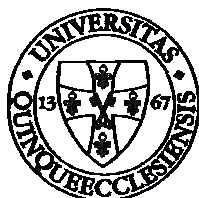


CYTOGENETIKAI VIZSGÁLATOK GYERMEKKORI  
IMMUNOLÓGIAI ÉS GASTROINTESTINÁLIS  
BETEGSÉGEKBEN ÉS MALFORMATIÓKBAN

Doktori (PhD) értekezés tézisei

DR. TÁRNOK ANDRÁS



Pécsi Tudományegyetem,  
Gyermekegyógyászati Klinika

2009.

**CYTOGENETIKAI VIZSGÁLATOK GYERMEKKORI  
IMMUNOLÓGIAI ÉS GASTROINTESTINÁLIS  
BETEGSÉGEKBEN ÉS MALFORMATIÓKBAN**

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Dr. Tárnok András**

Pécsi Tudományegyetem,  
Gyermekegyógyászati Klinika

Programvezető: Prof. Dr. Molnár Dénes

Tutor: 

Prof. Dr. Méhes Károly
------------------------

**2009.**

## **RÖVIDÍTÉSEK**

CSI	Centromere Separation Index = Centroméra Szétválási Index
EMA	Endomysium-ellenes antitest
GI	Gastrointestinális
ID	Immundeficiencia
IgA	Immunglobulin A
PCD	Premature Centromere Division = korai centroméra-szétválás
SCE	Sister Chromatid Exchange = testvérkromatida-kicserélődés

## **BEVEZETÉS**

Az eukaryóta sejt mitotikus osztódásakor két azonos leánysejt jön létre. A sejtosztódás S fázisában a kromoszómák megkettőződnek, majd a profázisban kondenzálódnak. Mindegyik kromoszóma két identikus kromatidából áll, melyeket a centroméra tart össze. A prometáfázisban és a metafázisban a kromoszómák a sejt egyenlítői síkjában helyezkednek el és az osztódási orsó húzófonalai a centromérákhoz kapcsolódó kinetochorokhoz tapadnak. Az anafázisban a centromérák szétválnak és az elvált testvérkromatidákat a húzófonalak a sejt két ellentétes pólusára juttatják. A sejtosztódás végére az eredeti sejttel megegyező genetikai állományú két leánysejt keletkezik.

Standard karyotípus elkészítéséhez bármilyen metafázisos sejteket tartalmazó, osztódni képes sejtpopuláció szükséges. Legtöbbször a vér lymphocytáit használják, mivel ezek proliferációját könnyű indukálni, de egyéb szövetek is pl. bőr (fibroblastok), csontvelő, amnion folyadék, chorion-boholy stb. felhasználhatóak szükség esetén.

### **A karyotípus elkészítésének rutin módszere – rövid összefoglalás**

1. A levett vérmintához heparint, hogy az alvadást meggátoljuk.
2. Centrifugálással a mononuclearis sejteket (lymphocyták és monocyták) elválasztjuk a vér egyéb alakos elemeitől
3. A mononuclearis sejteket mitogén hozzáadásával (pl. phytohemagglutinin, ami a lymphocyták proliferációját serkenti) 3-4 napig tenyésztjük
4. A mitózist metafázisban colchicinnel leállítjuk. A tenyésztési idő végén, amikor nagyszámú osztódó sejt észlelhető a colchicin az osztódási orsót tönkreteszi és megakadályozza, hogy a mitózis befejeződjön. Ezáltal a metafázisban levő sejtek aránya kifejezetten magas lesz.

5. A lymphocyták összegyűjtését követően rövid ideig tartó hypotonizálás következik. Ennek során a sejtek ozmotikus duzzadása következik be, mely nagymértékben elősegíti, hogy olyan preparátumokat készítsünk, melyben a kromoszómák nem fekszenek egymásra.
6. A duzzadt sejteket fixáljuk, majd tárgylemezre kicseppentjük (mely a kromoszómákat egy síkba rendezi) és megszárítjuk.
7. A tárgylemezeket különböző módon megfesthetjük. Sávozás hatására a kromoszómákon sávok jelennek meg, így a karyotípus összes kromoszómáját egyértelműen azonosítani lehet. Sávozás nélkül azonban egyes kromoszómák között lehetetlen különbséget tenni.
8. A sávozott tárgylemezeket átvizsgálva jól értékelhető mitózisokat keresünk (a kromoszómák sem túl rövidek, sem túl hosszúak és egymást sem fedik), melyeket lefényképezünk.
9. A képről kivágott egyes kromoszómákat karyotípusba rendezzük. Ezt a műveletet már számítógépes szoftverrel is végezhetjük. Hagyományos festést követően csak a főbb kromoszóma-csoportok különíthetőek el, míg sávozás esetén az összes kromoszóma egyértelműen párba állítható és megszámozható.

A kromoszómák mérete és alakja alapján az emberi szomatikus sejtek kromoszómái 7 csoportra és a nemi kromoszómákra oszthatóak.

### **Centroméra-szétválás**

#### **A sorrend létezése**

A sejtosztódás egyik lényeges mozzanata az, amikor a kromoszómákat alkotó testvérkromatidák a centromeránál szétválnak és a leánysejtekbe vándorolnak. 1935-ben Aisenberg elsőként írta le, hogy ez a szétválás nem véletlenszerűen történik. A 70-es évek közepén Méhes és Vig egymástól függetlenül publikálta a centroméra-szétválás sorrendjét emberi leukocytákban. Feltűnő volt, hogy a 2-es, 17-es és 18-as kromoszóma korábban vált szét, míg az akrocentrikus kromoszómák esetén a szétválás még akkor sem indult meg, amikor az összes többi kromoszómánál ez már befejeződött. Később más munkacsoportok is bekapcsolódtak ebbe a kutatásba és a szétválást nemcsak különböző emberi sejtekben, hanem egyéb speciesekben is vizsgálták. Közleményeik az eredeti megfigyeléseket erősítették meg. A kutatások eredményeként az emberi centromérák szétválási sorrendjét sikerült meghatározni.

#### **A centroméra-szétválás meghatározása**

A centroméra-szétválás vizsgálatához több száz vagy ezer mitózis aprólékos analízise szükséges. A szétválás legjobban hagyományosan festett, nem sávozott kromoszómánál lehetséges, ugyanakkor sávozás szükséges a kromoszómák biztonságos azonosításához. Olyan késői metafázisok keresése,

melyekben a szétválás jól látható, de a kromoszómák még biztonsággal azonosíthatóak kifejezetten nehéz és roppant időigényes. A fenti nehézségek mellett a centroméra-szétválás szubjektív megítélése is szintén hozzájárul a sorrend megállapításának bonyolultságához.

A szétválási sorrend meghatározása 2 módszer segítségével történhet:

**1. Premature Centromere Division (PCD, korai centroméra-szétválás):** Méhes módszerével elsősorban az idő előtti szétválásra való hajlam mutatható ki. Az értékelés során csak azokat a mitózisokat vesszük figyelembe, ahol legfeljebb 3 kromoszóma vált szét. Szétválásnak azt tekintjük, ha a mikroszkópos vizsgálatkor a két testvérkromatida között semmilyen összeköttetést nem találunk. Nagyszámú mitózisban az egyes kromoszómákban észlelt szétválások számát elosztva a „random” eloszlást feltételezve várt értékkel, a kapott szám kifejezi az adott kromoszóma korai szeparációra való hajlamát. („Várt érték” a 100 mitózisban észlelt összes szétválás száma osztva huszonhárommal.)

**2. Vig vezette be a Centromere Separation Index (CSI, Centroméra Szeparációs Index) nevű** értékelő módszert, amely szerint a kromoszómákat a szétválás relatív mértéke szerint osztályozzuk. A módszer szerint 0 pontot kap az a kromoszóma, ahol a szétválás jelei nem észlelhetők, 1 pontot, ahol a testvérkromatidák egymástól eltávolodtak, de még finom szálcás összeköttetés látható köztük, és 2 pontot ahol a kromatidák már teljesen elhagyták egymást.

A CSI-t úgy számítjuk ki, hogy a legmagasabb pontszámot elért kromoszómapár értékével, mint egységgel elosztjuk a többiek pontszámát, és így megkapjuk azok relatív értékét. CSI értékei 0-1 között mozognak; a legkoraibb szétváló így értelemszerűen 1 ponttal rendelkezik. Minél nagyobb egy kromoszóma CSI-je, annál korábbi centroméra-szeparáció figyelhető meg esetében.

Az értékelési nehézségek ellenére különböző laboratóriumokban végzett ismételt vizsgálatok alapján igazoltnak és elfogadottnak tekinthető, hogy ez emberi sejtek mitózisaiban a metafázis végén a különböző kromoszómák szétválása nem véletlenszerűen történik.

A sorrend élén a 18. és 2. kromoszómák vannak, ezeket követi a 4-5., X, 12., 3. 17. pár, késői szétválóak az 1., 7., 8., 9., 11., 16. kromoszómák, míg a sort a nagy akrocentrikusok (13-15) zárják.

Minél szélsőségesebb egy kromoszóma helyzete, annál megbízhatóbban állapítható meg a sorrendben elfoglalt helye, a rangsor közepén viszont fokozottan kell számolni a szubjektivitásból eredő bizonytalansággal.

### **A szétválaszi sorrend állandósága**

Különböző élőlényekben a szétválást vizsgálva a speciesre jellemző szekvenciát találtak. Az eddigi vizsgálatok alapján a sorrendet NEM BEFOLYÁSOLJA:

A kromoszóma hossza, a centroméra helyzete, a heterokromatikus rész nagysága, a tenyésztés időtartama vagy hőmérséklete, a táptalaj, a colchicin kezelés, a hypotonizálás változtatása, gyógyszerek, sugárzás és az egyed neme.

Az életkor szerepe nem tisztázott még. A fajspecifititás és a nagyfokú állandóság alapján úgy tűnik, hogy a szétválás sorrendje genetikailag meghatározott jelenség, melyet az eddigi kísérletek során exogén faktorokkal befolyásolni nem sikerült.

### **A szétválaszi sorrend és kóros állapotok – rövid összefoglalás**

Közismert, hogy minden olyan hatás, amely osztódáskor éri a sejtet a kromoszómák sérülését okozhatja, vándorlásukban, párosodásukban zavart idézhet elő. Az ilyenkor bekövetkező kromoszóma-rendellenesség latens vagy manifeszt betegség alapja lehet, amely számos esetben öröklődhet is.

- 1) **Aneuploidia:** A centroméra-szétválás sorrendjének megváltozása non-disjunctio révén aneuploidiahoz vezethet. Triszómiás gyermekek és szüleik vizsgálata során a kérdéses kromoszómák esetén nagyobb gyakorisággal írtak le túl korai, vagy késői esetleg hiányzó szétválást.
- 2) **Strukturális rendellenességek:** A kromoszómák szerkezeti rendellenességeiben is jelentkezhet túl korai vagy túl késői szétválás. Nemcsak a deléciós (13q14) vagy transzlokációs (3p:19q) kromoszómák idő előtti szétválását, hanem D csoportú kromoszómák fúziója során létrejött új kromoszóma túl késői szeparációját is leírták.
- 3) **Daganatképződés:** A kromoszóma aberrációknak alapvető szerepük van a rosszindulatú daganatok keletkezésében. Korábbi megfigyelések azt valószínűsítik, hogy a szétválaszi sorrend megváltozása mutagén hatást tükröz, és így a daganatkeletkezésben szerepet játszhat. A korai centroméra-szétválás, az aneuploidia, a mutagén ágensek, a kromoszóma törése, az immunológiai változások és a malignitás közötti kapcsolatrendszerre már korábban utaltak közlemények. Számos malignus megbetegedésben kimutatták a szétválaszi sorrend megváltozását.

## CÉLKITŰZÉS

1. A centroméra-szétválás sorrendje befolyásolható-e, változtatható-e exogén faktoral, mint pl. a vanádium, ami köztudottan befolyásolja a sejtosztódást;
2. a centroméra-szétválás vizsgálatához objektív módszer bevezetése;
3. kromoszóma rendellenességek és a korai centroméra-szétválás vizsgálata veleszületett immunhiányos gyermekekben;
4. kromoszóma törékenység és a korai centroméra-szétválás vizsgálata lisztérzékeny gyermekekben;
5. kromoszóma rendellenességek, társuló veleszületett fejlődési rendellenességek vizsgálata gastrointestinális fejlődési rendellenességben szenvedő újszülöttekben.

## STATISZTIKAI ANALÍZIS

Minden statisztikai feldolgozásnál az Excel vagy az SPSS programot használtuk. Az átlagok közti különbségek szignifikanciáját Fisher, Chi-négyzet vagy Student *t*-próba segítségével határoztuk meg a vizsgálatoknak megfelelően. A különbséget statisztikailag szignifikánsnak tekintettük, ha  $P < 0.05$  volt.

## VIZSGÁLATOK

### VANÁDIUM HATÁSA A CENTROMÉRA-SZÉTVÁLÁSRA

#### BEVEZETÉS

A centroméra-szétválás „normális” sorrendje ismert humán mitózisokban. Egy adott kromoszóma túl korai vagy túl késői szétválása triszómiához vagy monoszómiához vezethet, vagyis a sorrend megváltozása aneupoidiát okozhat, és a kromoszóma instabilitás egyik indikátora lehet. Jogosan vetődik fel a kérdés, vajon lehet-e ezt a jelenséget mutagén ágensekkel befolyásolni. Ismereteink szerint eddig kevés tanulmány foglalkozott ezzel a kérdéssel. Vizsgálatunk során a cytotoxikus ágensként jól ismert vanádium centroméra-szétválásra kifejtett hatását vizsgáltuk humán lymphocytákban.

#### ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Perifériás vér lymphocytáiból rutin kromoszóma-preparátumokat készítettünk. A vanádium hatásának vizsgálatához a tenyésztés végén különböző koncentrációkban és különböző ideig 5%-os

NaVO<sub>3</sub>-ot adtunk a kultúrákhoz az alábbiak szerint: 0,51, 1,02 és 2,56 μmol/ml, mindegyik 2,5 óráig, 2,56 μmol/ml 3 illetve 4 óráig, 5,12 μmol/ml 2,5 illetve 4 óráig, és 2,56 μmol/ml 6 óráig. Mivel 2,56 μmol/ml feletti vanádium koncentráció illetve 4 órán túli alkalmazás esetén a vanádium oly mértékben volt toxikus, hogy értékelésre alkalmas mitózisokat nem találtunk, ezért csak a legenyhébb illetve a legintenzívebb kezelésnek kitett, de még értékelhető mitózisokat tartalmazó kultúrákat vizsgáltuk tovább. Kontrollként ugyanazon vérminta szolgált, melyet vanádiummal nem kezeltünk. A mitotikus index meghatározása 5 különböző területen legalább 2000 sejt vizsgálatával történt és az észlelt mitózisok számát 1000 sejtre vonatkoztatva adtuk meg.

A szétválás könnyebb vizualizálása miatt a kromoszómákat nem sávoztuk, ami azzal a hátránnyal járt, hogy csak a főbb csoportok illetve azok jellegzetes képviselői voltak elkülöníthetőek. A centroméra-szétválás értékelése a korábban említett CSI segítségével történt.

**1. Táblázat. A mitotikus index és a centroméra szeparációs index (CSI) vanádiummal kezelt lymphocita kultúrákban és a kontroll csoportban**

	Kontroll	Vanádium-kezelt kultúrák	
		0,51 μmol/ml 2,5 óra	2,56 μmol/ml 4 óra
<b>Mitotikus index (1/1000)</b>	49.5	26.0 <sup>A</sup>	24.5 <sup>A</sup>
<u>CSI</u>			
Mitózisok száma	95	91	93
Kromoszóma vagy csoport			
1	0.11	0.15	0.08
2	1.00	0.99	1.00
3	0.47	0.51	0.47
4-5	0.61	0.60	0.58
6-X-12	0.50	0.56	0.52
13-15	0.00	0.01	0.01
16	0.02	0.08	0.03
17-18	0.97	1.00	0.93
19-20	0.45	0.50	0.44
21-22-Y	0.00	0.01	0.02

<sup>A</sup>p < 0.001 a kontrollhoz képest.

A CSI értékeinek különbsége a 3 csoportban statisztikailag nem szignifikáns..



## **EREDMÉNYEK**

A három csoport eredményeit (legenyhébb és legintenzívebb vanádium-kezelés, valamint a kontroll) az **1. Táblázat** mutatja. A vanádiummal kezelt kultúrákban a mitotikus index szignifikánsan alacsonyabb volt a kontrollhoz képest. Két gap-et kivéve sem törést, sem egyéb strukturális aberrációt nem találtunk egyik csoportban sem.

A CSI értékei csaknem azonosak voltak a vanádiummal kezelt csoportok illetve a kontroll csoportban. Mivel az egyes kromoszómákat sávozás hiányában nem tudtuk azonosítani, így csak a kromoszóma csoportok átlagait tudtuk összevetni, melyek hasonló tendenciájú szeparációt jeleztek. A kontroll csoportban és a vanádiummal kezelt csoportokban is a 2-es, 17-es és 18-as kromoszóma korai szeparációját észleltük, míg az 1-es, 16-os és az akrocentrikusok utolsóként váltak szét. Ez a sorrend megfelelt különböző laboratóriumok korábban publikált megfigyeléseinek.

## **CYTOGENETIKAI VIZSGÁLATOK VELESZÜLETETT IMMUNHIÁNYOS GYERMEKEKBEN**

### **BEVEZETÉS**

Korábbi közlemények szerint a veleszületett immundeficienciák (ID) gyakrabban társulnak strukturális kromoszóma aberrációkkal. Ezek mellett néhány szindrómában az ID kromoszóma fragilitással való társulása figyelhető meg: ataxia telangiectasia, Bloom szindróma és Nijmegen breakage szindróma. Bizonyos kromoszómák centroméráinak instabilitása mellett ezen kromoszómák karjainak szomatikus rekombinációja és a többszörös elágazódások fokozott tendenciája is megfigyelhető a nemrég leírt ICF (Immunodeficiency, Centromeric heterochromatin instability and Facial anomalies) szindrómában.

### **A vizsgálat céljai:**

- A kromoszómák számbeli és szerkezeti aberrációinak, valamint a korai centroméra-szétválás vizsgálata különböző ID-ban szenvedő gyermekekben.
- A kromoszóma instabilitás klasszikus jegyei (törés, gap, testvérkromatida-kicserélődés, dicentrikus ill. gyűrűképződés, stb.) és a korábban nem vizsgálat idő előtti centroméra-szétválás összefüggésének vizsgálata.

### **BETEGANYAG ÉS MÓDSZEREK**

12, különböző veleszületett immunhiányos gyermek – 5 hypogammaglobulinaemia, 3-3 variábilis ID illetve IgA-hiány, valamint 1 septicus granulomatosis - (életkor: 7 hónap-11 év, fiú:leány arány 9:3) „rutin” lymphocyta-kultúráit hasonlítottuk egészséges kontrollokéhoz (n=6). A lymphocyta-kultúrák elkészítése a korábban leírt módon történt.

Az alábbi aberrációkat/jelenségeket regisztráltuk minden beteg legalább 60 mitózisában:

Hypo-, hyperdiploidia, gap, törések, strukturális eltérések (dicentrikus, gyűrűképződés, transzlokáció), a testvérkromatida-kicserélődés (Sister Chromatid Exchange, SCE) és a korai centroméra-szétválás (Premature Centromere Division, PCD) gyakorisága.

A kromoszóma instabilitás klasszikus jegyein (pl. strukturális eltérések, SCE) túl különös figyelmet fordítottunk a PCD vizsgálatára. A vizsgálat során mindent megtettünk, hogy a legobjektívebbek lehessünk, ezért a PCD vizsgálatát az alábbiak szerint egyszerűsítettük. A centroméra-szétválás sorrendjét nem határoztuk meg minden egyes mitózisban, hanem csak azoknak a metafázisoknak az arányát adtuk meg, ahol 3 vagy több teljes szétválás volt látható. Saját és irodalmi adataink alapján a rutin lymphocytá-kultúrák kevesebb, mint 4%-a tartalmaz csak ilyen metafázisokat.

**2. Táblázat Kromoszóma törések, testvérkromatida-kicserélődés (SCE) és korai centroméra-szétválás (PCD) immunhiányos betegekben és kontrollokban**

Betegek	Vizsgált mitózisok száma	Kromatida törés/sejt	Kromoszóma törés/sejt	SCE	Mitózis $\geq$ 3 PCD (%)	PCD per mitózis (13-15 krom.)
Kontroll (n=6)	86	0,009	0,004	4,1 (2,1-6,0)	2,2 (1-4)	0,004
1.	70	0,014	0,014	4,6	4,2	0
2.	85	0,012	0	3,7	2,3	0
3.	76	0	0	-	2,6	0
4.	100	0,02	0,01	6,1	5,0	0,01
5.	70	0	0	4,4	2,8	0
6.	60	0,017	0	3,9	6,7	0
7.	66	0,061*	0,03	9,7	13,7*	0,182*
	100	0,1*	0,04*	11,6*	19,0*	0,210*
8.	100	0,01	0	-	2,0	0,10
9.	80	0,025	0,037*	8,5	22,5*	0,137*
	100	0,06*	0,02	7,9	17,0*	0,06*
10.	64	0	0,016	3,6	1,6	0
11.	75	0,013	0,013	4,5	4,0	0,013
12.	60	0,017	0	5,8	3,4	0,017

**Mitózis  $\geq$  3 PCD (%):** Metafázisok aránya 3 vagy több teljes PCD-vel \*p< 0,05

**PCD per mitózis (13-15 krom.):** A 13-15-as kromoszóma PCD-inek száma mitózisonként

## **EREDMÉNYEK**

A **2. Táblázat** adatai szerint a kromoszómatörések, az SCE és a PCD frekvenciája hasonló volt a legtöbb immunhiányos gyermek kontrollal való összevetése során. Ugyanakkor a 7-es és a 9-es betegnél (hypogammaglobulinaemia és variábilis ID) a strukturális eltérések, az SCE és a PCD gyakorisága szignifikánsabb magasabb volt. Egy esetleges közelmúltban lezajlott infekciót, vagy gyógyszerhatást illetve a lymphocyta preparáció technikai hibájából eredő artefaktot kizárandó ezeket a vizsgálatokat 4-6 hónap múlva megismételtük, azonban hasonló eredményeket kaptunk. Ezeknél a gyermekeknél a kromoszóma instabilitás klasszikus jegyei és a PCD paralell jelenségnek bizonyultak. A vizsgált 12 immunhiányos gyermek egyikénél sem tudtunk ICF vagy egyéb más meghatározott szindrómát igazolni.

Ismeretes, hogy a szétválás értékelése nem mentes a szubjektivitástól. Mindazonáltal ennél a két betegnél nemcsak a PCD volt feltűnő, hanem az egyébként legkésőbb szétváló, nagy akrocentrikus kromoszómák gyakori szeparációját is megfigyeltük. Ezen D-csoportú kromoszómák szétválását normális esetben nem észleljük.

## **A CENTROMÉRA-SZÉTVÁLÁS OBJEKTÍV VIZSGÁLATA**

### **BEVEZETÉS**

Eddigi ismereteink alapján elfogadott tényként kezelhetjük, hogy az emberi mitotikus sejtek kromoszómáinak szétválási sorrendje genetikailag meghatározott jelenség. A sorrend megváltozása non-disjunctió révén aneuploidiához, malignitáshoz és egyéb, a kromoszóma instabilitáshoz kapcsolódó állapotokhoz vezethet. Ezirányú megfigyelések egyre növekvő száma ellenére a megváltozott centroméra-szétválás illetve a PCD pathogenetikai szerepét mégsem fogadták el széles körben. A módszer legfőbb kritikája, hogy a centromérák szétválásának mértékét fénymikroszkópos vizsgálat során szemmel állapítjuk meg, ami nem lehet sem pontos, sem objektív. Az alábbiakban egy egyszerű, számítógépes módszerről esik szó, mely lehetőséget biztosít a kromoszómák centroméráinak pontos távolságának meghatározására, valamint egy kereskedelmi forgalomban lévő képelemző szoftver segítségével a centromérák szétválásának mértékét is objektíven és pontosan tudja meghatározni.

### **ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

Perifériás lymphocyta tenyészetből készült rutin Giemsa festésű, jól értékelhető metafázisokat vizsgáltunk NIKON mikroszkóppal 400x-os nagyítás alatt. A mikroszkóphoz egy CCD kamerát csatlakoztattunk és a megfelelő látótereket számítógépre vittük át, majd a képek elemzéséhez az

NIH Image Version 1.55 programot használtuk. Az egyes kromoszómák szürke árnyalatos digitális képen való azonosítását követően a denzitás szelet opciót választottuk. Ezt követően a kromoszóma hossz tengelyére merőleges és mindkét centroméra közepén áthaladó vonalat húztunk és elkészítettük a vonal menti denzitásgörbét minden egyes kromoszóma esetén. A centroméra szeparációs távolságot a denzitásgörbe két centromérát reprezentáló csúcspontjai közti távolság adta. Ezt a távolságot pixelben illetve megfelelő kalibrációt követően mikrométerben is meg tudtuk jeleníteni. A képeket bináris módban (fekete-fehér) is elemeztük. Ennek során a testvérkormatidák közti szétválás még élesebben látszott, ugyanakkor a Giemzával festett centromérák finom denzitásbeli különbségei illetve a háttér szürke árnyalata elveszett. Mindazonáltal mind a szürkeárnyalatos, mind a bináris funkciók érdekes adatokat szolgáltatottak a centroméra-szétválás mértékéről.

## **EREDMÉNYEK**

Öt egészséges, normális karyotípusú egyén (3 férfi) 15-20 mitózisát vizsgáltuk. Az összes mitózisban minden egyes kromoszóma esetén a centroméra szeparációs távolságot meghatároztuk és sorrendbe állítottuk őket azok szerint. A mérés gyors és objektív volt és a felállított sorrend megfelelt a korábbi közleményekben publikált „normális” sorrendnek, azaz a 2, 18, 17, 4, 5 és X kromoszóma korai szétváló volt, míg a 16-os és az acrocentrikusok utolsóként szeparálódtak.

A módszer előnyei nyilvánvalóak voltak egy Fanconi anaemiás betegnél a PCD meghatározásakor. Ebben az esetben teljesen intakt és részben szétvált kromoszómák mellett a nagy akrocentrikusok korai szétválása volt a legszembetűnőbb jelenség. Intakt kromoszóma esetén a denzitásgörbén csak egy csúcsot, részleges szétváláskor két különálló, de még összeköttetésben levő csúcsokat észleltünk, míg teljes PCD esetén a denzitásgörbe a két csúcs között a háttér-denzitás értékére csökkent le.

## **KROMOSZÓMA TÖRÉKENYSÉG ÉS KORAI CENTROMÉRA-SZÉTVÁLÁS COELIAKIÁBAN**

### **BEVEZETÉS**

A coeliakia 1-es típusú diabetes mellitussal és más autoimmun betegségekkel való gyakori társulása jól ismert. Ez és a coeliakiában észlelt magasabb rizikójú malignitás alapján felvetődik, hogy a háttérben egy esetleges genetikai instabilitás szerepet játszhat. Kezelt és nem kezelt coeliakiásokban a kromoszóma instabilitási vizsgálatok eredményei a korábbi tanulmányok szerint ellentmondásosak. A PCD korábbi vizsgálatok alapján a kromoszóma instabilitás egyik markere

lehet. A tanulmány célja a kromoszóma törékenység és a PCD vizsgálata volt coeliakiás gyermekekben.

### **BETEGANYAG ÉS MÓDSZEREK**

Spontán és bleomycin indukált kromoszómatörékenységet és PCD-t vizsgáltunk 22 coeliakiás beteg 48 és 72 órás lymphocyta kultúráiban. Minden egyes esetben a coeliakia diagnózisát az ESPGHAN kritériumai alapján állítottuk fel. A fiú/lány arány 12/10, a betegek életkora 3-19 (átlag:12,59) év, míg a betegség fennállása 0-13 (átlag 5,9) év volt. Kontrollként 18 egészséges személy (9 fiú, 9 leány) hasonlóan elkészített lymphocyta kultúrái szolgáltak. Evvel párhuzamosan az endomysium-ellenes antitestet (EMA) is meghatároztuk és a diétára, lázas betegségre, oltásra és kromoszóma törékenységet okozó ártalmakra kérdőíveket töltöttek ki. A kérdőívek szerint sem lázas betegség, sem vakcináció illetve kromoszóma törékenységet okozó ártalom nem szerepelt a vizsgálatot megelőző 6 hétben egyik személynél sem. A gluténmentes étrend hatásának vizsgálatára 2 újonnan diagnosztizált és 5 nem diétázó coeliakiást is bevontunk a vizsgálatba.

Rutin 48 és 72 órás lymphocyta kultúrákat készítettünk perifériás vérből. A bleomycin kezelt kultúrák elkészítése a rutin kultúrákhoz hasonlóan történt, azzal a különbséggel, hogy a tenyésztés utolsó 5 órájában 30 µg/ml bleomycint adtunk hozzá. G sávosságú (kb. 400 sáv felbontású) lemezeket készítettünk karyotípus meghatározására minden személynél. A fennmaradó lemezeket csak Giemzával festettük és az alábbi jelenségeket regisztráltuk: kromatida vagy kromoszóma törés, átrendeződés, dicentrikus és gyűrűképződés. A végső értékeléskor csak a fenti aberrációkat hordozó mitózisok arányát adtuk meg, függetlenül az aberráció természetétől vagy mitózisonkénti számától. Mindez megfelel a korábban leírt bleomycin tesztnek. A 3 PCD-nél többet tartalmazó sejteket (PCD>3%) szintén regisztráltuk. 50-100 mitózist vizsgáltunk a 48 és 72 órás rutin és bleomycin kezelt kultúrából minden személy esetén és a kromoszóma aberrációkat és a PCD-t hasonlítottuk össze coeliakiás betegekben és egészségesekben.

### **EREDMÉNYEK**

Minden karyotípus normális volt, azaz sem kromatida vagy kromoszómatörést, vagy átrendeződést vagy dicentrikus vagy gyűrűképződést nem találtunk. A rutin kultúrákban a spontán kromoszóma aberrációk száma nagyon alacsony volt (0-3% betegenként) és nem volt szignifikáns különbség a coeliakiás és kontroll csoportban. Bár a kromoszóma aberrációk szignifikánsan gyakoribbak voltak a bleomycinnel kezelt kultúrákban a rutinhoz képest mindkét vizsgálati csoportban, a coeliakiásokban és a kontroll csoportban nem volt szignifikáns különbség a spontán és a bleomycin indukált kromoszómatörékenység esetén (**3. Táblázat**).

**3. Táblázat Kromoszóma aberrációk aránya rutin és bleomycin-kezelt kultúrákban (% , mean  $\pm$  SD)**

	Rutin		Bleomycin kezelt	
	48 óra	72 óra	48 óra	72 óra
<b>Coeliakia (n=22)</b>	0.38 $\pm$ 0.74 <sup>A</sup>	0.1 $\pm$ 0.29 <sup>C</sup>	42.2 $\pm$ 11.68 <sup>A</sup>	34.7 $\pm$ 16.56 <sup>C</sup>
<b>Kontroll (n=18)</b>	0.25 $\pm$ 0.46 <sup>B</sup>	1.2 $\pm$ 1.23 <sup>D</sup>	40.6 $\pm$ 9.02 <sup>B</sup>	35.3 $\pm$ 9.97 <sup>D</sup>

A,B,C,D = p<0.05

A PCD gyakorisága hasonlóan 0-5% közötti volt mind a kontroll mind a coeliakiás csoportban 4 lisztérzékeny beteg kivételével, akiknél ez az arány jóval magasabb, 8-23%-os volt.

**GASTROINTESTINÁLIS MALFORMATIÓK, TÁRSULÓ  
RENDELLENESÉGEK ÉS AZ INTRAUTERIN NÖVEKEDÉS  
VIZSGÁLATA ÚJSZÜLÖTTKÉBEN**

**BEVEZETÉS**

Egyéb malformatiókkal ellentétben a gastrointestinális (GI) fejlődési rendellenességekkel kevés célzott tanulmány foglalkozott. Jelen munka célja a GI malformatiókhoz társuló fejlődési hibák és az intrauterin növekedési zavarok tanulmányozása volt klinikánk újszülött beteganyagában.

**BETEGANYAG ÉS MÓDSZEREK**

Az 1987-2000 közötti 14 éves periódusban a POTE Gyermekklinika Perinatalis Intenzív Centrumába felvett 4241 újszülött közül 278 (6,55%) újszülöttet ápolunk GI malformatio miatt. A GI malformatiók mellett a társuló fejlődési hibákat, az ismert kromoszóma rendellenességeket, illetve associációkat, valamint a születési súlyt és gestációs kort regisztráltuk. Dysmaturusnak tekintettük azokat az újszülötteket, akiknek a súlya a 10 percentilis érték alatt volt.

**EREDMÉNYEK**

241 újszülöttben, a Hirschsprung betegség és pylorus stenosis miatt ápolott betegeket nem számítva, összesen 304 GI malformatiót észleltünk. 108 újszülöttben izoláltan, míg 133 esetben multiplex fejlődési rendellenesség részeként észleltük az emésztőtraktus anomáliáját. Ezen utóbbi 133 betegből 27 esetben ismert szindrómát, míg 9 esetben associációt sikerült igazolni. A fennmaradó 97 betegben az összetett fejlődési rendellenesség háttérében meghatározott kórképet (szindrómát vagy associációt) nem találtunk. Ezen utóbbi betegekben a csontrendszert érintő rendellenességek voltak

a leggyakrabban társuló malformációk, melyek a cardialis és az urogenitalis fejlődési hibáknál is gyakoribbak voltak. GI fejlődési rendellenesség esetén a dysmaturitás aránya az átlag populációhoz mérten szignifikánsan magasabb volt ( $P < 0,001$ ). A dysmaturus betegek aránya izolált fejlődési rendellenességként regisztrált GI malformatio esetén 38,9%, míg multiplex malformációk esetén 30,8% volt. Mivel koraszülött intenzív osztályunk tercier központként működik, így epidemiológiai következtetéseket a 4241 ápolat beteg kapcsán nem tudunk levonni.

## MEGBESZÉLÉS ÉS A VIZSGÁLATOK GYAKORLATI KÖVETKEZMÉNYEI

### 1. Vanádium hatása a centroméra-szétválásra

A vanádium a sejtosztódás, különösen a kromoszómák mozgásának ismert inhibitora. A tanulmányban megfigyelt alacsony mitotikus index is ezt a gátló hatást tükrözi. Ugyanakkor a vanádium nem változtatta meg a centroméra-szétválás sorrendjét.

#### Gyakorlati következmények

- A. Különböző vanádium-vegyületek eltérő hatást gyakorolhatnak a sejt metabolizmusra, illetve a sejtosztódásra. Vizsgálatunk azt mutatja, hogy a Na-vanadát lelassítja a lymphocytakultúrában a sejtosztódást és csökkenti a mitotikus indexet.
- B. Korábbi tanulmányok szerint a sejtek tenyésztésekor a különböző tényezők, mint pl. a hőmérséklet, a táptalaj, a tenyésztési idő, a colchicin, a hypotoniás sokk és a calcium nem befolyásolják a centroméra-szétválás sorrendjét. Az a tény, hogy a toxikus mennyiségű vanádium is ineffektív volt ebben a tekintetben szintén támogatja azt a véleményt, mely szerint a centromérák szétválási sorrendje genetikailag meghatározott jelenség és exogén faktorokkal nem lehet befolyásolni. A szétválási sorrendre ható lehetséges endogén és exogén tényezők további vizsgálata ennek alátámasztására mindenképpen szükséges.

### 2. Cytogenetikai vizsgálatok veleszületett immunhiányos gyermekekben

A 12 immunhiányos gyermekből 2 betegnél észleltünk kromoszóma instabilitásra utaló jeleket, melyeket nemcsak a klasszikus módszerek, hanem a PCD-t magas arányban hordozó metafázisok is jeleztek.

#### Gyakorlati következmények

- A. Megfigyeléseink alapján fontos hangsúlyozni, hogy a korábban „artefakt”-nak tekintett PCD könnyen felismerhető rutin kromoszóma preparátumokban. Ez a megfigyelés a későbbi kutatásokra jelentős kihatással van.

**B.** Ezek az adatok és a korábbi Fanconi anaemiás és ataxia teleangiectasiás betegekben tett megfigyelések szerint kifejezetten kóros szétválási sorrend és a túl korai szétválás a kromoszóma instabilitás jeleként értékelendő. Éppen ezért a kromoszóma instabilitás vizsgálatát indokolt a korai centroméra-szétválás elemzésével kiegészíteni.

### **3. A centroméra-szétválás objektív vizsgálata**

A fénymikroszkóp és egy számítógépes képelemző program segítségével létrehozott egyszerű képelemző rendszert ismertetem, mellyel a centromérák szétválásának mértékét pontosan és objektíven meg lehet határozni.

#### **Gyakorlati következmények**

A módszer egyszerű, gyors és relatíve olcsó, feltéve, hogy a képelemző rendszer rendelkezésre áll. Segítségével pontosan és objektíven tudjuk vizsgálni a centromérák szétválását. Korábbi minták retrospektív vizsgálatát is lehetővé teszi, pl. családvizsgálatoknál, amikor a centromérák anomáliáit, mint a kromoszóma instabilitás egyik jelét keressük.

### **4. Kromoszóma törékenység és a korai centroméra-szétválás coeliakiában**

A kromoszóma törékenységet vizsgálva az alkalmazott módszertől függetlenül nem találtunk szignifikáns különbséget a coeliakiás és a kontroll csoportban. A törékenység nem mutatott összefüggést a diétával, a betegség fennállásának időtartamával, az életkorral vagy a nemmel. A törékenységi tesztek nem igazoltak kromoszóma instabilitást coeliakiában. A néhány betegnél észlelt szokatlanul magas arányú PCD (8-23%) oka nem tisztázott, de a jelenség további vizsgálatokat igényel, különösképpen a glutén enteropathia és a malignitás kapcsolata miatt.

#### **Gyakorlati következmények**

Vizsgálataink *Kolacek és mtsai* megfigyelését támasztják alá, azonban a diéta ideje és a törékenység között összefüggést mi nem találtunk. Hasonló összefüggés a diéta és a PCD között nem zárható ki, ugyanakkor adataink evvel kapcsolatosan nem egyértelműek. Lehetséges, hogy az instabilitás különböző jelei eltérően manifesztálódnak ugyanazon betegségben, amint ezt Fundia korábban felvetette.

Az ellentmondások ellenére nagyon valószínű, hogy a klasszikus coeliakiához nem szükségszerűen társul kromoszóma törékenység. Két évvel később az előbbi feltevésünket igazolták *Kolacek és mtsai*. Vizsgálatuk szerint coeliakiás betegek peripheriás véréből izolált lymphocytáiban a kromoszóma aberrációk gyakorisága szignifikánsan csökkent gluténmentes étrenden. Álláspontjuk szerint a genom szintű instabilitás másodlagos jelenség, melyet valószínűleg a krónikus intestinalis gyulladás idéz elő.



Coeliakiás gyermekek további vizsgálata során 2 leányt találtunk, akiknek karyotípusa 45,X/47,XXX volt (Méhes et al. 2007). A coeliakia és a nemi kromoszómák aberrációjának társulása – főként az Ullrich-Turner szindróma – korábbi közleményekből jó ismert, azonban ezt a fajta mozaikosságot még nem publikálták korábban coeliakiás betegeknél.

Ezen megfigyeléseknek legalább két gyakorlati következménye van:

- A.** Turner szindrómás betegekben a coeliakiát szűrni kell és a pozitív esetekben vékonybélbiopszia javasolt. A fel nem ismert, illetve nem kezelt coeliakiában a malignus lymphomák és egyéb rosszindulatú daganatok kockázata jóval magasabb, mint a jól diétázó coeliakiásokban. Ezen felül a nem kezelt coeliakia akadályozza a növekedési hormon kezelést Turner szindrómában.
- B.** Coeliakiás betegekben klinikai gyanú esetén cytogenetikai vizsgálat elvégzése javasolt, különösen alacsony termetű leányokban.

## **5. Gastrointestinális malformációk, társuló rendellenességek és az intrauterin növekedés vizsgálata újszülöttekben**

A vizsgálataink során észlelt gastrointestinális (GI) fejlődési hibák megoszlása megfelelt az irodalmi adatoknak. Az intrauterin növekedési elmaradás aránya az átlag populációhoz mérten jelentősen magasabb volt GI malformációk esetén. A társuló fejlődési hibák vizsgálatakor feltűnő volt, hogy a csontrendszeri malformációk gyakoribbak (45,4%) voltak a szív (41,2%) és az urogenitalis (31,9%) rendellenességekhez képest.

### **Gyakorlati következmények**

A GI malformációk gyakran társulnak dysmaturitással és a leggyakoribb társuló rendellenesség a csontrendszert érinti. Ez a társulás, – melyet korábban nem publikáltak – további vizsgálatokat igényel. Végezetül hangsúlyozzuk, hogy a GI fejlődési rendellenességek kivizsgálása során a szív és az urogenitalis traktus vizsgálatát célszerű kiegészíteni a csontok vizsgálatával, hiszen a betegek csaknem felében ilyen eltéréseket igazoltunk.

## ÖSSZEFOGLALÁS

Korábbi megfigyelések alapján kijelenthető, hogy a kromoszóma aberrációk, az immundeficiencia, a fejlődési rendellenességek, a malignitás, a spontán vetélés és a növekedési, érési zavar nemcsak önállóan fordulnak elő, hanem bizonyos esetekben átfedés lehet közöttük.

Nagy valószínűséggel nem specifikus genetikai instabilitás állhat a háttérben és annak különböző klinikai megnyilvánulásai a korábban említettek. Ezt a hypothesis-t nemcsak a korábbi hivatkozásokban említett közlemények, hanem jelen tézis megfigyelései és eredményei is támogatják.

Az alábbi témakörök átfedéseinek vizsgálatához járult hozzá jelen értekezés:

- A.** Kromoszóma aberrációk és immundeficiencia,
- B.** Kromoszóma aberrációk és coeliakia (autoimmun betegség),
- C.** Fejlődési rendellenességek és az intrauterin növekedési elmaradás.

A malignitás és a malformatiók átfedésének vizsgálatával kapcsolatosan egy, a tézisben nem részletezett munkánkra hivatkozunk (*Hadzsiev et al. 2006*). Prospektív, szisztematikus vizsgálatunk során a fejlődési rendellenességben szenvedő gyermekekben és családtagjaikban a malignus megbetegedések gyakoriságát vizsgálva szignifikánsabb több malignus betegségre derült fény a fejlődési rendellenességben szenvedő gyermekek nagyszüleiben a kontroll csoporthoz képest, ami a malignus megbetegedések magasabb rizikóját veti fel idősebb életkorban.

A centromérák sejtsztódásban betöltött szerepének széleskörű vizsgálata ellenére nagyon keveset tudunk a centroméra-szétválás szabályozásáról. A szétválási sorrendet irányító folyamatok szinte teljesen ismeretlenek számunkra. Ennek további vizsgálata közelebb vihet ahhoz, hogy megértsük ezt a folyamatot.

Végezetül fontosnak tartom megjegyezni, hogy a tézisben érintett kísérletes és klinikai vizsgálatok azt mutatják, hogy nehéz és izgalmas kérdések is vizsgálhatóak egyszerű módszerekkel, melyek eredménye további kutatások alapjául szolgálhat.

Irodalomjegyzék és köszönetnyilvánítás az angol nyelvű részben.