimusz. A szer alkalmazása jelentősen csökkenti az AML-k méretét, növekedési ütemét, és segít fenntartani a vesefunkciót. Emellett a veseciszták száma, átmérője és térfogata is csökkent az mTOR-inhibitor alkalmazása mellett, noha a progressziót lassító hatása nem volt kifejezett. Újabb terápiás lehetőségek még kísérleti fázisban vannak.

A hipertónia kialakulása több korábbi tanulmány szerint is korrelál a veseméret növekedésével, vagyis a teljes vese térfogattal. Az első és a harmadik betegnél a hipertónia megtartott vesefunkció mellett lépett fel, de a teljes vesetér fogat fokozott növekedésével egyenes arányban. A negyedik beteg esetében a beszűkülő vesefunkcióval párhuzamosan alakult ki magas vérnyomás, de az ő esetében a soliter vese kifejezett megnagyobbodása, esetlegesen társuló (a proteinuria megjelenése alapján gyanított) szekunder FSGS is befolyásolhatta mindezt.

Irodalmi adatok alapján a sclerosis tuberosával élő betegek között a tumorok kialakulásának átlagos ideje 36 éves kor körül van. Ugyanakkor a negyedik betegnek nem típusos megjelenésű és ismétlődő malignus tumoros elváltozásai alakultak ki, fiatal életkorban. Az irodalmi adatokat áttekintve azt találtam, hogy korábban sosem jegyezték le nephroblastoma kialakulást sclerosis tuberosával vagy ADPKD-vel élő betegben. A nephroblastoma kialakulása a *WT1* tumorsuppresszor gén mutációjával hozható összefüggésbe. Nem történt vizsgálat a negyedik betegnél annak szűrésére, vajon hordoz-e *WT1* mutációt, azonban irodalmi ritkaságnak számítana a *WT1* gén mutáció és a *TSC2-PKD1*-folyamatos géndeléciós szindróma együttes fennállása. A negyedik beteg második tumora vesesejtes karcinóma volt, ami mind sclerosis tuberosában, mind ADPKD-ben előfordulhat. Azonban a vesesejtes karcinóma általában ADPKD késői stádiumában, végstádiumú veseelégtelenség idején jelentkezik. A negyedik páciensnél ilyen fiatal életkorban jelentkező karcinóma figyelemfelkeltő volt, kiváltképp az évekkel korábbi onkológiai tünettől. Emiatt döntöttünk a genetikai vizsgálat kiterjesztése mellett. Az MLPA vizsgálati keret kibővítésével igazolódott az *NTHL1* gén első exonjának deléciója. Az *NTHL1* gén közvetlenül a *TSC2* gén előtt található, fej a fejhez

pozícióban. A gén homozigóta mutációi következtében leggyakrabban a gyomor- bél traktust érintő malignómák, kolorektális karcinóma, vagy emlőrák alakulnak ki. Azonban heterozigóta mutáció esetén inkább benignus elváltozások jellemzőek. Egy feltételezett „second-hit” szomatikus mutáció magyarázhatja a betegünk malignus tumorát, de ezirányú vizsgálatok nem történtek. Azonban hangsúlyozandó, hogy az irodalom átvizsgálása során úgy találtam, ez a második olyan eset, amikor a 3 nevezett gén érintettsége okozza a páciens tüneteit, illetve az általunk írt közlemény volt legjobb ismeretünk szerint az első, amiben az *NTHL1-TSC2-PKD1* gén együttes, folyamatos deléciója igazolódott.

A genetikai vizsgálatok indítványozása mind ADPKD, mind sclerosis tuberosa esetén dilemmát jelenthet. A hazai hétköznapi gyakorlatban a családfa analízis, az autoszomális domináns öröklésmenet, a típusos tünetek, kritériumrendszerek alapján klinikai genetikussal történő konzultáció keretében kimondható a diagnózis. Ugyanakkor a molekuláris genetikai vizsgálat feltárhatja ADPKD esetén a fehérje dózist meghatározó pontos defektust, és az eredmény a betegség progressziójának előrejelzésében és terápiás döntések meghozatalában létfontosságú lehet. Azokban az esetekben, amikor a sclerosis tuberosa és az autoszomális domináns policisztás vesebetegség együttes fennállása feltételezhető, csak a genetikai vizsgálat erősítheti meg a diagnózist, és tárhatja fel a progresszívebb kórfolyamatot. Így azon betegeknél, akiknél a sclerosis tuberosa diagnózisa a kritériumok alapján kimondható, de a renális fenotípusra a korán kialakuló, rapidan több centiméteresre növekvő ciszták jellemzőek, korai vesetérfogat növekedéssel, célzott MLPA vizsgálat vagy NGS elvégzése indokolt a *TSC2* és *PKD1* génekre nézve. Az etikai vonatkozás tekintetében megoszló vélemények, kételyek természetesen személyre szabott kivizsgálási tervet tesznek szükségessé.

Következtetések

A munkám során végzett megfigyelések alapján az alábbi következtetéseket vonhatom le:

1. ARPKD diagnózisa feltételezhető, és célzottan a *PKHD1* gén vizsgálata javasolható, ha a policisztás vesebetegnél a következő fenotípusos jegyek észlelhetők: a vesék kranio-kaudális hossza az életkori átlagot jelentősen, +4 SD meghaladja, de a legnagyobb ciszták átmérője a 2 cm-t nem haladja meg, ha a perinatális időszakban légzéstartogatási igény lépett fel, ha 1 éves kor előtt kialakul a sokszor súlyos hipertónia.
2. Amennyiben a *PKHD1* gén szekvenálása során egyik allélon sem sikerül kóroki mutációt igazolni, úgy a feltételezett ARPKD diagnózisának újragondolása, a fenotípusos jegyek újraértékelése, vagyis fenokópiák keresése a következő stratégiai

lépés. Biallélikus kópiaszám változás potenciálja alacsony, így MLPA vizsgálat csak a heterozigóta patogén pontmutáció igazolása esetén javasolt a másik allélon alacsony prevalenciával előforduló deléción, duplikáció vizsgálatára.

3. A sclerosis tuberosa renális kritériumtünetei között az általában kisebb átmérőjű ciszták, és az életkor folyamán akár több centiméteresre növekvő angiomyolipomák szerepelnek. Abban az esetben, amikor ez nem típusosan jelentkezik, hanem a számukban és méretükben rapidan növekvő ciszták dominálnak (3 éves kor előtt >10 ciszta, átmérőjük meghaladja a 2 cm-t), a kisebb, sokszor szinte észrevehetetlen AML-k mellett, akkor a sclerosis tuberosa és az autoszomális domináns policisztás vesebetegség együttes fennállása gyanítható. Ennek igazolásaként célzottan a *TSC2* és a *PKD1* gének MLPA vizsgálata javasolt a folyamatos géndeléción kimutatására. A genetikai vizsgálat elvégzésének indikációját adja, hogy a kórkép igazolása esetén szorosabb követési stratégia szükséges, továbbá a progresszív vesefunkció hanyatlás miatt az elérhető farmakoterápiás lehetőségek kihasználása felértékelődhet. A betegeknek a megfelelő tájékoztatást követően saját döntésük szerint joguk van tudni, hogy az évtizedekkel korábban fellépő végstádiumú veseelégtelenséggel kell-e számolniuk.
4. A *TSC2-PKD1* folyamatos géndeléción szindróma felismerése is a fenotípusos jegyek időben állandó újraértékelésén alapszik, melyek a ritka kórképen belül is lehetnek atípusosak. A két gént érintő deléción kiterjedése változó, nagyon ritkán egy harmadik gén, a szomszédos *NTHL1* egyes szakasza is kieshet deléción révén. Ennek MLPA vizsgálata akkor válhat szükségessé, ha a gyanítottan vagy igazoltan *TSC2-PKD1*-FGDS betegnél szokatlan, ismétlődő malignus folyamatok jelentkeznek fiatal életkorban.



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/403/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

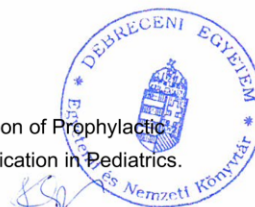
Jelölt: Orosz Petronella
Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10065565

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Orosz, P.**, Kollák, Z., Pethő, Á. G., Fogarasi, A., Reusz, G., Hadzsiev, K., Szabó, T.: The Importance of Genetic Testing in the Differential Diagnosis of Atypical TSC2-PKD1 Contiguous Gene Syndrome: Case Series.
Children-Basel. 10 (3), 1-9, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/children10030420>
IF: 2.4 (2022)
2. Szabó, T., **Orosz, P.**, Balogh, E., Jávorszky, E., Mátyus, I., Bereczki, C., Maróti, Z., Kalmár, T., Szabó, A., Reusz, G., Várkonyi, I., Marián, E., Gombos, É., Orosz, O., Madar, L., Balla, G., Kappelmayer, J., Tory, K., Balogh, I.: Comprehensive genetic testing in children with a clinical diagnosis of ARPKD identifies phenocopies.
Pediatr. Nephrol. 33 (10), 1713-1721, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00467-018-3992-5>
IF: 2.816

További közlemények

3. Pethő, Á. G., Tapolyai, M., Browne, M., Fülöp, T., **Orosz, P.**, P. Szabó, R.: The importance of the nephrologist in the treatment of the diuretic resistant heart failure.
Life (Basel). 13 (6), 1-13, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/life13061328>
IF: 3.2 (2022)
4. **Orosz, P.**, Durányik, M., Biró, E., Körhegyi, I., Balogh, I., Szabó, T.: Question of Prophylactic Anticoagulation in Steroid Sensitive Nephrotic Syndrome: rare Complication in Pediatrics.
J. Pediatr. & Child Health Care. 2 (1), 1-3, 2017.
IF: 1.449





5. Bíró, E., Szikszay, E., **Orosz, P.**, Bigida, L., Balla, G., Szabó, T.: Acute interstitial nephritis in T-cell leukemia in a pediatric patient.

Pediatr. Int. 58 (9), 940-942, 2016.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/ped.13029>

IF: 0.822

6. Ambrus, L., Oláh, A., Oláh, T., Balla, G., Saleem, M. A., **Orosz, P.**, Zsuga, J., Bíró, K., Csernoch, L., Bíró, T., Szabó, T.: Inhibition of TRPC6 by protein kinase C isoforms in cultured human podocytes.

J. Cell. Mol. Med. 19 (12), 2771-2779, 2015.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jcmm.12660>

IF: 4.938

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 15,625

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
5,216**

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

Debrecen, 2023.09.01.

