A vaszkuláris endoteliális növekedési faktor és az angiopoietin molekula család szerepe hipoxiás kórképekben

Doktori tézisek

Dr. Bányász Ilona

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Programvezető:	Prof. Dr. Tulassay Tivadar
Témavezetők:	Prof. Dr. Szabó András
	Dr. Vannay Ádám, Ph.D.
Hivatalos bírálók:	Dr. Sipos Ferenc, Ph.D.
	Dr. Balog Attila, Ph.D.

Budapest
2009.

Bevezetés

Az angiogenezis számos, a szervezetben zajló fiziológiás és patológiás folyamatban játszik szerepet. Míg a szervezet fejlődése során gyakorlatilag folyamatosan zajlik angiogenezis, addig felnőttkorban fiziológiásan a női reproduktív ciklusra és a terhesség időszakára korlátozódik. Patológiás körülmények között a gyulladás és a sebgyógyulás során figyelhető meg, valamint kulcs szerepet játszik a daganatok növekedésében és metasztázisképzésében.

Az érfejlődés kezdeti lépése a vazodilatáció, valamint a fokozott kapilláris permeabilitás, mely lehetővé teszi a plazma-proteinek (fibrinogén, plasminogén) transzportját a lumenből a perivaszkuláris térbe. Angiogenetikus faktorok hatására megindul az endotélsejtek proliferációja és migrációja. Az új endotélsejtek végül tubulusokat alkotnak és stabilizálódnak a körülöttük elhelyezkedő extracelluláris mátrixhoz.

Az angiogenezis szabályozásában számos molekula játszik szerepet. Ezek közül néhány elősegíti (angiogenetikus faktorok), néhány pedig gátolja (angiosztatikus faktorok) az érújdonképződést. Az angiogenetikus faktorok közül mi a vaszkuláris endoteliális növekedési faktorral (VEGF) és az angiopoietin (Ang) molekula családdal foglalkoztunk részletesebben.

A VEGF fokozza az endotélsejtek differenciálódását, migrációját, ill. proliferációját, mely hatásain keresztül az érfejlődés fő szabályozó molekulája. A nitrogén monoxid és a prosztaciklin szintézisének és sejtekből való felszabadulásának fokozásán keresztül fokozza az erek permeabilitását. Simaizomsejtek proliferációját gátló illetve trombocita-aggregáció gátló hatásának köszönhetően érprotektív hatása van.

A VEGF felfedezését követően egy másik, az angiogenezisben nélkülözhetetlen növekedési faktor családot azonosítottak. Az angiopoietin molekula-családnak eddig négy tagját írták le: angiopoietin-1 (Ang1), angiopoietin-2 (Ang2), angiopoietin-3 (Ang3) és angiopoietin-4 (Ang4). Munkánk során az angiopoietinek közül, az Ang1 és Ang2 molekulákkal, valamint receptorukkal foglalkoztunk részletesebben.

Az Ang1-indukált Tie2 szignalizáció szabályozza az endotélsejtek migrációját, túlélését, valamint részt vesz a kapilláris (endotélsejt) - tubulusok kialakításában. Ezeken a hatásain keresztül az Ang1 elengedhetetlen szerepet játszik az erek remodellingjében, a sejt-mátrix interakcióban valamint az erek stabilizációjában Az Ang2 hatása nem ennyire

egyértelmű: Az Ang2 a VEGF jelenlététől függően képes fokozni az erek fejlődését éppúgy, mint a vaszkuláris regressziót.

Célkitűzések

1. A szakirodalomban egyre több adat utal arra, hogy az iszkémia indukált akut veseelégtelenség kialakulásában és progressziójában a vese tubulushám sérülése mellett a renális vaszkuláris endotélium károsodása is szerepet játszik. Az angiogenezis központi szabályozó molekulájának, a VEGF-nek patogenetikai jelentősége ugyancsak ismert a vesekárosodások kialakulásában és progressziójában. Munkánk első felében in vivo vese iszkémia/reperfúziós állatmodellen végeztünk mRNS és fehérje expressziós vizsgálatokat. Legfontosabb célkitűzéseink a következők voltak:

1. a. A VEGF gén expresszióját számos tényező befolyásolja, ezek közül a legfontosabb a hipoxia. Ennek megfelelően a VEGF gén promotere több, a hipoxia által történő szabályozásban szerepet játszó transzkripciós faktor számára kötőhelyül szolgáló régiót tartalmaz. Ezek közül a legfontosabb a hipoxia válasz elem (HRE), mely a hipoxia indukálta faktor 1 (HIF-1) számára jelent kötőhelyet. Vizsgálatunk célja volt a HIF-1α valamint a VEGF együttes változásának meghatározása iszkémia/reperfúziós patkány vese modellben.

1. b. Számos vizsgálat eredménye mutatja, hogy a vesebetegségek előfordulása és progressziója a nőkben és a férfiakban eltér egymástól. Humán vizsgálatok, valamint állatmodelleken történt kutatások a női nem protektív szerepét támasztják alá a különböző etiológiájú vesekárosodásokban. Ismerve a VEGF vesekárosodásokban betöltött lehetséges protektív szerepére utaló irodalmi adatokat, vizsgáltuk, hogy van-e nemi különbség a VEGF és a HIF-1α expresszió változásaiban iszkémia/reperfúziós patkány vese modellben.

Az angiopoietinek vesebetegségekben betöltött szerepéről eddig viszonylag kevés információ áll rendelkezésünkre. Az egészséges glomerulus endotélsejtjeinek abluminális felszínén Tie2 receptor található. A vesében az Ang1-t a podociták, az Ang2-t a mesangium sejtek termelik. In vitro vizsgálatok során megfigyelték, hogy a mesangium sejtek Ang2 szintézise hipoxia hatására fokozódik.

1. c. Célkitűzésünk volt az angiopoietin/Tie2 mRNS expresszió vizsgálata iszkémia/reperfúziós patkány vese modellben.

2. A késői terhességi toxaemia vagy másnéven preeklampszia az egyik leggyakoribb megbetegedés, amely orvosi indikáció alapján megindított koraszüléshez vezethet. Patomechanizmusa a mai napig nem teljesen tisztázott, az egyik leginkább elterjedt elmélet szerint a kóros trofoblaszt-invázió játszik szerepet a kialakulásában. A placenta fejlődése során zajló folyamatok, mint pl. a vaszkuláris remodelling, vagy mint a placentáció alapvető lépésének, a citotrofoblasztoknak az intramiometrális erek falába történő inváziójának a szabályozása VEGF-en keresztül történik. Az irodalomban számos adat támasztja alá a VEGF szerepét a preeklampszia patomechanizmusában.

Az 1500 g alatti, kis súlyú koraszülött populáció a perinatális morbiditás és mortalitás szempontjából fokozott rizikóval rendelkeznek. Náluk számos - a szervezet éretlenségéből adódó - szövődmény megjelenésével kell számolni. Az irodalomban több közlemény található arra vonatkozóan, hogy a perinatálisan fellépő kóros állapotok (koraszülöttek retinopátiája, bronchopulmonális diszplázia, respirációs distressz szindróma, nyitott Botallo vezeték stb.) valamint az abnormális VEGF szintézis között összefüggés áll fenn.

Munkánk második felében az angiogenezisben szerepet játszó molekulák humán genetikai polimorfizmusait vizsgáltuk preeklampsziában és koraszülötteket érintő perinatális szövődményekben. A következő kérdésekre kerestük a választ:

2. a. Vizsgáltuk, hogy befolyásolják-e a VEGF szintézisét meghatározó funkcionális polimorfizmusok (VEGF $G^{+405}C$, illetve a $C^{-2578}A$ polimorfizmusok) a preeklampszia kialakulását?

2. b. Valamint szerepet játszanak-e ezek a polimorfizmusok a preeklampszia progressziójában?

2. c. Vizsgáltuk, hogy van-e összefüggés az Ang2 $G^{-35}C$ és a VEGF $C^{-2578}A$ genetikai polimorfizmusok hordozása és a kis súlyú koraszülöttek retinopátiája között?

2. d. Vizsgáltuk, hogy van-e összefüggés a VEGF $G^{+405}C$, a VEGF $C^{-2578}A$, illetve a VEGF $T^{-460}C$ funkcionális genetikai polimorfizmusok hordozása és a kis születési súlyú koraszülöttség között?

2. e. Valamint vizsgáltuk a perinatális komplikációk genetikai hátterét a VEGF polimorfizmusok hordozása szempontjából.

Módszerek

1. In vivo vese iszkémia/reperfúziós kísérletek

1.1. A kísérletek során vizsgált állatok - műtéti beavatkozás

Kísérleteinket ivarérett, nőstény, illetve hím Wistar patkányokon végeztük el. Az állatok operációját intraperitoneális pentobarbitál anesztéziában végeztük. A műtéti beavatkozás során median laparotomiás feltárást követően kipreparáltuk a bal veseereket (a. és v. renalis), majd 55 percre kirekesztettük a keringésből. Közvetlenül az iszkémiás periódus lejárta előtt eltávolítottuk az állatok jobb, ellenoldali veséjét. Az ércsipeszeknek a bal veseerekről történő eltávolítása után a hasfalat zártuk.

Később az abdominális aortán keresztül történő kivéreztetéssel - az iszkémiás periódust követő 10 perc (T10; n=6), 20 perc (T20; n=6), 40 perc (T40; n=6), 60 perc (T60; n=6), 120 perc (T120; n=5) és 240 perc (T240; n=6) reperfúziós idő elteltével - öltük le az állatokat. Műtéti kontrollként (T0; n=6) altatott, áloperált, nem iszkemizált veséjű állatok szolgáltak. Az egyes csoportokba 6 hím illetve 6 nőstény állat tartozott.

Ang/Tie2 mRNS expressziós vizsgálatok esetén a méréseket csak a hím állatok esetében végeztük el a T0, T10, T40, T120 illetve T240 időpontokban.

1.2. Western Blot

A vesemintáinkhoz lízis puffert adtunk, majd jégen homogenizáltuk. A homogenizátumot centrifugáltuk (13000 RPM, 5 min). A felülúszó összfehérje koncentrációját spektrofotometriás módszerrel, Bradford szerint határoztuk meg. Primer antitestként, patkány VEGF ill. HIF-1α specifikus monoklonális ellenanyagot használtuk, másodlagos antitestként torma-peroxidázzal konjugált IgG antitestet alkalmaztunk. A mintákat 12,5% SDS-poliakrilamid gélen futtatuk. A blottmembránt blokkoló oldatban, majd mosó oldatban a specifikus ellenanyaggal (VEGF, HIF-1α) inkubáltuk. Mosást követően a membránokat másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk. A feleslegben kötött másodlagos ellenanyagot további mosásokkal távolítottuk el. Az immunoreaktív helyek kemolumineszcens szignálját Amersham Pharmacia protokoll szerint ECLplus reagenssel detektáltuk, majd denzitometráltuk.

1.3. Real-time RT-PCR vizsgálatok

A veseszövetekből az RNS-t szilikagél membránon izoláltuk, majd oligo-$(dT)_{12-18}$ primer segítségével reverz transzkripcióval írtuk át komplement DNS (cDNS) molekulává. A cDNS-t real-time PCR-el amplifikáltuk. A VEGF, Ang1, Ang2, Tie2 méréséhez fluorescence resonance energy transfer (FRET) hibridizációs próbákat használtunk. A HIF-1α és a glicerin-aldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) mRNS-ek mennyiségét SYBR Green I segítségével határoztuk meg. A PCR reakciókat Light Cycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) PCR automatán végeztük el. A specifikus primer párokat, valamint a próbákat a LightCycler ® Probe Design Software 2.0 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) - szoftver segítségével terveztük meg. Az eredmények kiértékelését a LightCycler Software 3.5.3. (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) - szoftver segítségével végeztük el.

1.4. Statisztikai analízis

A különböző csoportok real-time RT-PCR és Western blot eredményeinek összehasonlításához ANOVA tesztet használtunk Newman-Keul post-hoc teszttel kiegészítve. Az adatokat akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a *P* értéke kisebb volt, mint 0,05.

2. A VEGF és Ang2 génpolimorfizmusainak vizsgálata

2.1. A VEGF gén promoter polimorfizmusai preeklampsziában

Nyolcvanhét nullipara, súlyos preeklampsziás terhes nő vett részt a vizsgálatban (I. sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika beteganyaga 1998-2004). A súlyos preeklampszia diagnózisát az American College of Obstetricians and Gynecologists - ACOG Practice Bulletin No. 33. alapján állítottuk fel. A kontroll-csoportba 96 véletlenszerűen kiválasztott, komplikációktól mentes nullipara terhes nőt vontunk be.

2.2. Az Ang2 és a VEGF gén promoter polimorfizmusai koraszülöttek retinopátiájában

Vizsgálatainkba a Semmelweis Egyetem II. Sz. Szülészeti- és Nőgyógyászati Klinikáján és a Schöpf-Mérei Ágost Kórház Szülészeti- és Nőgyógyászati Osztályán született 90 – a koraszülöttek retinopátiája (ROP) miatt lézer, illetve fotokoagulációval kezelt – kis születési súlyú koraszülöttet (1160±300 gramm) vontunk be. A kontrollcsoportba 110 olyan kis születési súlyú koraszülött tartozott (1200±280 gramm), akiknél nem alakult ki ROP, vagy csak kezelést nem igénylő korai stádium (1. és 2. stádium) fordult elő. A kezelt és kezeletlen ROP-os koraszülöttek mellett megvizsgáltuk a súlyos ROP-os koraszülöttek (4.-5. ROP stádium) és a kevésbé súlyos ROP-os koraszülöttek (ROP 1.-3. stádium) közötti genotípusbeli különbséget is.

2.3. A VEGF gén promoter polimorfizmusai a kis születési súlyú koraszülöttek perinatális szövődményeiben

A Semmelweis Egyetem II. Sz. Szülészeti- és Nőgyógyászati Klinikáján született és kezelt 128 kis születési súlyú koraszülöttet (≤1500 gramm) vontunk be a vizsgálatba. Az egyes perinatális komplikációk fellépésétől függően alcsoportokat képeztünk. Az respirációs distressz szindróma (RDS) n=60, nekrotizáló enterokolitisz (NEC) n=49, koponyaűri vérzés (IVH) n=42, akut veseelégtelenség (ARF) n=41, bronchopulmonális diszplázia (BPD) n=23, nyitott Botallo vezeték (PDA) n=47, valamint pitvari szeptum defektus (ASD) n=13 koraszülöttnél fordult elő. A perinatális komplikációkat nemzetközileg elfogadott kritériumok alapján definiáltuk. A kis születési súlyú koraszülöttek genotípusbeli megoszlását 200 egészséges újszülött genotípus-megoszlásával hasonlítottuk össze. A koraszülött populáción belül összehasonlítottuk az egyes perinatális komplikációval rendelkező alcsoportok genotípusbeli megoszlását azoknak a koraszülötteknek a genotípusbeli megoszlásával, akiknél a vizsgált komplikáció nem fordult elő.

2.4. DNS izolálás

A preeklampsziás vizsgálathoz a vérmintából a DNS-t Proteináz K enzim segítségével izoláltuk. Az újszülöttek genotípusainak meghatározásához fenilketonuria szűrésére használt, szűrőpapírra cseppentett vérmintákból Chelex100-as reagens felhasználásával izoláltuk a DNS-t.

2.5. A VEGF gén $T^{-460}C$ polimorfizmus meghatározása real time PCR - FRET módszerrel

A VEGF gén $T^{-460}C$ polimorfizmusát real time PCR - FRET technika segítségével határoztuk meg. A PCR-eket 20 µl végtérfogatú reakcióelegyben végeztük, 2 µl DNS felhasználásával. A próbákat Light Cycler Red 640 fluoroforral, illetve fluoresceinnel jelöltük. A PCR termékeink olvadáspont analízise során kontrollok felhasználásával azonosítottuk a minták genotípusát.

2.6. A VEGF $C^{-2578}A$, VEGF $G^{+405}C$ és Ang2 $G^{-35}C$ polimorfizmusok meghatározása PCR-restrikciós fragment hossz polimorfizmus (RFLP) módszerrel

A VEGF $C^{-2578}A$, VEGF $G^{+405}C$ és Ang2 $G^{-35}C$ polimorfizmusainak meghatározását PCR–RFLP technikával végeztük el. Az izolált DNS minták megfelelő szakaszát PCR reakcióval szaporítottuk fel. A PCR-eket 50 µl végtérfogatú reakcióelegyben végeztük 2 µl DNS felhasználásával. A primerek tervezéséhez a Primer3™ szoftvert használtuk. Az Ang2 esetében az antiszensz primer a 3' végén egy mismatch bázist tartalmazott a restrikciós hasítási hely kialakítása céljából. A VEGF $C^{-2578}A$ polimorfizmus meghatározásakor Bgl II, a VEGF $G^{+405}C$ polimorfizmus esetén BsmF I, az Ang2 $G^{-35}C$ polimorfizmus esetén Hind III restrikciós endonukleázzal emésztettük a PCR reakció végtermékét.

2.7. Statisztikai analízis

A VEGF genotípusok és a preeklampszia kockázata közötti összefüggést logisztikus regressziós analízis segítségével határoztuk meg. Multiplex lineáris regressziós analízist alkalmaztunk a VEGF genotípusok és haplotípusok, valamint a hipertónia és proteinuria diagnosztizálásának időpontja közötti összefüggés meghatározására. Khí-négyzet tesztet alkalmaztunk a kezelt és kezeletlen ROP-os csoport között, valamint a 4.-5. ROP stádiumú és az 1.-3. ROP stádiumú csoport között az allél és a genotípus frekvenciák összehasonlítására. Khí-négyzet teszt segítségével hasonlítottuk össze az allél és a genotípus frekvenciákat a kis születési súlyú koraszülöttek és az egészséges újszülöttek között, valamint az egyes perinatális kórképben megbetegedett koraszülöttek és a vizsgált kórképre nézve nem beteg koraszülöttek között. A perinatális komplikációk és a ROP kockázati tényezőire történő korrigálást logisztikus regressziós analízis alkalmazásával végeztük el. A statisztikai

számításokhoz a SPSS 10.0 statisztika szoftvert alkalmaztuk. A Hardy-Weinberg egyensúly vizsgálatát az Arlequin™ szoftverrel végeztük.

Eredmények

1.1. A VEGF és a HIF-1α vizsgálata patkány vese iszkémia/reperfúziós modellben

1.1.1. HIF-1α mRNS expressziók változása

Hímekben a HIF-1α mRNS expressziója szignifikánsan nőtt a T120-as időpontban a korábbi reperfúziós időpontokhoz ill. a kontroll csoporthoz képest. A T240-es időpontban a HIF-1α mRNS expressziója további szignifikáns emelkedést mutatott. Nőstényekben a HIF-1α mRNS expressziója a T240-es időpontban megemelkedett a korábbi időpontokhoz és a kontroll csoporthoz képest.

Nemi különbséget a T120 és a T240 csoportok HIF-1α mRNS expressziójában találtunk. A T120-as hímekben magasabb HIF-1α mRNS expressziót tapasztaltunk az ugyanezekben az időpontokban mért nőstények értékeihez képest. A T240-es időpontban a nőstényekben volt magasabb a HIF-1α mRNS expressziója.

1.1.2. VEGF mRNS expressziók változása

Hímekben a VEGF mRNS expressziója fokozódott a T120-as időpontban, majd a T240-es időpontban további emelkedést mutatott. Nőstényekben a VEGF mRNS expressziója a T240-es időpontban megemelkedett a korábbi időpontokhoz és a kontroll csoporthoz képest.

Nemi különbséget a T120 és a T240 csoportok VEGF mRNS expressziójában találtunk. Mindkét időpontban a hímekben szignifikánsan magasabb VEGF mRNS expressziót tapasztaltunk az ugyanezekben az időpontokban mért nőstények értékeihez képest.

1.1.3. HIF-1α fehérje szintek változása

Hímek és nőstények esetén egyaránt a T10 időpontban magasabb HIF-1α fehérje szintet mértünk a kontroll csoporthoz (T0) képest. A T60 időpontban a fehérje szint csökkent a korábbi reperfúziós időpontokhoz képest, de végig a kiindulási érték felett maradt.

A HIF-1α fehérje szintek esetében nem találtunk nemi különbséget sem a kontroll csoportban, sem pedig a posztiszkémiás veseszövetekben.

1.1.4. VEGF fehérje szintek változása

Hímekben a T120 időpontban a VEGF fehérje szintje bár nem szignifikánsan, de megemelkedett. Hímekben és nőstényekben egyaránt a T240-es időpontban tapaszaltunk

szignifikánsan magasabb fehérje szintet a korábbi reperfúziós időpontokhoz és a kontroll csoporthoz képest.

A T240 időpontban a VEGF fehérje szintet nőstényekben magasabbnak találtuk, mint hímekben.

1.2. Az angiopoietin/Tie2 rendszer vizsgálata iszkémia/reperfúziós patkány vese modellben

1.2.1. Ang1 mRNS expresszió változása

A kontroll csoportban (T0) szignifikánsan magasabb volt az Ang1 mRNS expressziója, a többi csoporthoz képest.

1.2.2. Ang2 mRNS expresszió változása

Az Ang2 mRNS expressziójában nem volt szignifikáns változás az iszkémia/reperfúzió hatására.

1.2.3. Tie2 mRNS expresszió változása

A Tie2 mRNS expressziójában nem volt szignifikáns változás az iszkémia/reperfúzió hatására.

2. A VEGF és Ang2 génpolimorfizmusainak vizsgálata

2.1. A VEGF gén promoter polimorfizmusainak (VEGF $C^{-2578}A$ és $G^{+405}C$) szerepe preeklampsziában

Mindkét vizsgált polimorfizmus esetében teljesült a Hardy-Weinberg kritérium a preeklampsziás és a kontroll csoportban egyaránt.

A vizsgált populációban a $VEGF^{+405}$ G allél hordozása független protektív tényező volt a súlyos preeklampszia kialakulásával szemben.

A VEGF $^{-2578}$ A allél hordozók között a hipertóniát 1,6, a proteinuriát 1,9 héttel korábban diagnosztizálták. A VEGF $^{+405}$GC/$^{-2578}$CC haplotípust hordozók esetében a hipertónia 2,8, a proteinuria 1,8 héttel később alakult ki.

A kapott eredményeket a preeklampszia rizikótényezőire (anya életkora, a terhesség előtti BMI és a terhesség alatti dohányzás) korrigáltuk.

2.2. Az Ang2 és a VEGF gén promoter polimorfizmusainak (VEGF $C^{-2578}A$ és Ang2 $G^{-35}C$) szerepe kis születési súlyú koraszülöttek retinopátiájában

A Hardy-Weinberg kritérium teljesült a vizsgált polimorfizmusok megoszlásában a különböző csoportok esetében.

Nem találtunk különbséget a ROP miatt kezelt illetve nem kezelt kis születési súlyú koraszülöttek esetén sem az allél, sem pedig a genotípusok prevalenciáját illetően.

A $VEGF^{-2578}A$ allél hordozása szignifikánsan alacsonyabb volt a súlyos ROP-os (4.-5. ROP stádium) fiú koraszülöttek között, a nem ROP-os vagy alacsonyabb ROP stádiumú (1.-3. ROP stádium) fiú koraszülöttekhez képest. Az összefüggést a ROP kockázati tényezőire (gesztációs kor, születési súly, oxigénterápia és mechanikus lélegeztetés hossza) korrigáltuk.

2.3. A VEGF gén promoter polimorfizmusainak (VEGF $C^{-2578}A$, VEGF $T^{-460}C$ és a VEGF $G^{+405}C$) szerepe kis születési súlyú koraszülöttek perinatális szövődményeiben

A Hardy-Weinberg kritérium teljesült a vizsgált polimorfizmusok megoszlásában a különböző csoportok esetében.

A $VEGF^{+405}$ C allél hordozása gyakoribb volt a kis születési súlyú koraszülött populációban az egészséges újszülöttekhez képest.

A VEGF $^{-2578}$A allél prevalenciája magasabb volt a NEC-es kis születési súlyú koraszülöttek között, azokhoz a koraszülöttekhez képest, akiknél ez a komplikáció nem fordult elő. Az összefüggést gesztációs korra, valamint szepszis, PDA, súlyos hipotenzió (dobutamin igény > 9 μg/ születési súly kg /min) jelenlétére korrigáltuk.

A VEGF $^{-2578}$AA genotípus hordozása ritkábban fordult elő az ARF-es kis születési súlyú koraszülöttek között, azokhoz a koraszülöttekhez képest, akiknél ez a komplikáció nem fordult elő. Az összefüggést a gesztációs korra, valamint szepszis, NEC, RDS, PDA, súlyos hipotenzió (dobutamin igény > 9 μg/ születési súly kg /min) jelenlétére korrigáltuk.

Eredmények összefoglalása, következtetések

1. Endotélsejtek növekedési faktorainak vizsgálata a vese iszkémia/reperfúziós károsodása során

1.1. A VEGF és a HIF-1α vizsgálata iszkémia/reperfúziós patkány vese modellben

Munkánk eredményeképpen megállapíthatjuk, hogy iszkémia/reperfúzió okozta akut vesekárosodás során a HIF-1α, valamint a VEGF mRNS expresszió és fehérje szint egyaránt fokozódik. Bár korábbi eredményünk a hipoxiás vesében történő VEGF szintézis posztranszkripcionális szabályozásának jelentőségére hívta fel a figyelmet, jelenlegi vizsgálatunk eredménye arra utal, hogy a vesében megfigyelhető VEGF fehérjeszintézis fokozódás hátterében az mRNS szintek emelkedése is áll. A VEGF mRNS szintjének emelkedése feltételezhetően a HIF-1α transzkripciós faktoron keresztül valósul meg.

1.2. Nemi különbségek a VEGF és a HIF-1α expressziójában

A VEGF, ill. a HIF-1α mRNS szint emelkedése későbbi reperfúziós időpontban figyelhető meg nőstényeknél, a hímekhez képest. A T240 perces reperfúziós időpontban nőstényekben magasabb VEGF fehérjeszintet tapasztaltunk, a hímekhez képest. A HIF-1α fehérje szintek között nem találtunk különbséget a hímek és a nőstények között.

Az ösztrogének képesek a transzlációs iniciációs faktorok foszforilálását megakadályozva, fokozni a proteinek szintézist. Feltételezhető, hogy iszkémia/reperfúzió esetén, nőstényekben az ösztrogén ezen hatásának köszönhetően fokozottabb a VEGF protein szintézise, szemben a hímekkel, ahol ez a védő hatás kisebb.

Számos irodalmi adat utal a VEGF jótékony hatására vesekárosodás során. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a vese iszkémiával szembeni érzékenységében megfigyelt nemi különbségek hátterében – részben - a nőstények magasabb posztiszkémiás VEGF szintje áll.

1.3. Az angiopoietin/Tie2 rendszer vizsgálata iszkémia/reperfúziós patkány vese modellben

Az Ang/Tie2 rendszer hipoxia által történő szabályozásáról viszonylag keveset tudunk. Irodalmi adatok alapján úgy tűnik, hogy hipoxia hatására az Ang1/Tie2 jelátvitel gátlódik. A gátlás a különböző szövetekben eltérő módon valósul meg, részben az Ang1 illetve Tie2 szintézisének csökkenésén, részben pedig az antagonista hatású Ang2 szintézisének fokozódásán keresztül.

Munkánk során azt találtuk, hogy vesében az 55 perces iszkémiát követő 10 perces reperfúzió hatására szignifikánsan csökkent az Ang1 mRNS expressziója, míg az Ang2 és Tie2 mRNS expressziók nem változtak. Eredményeink arra utalnak, hogy hipoxia hatására az Ang1/Tie2 rendszer - az Ang1 mRNS expressziójának csökkenésén keresztül - gátlódik a vesében.

Különböző molekulárbiológiai folyamatok során megfigyelhető a VEGF és az Ang/Tie2 rendszer együttes szerepe. Gyulladásos folyamatokban, a vaszkuláris simaizomsejtek szabályozásában, valamint az endotélsejt-permeabilitás szabályozásában, a VEGF és Ang1 gyakran egymással ellentétes hatásokat fejtenek ki. Eredményünket összevetve az ugyanebben a modellben megfigyelt VEGF-szintézis változásokkal, azt találtuk, hogy iszkémia/reperfúziós vesekárosodás során a VEGF szintjének emelkedését az Ang1 mRNS expressziójának csökkenése előzi meg. Feltételezzük, hogy ezen molekuláris változások lényeges szerepet játszanak a posztiszkémiás veseszövetben megfigyelt kapilláris és tubuláris proliferáció folyamatában.

2. Endotélsejt növekedési faktorok polimorfizmusainak vizsgálata a koraszülöttség anyai és magzati oldalainak szempontjából

2.1. A VEGF gén promoter polimorfizmusainak szerepe preeklampsziában

A VEGF génjének polimorfizmusai közül néhány funkcionális, azaz befolyásolják a termelődő VEGF mennyiségét. In vitro vizsgálatok során azt találták, hogy a VEGF $G^{+405}C$ polimorfizmus GG genotípusát a legmagasabb, GC genotípusát közepes, míg a CC genotípust a legalacsonyabb mennyiségű VEGF-szintézis kísérte lipopoliszachariddal indukált perifériás mononukleáris sejtekben. A VEGF $C^{-2578}A$ esetében a CC homozigóta perifériás mononukleáris sejtek szignifikánsan több VEGF-et termeltek az AA homozigóta sejtekhez képest.

Eredményeink arra utalnak, hogy a magasabb VEGF termelő képességgel járó $VEGF^{+405}G$ allél hordozása, protektív hatással bírhat a preeklampszia kialakulásával szemben. Számos adat található az irodalomban arra vonatkozóan, hogy a VEGF részt vesz a szisztémás vérnyomás szabályozásában, valamint arra vonatkozóan, hogy a VEGF aktivitásának gátlása proteinuriához vezet. Munkánk során összefüggést találtunk a hipertenzió és a proteinuria korábbi megjelenése, valamint a csökkent VEGF termelő képességgel járó VEGF-2578 A

allél hordozása között preeklampsziában.

2.2. Az Ang2 és a VEGF gén promoter polimorfizmusainak szerepe koraszülöttek retinopátiájában

Nem találtunk összefüggést a VEGF $C^{-2578}A$, és az Ang2 $G^{-35}C$ SNP hordozása valamint a koraszülöttek retinopátiájának kockázata között. Az irodalomban nem található adat az Ang2 promoter polimorfizmusainak betegségekben betöltött szerepéről. Korábban igazolták, hogy az Ang2 expresszió szempontjából a promoter legfontosabb szakaszát a transzkripciós start pont körüli, körülbelül 600 bázispárnyi régiója alkotja. Az általunk vizsgált Ang2 $G^{-35}C$ polimorfizmus a promoternek ezen a szakaszán található. A promoteren belül, a polimorfizmus pontosabb lokalizációját tekintve, a Pax2 transzkripciós faktor kötőhelyén fekszik. A Pax2 transzkripciós faktor a retina fejlődésében lényeges szerepet játszik. Vizsgálatunk eredménye nem támasztja alá azt a feltételezésünket, hogy az Ang2 $G^{-35}C$ SNP hordozása befolyásolja a ROP kockázatát vagy progresszióját.

A 4.-5. ROP-stádiumú fiú koraszülöttekben szignifikánsan alacsonyabb volt a $VEGF^{-2578}A$ allél prevalenciája a többi fiú koraszülötthöz képest. Az összefüggés alapján feltételezhető, hogy az alacsonyabb VEGF termeléssel együtt járó mutáns allél hordozásának protektív szerepe lehet kis súlyú fiú koraszülöttekben, a ROP progressziójával szemben.

2.3. A VEGF gén promoter polimorfizmusainak szerepe kis születési súlyú koraszülöttek perinatális szövődményeiben

A $VEGF^{+405}C$ allél prevalenciáját szignifikánsan magasabbnak találtuk a kis súlyú koraszülöttekben az egészséges újszülöttekhez képest. Eredményeink arra utalnak, hogy kis súlyú koraszülöttek esetében az alacsonyabb VEGF termelő képességre hajlamosító $VEGF^{+405}$ polimorfizmus C alléljának hordozása hajlamosító tényező lehet a koraszülöttség szempontjából.

A kis súlyú koraszülötteket érintő perinatális szövődmények genetikai vizsgálata során a NEC és az akut veseelégtelenség esetében találtunk összefüggést a $VEGF^{-2578}A$ allél hordozásával.

Összefoglalásként azt mondhatjuk, hogy a VEGF polimorfizmusok hordozása kockázati tényező lehet mind a koraszülöttség, mind egyes perinatális komplikációk kialakulása szempontjából. Eredményeink arra utalnak, hogy a kis súlyú koraszülötteket érintő szövődmények rizikótényezőinek felmérése céljából érdemes lehet ezeknek a polimorfizmusoknak a meghatározása, azonban a klinikai jelentőség tisztázásához még

további vizsgálatokra van szükség.

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretném köszönetemet kifejezni Tulassay Tivadar Professzor Úrnak, hogy az általa vezetett PhD program résztvevője lehettem az I.sz. Gyermekklinika Nefrológiai kutatólaboratóriumában. Hálás vagyok a szakmai és anyagi háttér biztosításáért, mely lehetővé tette, hogy kutatómunkám éveit egy nemzetközi szinten is elismert laboratóriumban tölthettem.

Hálával tartozom témavezetőmnek, Szabó András Professzor Úrnak, hogy tudományos pályámon elindított. Köszönöm neki, hogy munkám során támogatására bármikor számíthattam, és hogy a kutatómunka technikai feltételeit megteremtette számomra.

Köszönöm Dr. Vannay Ádámnak, hogy már tudományos diákkörösként bekapcsolódhattam munkájába. Megtanított a kutatómunka lépéseire, a molekuláris biológiai metodikák alkalmazásától egészen az eredmények publikálásáig.

Köszönettel tartozom Dr. Vásárhelyi Barnának önzetlen szakmai és emberi segítségéért, különösen a publikációim kapcsán nyújtott rengeteg, hasznos tanácsáért.

Köszönöm Dr. Rigó János Professzor Úrnak és Dr. Fekete Andreának a közlemények publikálásában, illetve a kísérletek elvégzésében nyújtott segítségüket.

Külön köszönöm Dr. Treszl Andrásnak és Dr. Dunai Györgynek a klinikai beteganyag gyűjtésében és a humán genetikai vizsgálatok tervezésében és kivitelezésében végzett munkájukat. Köszönöm Dr. Bokodi Gézának, hogy a statisztikai elemzésekben segítségemre volt.

Köszönöm közvetlen munkatársaimnak, Dr. Szebeni Beátának, Dr. Bokodi Gézának, Dr. Derzbach Lászlónak, Dr. Rusai Krisztinának, Dr. Balogh Ádámnak, Bernáth Máriának, Dr. Szabó Viktóriának, Sziksz Ernának és Szabó Szilviának, hogy baráti, segítő társaságukban végezhettem munkámat.

A szerző értekezéssel kapcsolatos publikációi

Bányász I, Bokodi G, Vásárhelyi B, Treszl A, Derzbach L, Szabó A, Tulassay T, Vannay A. (2006) Genetic polymorphisms for vascular endothelial growth factor in perinatal complications. Eur Cytokine Netw, 17: 266-270. (IF: 1,073)

Bányász I, Bokodi G, Vannay A, Szebeni B, Treszl A, Vásárhelyi B, Tulassay T, Szabó A. (2006) Genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor and angiopoietin 2 in retinopathy of prematurity. Curr Eye Res, 31: 685-690. (IF: 1,116)

Bányász I, Szabó S, Bokodi G, Vannay A, Vásárhelyi B, Szabó A, Tulassay T, Rigó J Jr. (2006) Genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor in severe pre-eclampsia. Mol Hum Reprod, 12: 233-236. (IF: 3,191)

Disszertációtól független közlemények

Szabó V, Borgulya G, Filkorn T, Majnik J, Bányász I, Nagy ZZ. (2007) The variant N363S of glucocorticoid receptor in steroid-induced ocular hypertension in Hungarian patients treated with photorefractive keratectomy. Mol Vis, 13: 659-666. (IF: 2,239)

Bokodi G, Derzbach L, Bányász I, Tulassay T, Vásárhelyi B. (2007) Association of interferon gamma T+874A and interleukin 12 p40 promoter CTCTAA/GC polymorphism with the need for respiratory support and perinatal complications in low birthweight neonates. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 92: F25-29. (IF: 0,0)

Vannay A, Dunai G, Bányász I, Szabó M, Vámos R, Treszl A, Hajdú J, Tulassay T, Vásárhelyi B. (2005) Association of genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor and risk for proliferative retinopathy of prematurity. Pediatr Res, 57: 396-398. (IF: 2,875)