

# Citokinekre vonatkozó génpolimorfizmus vizsgálatok jelentősége szisztémás masztocitózisban

Doktori értekezés

**Dr. Rausz Eszter Zsófia**

Semmelweis Egyetem  
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Várkonyi Judit Ph. D. egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Horváth Laura Ph. D. egyetemi adjunktus  
Dr. Szalai Zsuzsanna Ph. D. osztályvezető főorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Dr. Sótonyi Péter D. Sc. egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Rónai Zsolt Ph. D. egyetemi adjunktus  
Dr. Kiss Csaba Ph. D. főorvos

Budapest  
2014

**Tartalomjegyzék**

Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés	10
2. Irodalmi áttekintés	11
2. 1. Masztocitózis	11
2. 1. 1. Patofiziológia	11
2. 1. 2. Epidemiológia	13
2. 1. 3. Klasszifikáció	13
2. 1. 4. Tünetek	15
2. 1. 5. Diagnózis	16
2. 1. 5. 1. Csontvelővizsgálat	18
2. 1. 5. 2. Szérumból történő vizsgálatok	18
2. 1. 5. 3. Egyéb vizsgálatok	19
2. 1. 6. Differenciáldiagnosztika	20
2. 1. 7. Terápia	21
2. 2. A hízósejtek érése, differenciálódása és a folyamatban szerepet játszó faktork	22
2. 2. 1. A citokinek általános tulajdonságai	23
2. 2. 2. A hízósejtekre ható citokinek	23
2. 2. 3. Az IL-6 szerepe	27
2. 2. 3. 1. Az IL-6 különböző betegségekben	27
2. 2. 3. 2. Az IL-6 és az IL-6R polimorfizmus	28

2. 3. Komplement rendszer	29
3. Célkitűzések	32
4. Anyag és módszer	34
4. 1. Betegek és kontrollcsoport	34
4. 2. Vérminták	34
4. 3. DNS mintavétel és izolálás	36
4. 4. Genotípus meghatározás	37
4. 4. 1. Az IL-6 gén Asp358Ala SNP vizsgálata	37
4. 4. 2. Az IL-6R gén -174 G/C promóter polimorfizmus vizsgálata	38
4. 5. Komplement rendszerrel kapcsolatos vizsgálatok	39
4. 6. Statisztikai módszerek	40
4. 7. Csontvelőbiopszia	40
4. 8. Endoszkópos vizsgálatok, mintavétel	40
4. 9. A szövettani minták feldolgozása	40
4. 10. A szerző szerepe a folyamatban	42
5. Eredmények	44
5. 1. IL-6 -174 G/C SNP vizsgálat	44
5. 2. IL-6R Asp358Ala (A/C) SNP vizsgálat	45
5. 3. az IL-6 -174 G/C és az IL-6R Asp358Ala (A/C) SNP-k előfordulásának együttes elemzése	46
5. 4. Komplement rendszerrel kapcsolatos vizsgálatok	47
5. 5. Esetbemutatók	49

5. 5. 1. I. számú eset bemutatása	49
5. 5. 2. II. számú eset bemutatása	56
5. 6. Egyéb statisztikai elemzések	60
5. 6. 1. Alcsoportok szerinti megoszlás	61
5. 6. 2. Nemek szerinti megoszlás	61
5. 6. 3. Életkor szerinti megoszlás	61
5. 6.4. Triptáz szint szerinti megoszlás	62
6. Megbeszélés	64
7. Következtetések	69
8. Összefoglalás	70
9. Summary	71
10. Irodalomjegyzék	72
11. Saját publikációk jegyzéke	83
12. Köszönetnyilvánítás	84

**Rövidítések jegyzéke**

Ala	alanin
ALAT	alanin aminotranszferáz
ALP	alkalikus foszfatáz
ASAT	aszpartát aminotranszferáz
ASM	agresszív szisztémás masztocitózis
Asp	aszparaginsav
AU/ml	Arbitrary Units/ ml
bp	bázispár
Ca	kalcium
CI	konfidencia intervallum
Cl	klór
CM	kután masztocitózis (cutan mastocytosis)
CN	karbamid, urea
CSF	kolónia stimuláló faktor (colony stimulating factor)
CT	computer tomography
DNS	dezoxi-ribo-nukleinsav
EDTA	etilén-diamin-tetra-acetát
ELISA	enzimmel kötött immunszorbens módszer (enzyme-linked immunosorbent assay)
EPO	eritropoetin
EtBr	etilén-bromid

fT3	szabad trijód-tironin
fT4	szabad tiroxin
G-CSF	granulocita kolóniastimuláló faktor
GGT	gamma glutamil transzferáz
Gly	glicin
GM-CSF	granulocita-makrofág kolóniastimuláló faktor
HANO	herediter angioneurotikus ödéma
HCT	hematokrit
HE	hematoxin-eozin
H-R1	hisztamin receptor-1
H-R2	hisztamin receptor-1
Ig	immunglobulin
IgA	immunglobulin-A
IgE	immunglobulin-E
IgE-R	immunglobulin-E-receptor
IgG	immunglobulin-G
IgM	immunglobulin-M
IL	interleukin
IL-1	interleukin-1
IL-10	interleukin-10
IL-13	interleukin-13
IL-14	interleukin-14

IL-3	interleukin-3
IL-4	interleukin-4
IL-6	interleukin-6
IL-6R	interleukin-6-receptor
IL-8	interleukin-8
IL-9	interleukin-9
INH	inhibitor
ISM	indolens szisztémás masztocitózis
K	kálium
KIT	őssejt faktor (SCF) receptora
LT	leukotrién
Lys	lizin
MAC	lítikus komplex, membrán attack molekula
MAT	masztocita aktivációs tünet együttes
MC	masztocita, hízósejt
MCH	egy vörösvértestre számított hemoglobin mennyiség
MCHC	vörösvérsejtek átlagos hemoglobinkoncentrációja
MCL	masztocita leukémia
MCV	vörösvértestek átlagos térfogata
MCS	masztocita szarkóma
Mg	magnézium
mIU	Milli-international units per liter

MM	mielóma multiplex
Na	nátrium
OR	Odds ráció
PCR	polimeráz láncreakció
PG	prostaglandin
PLT	trombocita
RBC	vörösvértest
RI	receptor inhibitor
rmp	egy percre eső fordulatok száma (centrifuga)
RT-PCR	valós idejű polimeráz láncreakció
SAP	szérum alkalikus foszfátáz
SCF	össejt faktor
SDS	nátrium (sodium) dodecyl szulfát
SE	Semmelweis Egyetem
se	szérum
SGOT	szérum glutamin oxálacetát transzamináz
SGPT	szérum glutamin piruvát transzamináz
SLE	szisztémás lupus eritematózus
SM	szisztémás masztocitózis
SM-AHNMD	szisztémás masztocitózis- nem hízósejtekhez kötődő hematológiai megbetegedésekkel társulva
SNP	egy pontú nukleotid polimorfizmus



SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SSM	szmoldering szisztémás masztocitózis
Tc	technécium
TK	tirozin kináz
TNF	tumor nekrosis faktor
TNF- $\alpha$	tumor nekrosis faktor- $\alpha$
TPO	trombopoetin
TSH	tiroida stimuláló hormon
UH	ultrahang
UP	urtikária pigmentóza
UV	ultraviola
V/m	volt / méter
Val	valin
w/v%	tömeg / térfogat (weight/volume) %
WBC	fehérvérsejt
WHO	Egészségügyi Világszervezet

## 1. Bevezetés

A népesség jelentős részét érintő patológiás állapotok, mint a szív-, és érrendszeri megbetegedések, az autoimmun folyamatok, a malignus betegségek kialakulásában polietiológiai eredet valószínű, azaz a környezeti tényezők a megfelelő genetikai hajlam esetében alakítják ki a manifeszt kórképet. A molekuláris genetikai szemlélet általános térhódítása a napi klinikai gyakorlat számára is új vizsgálómódszereket tesz rutinszerűen elérhetővé, melyek alapvető változásokat idéznek elő a medicinában, a betegségek diagnosztikájának, a célzott terápia megválasztásának terén.

Az egyes emberek génállományukban lévő variábilis szakaszok alapján különböznek egymástól. A populációban 1 %-nál ritkább gyakorisággal előforduló szekvencia változatokat polimorfizmusnak nevezzük, melyek esetében az emberekben egy adott tulajdonság kialakulásának valószínűsége tér el egymástól.

A ritka betegségek bizonyos polimorfizmusok szempontjából történő tanulmányozása közelebb vihet a betegségre való hajlam megismeréséhez, segít annak tisztázásához, mi az egészség megőrzésének feltétele egy genetikai hajlam ismeretében, illetve mi lehet a kezelés módja, ha már a betegség kialakult. Ilyen ritka megbetegedés a masztocitózis, melyre a hízósejtek proliferációja a jellemző.

A hízósejtek érésében és differenciálódásában számos humoralis tényező játszik szerepet, melyek közül doktori munkám során az IL-6 és a receptora (IL-6R) genetikai állományában kimutatható egy pontú nukleotid polimorfizmusokat (SNP) illetve a komplement rendszer egyes elemeit tanulmányoztam, ez utóbbiakat a beteg első jelentkezésekor levett vérmintában, illetve szekvenciálisan, a kórlefolyás során.

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2. 1. Masztocitózis

A masztocitózis a funkciójukban megváltozott hízósejtek (mast cells, masztociták, MC) felszaporodása következtében kialakuló ritka megbetegedés.

#### 2. 1. 1. Patofiziológia

A hízósejtek természetes körülmények között a kötőszövet állományában található, szabálytalan, esetenként kerek, néha ovális alakú sejtek, nagy kerek maggal. Az érett sejtek térfogatának jelentős részét szemcsés granulumok töltik ki, melyekben biológiailag aktív anyagok találhatóak. A tárolt anyagok közül hisztamin, hisztamin felszabadulásáért felelős faktor, heparin,  $\beta$ -triptáz, leukotrién B<sub>4</sub>, prosztaglandinok, citokinek, metakromáziásan festődő proteoglikánok a legjellemzőbbek, melyek degranuláció során felszabadulva és a szövetek közé áramolva lokális, vagy szisztémás hatást váltanak ki. E folyamat eredményeképpen a betegségre igen jellegzetes klinikai kép alakul ki, melyről részleteiben a tünetek tárgyalásánál beszélünk.

A hízósejtek fiziológiás körülmények között számtalan folyamatban vesznek részt. Szerepet játszanak a szöveti véráramlásban, vérnyomás optimális szinten tartásában, a vazodilatáció kialakításában, a nyákszekrécióban, a simaizom összehúzódás szabályozásában, a normál bélmotilitás fenntartásában, a sebgyógyulásban, az allergiás és gyulladásos reakciók létrehozásában, a paraziták elleni védekezésben, valamint a veleszületett és a specifikus immunválasz kiváltásában (Nordlind és mtsai 2006).

A hízósejtek a CD 34+ multipotens hemopoetikus őssejtből (stem cell) származnak, differenciálódásuk, érésük különböző citokin hatások eredményeként történik. A közös, multipotens hemopoetikus őssejtből a differenciálódás útjára lépő sejtek mieloid, vagy limfoid előalakokká válnak. Jelenlegi tudásunk szerint a hízósejtek, a megakariocitákkal, eritrocitákkal és mieloblasztokkal együtt a mieloid sejtvonalhoz tartoznak (Hutchinson 1992).

A hízósejtek növekedésében és aktiválódásában az ún. őssejt faktornak (stem cell factor, SCF) és az azt kötő tirozin kináz (TK) receptornak, a c-KIT-nek

tulajdonítunk döntő jelentőséget. A KIT ligand, azaz a SCF kötődése révén a receptor dimerizálódik, ezáltal aktivál egy belső TK útvonalat, mely a receptor foszforilációját idézi elő. E szignál transzdukció elengedhetetlen a CD34+ és CD117+ masztocita prekursorok proliferációjához, szöveti migrációjához, ezáltal érett hízósejteké történő alakulásához (Valent és mtsai 2005).

A CD34-, CD117+ prekursorok a perifériás vérben is megtalálhatóak, számuk áramlási citometria segítségével meghatározható. Masztocitózisban szenvedő betegek esetében e prekursorok nagyobb számban vannak jelen a periférián, mint egészséges kontrollok körében. A növekedés mértéke a betegség súlyosságával korrelál, a terápiás válasz monitorozására használható (Georgin-Lavialle és mtsai 2011).

A masztocitózis kialakulása jelenlegi tudásunk szerint, a SCF / KIT szabályozó mechanizmusának genetikai hibájára vezethető vissza (Tan és mtsai 2006). A receptor génállományában bekövetkezett Asp816Val (D816V) kodon mutáció hatására az A-hurok juxtamembrán régiójában szerkezeti változás alakul ki. E szerkezeti módosulás következtében a TK dimerizáció ligand bekötődés nélkül is megtörténik, azaz ligand independens KIT aktiválódást okozva korlátlan hízósejt szaporodás és aktiváció következik be (Laine és mtsai 2011).

A D816V kodon mutáció jelenlétét igazolták szisztémás masztocitózisban felnőtteknél és gyermekeknél egyaránt, felnőtt korban jelentkező urtikária pigmentóza (UP), illetve germinális sejtekből kiinduló tumorok, vagy akut leukémia eseteiben (Schumacher és mtsai 2008, Laine és mtsai 2011). Masztocitózis megbetegedés különböző alcsoportjaiban egyéb mutációkat is kimutattak: Gly560Val kodon mutációt hízósejtes leukémiában (Furitsu és mtsai 1993), Gly839Lys mutációt gyermekkori UP esetében (Castells 2004).

A masztocitózis betegséggel élők körében a D816V mutáció nem minden esetben igazolható. Az irodalmi adatok alapján a szisztémás masztocitózissal élő felnőttek 80-90%-ban (Schumacher és mtsai 2008), gyermekkorban 44%-ban mutáció pozitívak (Bodemer és mtsai 2010).

Áramlási citometria vizsgálattal minőségi CD expresszió igazolható a kóros hízósejtek felszínén. Az egészséges és érett hízósejtek CD117+, CD2-, CD25-, a klonálisan felszaporodottak CD117+, CD2+, CD25+ tulajdonságúak.

## 2. 1. 2. Epidemiológia

A betegség incidenciájára és prevalenciájára vonatkozó adatok nem tekinthetők mérvadónak a megfelelő nemzeti regiszterek hiányában. Annyi azonban biztosan állítható, hogy a ritka betegségek közé tartozik. Az Amerikai Egyesült Államokban az összlakosság körében kevesebb, mint 200 000 betegről tudnak, ezért az un. „árva” betegségek (orphan disease) közé sorolják ([www.rightdiagnosis.com](http://www.rightdiagnosis.com)). Európában az évente jelentkező új esetek számát 5-10 /1 millió lakosban határozta meg az *European Competence Network on Mastocytosis (ECNM)*, és a 2013. évi összejövetelükön kezdeményezték egy európai regiszter létrehozását.

## 2. 1. 3. Klasszifikáció

A masztocitózis a hízósejtek különböző szervekben történő kóros mértékű felszaporodásával jár együtt, mely alapján a különböző eseteket megfelelő csoportokban rendezhetjük. A betegség klasszifikációja első sorban szövettani vizsgálaton alapul, valamint a klinikai és laboratóriumi tünetek, továbbá a progresszió üteme szerint történik. Alapvetően két nagyobb alcsoport hozható létre: 1/ ha a kóros hízósejtek szöveti felszaporodása a bőrre lokalizálódik, akkor kután és 2/ ha a szövettani vizsgálat során egyéb szervekből is (csontvelő, máj, gasztrointesztinális rendszer, nyirokcsomók) kimutathatóak, akkor szisztémás formáról beszélünk.

A bőrérintettséggel járó kután masztocitózis (cutan mastocytosis, CM) betegség a következő alcsoportokra osztható: urtikária pigmentóza, makulopapulár kután masztocitózis, diffúz eritrodermális kután masztocitózis, telangiektázia makuláris eruptíva, kután masztocitóma (Valent és mtsai 2004).

A kután formák általában gyermekkorban gyakrabban fordulnak elő, a felnőttek körében inkább a szisztémás forma a gyakoribb (Duckworth és mtsai 2009). A kután masztocitózis felnőtt és gyermekkorban mind a prognózis, mind a gyógyulási hajlam szempontjából eltér, a gyermekkori forma terápiára kedvezőbben reagál, gyakran spontán remisszió is előfordul (Briley és mtsai 2008). A diffúz eritrodermális kután masztocitózis csoportba tartozó betegek közül kerülnek ki a legnehezebben kezelhető esetek: az általában jó prognózisú gyermekkori kután formák között is találunk terápia

rezisztens, egész testen kialakuló, súlyos elváltozást (Ghiasi és mtsai 2011). Felnőttek körében a kután formák jellemzően krónikussá válnak, malignus transzformáció ritkán figyelhető meg (Patrizi és mtsai 2011).

A kután masztocitózisban szenvedő betegek követésére több pontrendszer alkalmaznak, melyek közül legelterjedtebb a SCROMA index használata (Heide és mtsai 2001).

A bőrön kívül egyéb szöveti érintettséggel járó szisztémás masztocitózis (SM) betegségeken belül alábbi alcsoportokat különítünk el: indolens szisztémás masztocitózis, agresszív szisztémás masztocitózis, szmoldering (vagy lappangó) masztocitózis, klonális hematológiai – nem masztocitás – betegséggel társuló szisztémás masztocitózis, hízósejtes szarkóma (társuló eozinofiliával vagy nélkül), hízósejtes leukémia, és extrakután masztocitózis (Valent és mtsai 2004).

Az izolált bőrérítettségén túl, csak limitált kiterjedésű esetek indolens lefolyással párosulnak (indolens szisztémás masztocitózis, ISM), csak ritkán transzformálódnak agresszív kórformákba. Az agresszív szisztémás masztocitózis (ASM) a neoplasztikus sejtek progresszív növekedésével, és különböző szervekben történő felhalmozódásával, következményes organopátiával, funkciózavarral jár. A szmoldering, más szóval lappangó szisztémás masztocitózis (SSM) is progresszív folyamat, ASM-től elkülöníteni a később részletezésre kerülő tünetek, kritériumok alapján lehet.

A szisztémás masztocitózis klonális, nem hízósejthez kötődő hematológiai megbetegedésekkel társuló alcsoport (SM – AHNMD) esetében – mint amilyen a mielodiszpláziával vagy mieloproliferatív megbetegedésekkel társuló formák - a prognózis a társuló hematológiai megbetegedés kimenetelétől függ (Jaffe és mtsai 2001). E betegek perifériás vérmintáiból a c-KIT mutáció jellemzően kimutatható valós idejű polimeráz láncreakcióval (real time polymerase chain reaction, RT-PCR). Azoknál a betegeknél, akiknél egyéb hematológiai eltérések is megfigyelhetők, a c-KIT mutáció kimutatható, illetve későbbi életkorban kezdődött a betegségük, agresszív lefolyással kell számolnunk. Szintén gyors progresszió jellemzi a masztocita leukémiát (mast cell leukaemia, MCL) és a masztocita szarkómát (mast cell sarcoma, MCS).

A bőrtünetek nélkül fennálló masztocitózis betegség diagnosztikájára, követésére, terápiára adott válasz monitorozására több módszert is alkalmaznak,

leggyakrabban szérumban triptáz szint meghatározását. Európa szerte elfogadott pontrendszer a nem, a szérumban triptáz szint emelkedett vagy normális szintjén, a pruritus – csalánkiütés- angioödéma meglétének vagy hiányának, illetve prekollapszus vagy kollapszus előfordulásán alapul (Alvarez-Twose és mtsai 2012).

Sajnos Magyarországon a szérumban triptáz szintjének meghatározása még nem elérhető. Ebben nyilván szerepet játszik az, hogy ritka betegségről van szó és, hogy a mérés megfelelő eszközös háttérrel és technikai felkészültséget tesz szükségessé. Mindez költségnövelő tényező.

#### **2. 1. 4. Tünetek**

A betegséggel járó tünetek egy részben a hízósejt granulumaiban lévő biológiailag aktív anyagok (hisztamin, bradikinin, heparin, triptáz, leukotriének, prosztaglandinok, interleukinok, szerotonin) felszabadulása során kiváltott helyi, illetve szisztémás hatásokkal magyarázhatók (George és mtsai 2011). Fiziológiai körülmények között fertőzések, allergén anyagok jelenlétekor történik a degranuláció, a szervezet első védelmi vonalának mozgósítása kapcsán. Masztocitózis esetében ez a folyamat gyakran spontán, vagy a normálisnál enyhébb, attól eltérő ingerek hatására is bekövetkezik, immunglobulin E receptor (IgE-R) aktiválódásával összefüggésben, vagy attól függetlenül is.

A masztocitózis szisztémás megjelenése esetében kialakulhat egy jellegzetes tünetcsoport, melyet mediátor kiáramlás tünet együttesnek, vagy masztocita aktivációs tünet együttesnek (MAT) nevezzük. A folyamatot rohamokban jelentkező fejfájás, kipirulás, hipotónia, tachikardia, kollapszus / kollapiform rosszullét, hasmenés jellemzi, melyekhez gyakran rapid kialakulású mellűri folyadék (hydrothorax), vagy gége ödéma is társulhat.

A bőrt érő fizikai ingerek hatására a dermiszban jelen lévő hízósejtek degranulációja következik be, mely során jellegzetes elváltozás, lokális ödéma, hiperémia és pruritus alakul ki. Ezt az elváltozást Darier-féle jelnek hívjuk.

A betegséggel kapcsolatos, permanensen jelen lévő tünetek, panaszok a hízósejtek különböző szervekben történő felhalmozódásával függenek össze, leginkább

a bőr, a gasztrointesztinális rendszer, a lép, a máj, a nyirokcsomók, a központi idegrendszer, a csontok, és a csontvelő érintett.

A bőrben felszaporodó hízósejtek okozzák a klasszikus kután masztocitózis klinikai képét, a bőrben kialakult vörösbarna színű makulo – papulatózus elváltozások formájában. A makulák döntően a végtagokon és a törzsön jelennek meg, az arc megkímélt.

A bélfal hízósejtes infiltrációja során a helyben felszabaduló hisztamin, triptáz és egyéb biológiailag aktív vegyületek fokozott bélmotilitását idéznek elő, mely a krónikus, híg, vizes hasmenést okozza. A bélfolyamat peptikus fekélyekkel társulva malabszorpcióhoz, testsúlycsökkenéshez vezet. A lépben és a májban felhalmozódó hízósejtek az említett szervek extrém megnagyobbodását idézik elő, melyek következtében hepatopátia, aszcitesz alakul ki. A hasi nyomásviszonyok megváltozása, és a fenti mechanizmus következtében kialakult nyálkahártya duzzanatok akár mechanikus ileuszt is okozhatnak. Ezt jellemzően az agresszív formáknál látjuk.

A csontrendszerben felszaporodott hízósejtek, illetve az általuk kibocsátott citokinek az oszteoklasztok fokozott aktiválódásával magyarázható oszteoporozist, esetenként oszteolízist okoznak, és ezért gyakran alakulnak ki patológiás törések.

A hisztamin központi idegrendszerben történő felszabadulása felelős a gyakorta jelentkező fejfájás és pszichológiai tünetek, mint szorongás és a depresszió, kialakulásáért, illetve a koncentráció képesség csökkenéséért. Éjszakai verejtékezés, izzadás, nagyfokú gyengeség, lesóványodás, láz, vagy hőemelkedés jellemzően masztocitózishoz társuló hematológiai betegség esetében jelentkezik

## **2. 1. 5. Diagnózis**

A szisztémás masztocitózis diagnózis felállításához az alábbi 1 nagy és 1 kis kritérium együttes megléte, vagy a felsorolt kis kritériumok közül 3 együttes jelenléte szükséges (Jaffe és mtsai 2001).

Major (nagy) kritérium:

- multifokális hízósejt infiltráció a csontvelőben, vagy más bőrön kívüli szervben (15 hízósejtnél többet tartalmazó klaszter / góc) – immunhisztokémiailag igazolva



Minor (kis) kritériumok:

- az infiltráló hízósejtek minimum 25 %-a a normálistól eltérő morfológiájú
- az érintett szervben vagy csontvelőben c-KIT Asp816Val kodonmutáció mutatható ki
- CD 117+, CD 25+, CD 2+ ko-expresszió
- szérumban triptáz szintje 20 ng/ml-nél magasabb

A kis kritériumok szerepe a diagnózis felállításában nem elhanyagolható. Johnson és munkatársai az általuk vizsgált esetek csupán 70%-ban tudták a major feltételt igazolni. A fennmaradó 30%-ban a WHO (World Health Organization, Egészségügyi Világszervezet) ajánlása szerint, minor kritériumok alapján jutottak diagnózishoz (Johnson és mtsai 2009).

A Nemzetközi Klinikai Citometria Társaság (International Clinical Cytometry Society) a hármas ko-expresszió igazolása céljából alkalmazott módszerek közül az áramlási citometria eljárást találta a kritérium felállítására legalkalmasabbnak (Perbellini és mtsai 2011).

A triptáz szint meghatározása során a szérumban teljes triptáz mennyiségét határozzuk meg, mely a hízósejtekből folyamatosan ürülő  $\alpha$ -triptáz, és a degranuláció, MAT során alkalomszerűen felszabaduló  $\beta$ -triptáz szintjét együttesen jelenti. A  $\beta$ -triptáz a hízósejtek granulumaiban tárolódó neutrális proteináz, degranuláció során szabadul fel, így csak a hízósejtek aktivációját követően mutatható ki a szérumból. A szérumban mért koncentrációja egyenes arányban áll a reakció súlyosságával. A  $\beta$ -triptáz szintje a levett vérmintát fagyasztás után tárolva hónapokkal / évekkel később is meghatározható ugyan, de a diagnózishoz vagy a betegség követésére ideális esetben jó, ha aktuálisan rendelkezésre áll. Az  $\alpha$ -triptáz nem a granulumokban található, hanem a hízósejtekből folyamatosan ürül. Fiziológiai körülmények között szérumszintje nem haladja meg a 10 ng/ml-t, hízósejt felszaporodás estében a szérumban mérhető koncentrációja megnő. Az általánosan használt vizsgálatok mind az  $\alpha$ -, mind a  $\beta$ -triptáz szintjét mérik (Kemp és mtsai 2002).

A prognózisra az ún. „B”- és „C” tünetek jelenléte alapján következtethetünk. „B” tünetként értékeljük a szöveti infiltrációt (csontvelő minimum 30%-os infiltrációja), az organomegáliát (máj-, lép-, és nyirokcsomó megnagyobbodás UH, illetve CT kép

alapján, az adott szerv működésének megtartása mellett) 20 ng/ml értéket meghaladó szérumból triptáz szintet, MDS/MPS jellegű eltérések hisztológiai igazolása, SM-AHNMD fennállása nélkül.

A „C” tünetek a szervi működészavarra utalnak (anémia, trombocitopénia és leukopénia, májenzimek szintjének emelkedése, hasi- és mellűri folyadék jelenléte, oszteoporózis, illetve patológiás törések kialakulása, hiperszplénia, felszívódási zavarok, krónikus hasmenés).

A korábban említett SSM esetében a „B” tünetek közül kettőt, vagy hármat tudunk kimutatni, „C” tünet nem igazolható, míg az ASM-ben C tünetek is jelen vannak.

#### **2. 1. 5. 1. Csontvelővizsgálat**

A SM diagnózisának igazolásához csontvelő biopszia szükséges, az aspiráció nem elegendő, mivel a peritrabekuláris vagy perivaszkuláris elhelyezkedésű hízósejtek gyakran nem nyerhetők ki ezzel a módszerrel. A minta hagyományos és specifikus festését követően (hematoxin-eozin, May-Grünwald-Giemsa, naftol-AS-D-kloroacetát) végzett mikroszkópos morfológiai elemzés történik klaszterképződés, involváltság mértékének megállapítására. Az immunhisztokémiai módszerek közül anti - triptázt, anti-CD 117- (c-KIT), anti-CD2-, anti-CD25-festést alkalmazunk. A hagyományos elemzés mellett genetikai vizsgálatok történnek: PCR vizsgálat során a minor kritériumként szereplő D816V mellett vad típus esetén sequenálással más, 1 Gly560Val, Gly839Lys pontmutációkat is keresünk. Az eozinofiliával társuló SM esetekben a FIP1L1-PDGFR $\alpha$  fúziós (4. kromoszóma q12 régiójában mintegy 800 kb hosszúságú, belső szakaszt érintő gén átrendezés) génszakasz jelenlétének kimutatására is törekedni kell.

#### **2. 1. 5. 2. Szérumból történő vizsgálatok**

A rutin laboratóriumi vizsgálatoknak mind a diagnózis felállításában és a differenciáldiagnosztikában, mind a betegség monitorozásában alapvető szerepe van.

A rutin panelbe tartozó vizsgálatok a következők:

- teljes vérkép (mennyiségi és minőségi)
- süllyedés (Westergreen)
- ionszintek (nátrium, kálium, klór, kalcium)
- vesefunkció (karbamid, kreatinin)
- májfunkció (SGOT - szérumbilirubin, SGPT - szérumbilirubin, glutamin piruvát transzamináz, GGT - gamma glutamil transzferáz és SAP- szérumbilirubin alkalikus foszfatáz)
- laktát dehidrogenáz (LDH)
- szérumbilirubin
- vitamin szintek
- vas anyagcsere paraméterek (vas, transzferrin)
- pajzsmirigy-működést jelző hormonok (TSH - tiroidea stimuláló hormon, fT3 - szabad - trijód- tiroxin, fT4 – szabad - tiroxin).

A masztocitózis betegség kritériumai között a szérumbilirubin szintjének meghatározása is szerepel. 20 ng/ml szint feletti teljes szérumbilirubin esetén merül fel a SM diagnózis.

### **2. 1. 5. 3. Egyéb vizsgálatok**

A fentieket kiegészítő, a betegség kiterjedésének felmérését, szöveti infiltráció fokát meghatározó vizsgálatok között elsősorban a non-invazív képalkotóknak van jelentősége. Rutinszerűen alkalmazható a hasi – kismedencei UH, a CT, a gasztro-duodeno- kolonoszkóp, az oszteo denzitometria, technécium 99m csont-izotóp vizsgálat. A vizsgálatok során vett szövettani minta mikroszkópos feldolgozása során az infiltráció mértéke jellemezhető. A szövettani eredmények értékelésében gyakorlott patológus és hematológus kolléga együttesen vesz részt.

Differenciál diagnosztikai szempontból a komplementek közül a C 1q inhibitor koncentráció meghatározásnak van jelentősége a veleszületett hereditár angioneurotikus ödéma (HANO) vagy annak szerzett formájától való elkülönítés érdekében.

## 2. 1. 6. Differenciál diagnosztika

A ritka betegségek közé tartozó masztocitózis diagnosztizálását számos differenciáldiagnosztikai kérdés is nehezíti. Általánosságban megállapítható, hogy az urtikária és az angioödéma vazoaktív mediátorok felszabadulására vezethető vissza, melyek a nyálkahártyák vagy a bőr hízósejtjeiből származnak (Metcalf 1991). A bőrgyógyászati vonatkozások terén utalnék az ezzel foglalkozó monográfiára (Zuraw 1997).

Bizonyos típusú csalánkiütések háttérében gyakran évek óta fennálló fizikai vagy kémiai irritáció áll, melyek eredete sokszor nehezen tárható fel. Az urtikária, illetve az angioödéma patogenezisének és klinikai lefolyásának pontos értelmezése ugyanakkor elengedhetetlen a betegségek megfelelő kezelése érdekében.

A szisztémás masztocitózis tüneteivel hasonlóan testsúlycsökkenés jelentkezik malignus betegségek, táplálkozási-, felszívódási zavarok esetén, illetve különböző egyéb malabszorpciós szindrómákhoz társulva. Nagy mennyiségű, híg, vizes hasmenés jelentkezik Whipple kórban, gyulladásos bélbetegségek, vagy irritábilis bél szindróma fennállásakor, tireotoxikózisban, vagy hipertireózis esetén. Az ödéma kialakulása, mint önálló tünet is okozhat nehézséget a betegség diagnosztizálása során, ezért a differenciál diagnosztikában az első lépés a HANO betegségtől való elkülönítés, melynek lényege a C1 INH hiány, vagy funkcióvesztés.

A C1-INH szerepet játszik a véralkohol-, a komplement-, a fibrinolitikus- és a kinin rendszer szabályozásában is. C1-INH hiánya, vagy csökkent aktivitása hatására a XII faktor fokozott aktivációja következik be, mely a prekallikrein – kallikrein, illetve a kininogén – bradikinin képződést segíti elő, végső soron a bradikinin szérumkoncentrációjának emelkedését okozza. A bradikinin vazoaktív hatással rendelkező molekula, a kapillárisok permeabilitásának fokozásában játszik szerepet mely hatására az intravaszkuláris térből fokozott plazmaáramlás jön létre az extravaszkuláris tér irányába, azaz ödéma alakul ki.

A HANO rohamokban fellépő, szubkután vagy szubmukózus ödéma kialakulásával járó betegség. Szubkután ödémák jellemzően a végtagokon, az arcon, a nyakon és a törzsön jelennek meg. Ezek az elváltozások általában nem viszketnek, nem

vörösek és nem fájdalmasak. A szubmukózus ödémák leggyakrabban a felső légutak nyálkahártyájában, a gasztrointesztinális traktus falában helyezkednek el, ritkán megfigyelhetők a nyelőcsőben, a központi idegrendszerben és a mellkasban is. A gyomor-bélrendszer területén kialakuló szubmukózus ödémák társulhatnak akut hasi tünetekkel, hányingert, hányást, görcsös hasi fájdalmat, illetve rohamokban fellepő vizes hasmenést okozhatnak.

A betegség különböző alcsoportokra osztható: a HANO I. típusa a C1-INH fehérje hiányára vezethető vissza, míg a HANO II. típusa esetén e fehérje funkciójában figyelhető meg változás. A betegség e típusainak hátterében a 11 kromoszóma q12-q13 szubrégiójában elhelyezkedő C1-INH gén mutációi állnak. A HANO III. típusa (más elnevezés szerint HANO-FXII, vagy ösztrogén dependens forma) esetében a XII faktorban mutatható ki missense mutáció.

HANO-I. esetben a C1-INH koncentrációja alacsony, aktivitása csökkent, a C4 koncentrációja is alacsony, míg a C1q és a C3 szintje normális. HANO-II. típus esetében a C1-INH koncentrációja normális vagy emelkedett. Szerzett C1-INH hiány esetében a C4 és a C1-INH koncentrációja csökkent, a C1-INH aktivitása csökkent, valamint a C1q szérumbeli szintje is alacsonyabb a normálértéknél. Ez utóbbi segítséget jelent a hereditár formától való elkülönítésben (Farkas 2004).

## **2. 1. 7. Terápia**

Bőrtünetek kezelésében az ultra-viola (UV) fénnel történő megvilágítás jótékony hatásának bizonyult, a bőrben kialakuló, vöröses színű, viszkető makulák kezelésére 311-313 nm-es emissziós csúcsú UV-B lámpák alkalmazását javasolják (Brazzelli és mtsai 2011).

A szisztémás betegség tüneti kezelésében a hisztamin-receptorblokkolók (H-R1, H-R2), a nátrium kromoglikánok és szteroidok adása jön szóba. Anafilaxia elkerülése céljából a noradrenalin adása életmentő lehet. Csontvelő érintettség következtében transzfúziós igény léphet fel. A felszaporodott mellkasi folyadék diuretikumokkal nem befolyásolható, és jellemzően pleurodézis elvégzését követően is visszatérő problémát jelent. Ilyen esetekben a mellkas punkció elkerülhetetlen. A folyadék visszatelődését megakadályozó eddigi leghatásosabb terápia az  $\alpha$ -interferon folyamatos alkalmazása. A

csont érintettség következtében kialakuló oszteoporózis esetében nagy gondot kell fordítani a patológiás csonttörések megelőzésére. Kalcium, kolekalciferol, biszfoszfónátok adása jön szóba, de az  $\alpha$ -interferon és egyéb célzott terápia mellett legújabbán a RANK ligand inhibitor kezelés lehetősége merült fel.

A SM célzott kezelésében a TK gátló, imatinib terápiára jól reagáló esetek a 17-es exonon kívüli mutációval járó, illetve hipereozinofil szindrómával társuló mieloproliferatív kórképek voltak. Imatinib kezelés hatástalansága esetében interferon vagy egyéb, más jelátviteli úton ható TK gátlók, mint például a dasatinib, vagy a midostaurin bevezetése jön szóba (Ustun és mtsai 2011).

## **2. 2. A hízósejtek érése, differenciálódása és a folyamatban szerepet játszó faktork**

A multipotens hemopoetikus őssejt mieloid előalakjából származó masztocita kialakulása során számos faktor együttes hatása érvényesül. A megfelelő mennyiségű és minőségű, valamint normális működésű hízósejt több, részben egymástól függetlenül működő rendszer közös hatásaként jön létre.

A hízósejtek éréséhez és differenciálódásához szükséges citokineket kódoló gének polimorfizmusa az adott citokin szérumszintjében egyéni különbséget eredményez. A szérumban mérhető citokinkoncentráció normálértéktől való eltérése a masztociták mennyiségi és aktivációs állapotban mérhető különbséget eredményez, mely egyéb körülmények együttes hatásának összegeződése révén masztocitózis kialakulásához is vezethet.

A hízósejtek érését és fejlődését az interleukinokon, illetve citokineken kívül egyéb faktork is befolyásolhatják, mint például a szervezetünkben széleskörű szerepet betöltő komplement rendszer elemei is. Mivel a masztocitózis a hízósejtek felszaporodásával, azok spontán aktiválódásával és degranulációjával járó betegség, a kórkép patogenezisében felmerülhet a sejtek aktiválódásában részt vevő komplement faktork esetleges szérumkoncentrációjának, vagy aktivitásának megváltozása.

Doktori munkám első szakaszában az IL-6 és az IL-6R gének polimorfizmusát vizsgáltuk, majd a komplement rendszer elemeinek szérumkoncentrációját hasonlítottuk össze egészséges és masztocitózisban szenvedő betegek körében. A következőkben az említett faktork főbb tulajdonságait, általános szerepét tekintjük át.

### **2. 2. 1. A citokinek általános tulajdonságai**

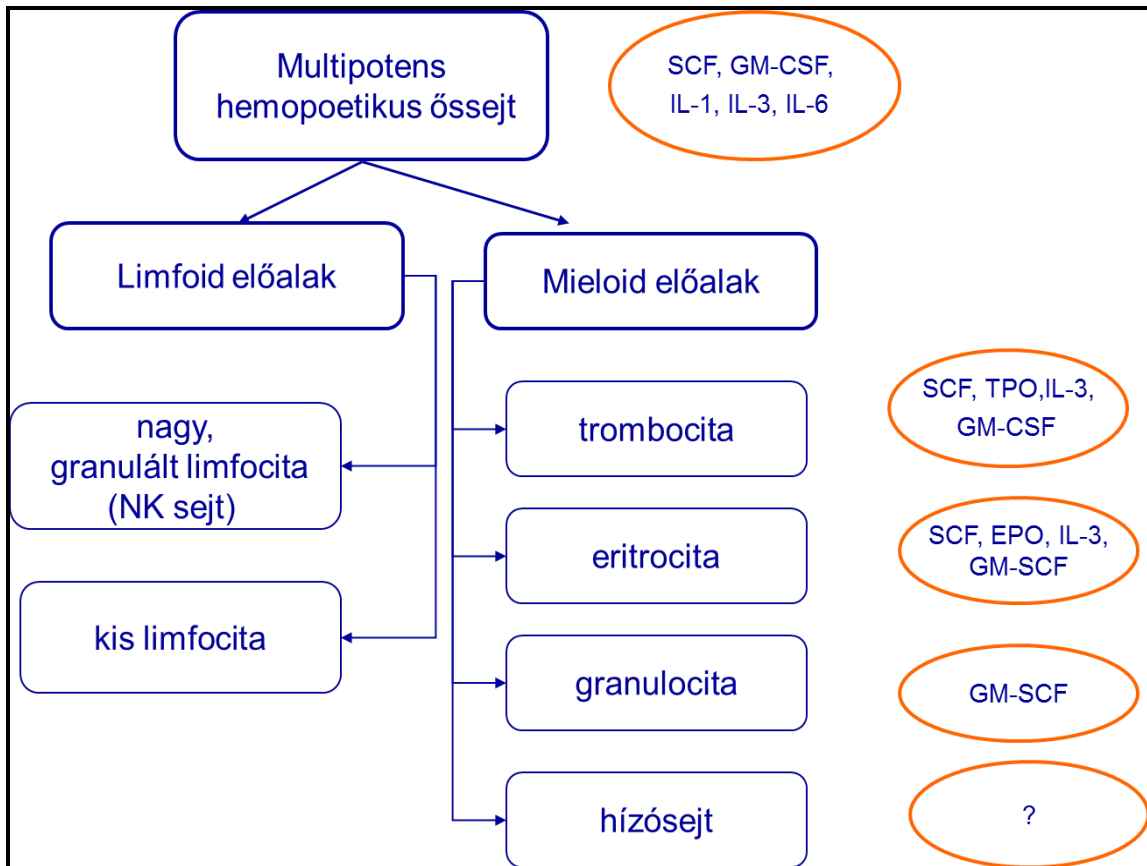
A citokinek közé tartozó molekulák a sejtek közötti kommunikációban játszanak szerepet, az immunrendszer fontos összetevői. Minden magvas sejt termeli őket. Hatásukat specifikus, nagy affinitású receptorokhoz kötődve fejtik ki, melyek közé a gyulladásos folyamatok kialakulása, a limfociták aktivációja és differenciálódása, az immunsejtek érése és a hemopoézis sorolható (Tayal és mtsa 2008). Peliotrop tulajdonságúak, azaz egy citokin többféle hatást kifejtve többféle funkció betöltésére alkalmas (Cohen és mtsai 1974), ezen kívül működésükben redundancia is megfigyelhető, azaz egy adott hatás kiváltására több citokin is képes. A citokinek termelése nem izoláltan történik, szabályozásukban pozitív és negatív szignálok együttesen vesznek részt. A termelt citokinek hatásában szinergizmus, illetve antagonizmus egyaránt megfigyelhető.

A citokinek családjába számos molekula tartozik, ezek lehetnek kemokinek, interferonok, interleukinok, kolónia stimuláló faktorok, és közéjük soroljuk a tumor nekrozis faktort is (Leonard 1999).

A hízósejtek optimális érési folyamatához, növekedésükhöz és működésükhöz a különféle citokinek összehangolt működése, interakciója szükséges. A citokinek arányának optimálistól való eltérése számos patológiai állapot kialakulásával hozható összefüggésbe, melyek további elemzése a hízósejtekkel kapcsolatba hozható betegségek lefolyásának jobb megértését, ezáltal a terápia individualizálását eredményezheti.

### **2. 2. 2. A hízósejtekre ható citokinek**

A hemopoetikus őssejt a csontvelőben megfelelő hatások következtében limfoid és mieloid irányba differenciálódik tovább (1. ábra), ezáltal a különféle végsejtek kialakulását eredményezi. A hízósejtek jelenlegi tudásunk szerint a mieloid előalakból származnak (Hutchinson és mtsai 1992).



1. ábra: A multipotens hemopoetikus őssejt és a mieloid sejtvonal éréseire ható citokinek (szerző ábrája, referenciákat lásd a szövegben)

A multipotens hemopoetikus őssejtre az ún. “őssejt faktor” (stem cell factor, SCF), a granulocita-makrofág kolóniastimuláló faktor (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF), az interleukin-1 (IL-1), az interleukin-3 (IL-3) és az interleukin-6 (IL-6) gyakorol sejtproliferatív hatást.

A multipotens őssejtek két irányba alakulhatnak tovább, egyik ágon limfoid, másik ágon mieloid előalakokká érnek. A mieloid előalakok érése során megakariociták, eritrociták, mieloblasztok és hízósejtek alakulnak ki belőlük. A megakariociták éréseben SCF, trombopoetin (TPO), IL-3, GM-CSF; az eritrociták esetében SCF, eritropoetin (EPO), IL-3, GM-CSF; a mieloblasztokra GM-CSF a legjelentősebb hatású (Coffer és mtsai 2000).

A hízósejtek differenciálódására és fejlődésére számos citokin gyakorol hatást: az SCF, a GM-CSF és különböző interleukinok is (Niedoszytko és mtsai 2009). A hatások között additív, szinergista és ko-stimulátor effektusokat is megfigyelhetünk.



Direkt hatású az interleukinok közül az IL-3, IL-4, IL-6, IL-9, IL-13, IL-14, a masztociták érését indirekt módon befolyásolja a SCF, a GM-CSF és az IL-1, IL-3, IL-10.

A hízósejtek általános fejlődése az el nem kötelezett hemopoetikus őssejteken át az irányukba elkötelezett, CD34+ progenitor sejtekből indul ki. A hízósejtek korai és késői érése, és differenciálódása komplex szabályozásai mechanizmusok által ellenőrzött folyamat, melyet in vitro vizsgálatokban, és állatkísérleti modellekben elemeztek. A progenitor sejtek növekedését elsősorban különféle citokinek, mint például az IL-3 befolyásolják, de a mikrokörnyezetben jelen lévő anyagok, mint a stróma-, és egyéb, immunsejtek által kibocsátott differenciálódási faktorok és sejtkölcsönhatások is hatást gyakorolnak rá (Valent és mtsai 1991).

Emberi hízósejt előalakok érése során kifejeződésre kerülő CD antigének vizsgálatát alapján GM-CSF-R $\alpha$ , IL-3R $\alpha$  expressziója igazolódott (Scherthaner és mtsai 2005).

Nyálkahártyák allergiás eredetű gyulladásos folyamatai esetében különféle sejt invázió meghatározó jelentőségű, mint például az IgE által érzékenyített hízósejtek, az aktivált eozinofilek, és interleukinok szabadulnak fel, mint például az IL-4 és az IL-5. Habár e citokinek szerepével kapcsolatban a CD4+ T-limfociták az elsődlegesek, az emberi szervezetben megtalálható hízósejtek felszínén is kimutathatóak, valamint itt IL-4 és tumor nekrozis faktor -  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) szekréció is megfigyelhető. IL-4, IL-5, IL-6, és IL-8 expresszióját vizsgálták meg orrnyálkahártya biopszia során vett mintában allergiás rinitisszel élők és egészséges kontrollok között. Az IL-4 immunoreaktív sejtek 90%, az IL-6 immunoreaktívak több mint 90%, és az IL-5 immunoreaktív sejtek 50% hízósejt volt. Ez alapján a nevezett citokinek és a hízósejtek közötti kapcsolat egyértelműnek látszik (Bradding és mtsai 1993). A nyálkahártyákban lévő hízósejtek fejlődéséhez a T-sejtből felszabaduló faktorok jelenléte szükséges (Galli 1990), melyek közül számos molekulát azonosítottak. E faktorok egyik legmeghatározóbbja az IL-3, mely mind a hízósejtek hosszú távú túlélésében, mind a masztocita progenitorok fejlődésében számottevő (Rennick és mtsai 1985). Ezzel ellentétben, az IL-4 számos sejtvonal esetében csupán gyenge aktiváló hatású (Smith és mtsai 1986), sőt a progenitor sejtek kifejezett stimulálására képtelen (Rennick és mtsai 1987). Mindazonáltal, számos eredmény alapján arra következtethetünk, hogy az IL-4

potenciózza a hízósejtek IL-3 függő növekedését, azaz, elsődleges hatása az IL-3-nak van, az IL-4 inkább kofaktorként működik, hasonlóan az IL-9-hez (Hültner és mtsai 1990).

Az IL-6 masztocitákra kifejtett hatása részben indirekt módon, a multipotens hemopoetikus őssejt, részben direkt a hízósejtek differenciálódásának befolyásolásával jellemezhető. Az IL-6 széles spektrumú biológiai funkcióval rendelkező citokin, mely a B- sejtek immunglobulint (IG) elválasztó sejtekké válásában, a mielóma / plazmocitóma sejtek növekedésében, az idegsejtek differenciálódásban, a májsejtekben kialakuló akut fázis válaszban, valamint a hízósejtek proliferációjában tölt be központi szerepet (Hirano és mtsai 1986). Klinikai vizsgálatok eredménye szerint SM-ban szenvedő betegek plazmájában emelkedett IL-6 szint mérhető, és ez a mérték korrelál a tünetek, és a betegség súlyosságával (Brockow és mtsai 2005), esetleg a terápiára adott válasz monitorozására is alkalmassá tehető.

A mieloid sejtvonala alakjainak differenciálódásában, a normális és a transzformált sejtek proliferációjában és kolóniaképzésében betöltött szerepük alapján egyéb molekulákat is sorolhatunk az IL-6-tal egy csoportba (Clogston és mtsai 1989, Heinrich és mtsai 1991). Ilyen anyag lehet, pl. a GM-CSF.

A masztocitákra legkifejezettebb hatással az IL-3 rendelkezik, a többi interleukin hatását ehhez viszonyítva jellemezhetjük (Thompson-Snipes és mtsai 1991). A korábbi vizsgálatok eredményei alapján az IL-4 csupán kofaktorként hat a hízósejtek növekedésére (Hültner és mtsai 1990). Azonban in vitro vizsgálatok során, az IL-4-et és IL-10-et együttes alkalmazása esetén az IL-3-hoz hasonló mértékű változást észleltek a hízósejtek körében (Smith és mtsai 1986).

A T-sejt eredetű IL-10 hatását számos hemopoetikus sejten, a T-, és B-sejteken, monocitákon, makrofágokon is megfigyelték (Rennick és mtsai 1995), továbbá a hízósejtek stimulálásban, érésük és differenciálódásuk szabályozásában betöltött szerepét is igazolták (O'Garra és mtsai 1990).

Az IL-13 szabályozó hatása a B-limfociták, a monociták és a hízósejtek működésében, egyaránt megfigyelhető: in vitro a masztociták bizonyos felszíni antigénjei (KIT, CD 53, c-fos) fokozottan expresszálódnak, in vivo a masztociták differenciálódása kifejezettebbé válik.

A hízósejtek éréséhez és differenciálódásához szükséges citokineket kódoló gének polimorfizmusai hatására az adott citokin szérumszintjében is változás következik be. A szérumban mérhető koncentrációváltozás hatására a masztociták mennyiségében jelentős változás következhet be, mely a masztocitózis kialakulásához is hozzájárulhat.

#### **2. 2. 4. Az IL-6 szerepe**

Az IL-6, és a hozzá hasonló funkciókat betöltő GCSF-170-180 aminosavból álló glikoprotein, szerkezetét 4  $\alpha$ -hélix és 2 diszulfid híd jellemzi, mely a globuláris formában történő stabilizációját biztosítja (Clogston és mtsai 1989).

A négy, anti-paralel elhelyezkedésű, alulról felfelé irányuló összeköttetéssel rendelkező  $\alpha$ -hélix a molekula biológiai aktivitásáért felel (Walter és mtsai 1992).

Az interleukin-6 (IL-6) mind a pro-, mind az anti- inflammatorikus folyamatokban szerepet játszó citokin. Mononukleáris fagociták, fibroblaszok és aktivált T-sejtek által termelt anyag, amelyik az egyik legfontosabb mediátora a láznak, illetve az akut fázis folyamatoknak.

##### **2. 2. 4. 1. Az IL-6 különböző betegségeiben**

A gyulladásban betöltött szerepén kívül, kifejezett „tumorogén“ hatást fűznek hozzá, mivel összetett szerepe van a tumor sejtek progressziójában, túlélésében és az angiogenezisben. Ezekre bizonyítékként humán csont áttétek eseteiben vizsgálatokat végeztek, melyeknél a szérumban emelkedett IL-6 és IL-6 receptor (IL-6R) szintet igazoltak (Ara és mtsai 2010).

Masztocitózisban szenvedő betegeknél emelkedett szérum IL-6 szint figyelhető meg, a betegség súlyossága korrelál az IL-6 szérumban mérhető koncentrációjával. Pozitív korrelációt írtak le a teljes triptáz-, alkalikus foszfatáz-, IgM- szint, a fehérvérsejt- és a neutrofil szám és az IL-6 plazmaszintje között. Hemoglobinszint esetében a korreláció fordított volt (Brockow és mtsai 2005).

Az IL-6-nak, mint proinflammatorikus faktornak a szerepét számos krónikus gyulladással járó folyamatban vizsgálták. E folyamatokhoz kapcsolódóan nem kizárólag

az IL-6 szérumban mérhető koncentrációját vetették össze az adott betegséggel, hanem a promóter régiójának a -174 G/C polimorfizmusát is: az adott lókuszon a „G” allél hordozása magasabb IL-6 szérumszintet eredményez (Yalcin és mtsai 2011).

A plazmasejtek túlélésért és proliferációjáért felelős citokinek között fontos szerepet tölt be az IL-6, mely alapján felmerült az összefüggés a mieloma multiplex és a szérumban mérhető emelkedett IL-6 szint között. Egy hazai vizsgálat során a promóter régió -174 G/C polimorfizmusa valamint a mieloma multiplex és a mielodiszplázia kialakulása között nem találtak összefüggést (Aladzsity és mtsai 2009). Egyéb kutatások szerint azonban a polimorfizmus a betegség kimenetelét és a beteg túlélését befolyásolhatja (Mazur és mtsai 2005).

#### **2. 2. 4. 2. IL-6 és IL-6R polimorfizmus**

Az IL-6-nak, mint proinflammatorikus faktornak a szerepét számos krónikus gyulladásal járó folyamatban vizsgálták, mint például Alzheimer-kór, szisztémás lupusz eritematózus vagy szklerózis multiplex esetében. E folyamatokhoz kapcsolódóan nem kizárólag az IL-6 szérumban mérhető koncentrációját vetették össze az adott betegséggel, hanem a promóter régiójának a -174 G/C polimorfizmusát is, illetve az ezzel összefüggésben kialakult magasabb fokú expressziót is elemezték. Sokféle klinikai jellemző (például a nem, vagy az életkor) mellett az IL-6 szint mértéket genetikai tényezők is befolyásolhatják. Az IL-6 gén promóterén, a -174 lókuszon G-allélt C-allélra cserélő SNP in vitro az IL-6 transzkripciójának mértéket csökkenti. Ezzel egyezően bizonyos vizsgálatok során az IL-6 szérumszintjében különbséget találtak a vad, illetve a mutáns allélt hordozó egyének között (Fishman és mtsai 1998), bár ezt az eredményt nem minden esetben sikerült ismételt kimutatni (Qi és mtsai 2006). Az IL-6 receptor (IL-6R) exonjának funkcionális polimorfizmusa (Asp358Ala) proteolitikus hasítás révén a két aminosav egyikének szubsztitúcióját eredményezi, amely az IL-6 membránhoz történő kapcsolódásának megváltozásához vezet (Galicia és mtsai 2004). Mivel a szolubilis IL-6R a szérumban az IL-6-ot megköti, az IL-6 szintjét a keringő receptor szintje is befolyásolhatja, szekvesztráció keresztül (Rose-John és mtsai 2008). A nevezett polimorfizmust vizsgálva több eredményt is közöltek a „C” allél

előfordulásával kapcsolatban, mely az IL-6 és az IL-6R magasabb szérumszintjét eredményezi (Galicía és mtsai 2004, Reich és mtsai 2007).

Iráni populációban, a szklerózis multiplexben szenvedő betegek esetében az IL-6 promóter régiójának -174 G/C SNP esetében a „C” allél gyakoribb előfordulását figyelték meg. Szintén iráni vizsgálat során a szisztémás lupusz eritematózusban (SLE) szenvedő betegek körében ugyanezen SNP esetében nem találtak frekvenciabeli különbséget az egészségesekhez viszonyítva (Shahbazi és mtsai 2010, Godarzi és mtsai 2011). Elméletileg az IL-6, mint pro-inflammatórikus citokin emelkedett szintje, illetve a -174 G/C polimorfizmus jelenléte a rizikófaktorok közé sorolható lenne az Alzheimer-kór patogenezisében is. Az ezzel kapcsolatban hozható vizsgálatok azonban nem adnak egyértelmű eredményt. Lengyel (Klimkowicz-Mrowiec és mtsai 2010) és indiai (Mansoori és mtsai 2010) kutatások nem igazoltak ilyen jellegű összefüggést, vagy pozitív korrelációt a szérum IL-6 szint emelkedése, vagy az IL-6 -174 G/C polimorfizmus és a betegség előfordulása, vagy annak súlyossága között.

### **2. 3. Komplement rendszer**

A komplement rendszer szerepe a kórokozók elleni védekezésben, a normális gyulladásos válasz és az immunfolyamatok szabályozásában jól ismert. Különböző kórképek kapcsán a komplement rendszer bizonyos elemeinek eltérései figyelhetők meg, melyek jellemzők lehetnek a különböző betegségekre.

A komplement rendszer aktiválódása a proteolitikus kaszkád révén valósul meg, mely a szervezet egyik legerősebb effektor mechanizmusa. A folyamat több módon aktiválódhat: klasszikus, lektin függő vagy alternatív úton. A különböző utak aktiválódása végső soron a rendszer központi molekulájának, a C3-nak a limitált proteolíziséhez vezet. Ezután az aktiváció közös úton folytatódik; létrejön a lítikus komplex (MAC), és kisebb, 74-77 aminosav hosszúságú fragmentumok szakadnak le. Ilyen töredék például a C3a, a C4a vagy a C5a, melyek anafilatoxikus hatással rendelkeznek.

A C3a és C5a simaizom összehúzódnást okoz, ezáltal növeli a vaszkuláris permeabilitást, ezen kívül képes leukocitákat toborozni és kemoattraktáns makrofágokat, neutrofil sejteket, limfocitákat, bazofileket és a hízósejteket aktiválni

(Lambris és mtsai 1998). A C3b komplex hozzájárul a fagocitózishoz, illetve az immunkomplexek eltávolításához. A komplement fehérjék kevésbé ismert hatásai közül kiemelendő a C3 korai vérképzésben, valamint a csontváz- és érrendszeri fejlődésben (Volanakis és mtsai 2002), továbbá komplement rendszer által szabályozott szervfejlődési és szervregenerációs folyamatokban betöltött szerepe (Mastellos és mtsai 2002). Laboratóriumi vizsgálatok és klinikai tapasztalatok igazolják, hogy a komplement eredetű anafilatoxikus peptidek, mint a C3a, a C3b, a C3d, a C4a és a C5a komplexek hatására a szérumban megnő a hisztamin mennyisége, valamint e peptidek erőteljes aktiváló hatást fejtenek ki a bazofil granulocitákra és a hízósejtekre (Erdei és mtsai 2004).

A hízósejtek migrációja a gyulladás helyére különböző kemotaktikus tényezők révén valósul meg, melyek között az SCF, a C3a és C5a peptid is szerepel, hatásukra fokozódik az emberi hízósejtek, a köldökzsinór-vér eredetű hízósejtek és a bőrben található hízósejtek migrációja (Hartmann és mtsai 1997).

A komplement rendszer bizonyos elemeinek a hízósejteken alapuló gyulladásos válaszban, így a természetes immunitásban betöltött szerepét C4-, illetve C3-hiányos egerekben vizsgálták. Mutáns és vad típusú egerekben hasonlították össze az akut szepikus peritonitisz kórlefolyását vakbél ligáció és punkció után. A beavatkozást követően a C4- és C3 -hiányos egerek között szignifikánsan magasabb halálozási arányt tapasztaltak a vad típusú kontrollcsoporthoz viszonyítva. A C3 deficiens egerekben csökkent a peritoneális hízósejtek degranulációja, a TNF- $\alpha$  termelés, a neutrofil infiltráció és a baktérium- clearance. A vizsgálat második szakaszában a C3- hiányos egerek tisztított C3 proteinkezelésben részesültek, mely eredményeképpen fokozott peritoneális hízósejt aktivációt, TNF- $\alpha$  termelést, neutrofil toborzást, baktérium opszonizációt, továbbá fagocitózist tapasztaltak. E kísérlettel bizonyítást nyert az eltérések komplement rendszertől való függősége, valamint a komplement aktiváció és a veleszületett immunitás kapcsolata (Prodeus és mtsai 1997).

A különböző szövetekben különböző fenotípusú hízósejtek mutathatók ki, mint a kötőszövet- típusú, illetve a nyálkahártya- típusú hízósejtek. Kötőszövet típusú hízósejtek a bőrben, a légzési traktus falában és a hashártyában figyelhetők meg, míg a nyálkahártya- típusú hízósejtek főként a gyomor- nyálkahártyában fordulnak elő.

Megfigyelések szerint a C3a és a C5a anafilatoxikus peptidekre a különböző típusú hízósejtek különböző módon reagálnak, mely háttérében a különböző típusú hízósejtek eltérő sejtfelszíni receptor expressziója áll (Gerard és mtsai 1991). A rodopszin alcsaládba tartozó C3a- és C5a receptor csak a savós hártya típusú hízósejteken található meg, a nyálkahártya típusú hízósejtek felszínén nem fejeződik ki (Erdei és mtsai 2004). Ennek megfelelően a nevezett anafilatoxinok hatására csak a savós hártya típusú hízósejtek és bazofilek aktiválódnak, a nyálkahártya típusú hízósejtek nem (Mousli és mtsai 1994).

### 3. Célkitűzések

Doktori munkám során egy ritka, a hízósejtek felszaporodásán alapuló betegség, a masztocitózis genetikai hátterét vizsgáltam, valamint a hízósejtek fejlődését befolyásoló egyéb faktorok hatásai elemeztem. Korábbi eredmények alapján a hízósejtek differenciálódására ható citokinek közül az IL-6 mind direkt, mind indirekt módon befolyásolja a hízósejtek differenciálódását. A fentiekben részletezett irodalmi adatok szerint a citkonin, illetve receptora génállományában jelen lévő SNP az adott citokin szérumbeli koncentrációját befolyásolja. A disszertációban részben e génekben észlelhető egy pontú nukleotid polimorfizmusok frekvenciáját vizsgáltam a masztocitózisban szenvedők és egészséges kontrollok között.

A nemzetközi irodalmat áttekintve nem található olyan közlemény, amelyben szisztematikusan felmérnék a komplement rendszer főbb paramétereinek változását masztocitózisban szenvedő betegekben. Ezért a rendelkezésünkre álló betegek mintáiban megvizsgáltuk a komplement rendszerrel kapcsolatba hozható betegségekben leggyakrabban vizsgált komplement paramétereket (CH50, C3, C4), valamint az öröklött és szerzett C1-INH hiány gyanúja esetén vizsgált paramétereket (C1-INH szint és aktivitás, C1-INH ellenes antitestek szintje, C1q, C1q ellenes antitestek szintje).

A dolgozatban két, részletesebben elemzett, differenciáldiagnosztikai nehézségekkel járó esetet mutatok be, valamint a betegek kórtörténete folyamán bekövetkezett, komplement rendszert érintő változásokat elemezve próbálok lehetséges összefüggéseket találni.

Végül a SE Masztocitózis Hálózatban a tanulmány kezdetéig regisztrált magyar, masztocitózisban szenvedő betegcsoport összetételét tekintem át, kor, nem és szérum triptáz szint alapján, alcsoportokra bontva, illetve egységesen.

Konkrét kérdések formájában az alábbiakat fogalmaztuk meg:

1. az IL-6 gén -174 G/C polimorfizmus frekvenciájában kimutatható-e különbség a masztocitózisban szenvedő betegek és egészséges kontrollok között



2. az IL-6R gén ASP358Ala (A/C) polimorfizmus frekvenciájában kimutatható-e különbség a masztocitózisban szenvedő betegek és egészséges kontrollok között
3. kimutatható-e eltérés a betegek és egészséges kontrollok között a CH50-, a C3-, a C4-szintjét, a C1-INH szintjét és aktivitását, a C1-INH ellenes antitestek szintjét, a C1q-szintjét, a C1q ellenes antitestek szintjét illetően
4. a betegség kórlefolyása során megfigyelhető-e változás a CH50-, a C3-, a C4-szintjét, a C1-INH szintjét és aktivitását, a C1-INH ellenes antitestek szintjét, a C1q-szintjét, a C1q ellenes antitestek szintjét illetően
5. milyen a masztocitózisban szenvedő magyar betegcsoport nembeli, életkorbeli összetétele, szérum triptáz szintje egységesen, illetve alcsoportok szerint

## 4. Anyag és módszer

### 4. 1. Betegek és kontrollcsoport

Az IL-6 -174 G/C, és IL-6R Asp358Ala (A/C) SNP vizsgálatba a WHO kritériuma szerint a masztocitózis több alcsoportjában szenvedő beteget vontunk be Magyarországról (Budapest), Ausztriából (Bécs) és Lengyelországból (Gdansk). A magyar betegek Dr. Várkonyi Judit docens gondozása alatt állnak, a Semmelweis Egyetem Masztocitózis Központjában.

A vizsgálatba 66 beteget vontunk be; 19 osztrák, 24 lengyel és 23 magyar nemzetiségűt, a következő nem szerinti megoszlásban: 26 férfi, 40 nő. A betegek átlagos életkora 42, 9 év volt (18-80 év között).

A betegek a WHO kritériumrendszer alapján a masztocitózis következő alcsoportjaiba tartoztak: 27 a kután masztocitózis, 27 az indolens szisztémás masztocitózis, 3 a szmoldering szisztémás masztocitózis, 6 a szisztémás masztocitózis társuló nem masztocitózisos hematológiai betegséggel, 2 az agresszív szisztémás masztocitózis, és 1 a hízósejtes leukémia alcsoportba.

A komplement rendszer esetleges eltéréseit érintő elemzéseket a magyar beteganyag mintáiból végeztük el. A vizsgálatba 46 beteget vontunk be, 27 nőt és 19 férfit. Életkoruk 1-81 év, átlagosan 49, 18 év volt. A betegek között 25 kután forma, 21 szisztémás forma fordult elő. Az alacsony betegszám miatt az esetek további, különböző alcsoportokba történő sorolását nem végeztük el.

A kontroll csoportba 99, nem rokon, a kaukázusi rasszhoz tartozó, malignus, és immunológiai betegségektől mentes, átlagos kórházi beteget választottunk. A nem szerinti megoszlás 45 férfi, 54 nő; átlagéletkoruk 68, 0 év volt (37-91 év között). A kontroll populáció genotípus eloszlása Hardy-Weinberg egyensúlyban volt. Az eset-kontroll vizsgálatok során a teljes kontroll minta nem és kor szerint illesztett szubpopulációit használtuk.

### 4. 2. Vérminták

A vizsgálatban résztvevő pácienseket a vérminta levételét megelőzően céljainkról, alkalmazott mintavételi eljárásról (vérvétel, laboratóriumi elemzés),

vizsgálat menetéről tájékoztattuk, írásos beleegyezésüket kértük. A vizsgálatot a Nemzeti Kutatás- és Innovációs Bizottság engedélyével végeztük (ETT TUKEB 12236-45/2004-1018EKU). A résztvevők azonosítása sorszámozással (kódolással) történt. Tekintettel a masztocitózis ritka előfordulására a betegcsoportot a WHO definíciók szerint kialakított további alcsoportokba nem rendeztük.

A vizsgálat során rutin eljárással, a dezinficiálás szabályait betartva a véna kubitális egy alkalommal történő szúrásból nyertünk vérmintát. Mintavételre a Semmelweis Egyetem laboratóriuma által elfogadott, egyszer használatos, vákuumos rendszerű vérvételi csöveket használtunk. Mind a betegek, mind a kontrollok esetében a vérvétel a reggeli órákban történt (7 és 9 óra között), minimum 8 órával az utolsó étkezést (átlagosan 9, 5 óra) és minimum 1 órával az ébredést követően (átlagosan 2, 5 óra).

Rutinszerűen a vérvételi panelből az alábbi paramétereket ellenőrizzük és vizsgáljuk a betegek és kontrollok esetében:

-süllyedés (Westergreen)

-mennyiségi és minőségi vérkép:

-vörösvértest (RBC), fehérvérsejt (WBC), vérlemezke (PLT) szám

-hematokrit (HCT)

-egy vörösvértestre számított hemoglobin mennyiség (MCH), vörösvértestek átlagos térfogata (MCV), vörösvértestek átlagos hemoglobinkoncentrációja (MCHC)

-ionok: nátrium ( $\text{Na}^+$ ), kálium ( $\text{K}^+$ )

-vesefunkciót jelző paraméterek: karbamid (CN), kreatinin

-májfunkciót jelző paraméterek:

- szérum glutamin oxálacetát transzamináz (SGOT), vagy aszpartát aminotranszferáz (ALA / ASAT)
- szérum glutamin piruvát transzamináz (SGPT), vagy alanin aminotranszferáz (ALA / ALAT)
- szérum alkalikus foszfatáz (SAP)
- gamma globulin transzferáz (GGT)
- laktát dehidrogenáz (LDH)

– szérumbilirubin.

A WHO által mind a diagnosztizálásra, mind a beteg állapotának és a terápia monitorozásához rutinszerűen javasolt triptáz szint meghatározását jelenleg Magyarországon nem tudjuk elvégezni. A betegek adatai között szereplő triptáz értékeket kollaborációban professzor Boguszlav Nedoszytko (Gdansk, Lengyelország) laborjából kaptuk meg.

A betegek esetében követés során keressük a malabszorpció jeleit, ekkor TSH, szabad T3, szabad T4 szint meghatározást, makrociter anémia esetében differenciál diagnosztikai okokból folsav és B12 szérumszint ellenőrzést, valamint fehérje és Ca-szint mérést is kérünk.

Gondozott betegeink esetében a rutin eljárások közé soroljuk szérumban jelen lévő komplement rendszer elemeinek szérumszint meghatározását, melyet kéthavonta végzünk el. A vizsgálat a Semmelweis Egyetem III. Belklinika Kutatólaboratóriumában történik (Dr. Prohászka Zoltán és munkacsoportja végzi).

#### **4. 3. DNS mintavétel és izolálás**

A mintavétel rutin vérvételi körülmények között történt, betegektől és kontrollszemélyektől egyaránt, etilén-diamin-tetra-acetát (EDTA) antikoaguláns tartalmazó rutin vérvétel során alkalmazott, egyszer használatos vérvételi csőbe. A lengyel és osztrák betegek mintái fagyasztott állapotban érkeztek, tárolásuk, szállításuk -20 °C fokon történt.

A genomiális DNS mintát a fehérvérsejtekből nyertük, a Miller-féle egyszerű kisózási technika szerint eljárva.

A standard 2 milliliteres (ml-es) csőbe 1 ml vörösvértest lízis puffert (a Kutatólabor által készített puffer, összetevők: Sigma-Aldrich gyártmányúak, összetétele 54,8 g szacharóz, 5 ml Triton, 2,5 ml 1 M  $MgCl_2 \times 6 H_2O$ , 6 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5, desztillált vízzel 500 ml-re feltöltve) mértünk, majd erre kb. 0,5 ml-t öntöttünk a vérmintából, ezeket 30 másodpercen (mp-en) keresztül óvatosan összeforgattuk. Ezután 13 000 rpm (revolutions per minute, egy percre eső fordulatok száma) sebességgel 2 percen keresztül centrifugáltuk. A felülúszó leöntése után a pelletre 1 ml desztillált vizet

mértünk, majd ismét 2 percen keresztül centrifugáltuk 13 000 rpm sebességgel. A felülúszót pipettával leszívtuk, majd a pelletre 80 µl proteináz K puffert (a Kutatólabor által készített puffert használtuk, összetevők: Sigma-Aldrich gyártmányúak, összetétele 750 µl 5 M NaCl, 2, 4 ml 0, 5 M EDTA, 6, 85 ml desztillált víz), majd 15 µl, 10 mg/ml koncentrációjú proteináz K enzimet (Thermo Scientific) mértünk. Az anyagunkhoz ezután 20 µl, 20 %-os SDS-t (nátrium-dodecil-szulfát), és 240 µl desztillált vizet mértünk, majd 30 percen keresztül 55-56 Celsius (°C) fokon emésztettük vízfürdőben. A minták kihűlése után (kb. 10 perc elteltével) az elegyhez 250 µl 5-6 M nátrium-klorid oldatot adtunk, 15 mp-ig erősen ráztuk. Ezután ismét centrifugálás következett 7 percen keresztül, 13 000 rpm sebességgel. A csapadék a cső aljára leülepedett (nem megfelelő minőség esetén ismét 250 µl NaCl hozzáadása, majd centrifugálás), a felülúszót 1, 5 ml-es csövekbe öntöttük át, ezt ismét 3 percen keresztül 13 000 rpm sebességgel centrifugáltuk, ismét 1, 5 ml-es csövekbe öntöttük át a felülúszót, amire 1, 5 ml izopropil- alkohol (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O, i-propanol) pipettáztunk. A csöveket kezdetben lassan, később erősebben forgatva a DNS kicsapódását idéztük elő, majd ismét 2 percen keresztül 13 000 rpm sebességgel centrifugáltuk, a felülúszót óvatosan leszívtuk. A kapott DNS mintára 70%-os etanolt mértünk, összerázás után újra 2 percen keresztül centrifugáltuk 13 000 rpm sebességgel. Az etanolt ekkor leszívtuk, a DNS mintát 23 °C fokon, 20 percen keresztül vákuumcentrifugában szárítottuk. Ezt követően az anyagot 75 µl desztillált vízben feloldottuk, 24 órán keresztül 4 °C fokon tartottuk. További vizsgálatok elvégzése előtt fél órán keresztül 37 °C fokon állni hagytuk. Amennyiben a vizsgálatokat halasztottan végeztük el, mintákat -20 °C fokon tároltuk.

#### **4. 4. Genotípus meghatározás**

Az interleukinok genotipizálása a Semmelweis Egyetem III. Belgyógyászati Klinika Kutatólaboratóriumában történtek.

##### **4. 4. 1. Az IL-6 gén Asp358Ala SNP vizsgálata**

Az IL-6 gén Asp358Ala egy pontú polimorfizmus vizsgálatát fluorogénikus 5' nukleáz aktivitású TaqMan assay-vel végeztük, a vizsgálat során Hin1II (NlaIII)

használtunk (Thermo Scientific), hasítóhely: CATG<sup>^</sup>. A genotipizáláshoz „TaqMan SNP Genotyping Assays” (Applied Biosystems) és „TaqMan Universal PCR Master Mix” (without AmpErase UNG) használtunk, a gyártó utasításait betartva.

#### 4. 4. 2. Az IL-6R gén -174 G/C promóter polimorfizmus vizsgálata

Az IL-6R gén -174 G/C (rs1800795) SNP meghatározása PCR-RFPL módszerrel történt. A 299 bázispár (bp) méretű szakaszt az 5'-TTGTCAAGACATGCCAAAGTG-3' és az 5'-TCAGACATCTCCAGTCCTATA-3' primerrel sokszoroztuk, a következő amplifikáció során: 94 °C fokon 30 mp-ig denaturáltuk 40 cikluson keresztül, 56 °C fokon anneáltuk 40 mp-ig, majd 30 mp-ig 72 °C fokon extendáltuk.

A SNP-ok vizsgálatát restrikciós emésztéssel kezdjük. A restrikciós endonukleázok baktériumokból nyerhető enzimek, melyek meghatározott, 4-8 nukleotidból álló palindrom szakasz felismerésére képesek, és itt a kettős spirált hasítani tudják.

A PCR eredményeképpen kapott fragmentumok hosszának meghatározására szolgáló eljárás, mely során a terméket egyenáramú elektromos térerőbe helyezett agaróz gélen futtatjuk. Az adott idő alatt megtett út mértéke a fragmentum nagyságától, térszerkezetétől, töltésétől, az elektroforetikus puffer összetételétől (ionerősségétől és az agaróz koncentrációjától) és az áramerősségtől függ. A DNS darabokat etidium-bromiddal (EtBr) tesszük láthatóvá, mely az UV fény hatására narancsszínnel fluoreszkálva jelzi a fragmentum helyét a gélben (Dezső és mtsa 2005). A fragmentum méretének meghatározását kereskedelmi forgalomban kapható ún. „molekulaméret markerek” segítségével végezzük.

A különböző méretű PCR termékek elválasztása hagyományos gél elektroforézis során történt, etidium-bromid tartalmú, 2 w/v%-os agaróz gélen, 5 V/m térerő mellett. A 135+111+45 bázispár (bp) hosszúságú fragmentumok a „C”, míg a 245+45 bp méretűek a „G” alléllal egyeztek meg.

#### 4. 5. Komplement rendszerrel kapcsolatos vizsgálatok

A rendelkezésünkre álló betegek mintáiban megvizsgáltuk a komplement rendszerrel kapcsolatba hozható betegségekben leggyakrabban vizsgált komplement paramétereket (CH50, C3, C4), valamint az öröklött és szerzett C1-INH hiány gyanúja esetén vizsgált paramétereket (C1-INH szint és aktivitás, C1-INH ellenes antitestek szintje, C1q, C1q ellenes antitestek szintje). A paramétereket ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) módszerrel, specifikus monoklonális ellenanyagok segítségével határoztuk meg (Seelen és mtsai 2005). A mérések a Semmelweis Egyetem III. Belgyógyászati Klinika Kutatólaboratóriumában történtek (laboratóriumvezető: Dr. Prohászka Zoltán), Dr. Szilágyi Ágnes irányítása mellett, Elisys Duo, Huma Reader és Huma Temp berendezésekkel, 230/110 VAC feszültségen, a gyártó utasításainak megfelelően.

Az ELISA módszer alapja az antigén felületén elhelyezkedő egyedi régiók és specifikus ellenanyag között kialakult kötés kromogén szubsztráttal történő kimutatása. A reakció során képződő színes termék intenzitását megfelelő hullámhosszon spektrofotométerrel mértük, majd az abszorbanciákat kalibrációs görbe alapján koncentrációkra számítottuk át, így a módszer segítségével mennyiségi elemzés végeztünk. A mért abszorbancia a vizsgálandó fehérje (minta, antigén) koncentrációjával egyenesen arányos. Ezen paraméterek meghatározásához már több, kereskedelmi forgalomban elérhető kit áll rendelkezésünkre, a mérések kivitelezését a kitekhez mellékelt használati útmutatók szerint végeztük (Quidel Inc, BD Biosciences, Franklin Lakes, USA).

Az immunkomplexek kimutatására komplement konszumpciós tesztet alkalmaztunk, mely elméleti hátterét specifikus kötések kialakulása képezi az adott komplement és a mintában jelen lévő antigén-antitest komplex között. Ha a rendszerben nincs elegendő immunkomplex, akkor a hozzáadott vörösvértest- anti-vörösvértest komplex lízise következik be, tehát komplement fogyasztás (azaz konszumpció) nem igazolódik. A mérések során a gyártó által előírt utasításokat követtük.

#### **4. 6. Statisztikai módszerek**

Az adatainkat MedCalc 9. 3. 3. 0. programot használva elemeztük. A Hardy-Weinberg equilibriumtól való eltérések és egyezések becslését és az asszociáció analízist chi-négyzet próbával végeztük, „Graphard Prims v. 4. 0” és „Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) v. 13. 0” programmal hajtottuk végre. Minden tesztünk két szálon futott, a statisztikai szignifikanciát  $P < 0,05$  esetében mondtuk ki.

#### **4. 7. Csontvelőbiopszia**

Betegeink csontvelővizsgálatát a felső hátsó csípőtővis biopszia során vett mintákból végeztük el, a csonthengert 40%-os formaldehid oldatban fixáltuk és tároltuk. A biopszia a Magyar Hematológus Társaság szakmai ajánlása alapján történt, helyi anesztéziában, ambuláns körülmények között.

A mintavételben a SE III. Belgyógyászati Klinika hematológusai voltak segítségünkre, leggyakrabban Dr. Szombath Gergely.

#### **4. 8. Endoszkópos vizsgálatok, mintavétel**

A gasztrodoudenó-, illetve kolonoszkópia a SE III. Belgyógyászati Klinika gasztroenterológiai vizsgálóhelyiségeiben történtek, jellemzően ambuláns körülmények között.

Az eszközös vizsgálatok és a minták vétele a Magyar Gasztroenterológiai Társaság Szakmai Kollégiumának ajánlásai és állásfoglalása alapján történtek, a SE III. Belgyógyászati Klinika gasztroenterológiai protokollja szerint.

Az eszközös vizsgálatok során vett minták további feldolgozása az SE I. Patológiai Intézetben, a Patológus Szakmai Kollégium ajánlásai alapján történtek.

#### **4. 9. A szövettani minták feldolgozása**

A szövettani feldolgozás kezdetén a vizsgálandó szervből több, kb. 2 cm széles, kb. 3 cm hosszú és kb. 0,5 cm vastag blokkokat készítettünk zsilettpengével. A



mintákat gézbe csomagolva, megfelelő azonosító jellel ellátva automata szövetbeágyazó készülékbe helyeztük.

A folyamat következő lépése során a rögzítésre kerülő anyagunkat bőséges, kb. 20- szoros mennyiségű 40%-os formaldehid oldatban fixáltuk. Az oldat elkészítéséhez 10%-os koncentrációjú formalint használtunk, négyszeres hígításban. A formalint nátriumkarbonáttal vagy nátrium-hidrogénkarbonáttal neutralizáltuk. A rögzítéshez formalint vagy bouin keveréket (15 ml cc. vizes pikrinsav oldat + 5, 0 ml formalin + 1, 0 ml jégecet) használtunk.

A fixálás után az anyagot kimostuk, majd ún. felszálló alkoholsort alkalmazva víztelenítettük a mintákat. Az alkoholos víztelenítés után, az anyagunkat acetonba, majd intermedierbe (xilolba) helyeztük. Az eljárás során az intermedierrel eltávolítottuk az alkoholt és az acetont és az így előkészített anyagot 56 C<sup>0</sup>-os, olvadt paraffinba ágyasztuk be, majd blokkoltuk és mikrotommal metszettük. A mikrotomkésről a metszeteket zsírtalanított tárgylemezre húztuk, szobahőmérsékleten szárítottuk, 56 C<sup>0</sup>-os termosztátban 15-35 percig inkubáltuk, majd xilollal deparaffináltuk. A deparaffinálás után metszeteinket ún. leszálló alkoholsorban készítettük elő a megfelelő festési eljáráshoz.

A metszetek általános vizsgálata során hematoxilin- eozin kettős festési eljárást alkalmaztunk. A magok festéséhez az ún. természetes festékek közé tartozó hematioxilint (10 ml 96 %-os alkoholban oldva 1 g hematoxilin és 200 ml meleg desztillált vízben oldva 20 g timsó, a két oldatot összeöntés után felforraltuk és oxidáltuk), a palzma megfestésére a xantén származékok közé tartozó eozint használtuk (a vízben oldódó eozinból 1%-os törzsoldatot készítünk, melyet egészen 0, 1%-osig hígítottunk tovább).

A vérkenetek vizsgálatára a legáltalánosabban elfogadott módszerként ismert May-Grünwald-Giemsa festést használtuk, mely során bázikus festékként metilénkékét és azúrt, savanyú festékként eozint alkalmaztunk (törzsoldatok: 1 g metilénkék festék 100 ml desztillált vízben oldva + 1 g azúr festék 100 ml desztillált vízben oldva + 1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> oldat, 1: 1: 2 arányú elegye). A bázikus festék a negatív töltésű sejtmagokat és a bazofil granulociták granulumaikat kékre, a negatív töltésű eozin a vörösvértesteket és az eozinofilek granulumaikat pirosra festi.

A csontvelővizsgálatok során a mieloid sejtek markereként ismert naftol AS-D kloroacetát reakciót is alkalmaztuk. A paraffinba ágyazott mintákat a reakció megkezdése előtt minimum 30 percen keresztül szobahőmérsékleten szárítottuk, páramentes környezetben.

Differenciáldiagnosztikai problémák miatt került előtérbe a C-KIT immunhisztokémiai reakció elvégzése. A pozitív reakció jelzi a C-KIT gén aktivációs mutációját, azaz megerősíti a diagnózist, ezen kívül valószínűsíti az imatinib kezelés hatékonyságát is (Orosz 2005). C-KIT pozitív reakció a masztocitózis mellett egyéb patológiai elváltozások jelenlétében is megfigyelhető, például gasztrointesztinális sztrómális tumor esetében. A vizsgálat elvégzését indokoltnak tartjuk a gyomor-bél rendszerben kialakuló léziók, primer és szekunder daganatok, illetve differenciáldiagnosztikai kérdések során.

A hízósejtekből a degranuláció, illetve anafilaxiás reakció során többféle biokémiai mediátor és kemoatikus anyag kerül a szervezetbe, ilyen például a  $\beta$ -triptáz. Azok az anafilaktikus reakciók, melyek nem hízósejt aktiváció útján alakulnak ki, hanem például a komplement-rendszer aktivációja révén, nem járnak triptáz emelkedéssel. Az  $\alpha$ -triptázt is a hízósejtek termelik, és ez az anyag magukból a hízósejtekből ürül kis mennyiségben. Az általában használt triptáz assay mind az  $\alpha$ -, mind a  $\beta$ -triptázt méri, az immunhisztokémiai reakció mindkét variánst kimutatja.

#### **4. 10. A szerző szerepe a folyamatban**

A doktori munka végzése során szerteágazó ismereteket, nagy gyakorlatot igénylő mintavételek, laboratóriumi elemzések, folyamatanalízisek és vizsgálatok történtek. A dolgozatot nem sikerült volna elkészítenem megfelelő külső szakmai segítség, illetve tanácsadás nélkül. A munka során közremukodó kollégák segítséget ez úton is köszönöm.

A vizsgálatok megkezdését természetesen a nemzetközi irodalom tanulmányozása előzte meg, mely során számtalan angol, német és svéd nyelvű tankönyvet, szakcikket, ajánlást és protokollt olvastam át.

Személyesen végeztem a masztocitózisos betegek vizsgálatát témavezetőm, Dr. Várkonyi Judit ambuláns rendelési ideje alatt és alkalmanként a SE III. Belgyógyászati Klinika Hematológiai Osztályán.

A betegektől történő mintavételek idején lehetőségeimhez mérten igyekeztem jelen lenni, az aspirációs citológiai - és csontminták nyérése során esetenként asszisztáltam is.

Rendszeresen részt vettem a SE III. Belgyógyászati Klinika Kutatólaboratóriumában történő molekuláris genetikai vizsgálatok végzésén. A mérések előtt törekedtem a laboratóriumi módszerek és a statisztikai elemzések elsajátítására. Az adatok elemzését kollégáimmal együttesen végeztük el.

Az eredmények ellenőrzése után a magyar és angol nyelvű közlemények megírása tette teljessé a munkámat.

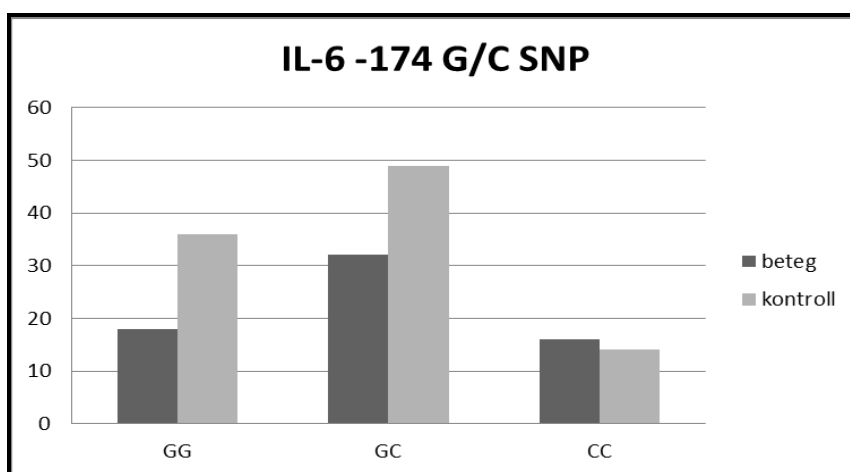
## 5. Eredmények

### 5. 1. IL-6 -174 G/C SNP vizsgálat

Az IL-6 gén -174 G/C polimorfizmusában nem találtunk szignifikáns eltérést a betegek és a kontrollok között (1. táblázat, 2. ábra).

1. táblázat: IL6 gén -174 G/C SNP vizsgálata betegek és egészséges kontrollok esetében, eredmények I.

	<b>masztocitózis n=66</b>	<b>kontroll n=99</b>	<b>p érték</b>
<b>IL-6 -174 G/C genotípus</b>			
GG	18 (27, 3%)	36 (36, 4%)	0, 1988
GC	32 (48, 5%)	49 (49, 5%)	
CC	16 (24, 2%)	14 (14, 1%)	
<b>allél</b>			
G	68 (51, 5%)	121 (61, 1%)	0, 0843
C	64 (48, 5%)	77 (38, 9%)	



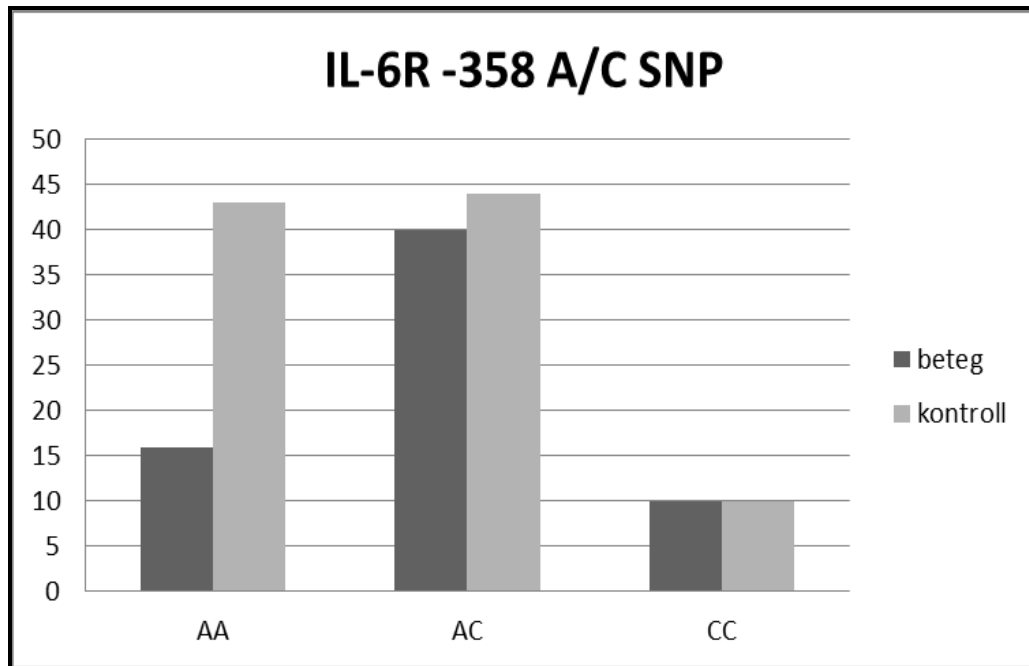
2. ábra: IL-6 gén -174 G/C SNP vizsgálata betegek és egészséges kontrollok esetében, eredmények II.

## 5. 2. IL-6R Asp358Ala (A/C) SNP vizsgálat

Az IL-6R gén Asp358Ala (A/C) SNP esetében a betegek körében az „AA” genotípus szignifikánsan ritkábban fordult elő az egészséges kontrollokhoz viszonyítva („AA” genotípus esetében  $P=0,0317$ ; „A” allél esetében  $P=0,0229$ ). Az masztocitózis kialakulásának Odds rációja (OR) az „AA” genotípusúak körében 0,4019 volt (95% konfidencia intervallum (CI)= 0,2013-0,8021;  $P=0,0088$ ), a „C” allél hordozása („AC” és „CC” genotípus) esetén a masztocitózis gyakrabban fordult elő (OR=2,488; 95% CI=1,247-4,967;  $P=0,00888$ ). (2. táblázat, 3. ábra)

2. táblázat: IL-6R gén Asp358Ala (A/C) SNP vizsgálata betegek és egészséges kontrollok esetében eredmények I.

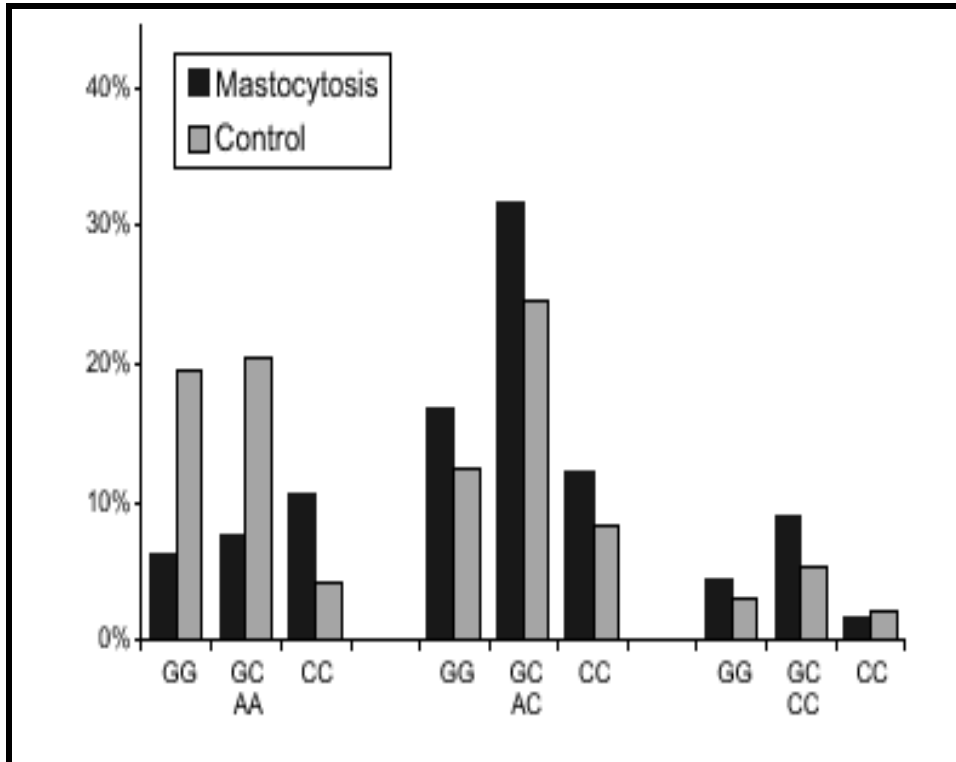
	<b>masztocitózis n=66</b>	<b>kontroll n=99</b>	<b>p érték</b>
<b>IL-6R -358 A/C genotípus</b>			
AA	16 (24, 2%)	43 (44, 3%)	0,0317
AC	40 (60, 6%)	44 (45, 4%)	
CC	10 (15, 2%)	10 (10, 3%)	0,00888
<b>allél</b>			
A	72 (54, 5%)	130 (67%)	0,0229
C	60 (45, 5%)	64 (33%)	



3. ábra: IL-6R gén Asp358Ala (A/C) SNP vizsgálata betegek és egészséges kontrollok esetében, eredmények II.

### 5. 3. Az IL-6 -174 G/C és az IL-6R Asp358Ala (A/C) SNP-k előfordulásának együttes elemzése

Az IL6 és IL-6R génpolimorfizmusának együttes elemzése során további következtetéseket is levonhatunk. Masztocitózis halmozottan jelentkezett az IL-6R gén AC heterozigóta formái mellett, leggyakrabban az IL-6 gén GC allél és az IL-6R gén AC allél együttes hordozása esetén igazolódott (4. ábra).



4. ábra: Az IL-6 gén -174 G/C és az IL-6R gén Asp358Ala (A/C) SNP együttes vizsgálata; a grafikon vízszintes tengelyének feliratozása: felső sor – IL-6 gén -174 G/C SNP, genotípus; alsó sor – IL-6R gén Asp358Ala (A/C) SNP, genotípus megoszlása betegek és egészséges kontrollok esetében, eredmény

## 5. 2. Komplement rendszerrel kapcsolatos vizsgálatok

Doktori munkám során elemeztük a komplement rendszerrel kapcsolatba hozható betegségekben leggyakrabban vizsgált komplement paramétereket (CH50, C3, C4), valamint az öröklött és szerzett C1-INH hiány gyanúja esetén vizsgált paramétereket (C1-INH szint és aktivitás, C1-INH ellenes antitestek szintje, C1q, C1q ellenes antitestek szintje).

Összességében megállapítottuk, hogy a vizsgálatok során nem tapasztalható eltérés a normális tartománytól a betegek medián- és átlagértékeit tekintve (3. és 4. táblázat).

A kapott értékeket egyesével áttekintve találtunk kis százalékban normál tartományon kívül eső értéket: Szükségesnek tartjuk hangsúlyozni, hogy az eltérő értékek nem ugyanahhoz a beteghez tartoztak.

3. táblázat: A SE III. Belgyógyászati Klinika Masztocitózis Központjában gondozott betegek komplement értékei, eredmények I.

	normálérték	betegeink értékei, medián
CP, CH50 U/ml	48-103	68
C1q, mg/l	60-180	107
C4, g/l	0, 15-0, 55	0, 3
C3, g/l	0, 7-1, 8	1, 17
C1INH, %	70-105	95
C1INH, g/l	0, 15-0, 3	0, 22
Anti-C1INH (IgG), AU/ml	0-2, 0	0, 01
Anti-C1INH (IgA), AU/ml	0-0, 6	0, 04
Anti-C1INH (IgM), AU/ml	0-12	1, 8
Anti-C1q (IgG), AU/ml	0-52	4

4. táblázat: A SE III. Belgyógyászati Klinika Masztocitózis Központjában gondozott betegek komplement értékei, eredmények II

	normálérték	betegeink értékei			
		minimum	maximum	normál tartományon kívül (db)	normál tartományon kívül (%)
CP, CH50 U/ml	48-103	51	108	0	0
C1q, mg/l	60-180	56	226	3	6, 7
C4, g/l	0, 15-0, 55	0, 14	0, 57	1	2, 17
C3, g/l	0, 7-1, 8	0, 65	2, 36	2	4, 35
C1INH, %	70-105	80	122	5	10, 87
C1INH, g/l	0, 15-0, 3	0, 13	0, 39	3	6, 7
Anti-C1INH (IgG), AU/ml	0-2, 0	0	0, 3	0	0
Anti-C1INH (IgA), AU/ml	0-0, 6	0	0, 3	0	0
Anti-C1INH (IgM), AU/ml	0-12	0	14	3	6, 7
Anti-C1q (IgG), AU/ml	0-52	0	69	1	2, 17



#### 5. 4. Estebemutatók, elemzések

A masztocitózist a ritka betegségek közé soroljuk. A betegség genetikai hátterének alaposabb megismerését a diagnosztikai problémák is nehezítik. Véleményünk szerint a betegség molekuláris genetikai értelmezése elsősorban a különböző vizsgálatokba bevont esetek számának növelésével oldható meg. Az esetszám növelésének egyetlen módja a betegek centrumokban történő regisztrációja, szükség esetén kezelése. A különböző regiszterek elkészítése lehetővé teszi egy surveillance rendszer kidolgozását, ezáltal a minták különböző vizsgálatokba történő bevonását.

Elképzelésünk szerint a diagnosztizálás is a centrumok feladata közé tartozik, ezért a betegek megfelelő irányítása már a betegség gyanúja esetén is szükséges. A szövettani mintavételek, a hisztológiai, a citológiai és a molekuláris genetikai vizsgálatok végzése is kizárólag megfelelő intézményi háttér esetén biztosítható.

##### 5. 4. 1. I. számú eset bemutatása

Betegünk kórlefolyását és betegsége diagnosztizálását bemutatva szeretnénk betekintést nyújtani a klinikai munka lépéseiről. Klinikánkon jelentkező férfi beteget kb. 40 éven keresztül gondozták, az egész testen jelentkező, viszkető, barna színű bőrelváltozásai miatt, melyet urtikária pigmentózáként diagnosztizáltak. Szövettani vizsgálat Giemsa festéssel a dermiszben jelentős számú hízósejtet igazolt, melyek citoplazmájában szekréciós vakuólumok ábrázolódtak. Molekuláris vizsgálat intenzív c-KIT expresszit igazolt.

A kórlefolyás során krónikus hasmenés jelentkezett, mely loperamidra nem reagált. Differenciál diagnosztikai okokból laktóz intolerancia, *Helicobacter pylori* és széklet mikrobiológiai vizsgálat, valamint kolonoszkópia történt, melyek kóros elváltozást nem igazoltak. A beteg állapotában további progressziót a recidiváló, rendszeres punkciót igénylő mellúri folyadék jelentett, az izzadmány citológiai vizsgálata malignitást nem igazolt.

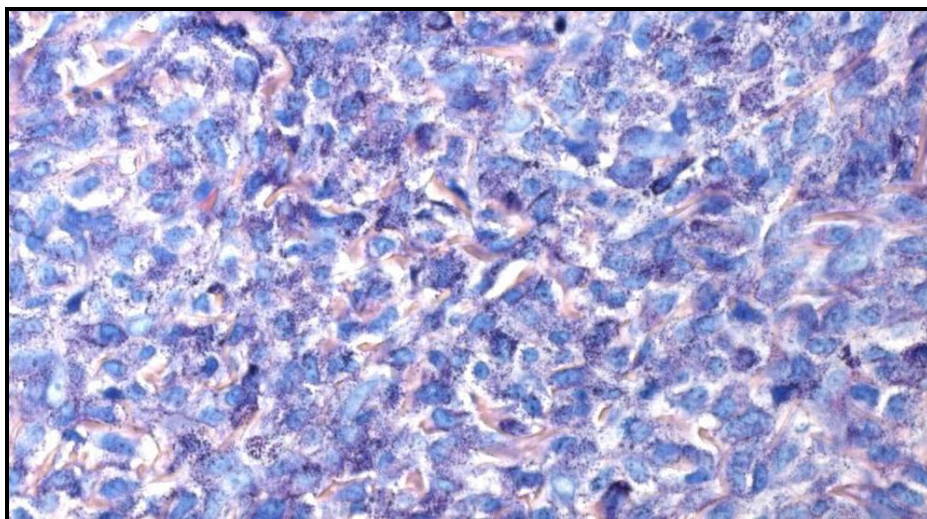
A beteg Klinikánkon 81 éves korában jelentkezett első alkalommal makrociter anémia, emelkedett SAP, az életét megkeserítő krónikus hasmenések, főként az esti órákra elviselhetetlenné váló viszketés, a mellkas csapolást követően rendre visszatelődő pleurális folyadék és a diffúz csontfájdalmak okának tisztázása céljából.

Fizikális vizsgálat során ekkor kiterjedt bőr manifesztációt, jelentős máj- és lépmegegyesbódást észleltünk (5. ábra).

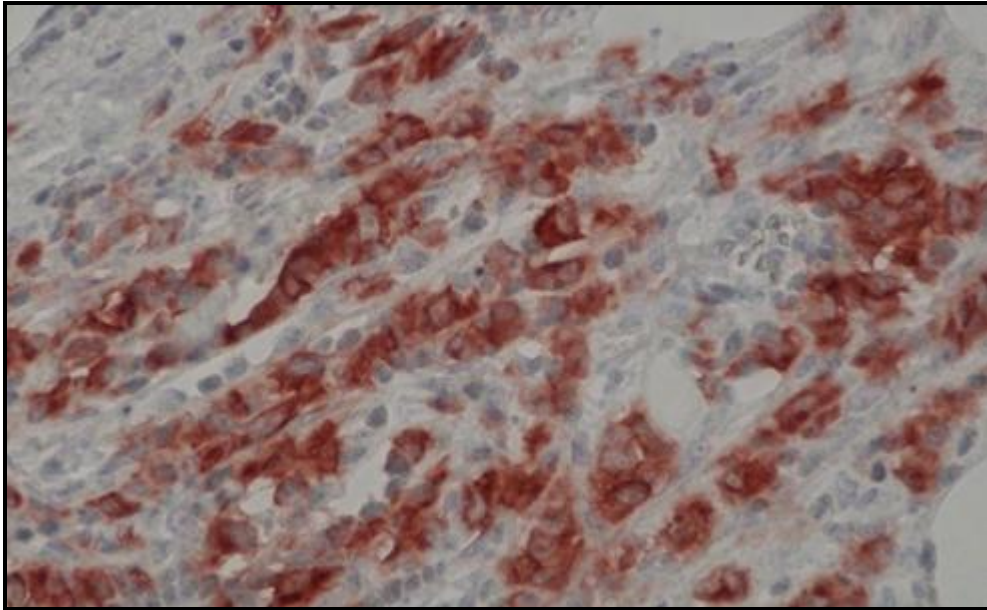


5. ábra: I. számú eset; megfigyelhetőek a kiterjedt bőrelváltozások és a kifejezett hepato- szplenomegália.

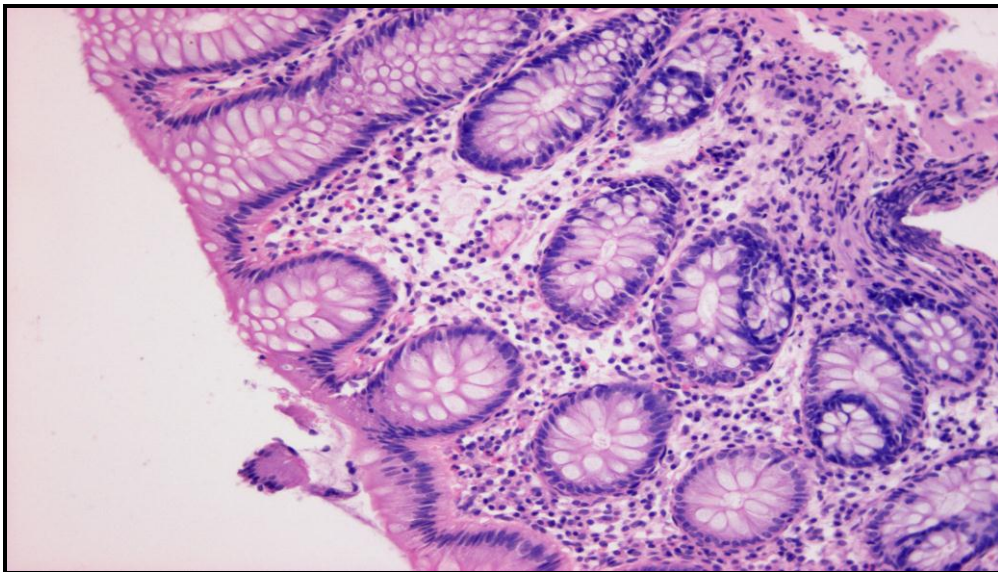
Szövettani vizsgálat céljából a bőrből és a vastagbélből mintavétel történt. A szövettani vizsgálat abnormális morfológiájú hízósejtek felszaporodását és klaszterképződést igazolt, c-KIT expresszió és triptáz pozitivitás mellett. (6., 7., 8., 9. ábra).



6. ábra: Bőr szövettani metszet részlet, abnormális morfológiájú masztociták, May-Grünwald- Giemsa festés, SE I. Patológiai Intézet anyagából

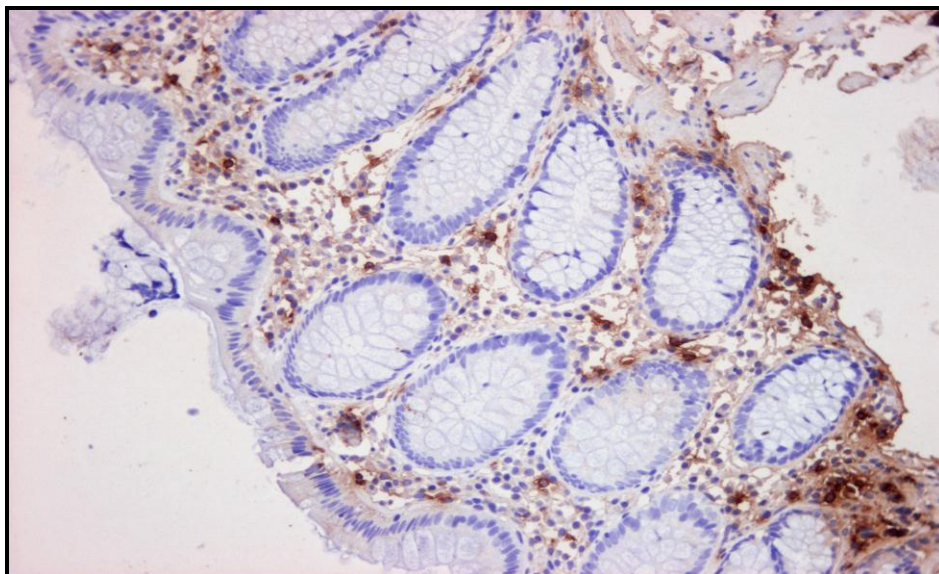


7. ábra: Bőr szövettani metszet részlet, megfigyelhető a barnás-vörös színt mutató, c-KIT pozitív reakció



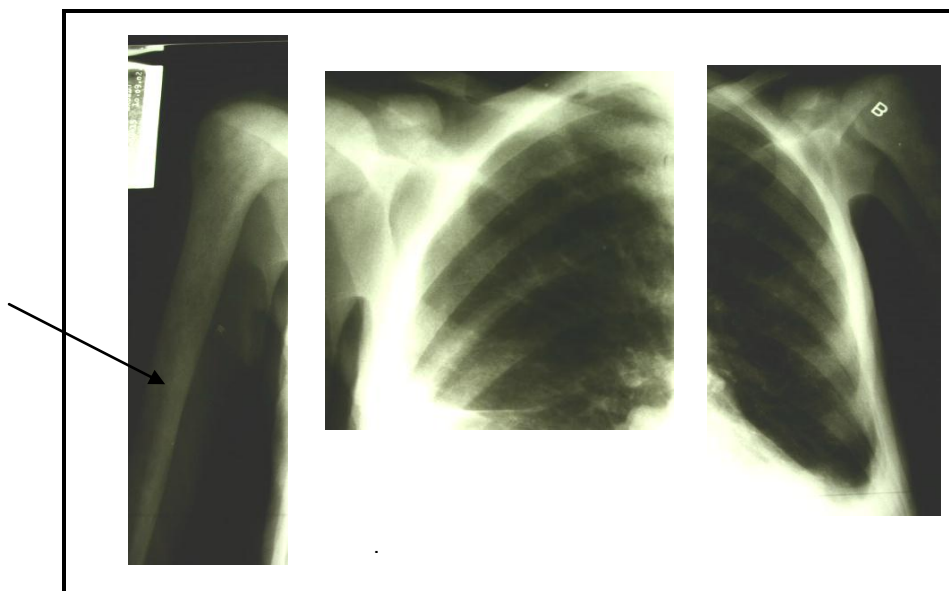
8. ábra: Bél szövettani metszet részlet, megfigyelhető a masztocita-invázió, HE festés





9. ábra: Bél szövettani metszetben kimutatott triptáz aktivitás, barnás színreakció jelentkezése esetében pozitív a teszt

Az oszteo-denzitometria jelentősen csökkent csont sűrűséget, fokozott töréskockázatot mutatott: Z score -1. 71 (64%) és T score -3, 50 (47%) / ulnaris; Z score -1. 32 (73%) T score -2. 92 (56%) / distal. A súlyos csontelváltozásokat röntgenfelvételek igazolták (10. ábra).



10. ábra: A felkar átépült csontszerkezetét bemutató röntgenfelvétel, az elváltozás jelölve.

Laboratóriumi vizsgálatok kisfokú eozinofiliát, makrociter anémiát és trombopéniát mutattak. Az anémia hátterében részben vitaminhiány, illetve a krónikus hasmenés következtében kialakult malnutrició állt (5. táblázat). A magas triptáz szint kiterjedt megbetegedésre utalt. Az emelkedett SAP a máj és a csont érintettségét is jelezte.

5. táblázat: A beteg laboratóriumi leletei a megjelenéskor és a progresszió időszakában, SE III. Belgyógyászati Klinika laboratóriumából (\* a vizsgálat a fent nevezett lengyel laboratóriumban történt)

Laboratóriumi vizsgálatok	Laboratóriumi leletek		Referencia értékek
	Első jelentkezéskor	A progresszió időszakában	
WBC	7, 80	11, 98	4, 0-10, 0 x 10 <sup>9</sup> /L
Neutrofil sejt	74	60	53-75%
Limfocita	10	6	25-40%
Monocita	5	2	2-10%
Eozinofil	12	33	0-5%
RBC	2, 46	2, 09	4, 50 -5, 90 x10 <sup>12</sup> /L
Hemoglobin	86	73	140-175g/l
HCT	0, 27	0, 21	0, 36 -0, 48
MCV	109	101	80-96 fl
Trombocita	115 x 10 <sup>9</sup> /L	31	150-400 x 10 <sup>9</sup> /L
SAP	150 U/L	130	40 -129 U/L
Szérum folsav	17, 5	-	6, 0 -39, 7 nmol/L
Se B12	163, 9	-	145, 0 -637, 0 pmol/L
Triptáz *	611	-	<20 ng/ml

A Klinikánkon elvégzett felső hátsó csípőtővis biopszia szövettani feldolgozása és citológiai vizsgálata a SE I. Patológiai Intézetében történt, Dr. Csomor Judit főorvosnő irányítása mellett. A minta gazdagon granulált, kerekded, finom kromatin szerkezetű magvas hízósejtes infiltrátumot írt le, az áramlási citometria vizsgálat 1, 7 %

CD2-CD25-CD117 hármas ko-expressziót mutató szisztémás masztocitózisnak megfelelő fenotípusú sejtet igazolt (6. táblázat).

6. táblázat: A beteg 2008-PA10/01251 számú lelete; SE I. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Dr. Barna Gábor eredményei alapján

**Áramlási citometria:**

Kontrollok (aszpecifikus immunglobulin kötődés kimutatása)

IgG FITC IgG RPE Cy5 az összes sejt között mind 1, 0% alatt

**Sejtmegoszlás a CD45-SSC diagramm alapján**

Limfoidok 3, 8%

Monociták 3, 6%

Granulociták 73, 1%

Progenitor sejt 5%

**A szubpopulációk megoszlása az összes sejt között**

CD2 6, 3%

CD117 5, 5%

CD25 2, 6%

1, 7% CD2-CD25-CD117 pozitív sejt található

A csontvelő sejtjeinek 3, 8%-a limfoid sejt, 3, 6%-a monocita, 73% granulopoetikus sejt jelent meg. A blasztkapuba 5% progenitor sejt esett. A csontvelőben CD2-CD25-CD117 hármas expressziójú sejt 1, 7%-ban jelent meg.

A beteg DNS mintájában a c-KIT gén 17-es exonján pontmutációt, citozin-timin báziscserét igazoltunk a 798-as kodonban, a 81350-es pozícióban. Ez az úgynevezett csendes, azaz nem aktiváló mutációk közé tartozik, a c-KIT fehérje aminosav sorrendjében eltérést nem okoz (Dr. Kovalszky Ilona lelete szerint).

A masztocitózis diagnózisához szükséges kritériumok közül az alábbiak fordultak elő betegünknel:

A major kritériumként meghatározott hízósejtes infiltráció és klaszterképződés kimutatása, illetve ezek immunhisztokémiai igazolása megtörtént. A csontvelői kenetben és a vastagbél metszetében igazoltuk a hízósejtes infiltrációt, és a minimum 15 masztocitából álló klaszterek meglétét. A hízósejtek egynegyede a normálistól eltérő morfológiájú volt, mely az egyik minor kritériumnak megfelel. A második minor feltételt, azaz a CD 117+, CD 2+, CD 25+ hármas ko-expressziót áramlási citometriával igazoltuk. A beteg szérum triptáz szintje a 20 ng/ml értéket többszörösen meghaladta (661 ng/ml), mely szintén az egyik minor kritérium. Összegezve: betegünk a major

kritériumnak, és a négy minor kritérium közül háromnak megfelelt. Jelen esetben a c-KIT Asp816Val kodonmutáció nem állt fenn, a DNS vizsgálat c-KIT 17 exon 798 kodon 81350 lókuszon igazolt csendes mutációt.

A betegség kórlefolyása során több alkalommal állt módunkban elemezni a komplement rendszer paramétereit. A komplement rendszerrel kapcsolatba hozható betegségekben leggyakrabban vizsgált komplement paramétereket (CH50, C3, C4), valamint az öröklött és szerzett C1-INH hiány gyanúja esetén vizsgált paramétereket (C1-INH szint és aktivitás, C1-INH ellenes antitestek szintje, C1q, C1q ellenes antitestek szintje) mértük ELISA módszer segítségével. A mért paraméterek változásait vetettük össze a kórlefolyás során jelentkező tünetekkel.

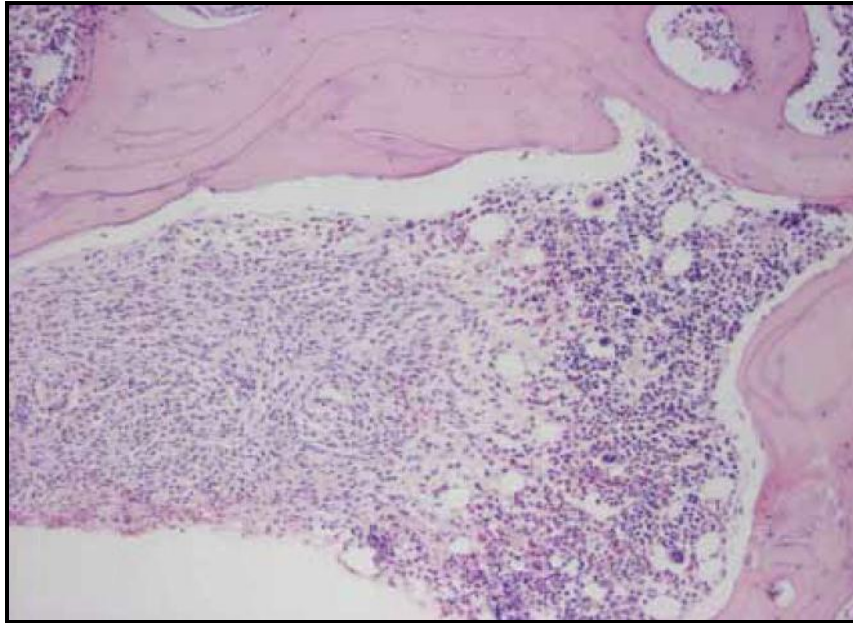
Betegünk követése során megpróbáltunk összefüggést találni a komplement rendszer vizsgált paramétereinek és a beteg általános állapota, tüneteinek megjelenése között. A betegtől 6 alkalommal vettünk vért általános kontroll-, illetve a komplement rendszer elemeinek vizsgálata céljából. A vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a mért paraméterek a normál tartományon belül mozogtak (7. táblázat). A kórfolyamat során jelentkező akut állapotváltozásokat nem követte a komplement rendszer adott elemeinek változása.

7. táblázat: A beteg komplement paramétereinek medián értéke a betegség kórlefolyása során

	normálérték	beteg értékei 6 minta alapján, medián
CP, CH50 U/ml	48-103	59, 5
C1q, mg/l	60-180	119
C4, g/l	0, 15-0, 55	0, 225
C3, g/l	0, 7-1, 8	1, 02
C1INH, %	70-105	89, 5
C1INH, g/l	0, 15-0, 3	0, 205
Anti-C1INH (IgG), AU/ml	0-2, 0	0
Anti-C1INH (IgA), AU/ml	0-0, 6	0
Anti-C1INH (IgM), AU/ml	0-12	0
Anti-C1q (IgG), AU/ml	0-52	4

#### 5. 4. 2. II. számú eset bemutatása

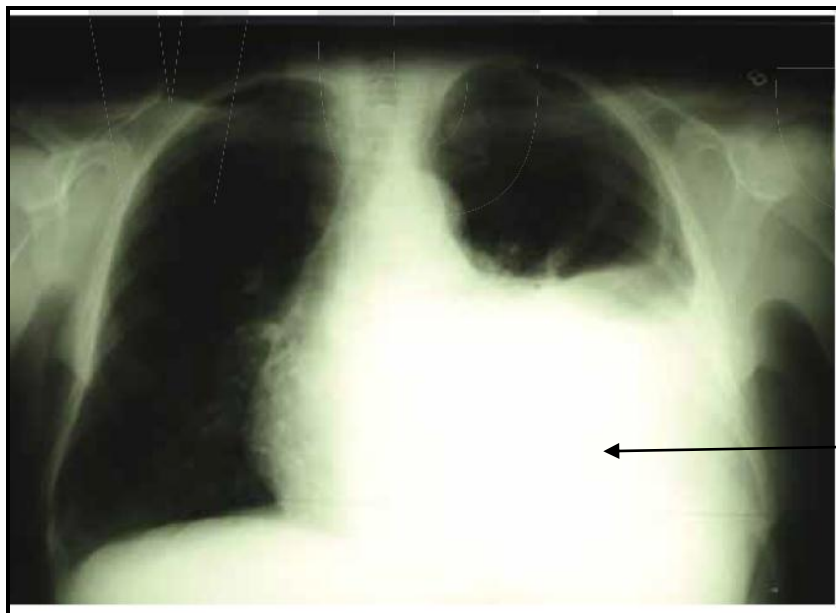
A 78 esztendőes nőbetegnél csont biopszia mintája (11. ábra) alapján szisztémás masztocitózist diagnosztizáltak, mely esszenciális trombocitemiával (ET) társult.



11. ábra: A beteg csont biopszia mintája, kifejezett masztocita infiltráció, 3. fokozatú fibrózis; HE festés

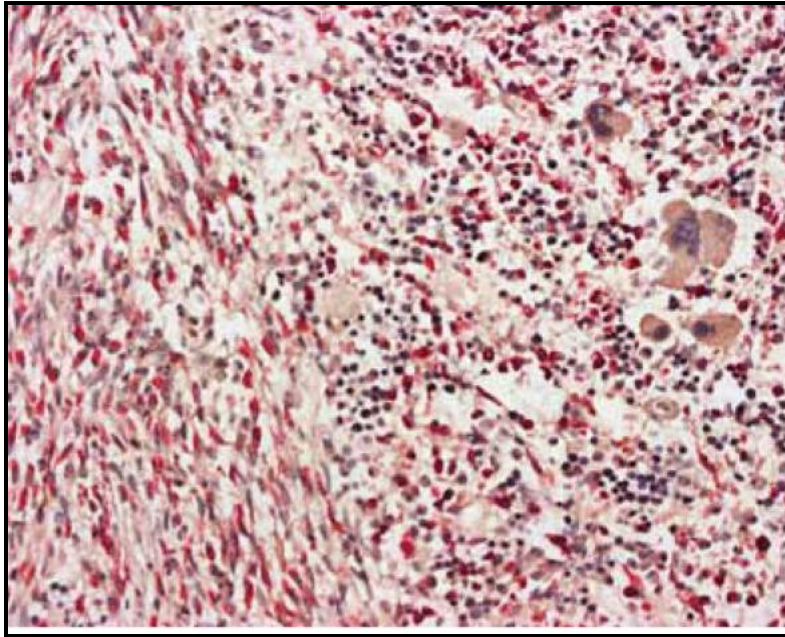
ET miatt napi 100 mg acetil-szalicilsavat szedett rendszeresen. Egyéb betegségei közül kiemelnénk 2-es típusú, inzulinnal kezelt diabétesz mellitusát, hipotireozist és IgG kappa típusú monoklonális gammopátiáját. Fizikális vizsgálata során a törzsön és a végtagokon is jelen lévő barnásvörös papulákat észleltünk, jelentős máj- és lépmegegyesítés mellett. Kóros méretű nyirokcsomót nem tapintottunk. Betegük légzési panaszai háttérében radiológiailag igazolt, jelentős mennyiségű, a bal alsó tüdőlebenyt összenyomó folyadék állt (12. ábra).



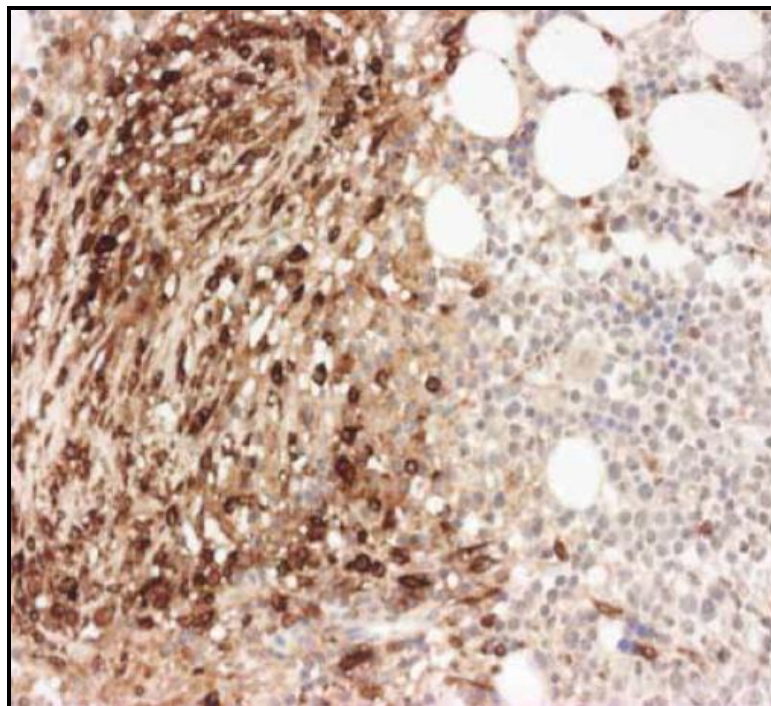


12. ábra: A beteg mellkasröntgen felvétele, megfigyelhető nagy mennyiségű mellkasi fluidum

A mellúri folyadék több alkalommal visszatelődött, emiatt rendszeresen pleurális punkciót alkalmaztunk, alkalmanként 1, 8-3, 2 l mellúri szalmasárga folyadékot bocsátottunk le. Diuretikumok és talkumos pleurodézis sem vezetett eredményre. Intézetünkben végzett csontvelő elemzése a korábban felállított diagnózist -szisztémás masztocitózis, és esszenciális trombocitémia együttes fennállása- megerősítette (13. és 14. ábra).



13. ábra: A beteg csontvelő mintája, narancsvörös színnel jelentkező naftol-AS-D-kloroacetát pozitivitás



14. ábra: A beteg csontvelő mintája, megfigyelhető a barna színreakciót mutató triptáz pozitivitás

Molekuláris genetikai vizsgálatok D816V c-KIT mutációt igazoltak a 17-es lókuszon; JAK2 V617F mutációt, illetve bcr/abl géntranszlokációt nem igazoltunk. A beteg kariotípusa 46, XX volt. Genetikai vizsgálatunk TCRgamma-, Ig nehézlánc-, és FIP1L1-PDGFR- -fúziót sem igazolt. A beteg triptáz szintje 200 ng/ml (normálérték 20 ng/ml alatt) volt, alkalikus foszfatáz értéke is emelkedett volt (átlagosan 158 U/l). A kórlefolyás során mért legmagasabb vérlemezke szám az INF- $\alpha$  terápia bevezetése előtt  $985 \cdot 10^9$  /l volt. Az INF- $\alpha$  heti 3x3 mIU/hét dózis bevezetése után a vérlemezke száma rendeződött és a mellkasi fluidum visszatelődését sem észleltük, a beteg erre vonatkozó panaszai megszűntek. Az észlelt makrocitás anémia miatt differenciál diagnosztikai okokból szérum B12- és folsav- szint meghatározást kérünk, melyek normálisnak bizonyultak. A csontsűrűség vizsgálat osteoporózist igazolt. A betegnél glutaminsav-dekarboxiláz antitestet nem tudtunk igazolni, a C-peptid-szint normális volt (1, 61 ng/ml és 2, 05 ng/ml – normálérték 0, 8-4, 2 ng/ml), amely az inzulinszekréció jelenlétét igazolta. TSH szintje a normálisnál magasabb (5, 3 mIU/L – normálérték: 0, 55-3, 75 mIU/L között), perifériás hormonszintjei a normálisnál alacsonyabb értéket mutattak (fT3 1, 3 pmol/L – normálérték: 1, 9-5, 7 pmol/L között; fT4 9, 1 pmol/L – normálérték 10-22 pmol/L között), emiatt hormonpótló terápiát vezettünk be. A betegnél anti-peroxidáz és anti-tiroglobulin antitestet ELISA módszerrel kimutatni nem tudtunk. A pajzsmirigy hormonok pótlása a beteg anémiáját nem javította. Immunglobulin analízist végeztünk, mely alapján az IgA- és IgM-szint normálisnak bizonyult (IgA 1, 43 g/L – normálérték 0, 7-4, 0 g/l között; IgM 1, 83 g/L – normálérték 0, 4-2, 3 g/L között), az IgG értéke a normálisnál magasabb volt (IgG 23, 26 g/L- normálérték 7-16, 0 g/L között). A vizeletvizsgálat proteimuriát (237 mg/nap) és kappa- könnyűlánc ürítést igazolt.

A SE III. Belgyógyászati Klinika Kutatólaboratóriumában a beteg komplement analízise rendszeresen megtörtént (eredményeket részletesen a 8. táblázatban tüntettük fel), mely a komplement rendszer klasszikus aktivációs útvonalában részt vevő faktorok szérumszintjében mutatott normálértékektől való eltérést, a C1q koncentráció szignifikánsan magasabb volt, a C3 és C1INH koncentrációja a normál tartomány alatt maradt.

8. táblázat: A beteg komplement paramétereinek medián értéke a betegség kórlefolyása során

	normálérték	beteg értékei 6 minta alapján, medián
CP, CH50 U/ml	48-103	46, 5
C1q, mg/l	60-180	250
C4, g/l	0, 15-0, 55	0, 16
C3, g/l	0, 7-1, 8	0, 54
C1INH, %	70-105	83
C1INH, g/l	0, 15-0, 3	0, 13
Anti-C1INH (IgG), AU/ml	0-2, 0	0
Anti-C1INH (IgA), AU/ml	0-0, 6	0
Anti-C1INH (IgM), AU/ml	0-12	1
Anti-C1q (IgG), AU/ml	0-52	12

C1-inhibitor (INH)-, és C1q-ellenes antitesteket nem detektáltunk, de a C1q szérumszintje a normálistól eltérő volt. A beteg szérumában esetleg jelen lévő komplement konszumpciós faktorok kimutatása céljából komplement fogyasztásos tesztet végeztünk. Az eredmények alapján megállapítottuk, hogy a beteg szérumában a kontrollcsoportéhoz képest nem mérhető alacsonyabb aktivitás (medián: 96%, 79-99, 5% interquartilis ráta). Ezek alapján feltételezzük, hogy fenti beteg esetében komplement konszumpció nem igazolódott.

### 5. 3. Egyéb statisztikai elemzések

A masztocitózis különféle formáiban szenvedő betegek csoportját további szempontok szerint elemeztük, mint az alcsoportok összetétele, a betegek életkora, neme és szérum triptáz értéke.

### 5. 3. 1. Alcsoportok szerinti megoszlás

Kután és egyéb alcsoportba sorolható masztocitózis megoszlása a mintánkban: kután masztocitózis 27 esetben (40, 91%). nem kután forma 39 esetben (59, 09%) fordult elő. A nem kután esetek aránya a következő volt: 27 indolens szisztémás masztocitózis (40, 91%), 3 szmoldering szisztémás masztocitózis (4, 54%), 6 szisztémás masztocitózis társuló nem masztocitózisos hematológiai betegséggel (9, 091%), 2 agresszív szisztémás masztocitózis (3, 03%), 1 hízósejtes leukémia (1, 51%).

### 5. 3. 2. Nemek szerinti megoszlás

A nembeli különbségek alapján: a férfi - női arány 26: 40 volt, betegeink 39, 39%-a férfi, a 60, 61% nő.

Nemek szerinti különbségek a különböző alcsoportokban; illetve alcsoporton belül a nemek százalékos előfordulása:

- kután masztocitózis: nő: 35 fő, 89, 7%; férfi: 4 fő, 10, 3%
- indolens szisztémás masztocitózis: nő: 23 fő, 85, 18%; férfi: 4 fő, 14, 82%
- szmoldering szisztémás masztocitózis: nő: 2 fő, 66, 66% férfi: 1 fő, 33, 33%
- szisztémás masztocitózis társuló nem masztocitózisos hematológiai betegséggel: nő: 4 fő, 66, 66%, férfi: 2 fő, 33, 33%
- agresszív szisztémás masztocitózis: nő: 0 fő, férfi: 2 fő, 100%
- a hízósejtes leukémiában szenvedő beteg: nő: 1 fő, 100 %

Az általános masztocitózis nembeli megoszlásának ismerete alapján megállapíthatjuk, hogy a női dominancia a jellemző. Ez alól kivételt képez az agresszív szisztémás masztocitózis betegcsoport, ahol minden beteg férfi volt (nem szabad figyelmen kívül hagynunk az alacsony esetszámot, itt összesen 2 esetünk volt).

### 5. 3. 3. Életkor szerinti megoszlás

Életkor szerinti vizsgálat céljából áttekintve a különböző alcsoportokat:

- kután masztocitózisban szenvedők átlagéletkora 34, 74 év (1-78 év között)

- indolens szisztémás masztocitózisban szenvedők átlagéletkora 41, 59 év (19-66 év között)
- szmoldering szisztémás masztocitózisban szenvedők átlagéletkora 51, 67 év (48-56 év között)
- szisztémás masztocitózis társuló nem masztocitózisos hematológiai betegséggel kórképben szenvedők átlagéletkora 65, 67 év (51-81 év között)
- agresszív szisztémás masztocitózisban szenvedők átlagéletkora 77, 5 év (73-80 év között)
- a hízósejtes leukémiában szenvedő beteg életkora 35 év.

Életkor szerinti bontás alapján azt mondhatjuk, hogy a legnagyobb szórás után masztocitózis esetében igazolódott. A legfiatalabb betegek a után masztocitózis alcsoportból kerültek ki, a legidősebbeket a szisztémás masztocitózis társuló hematológiai nem masztocitózisos betegség és az agresszív szisztémás masztocitózissal élő alcsoportokban kell keressük.

#### **5. 3. 4. Triptáz szint szerinti megoszlás**

A WHO ajánlása szerint szérum triptáz szint meghatározása szükséges betegség gyanúja esetén, az enzim emelkedett szintje (normálérték 20 ng/ml alatt) a betegség minor kritériumai között szerepel. Sajnos finanszírozási és technikai okok nem teszik lehetővé hazánkban a vizsgálat rutinszerű elvégzését. A magyar betegek szérum triptáz szintjének meghatározása Gdanskban történt. A jelen vizsgálatba került lengyel és osztrák betegek szérum triptáz szintje rendelkezésünkre állt, ezért azokból további elemzéseket tudtunk elvégezni.

A betegek száma 46 fő volt, 27 nő és 19 férfi esetében tudtuk a szérum triptáz szintjét vizsgálni. Az összes betegre vonatkoztatva az átlagérték 210, 48 ng/ml volt, a két szélső érték 2, 14 és 2357 ng/ml volt.

Alcsoportok szerinti bontásban a következő eredményt kaptuk:

- után masztocitózis: átlag: 10, 54, min.: 2, 41, max.: 21, 5 ng/ml
- indolens szisztémás masztocitózis: átlag: 48, 67, min.: 13, 8, max.: 112, 0 ng/ml
- szmoldering szisztémás masztocitózis: átlag: 559, min.: 181, max.: 937 ng/ml

- szisztémás masztocitózis társuló nem masztocitózisos hematológiai betegséggel: egy eset tartozott ide, 243 ng/ml értékkel
- agresszív szisztémás masztocitózis: egy eset tartozott ide, 2357 ng/ml értékkel
- a hízósejtes leukémiában szenvedő beteg: egy eset tartozott ide, 489 ng/ml értékkel.

Az adatokat áttekintve megállapíthatjuk, hogy a maximális triptáz szintet agresszív szisztémás masztocitózis esetében mértük, a legalacsonyabb szint a kután forma esetében jelentkezett. Átlagos értékeket vizsgálva (ahol volt átlagos érték, tehát CM, ISM, SSM esetében), azt mondhatjuk, hogy az alcsoportokon belül a kután formában igazoltuk a legalacsonyabb, indolens formánál a közepes, és szmoldering formában a legmagasabb értéket.

## 6. Megbeszélés

Doktori munkám során a masztocitózis betegség kialakulásában a nemzetközi irodalmi adatok alapján feltételezhetően szerepet játszó interleukinok egy pontú nukleotid polimorfizmusait, valamint a hízósejtek kialakulására és differenciálódására ható lehetséges tényezőként komplement vizsgálatok eredményét analizáltam.

Az SNP-k felelősek az emberi genom változatosságáért. Átlagosan 100-300 bázispárként fordulnak elő, a populációban merhető gyakoriságuk 1% körüli. Jelen tudásunk szerint a SNP-ok egy része a szervezetre hatással nem bír, más része bizonyos tulajdonság megjelenésével, illetve bizonyos megbetegedések kialakulásával, hajlammal áll összefüggésben (Buzás és mtsai 2007).

A masztocitózis kialakulásában a c-KIT mutációja meghatározó jelentőséggel bír (Valent és mtsai 2005). A nevezett receptort kódoló szakasz szerkezetében bekövetkezett változás a masztocitózison kívül egyéb betegségek esetében is igazolható: gasztrointesztinális sztróma tumor (Heinrich és mtsai 2003), tesztikuláris szeminóma (Kemmer és mtsai 2004) egyéb mieloproliferatív kórképek, mint policitémia vera (James és mtsai 2005), esszenciális trombocitémia (Levine és mtsai 2005) és akut mieloid leukémia (Care és mtsai 2003) kialakulásával is kapcsolatban áll. A c-KIT Asp816Val (D816V) mutációt csak a betegség egyik diagnosztikai kritériumaként tartjuk számon; SM-ban szenvedő felnőttek körében a pozitivitás 80-90%, SM-ban szenvedő gyermekek esetében a pozitivitás 44% (Schumacher és mtsai 2008, Lange és mtsai 2012).

A hízósejtek differenciálódására, érésére ható különböző citokinek és interleukinok azonosítását korábbi vizsgálatok során elvégezték, hatásaikról tudományos értekezések állnak rendelkezésünkre. Receptorainak génállományában bekövetkező SNP-ok hatására az adott citokin szérumban mérhető koncentrációja megemelkedik, mely következtében a hízósejtekre gyakorolt hatása is effektívebb lesz.

Számos adat áll rendelkezésünkre a hízósejtek növekedésében szerepet játszó faktorokról, így tudjuk, hogy abban nem csak a SCF, hanem különböző citokinek is részt vesznek. Ilyenek például az IL-4, IL-6, IL-10 és az IL-13 (Nedoszytko és mtsai 2009).



Masztocitózisban szenvedő betegeknél emelkedett szérumban IL-6 szint figyelhető meg, a betegség súlyossága korrelál az interleukin szérumban mérhető koncentrációjával. Pozitív korrelációt írtak le a teljes triptáz-, alkalikus foszfatáz-, IgM-szint, a fehérvérsejt és neutrofil szám és az IL-6 plazmaszintje között (Brockow és mtsai 2005). Az IL-6 inflammatorikus folyamatokban szerepet játszó citokin. Mononukleáris fagociták, fibroblasztok és aktivált T-sejtek által termelt anyag, amely az egyik legfontosabb mediátora a láznak, illetve az akut fázis folyamatoknak, krónikus gyulladás kialakulásának, valamint összetett szerepe igazolható a tumorsejtek progressziójában, túlélésében, és az angiogenezisben (Ara és mtsai 2010).

A humán IL-6 gén a 7p21 kromoszómán lokalizálódik, a promóter régiójában bekövetkező -174 G/C SNP hatására megemelkedik az IL-6 szérumszintje (Yalcin és mtsai 2011). Fenti eredmények alapján feltételeztük a hízósejtek felszaporodásával járó megbetegedés, a masztocitózis és az IL-6 -174 G/C SNP közötti összefüggést. Jelen vizsgálatainkkal nem tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni az IL-6 -174 G/C allélfrekvenciájában egészséges kontrollok és masztocitózisban szenvedő betegek körében.

Az IL-6R exonjának funkcionális polimorfizmusa (Asp358Ala) az IL-6 membránhoz történő kapcsolódásának megváltozásához vezet (Galicía és mtsai 2004). A szolubilis IL-6R szekvesztráción keresztül befolyásolja a szérumban mérhető IL-6-szintet (Rose-John és mtsai 2008).

A nevezett polimorfizmust vizsgálva több eredményt is közöltek a „C” allél előfordulásával kapcsolatban, mely az IL-6 és az IL-6R magasabb szérumszintjét eredményezi (Galicía és mtsai 2004, Reich és mtsai 2007).

Eredményeink alapján az IL-6R Asp358Ala (A/C) SNP előfordulásában találtunk szignifikáns különbséget az egészségesek és a betegek között: masztocitózisban szenvedők körében a „C” allél hordozását (azaz „AC”, „CC” genotípust) találtuk gyakoribbnak. Az IL-6 -174 G/C SNP elemzése során szignifikáns különbség nem igazolódott.

Az IL-6 -174 G/C, illetve az IL-6R Asp358Ala (A/C) lókuszon előforduló SNP-k együttes elemzését is elvégeztünk, a vizsgálat során szignifikáns eltérést tapasztaltunk. Az IL-6R -358 lókuszon igazolható „AA” és az IL-6 -174 lókuszon jelen lévő „GG” genotípus együttesen szignifikánsan ritkábban fordult elő betegeink körében. Ez alapján

feltételezzük, hogy e két genotípus együttes jelenléte védő hatást jelenthet a betegség kialakulásával szemben, mely pontos hatását jelenleg nem ismerjük. Ismételten megjegyeznénk azonban, hogy az allélfrekvencia változása nem azonos a betegség kialakulásával. Ez mindössze azt jelenti, hogy bizonyos allél hordozása esetében egy adott betegség kialakulásának hajlama, azaz előfordulásának gyakorisága változik. Adott genetikai eltérések hatására, azaz jelen esetben a c-KIT D816V mutációja, az IL-6R -358 lókuszon jelen lévő „AC” és az IL-6 -174 lókuszon igazolt „CG” allél együttes hordozása esetében a betegség gyakrabban fordul elő. A folyamatban feltételezhetően további, jelenleg még nem azonosított egyéb tényezők is szerephez jutnak.

A hízósejtek érése nem kizárólag interleukinok hatására történik. A folyamat során számos egyéb tényező hatása is szerepet játszik a genetikai eltérések mellett.

A komplement rendszer szerepe a kórokozók elleni védekezésben, a normális gyulladásos válasz és az immunfolyamatok szabályozásában jól ismert. Különböző kórképek kapcsán a komplement rendszer bizonyos elemeinek eltérései figyelhetők meg, melyek jellemzők lehetnek a különböző betegségekre. A hízósejtek aktivációjában, a kemotaxisuk mértékében, a hisztamin felszabadulásban és a hízósejt függő gyulladásos válaszban elengedhetetlen a komplement rendszer bizonyos elemeinek –C3, C3a, C3b, C3d, C4, C4a, C5a, - aktív közreműködése.

CH50 aktivitás meghatározásával a teljes komplement aktivitás jellemezhető. A CH50 normális aktivitásától való eltéréssel járnak akut, illetve krónikus gyulladások, különböző genetikai eltérések és bizonyos hematológiai betegségek. Alacsony CH 50 aktivitás figyelhető meg például krónikus májbetegség, krónikus és akut glomerulonefritisz, reumatoid artritisz, hemolitikus anémiák, szisztémás lupusz eritematozis esetében. Emelkedett CH 50 aktivitással járnak az akut gyulladásos állapotok, bizonyos leukémiák, a Hodgkin-kór és a Behcet-betegség. A teljes komplement aktivitás számszerű jellemzése kiindulópontként szolgál bizonyos betegségek és a komplement rendszer összefüggéseinek elemzése során. A dolgozat elkészítése során történt vizsgálatok nem mutattak különbséget az egészséges kontrollok és betegek CH 50 aktivitása között.

A C1q a komplement rendszer klasszikus aktiváció útjának fő komponense, mind az antitest-függő, mind az attól független immunválaszban vesz részt (Kishore és mtsa 2000). C1q deficiens állatkísérletek alapján következtethetünk szerepére, mely az

autoimmun folyamatokban és a humorális immunválaszban nyilvánul meg (Walport és mtsai 1998). A C1q hiány, egy ritka, autoszomális recesszív öröklődésű rendellenesség, mely visszatérő bőrelváltozásokkal, krónikus fertőzésekkel jár együtt. Jelen vizsgálataink alapján nem igazoltunk különbséget az egészséges kontrollok és betegek C1q aktivitása között.

C1-inhibitor az egyik legfontosabb fékezője a klasszikus aktivációs útnak, hiányában a gyulladásos folyamatok fellángolása, kifejezettebb szövetkárosító hatása figyelhető meg. A C1-inhibitor helyi inaktiválódását igazolták gyulladásos szövetekben (Erdei és mtsai 2004). Gyulladásos, illetve autoimmun betegségek esetében a komplement rendszer és a véralvadást szabályozó rendszer összekapcsolt aktivációja figyelhető meg, melyben jellemzően vazoaktiv peptidek, és anafilatoxinok vesznek részt. A hízósejtek biológiai funkciói közé tartozik a természetes és adaptív immunválaszban, valamint az allergiás folyamatokban történő részvétel, melynek egyik következménye az erek permeabilitásának fokozódása. A C1-INH és a hízósejtek tehát egyaránt részt vesznek a gyulladásos folyamatokban, vérerek permeabilitásának szabályozásában.

C1 INH hiány esetén klinikailag megnyilvánuló HANO és a masztocitózishoz társuló MAT hasonló tünetekkel jár, ezért differenciál diagnosztikában fontos a két betegség egymástól való elkülönítése. C1 INH vizsgálatokat emiatt végeztünk masztocitózisban.

Az elvégzett vizsgálataink nem igazoltak C1-INH szint eltérést masztocitózisban szenvedő betegeinknél, csak egy (O.B.) esetben.

Bizonyos komplement eredetű anafilatoxikus peptidek, mint a C3a, a C3b, a C3d, a C4a és a C5a komplexek hatására a szérumban megnő a hisztamin mennyisége (el-Lahti és mtsai 1994), továbbá a fent nevezett peptidek erőteljes aktiváló hatást fejtenek ki a hízósejtekre (Erdei és mtsai 2004). A C3a és C5a peptid ezen kívül szerepet játszik a humán köldökzsinórvér és a bőrben található hízósejtek migrációjában (Hartmann és mtsai 1997). Állatkísérletek során végzett C3 protein kezelés hatására fokozott peritoneális hízósejt aktiváció, TNF- $\alpha$  termelés, neutrofil toborzás, baktérium opsonizáció, és fagocitózis figyelhető meg, mellyel bizonyítható a komplement rendszer, a komplement aktiváció és a veleszületett immunitás kapcsolata (Prodeus és mtsai 1997). A C3-, C4- és C5 aktiváció valamint a hízósejtek működése között tehát

összefüggés mutatható ki. A masztocitózis betegség hátterét vizsgálva, jelen vizsgálataink alapján nem tudunk a betegséggel összefüggésben normálértéktől eltérő C3- és C4-szintet kimutatni.

Doktori munkám során elemeztük a komplement rendszerrel kapcsolatba hozható betegségekben leggyakrabban vizsgált komplement paramétereket (CH50, C3, C4), valamint az öröklött és szerzett C1-INH hiány gyanúja esetén vizsgált paramétereket (C1-INH szint és aktivitás, C1-INH ellenes antitestek szintje, C1q, C1q ellenes antitestek szintje). Nem találtunk összefüggést a masztocitózis betegség különböző alcsoportjaiban szenvedők és egészséges kontrollok között a komplement rendszer vizsgált paramétereit illetően. Két betegünk rendszeres ellenőrzését mutattuk be, a komplement rendszer vizsgálata során nem igazolódott eltérés, a komplement rendszer elemeinek változásai nem követték a kórlefolyást.

Feltételezésünk szerint különböző fakorok additív, esetleg szinergista módon befolyásolják a betegség kialakulását, melyben még további, jelenleg nem ismert egyéb tényezők is szerepet játszhatnak. A betegség ritka előfordulása miatt a tanulmányban szereplő betegek száma - a nemzetközi irodalomban szereplőkéhez hasonlóan alacsony. Nemzetközi (magyar, osztrák, és lengyel) hematológus kollégák összefogásával tudtuk a jelen dolgozat eredményeit szolgáltató 67 beteg mintáit begyűjteni, vizsgálni, majd elemezni. További betegek bevonásával, az esetszám emelésével, esetleg alcsoportokat kialakítva vizsgálatainkat ismételni szeretnénk. Az esetszám emelését csak hazai és nemzetközi centrumok összefogásával látjuk megvalósíthatónak.

## 7. Következtetések

Doktori munkám megkezdésekor célom a hízósejtek kialakulására ható körülmények, faktorok felderítése volt. Munkám során konkrét kérdések megfogalmazására, illetve azok megválaszolására törekedtem. A vizsgálatok során kapott eredményeket a következőkben szeretném röviden összegezni.

Az IL-6 gén -174 G/C polimorfizmus frekvenciájában nem mutatható ki szignifikáns eltérés a masztocitózisban szenvedő betegek és egészséges kontrollok között.

Az IL-6R gén ASP358Ala (A/C) polimorfizmus frekvenciájában igazoltunk szignifikáns különbséget a masztocitózisban szenvedő betegek és egészséges kontrollok között.

Az IL6 és IL-6R génpolimorfizmusának együttes elemzése során megállapítottuk, hogy betegség leggyakrabban az IL-6 gén GC allél és az IL-6R gén AC allél együttes hordozása esetén igazolódott.

A komplement rendszer paramétereinek elemzése során nem igazoltunk eltérést a betegek és egészséges kontrollok között a CH50-, a C3-, a C4-szintjét, a C1-INH szintjét és aktivitását, a C1-INH ellenes antitestek szintjét, a C1q-szintjét, a C1q ellenes antitestek szintjét illetően.

A betegség kórlefolyása során nem mutattunk ki változást a CH50-, a C3-, a C4-szintjét, a C1-INH szintjét és aktivitását, a C1-INH ellenes antitestek szintjét, a C1q-szintjét, a C1q ellenes antitestek szintjét illetően.

A masztocitózisban szenvedő magyar betegcsoport elemzése során azt találtuk, hogy a betegség agresszív formái jellemzően 70 év felett fordultak elő. A betegség nembeli összetételének elemzése alapján női nemi dominanciát találtunk, mely az immunológiai betegségekre jellemző.

## 8. Összefoglalás

Jelen disszertáció témája a ritka betegségek közé sorolható, hízósejtek felszaporodásával járó masztocitózis kialakulásában szerepet betöltő faktorok elemzése, illetve azok genetikai hátterének felderítése volt, korábbi kutatási eredményekkel és irodalmi adatokkal való összevetésben. A hízósejtek kialakulását és differenciálódását befolyásoló humorális tényezők közül a dolgozatban az interleukinok és a komplement rendszer elemeinek szerepét tekintettük át.

Az interleukinok közül az IL-6 és IL-6R genetikai állományában bekövetkező egy pontú nukleotid polimorfizmusok elemzése alapján következtettünk lehetséges összefüggésekre. Az IL-6 gén -174 G/C polimorfizmus frekvenciájának vizsgálata során nem mutattunk ki szignifikáns eltérést a masztocitózisban szenvedő betegek és egészséges kontrollok között. Az IL-6R gén Asp358Ala (A/C) polimorfizmus frekvenciájában szignifikáns különbséget igazoltunk a masztocitózisban szenvedő betegek és egészséges kontrollok között: masztocitózisban szenvedők körében a „C” allél hordozását (azaz „AC”, „CC” genotípust) találtuk gyakoribbnak. Az IL-6 és IL-6R génpolimorfizmusának együttes elemzése során megállapítottuk, hogy betegség az IL-6 gén GC allél és az IL-6R gén AC allél együttes hordozása esetén a leggyakoribb.

A komplement rendszerrel kapcsolatban végzett vizsgálati eredmények elemzése során nem igazoltunk eltérést a betegek és egészséges kontrollok között a CH50-, a C3-, a C4-szintjét, a C1-INH szintjét és aktivitását, a C1-INH ellenes antitestek szintjét, a C1q-szintjét, a C1q ellenes antitestek szintjét illetően. Két eset példáján keresztül mutattuk be a komplement rendszer elemeinek monitorozásának eredményét. A betegség kórlefolyása során nem mutattunk ki változást a CH50-, a C3-, a C4-szintjét, a C1-INH szintjét és aktivitását, a C1-INH ellenes antitestek szintjét, a C1q-szintjét, a C1q ellenes antitestek szintjét illetően.

## 9. Summary

The aim of this study was to investigate the factors, that can contribute to the development of a rare disease, called mastocytosis. In order to gain an insight into the genetic background of this illness we investigated genetic polymorphisms in genes encoding interleukins, and different members of the complement system. These are important components of the humoral immunity, that are known to effect the development and differentiation of mast cells.

Among the large family of interleukins, we focused on single nucleotide polymorphisms in the gene of interleukin 6, and its receptor, IL6R. In case of the G/C SNP, located -174 basepairs of the IL6 gene, we could not show significant difference between the allele frequencies in the control group, or the people suffering from mastocytosis. On the other hand, we detected significant difference in case of the missense Asp358Ala (A/C) variation in the IL6R gene. The C allele is more frequent among the people living with the diagnosis of mastocytosis (the AC or CC genotype is more abundant in this group). We took a step further, and made haplotype analysis with the above mentioned SNPs. The most abundant haplotype among the people with mastocytosis was the GC (IL6 gene), and AC (IL6R gene).

After the investigation of the putative effect of IL 6 polymorphisms, we wanted to measure the level of different components of the complement system. In addition to the investigation of CH50-, C3-, C4 level, we measured the level and activity of C1-INH, as well as C1-INH antibodies, and the C1q, C1q antibody level. We could not detect any significant alterations among the people affected by the disease. We showed the result of the monitoring of these parameters through two cases.

## 10. Irodalomjegyzék

Aladzsity I, Kovács M, Semsei A, Falus A, Szilágyi A, Karádi I, Varga G, Füst G, Várkonyi J. (2009) Comparative analysis of IL6 promoter and receptor polymorphisms in myelodysplasia and multiple myeloma. *Leuk Res*, 33, 11: 1570-1573.

Alvarez-Twose I, González-de-Olano D, Sánchez-Muñoz L, Matito A, Jara-Acevedo M, Teodosio C, García-Montero A, Morgado JM, Orfao A, Escribano L. (2012) Validation of the REMA score for predicting mast cell clonality and systemic mastocytosis in patients with systemic mast cell activation symptoms. *Int Arch Allergy and Immunol*, 157, 3: 275-280.

Ara T, Declerck YA. (2010) Interleukin-6 in bone metastasis and cancer progression. *Eur J Cancer*, 46, 7: 1223-1231.

Bodemer C, Hermine O, Palmérini F, Yang Y, Grandpeix-Guyodo C, Leventhal PS, Hadj-Rabia S, Nasca L, Georgin-Lavialle S, Cohen-Akenine A, Launay JM, Barete S, Feger F, Arock M, Catteau B, Sans B, Stalder JF, Skowron F, Thomas L, Lorette G, Plantin P, Bordigoni P, Lortholary O, de Prost Y, Moussy A, Sobol H, Dubreuil P. (2010) Pediatric mastocytosis is a clonal disease associated with D816V and other activating c-KIT mutations. *J Invest Dermatol*, 130, 3: 804-815.

Bradding P, Feather IH, Wilson S, Bardin PG, Heusser CH, Holgate ST, Howarth PH. (1993) Immunolocalization of cytokines in the nasal mucosa of normal and perennial rhinitic subjects. The mast cell as a source of IL-4, IL-5, and IL-6 in human allergic mucosal inflammation. *J Immunol*, 151, 7: 3853-3865.

Brazzelli V, Grasso V, Manna G, Barbaccia V, Merante S, Boveri E, Borroni G. (2011) Indolent systemic mastocytosis treated with marrow-band UVB phototherapy: study of five cases. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 26, 4: 465-469.

Briley LD, Phillips CM. (2008) Cutaneous mastocytosis: a review focusing on pediatric population. *Clin Pediatr*, 47, 8: 757-761.



Brockow K, Aktin C, Huber M, Metcalfe DD. (2005) IL-6 levels predict disease variant and extent of organ involvement in patient with mastocytosis. *Clin Immunol*, 115, 2: 216-223.

Buzás E, Falus A, Szegedi GY. (2007) Az autoimmun betegségek patogenetikai jellemzői. *Orvosi Hetilap*, 148, 1: 12-16.

Care RS, Valk PJM, Goodeve AC, Abu-Duhier FM, Geertsma-Kleinekoort WMC, Wilson GA, Gari MA, Peake IR, Löwenberg B, Reilly JT. (2003) Incidence and prognosis of c-KIT and FLT3 mutations in core binding factor (CBF) acute myeloid leukaemias. *Br Journ Haem*, 121, 5: 775–777.

Castells MC. (2004) Mastocytosis: classification, diagnosis, and clinical presentation. *Allergy Asthma Proc*, 25, 1: 33-36.

Clogston CL, Boone TC, Crandall BC, Mendiaz EA, Lu HS. (1989) Disulfide structures of human interleukin-6 are similar to those of human granulocyte colony stimulating factor. *Arch Biochem and Biophys*, 272, 1: 144-151.

Coffer PJ, Koenderman L, de Groot RP. (2002) The role of STATs in myeloid differentiation and leukaemia. *Oncogene*, 19, 21: 2511-2522.

Cohen S, Bigazzi PE, Yoshida T. (1974) Similarities of T-cell functions in cell-mediated immunity and antibody production. *Cell Immunol*, 12, 1: 150-159.

Dezső P, Nagy J. (2005) A polimeráz láncreakció (PCR) és gyógyszerkutatási alkalmazásai. *Magyar Kémiai Folyóirat*, 111, 4: 153-157.

Duckworth AK, Bhatti A, Barnes C. (2009) Diffuse cutaneous mastocytosis in fraternal twins. *Int J Dermatol*, 48, 2: 170-172.

el-Lahti SG, Dahinden CA, Church MK. (1994) Complement peptides C3a- and C5a-induced mediator release from dissociated human skin mast cells. *J Invest Dermatol*, 102, 5: 803-806.

Erdei A, Andrásfalvy M, Péterfy H, Tóth G, Pecht I. (2004) Regulation of mast cell activation by complement-derived peptides. *Immunol Lett*, 92, 1-2: 39-42.

Farkas H. (2010) Pediatric hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency. *Allergy, Asthma Clin Immunol*, 6, 1:18.

Fishman D, Faulds G, Jeffrey R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphires S, Woo P. (1998) The effect of novel polymorphism in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest*, 102, 7: 1369-1376.

Furitsu T, Tsujimura T, Tono T, Ikeda H, Kitayama H, Koshimizu U, Sugahara H, Butterfield JH, Ashman LK, Kanayama Y. (1993) Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *J Clin Invest*, 92, 4: 1736-1744.

Galicía JC, Tai H, Komatsu Y, Shimada Y, Akazawa K, Yoshie H. (2004). *Genes Immun*, 5, 6: 513-516.

Galli SJ. (1990) New insights into "the riddle of the mast cells": microenvironmental regulation of mast cell development and 8 phenotypic heterogeneity. *Lab Invest*, 62, 1: 5-33.

George TI, Horny HP. (2011) Systemic Mastocytosis. *Hematol Oncol Clin North Am*, 25, 5: 1067-1083.

Georgin-Lavialle S, Lhermitte L, Baude C, Barete S, Bruneau J, Launay JM, Chandesris MO, Hanssens K, de Gennes C, Damaj G, Lanternier F, Hamidou M, Lortholary O,

Dubreuil P, Feger F, Lepelletier Y, Hermine O. (2011) CD34-c-Kit<sup>+</sup> cell rate correlates with aggressive forms of systemic mastocytosis and behaves like a mast cell precursor. *Blood*, 118, 19: 5246-5249.

Gerard NP, Gerard C. (1991) The chemotactic receptor for human C5a anaphylatoxin. *Nature*, 349, 6310: 614–617.

Ghiasi M, Ghanadan A, Jesri SB, Sotudeh S, Ramyar A. (2011) Diffuse cutaneous mastocytosis: Report of a severe case with fatal outcome. *Dermatol Online J*, 17, 3: 7.

Godarzi EM, Sarvestani EK, Aflaki E, Amirghofran Z. (2011) Interleukin-6 gene polymorphism in Iranian patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*, 30, 2: 179-184.

Hartmann K, Henz BM, Krüger-Krasagakes S, Köhl J, Burger R, Guhl S, Haase I, Lippert U, Zuberbier T. (1997) C3a and C5a Stimulate Chemotaxis of Human Mast Cells. *Blood*, 89, 8: 2863-2870.

Heide R, Middelkamp-Hup MA, Mulder PG, Oranje AP. (2001) Clinical Scoring of Cutaneous Mastocytosis. *Acta Derm Venereol*, 81: 273–276.

Heinrich MC, Corless CL, Duensing A, McGreevey L, Chen CJ, Joseph N, Singer S, Griffith DJ, Haley A, Town A, Demetri GD, Fletcher CDM, Fletcher JA. (2003) *PDGFRA* Activating Mutations in Gastrointestinal Stromal Tumors. *Science*, 299, 5607: 708-710.

Heinrich PC, Rose-John S, Luttkien C, Krüttgen A, Moller C. (1991) Evidence for the importance of a positive charge and an alpha-helical structure of the C-terminus for biological activity of human IL-6. *FEBS Lett*, 282, 2: 265-267.

Hirano T, Harada H, Nakajima K, Iwamatsu A, Yasukawa K, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, Kashiwamura S, Koyama K. (1986) Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature*, 324, 6092: 73-76.

Hutchinson RM. (1992) Mastocytosis and Co-existent Non-Hodgkin's Lymphoma and Myeloproliferative Disorders. *Leuk Lymphoma*, 7, 1-2: 29-36.

Hültner L, Druetz C, Moeller J, Uyttenhove C, Schmitt E, Rüde E, Dörmer P, Van Snick J. (1990) Mast cell growth-enhancing activity (MEA) is structurally related and functionally identical to the novel mouse T cell growth factor P40/TCGFIII (interleukin 9). *Eur J Immunol*, 20, 6: 1413-1416.

Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. (2001) WHO classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. *Ann Oncol*, 13: 490-491.

James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garçon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W. (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signaling causes polycythaemia vera. *Nature*, 434, 7037: 1144-1148.

Johnson MR, Verstovsek S, Jorgensen JL, Manshouri T, Luthra R, Jones DM, Bueso-Ramos CE, Medeiros LJ, Huh YO. (2009) Utility of the World Health Organisation classification criteria for the diagnosis of systemic mastocytosis in bone marrow. *Mod Pathol*, 22, 1: 50-57.

Kemmer K, Corless CL, Fletcher JA, McGreevey L, Haley A, Griffith D, Cummings OW, Wait C, Town A, Heinrich MC. (2004) *KIT* Mutations Are Common in Testicular Seminomas. *Am J Pathol*, 164, 1: 305-313.

Kemp SF, Lockey RF. (2002) Anaphylaxis: A review of causes and mechanisms. *J Allergy Clin Immunol*, 110, 3: 341-348.

Kishore U, Reid KBM. (2000) C1q: Structure, function, and receptors. *Immunopharmacol*, 49, 1: 159-170.

Klimkowicz-Mrowiec A, Wolkow P, Spisak K, Maruszak A, Styczynska M, Barcikowska M, Szczudlik A, Slowik A. (2010) Interleukin-6 gene -174 G/C and apolipoprotein E gene polymorphism and the risk of Alzheimer disease in a Polish population. *Neurol Neurochir Pol*, 44, 6: 537-541.

Laine E, Chauvot de Beauchêne I, Perahia D, Auclair C, Tchertanov L. (2011) Mutation D816V Alters the Internal Structure and Dynamics of c-KIT Receptor Cytoplasmic Region: Implications for Dimerization and Activation Mechanism. *PloS Comput Biol*, 7, 6: e1002068 DOI: 10.1371/journal.pcbi.1002068.

Lambris DJ, Sahu A, Wetsel R. (1998) The chemistry and biology of C3, C4 and C5. The human complement system in health and disease. Marcel Dekker, New York, 83–118.

Lange M, Nedoszytko B, Górska A, Żawrocki A, Sobjanek M, Kozłowski D. (2012) Mastocytosis in children and adults: clinical disease heterogeneity. *Arch Med Sci*, 8, 3: 533-541.

Leonard WJ. *Fundamental Immunology*. 4<sup>th</sup> edition, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1999: 741-774.

Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, Boggon TJ, Wlodarska I, Clark JJ, Moore S, Adelsperger J, Koo S, Lee JC, Gabriel S, Mercher T, D'Andrea A, Fröhling S, Döhner K, Marynen P, Vandenberghe P, Mesa RA, Tefferi A, Griffin JD, Eck MJ, Sellers WR, Meyerson M, Golub TR, Lee SD, Gilliland DG. (2005) Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*, 7, 4: 387-397.

Mansoori N, Tripathi M, Alam R, Luthra K, Ramakrishnan L, Parveen S, Mukhopadhyay AK. (2010) IL-6 -174 G/C and Apo E gene polymorphism in Alzheimer's and vascular dementia patients attending the cognitive disorders clinic of

the All India Institute of Medical Sciences, New Delhi. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 30, 6: 461-468.

Mastellos D, Lambris JD. (2002) Complement: more than a “guard” against invading pathogens? *Trends Immunol*, 23, 10: 485–491.

Mazur G, Bogunia-Kubik K, Wróbel T, Karabon L, Polak M, Kuliczowski K, Lange A. (2005) IL-6 and IL-10 promoter gene polymorphisms do not associate with the susceptibility for multiple myeloma. *Immunol Lett*, 96, 2: 241-246.

Metcalf DD. (1991) Classification and Diagnosis of Mastocytosis: Current Status. *J Invest Dermatol*, 96, 3 Suppl: 2S–4S.

Mousli M, Hugli TE, Landry Y, Bronner C. (1994) Peptidergic pathway in human skin and rat peritoneal mast cell activation. *Immunopharmacol*, 27, 1: 1–9.

Nedoszytko B, Nedoszytko M, Lange M, Van Doormaal J, Gleń J, Zabłotna M, Renke J, Vales A, Buljubasic F, Jassem E, Roszkiewicz J, Valent P. (2009) Interleukin-13 promoter gene polymorphism -1112C/T is associated with the systemic form of mastocytosis. *Allegory*, 64, 2: 287–294.

Nedoszytko M, de Monchy J, van Doormaal JJ, Jassem E, Oude Elberink JN. (2009) Mastocytosis and insect venom allergy: diagnosis, safety and efficacy of venom immunotherapy. *Allergy*, 64, 9: 1237-1245.

Nordlind K, Thorslund K, Lonne-Rahm S, Mohabbati S, Berki T, Morales M, Azmitia EC. (2006) Expression of serotonergic receptors in psoriatic skin. *Arch Dermatol Res*, 298, 3: 99-106.

O’Garra A, Stapleton G, Dhar V, Pearce M, Schumacher J, Rugo H, Barbis D, Stall A, Cupp J, Moore K. (1990) Production of cytokines by mouse B cells: B lymphomas and normal B cells produce interleukin 10. *Int Immunol*, 2, 9: 821-832.

Patrizi A, Viridi A, Neri I. (2011) Cutaneous Mastocytosis Exacerbated by Pniworm is a Young Boy. *Pediatr Dermatol*, 29, 2: 229-230.

Perbellini O, Zamò A, Colarossi S, Zampieri F, Zoppi F, Bonadonna P, Schena D, Artuso A, Martinelli G, Chilosi M, Pizzolo G, Zanotti R. (2011) Primary role of multiparametric flow cytometry in the diagnostic work-up of indolent clonal mast cell disorders. *Cytometry. B, Clin Cytom*, 80, 6: 362-368.

Prodeus AP, Zhou X, Maurer M, Galli SJ, Carroll MC. (1997) Impaired mast cell-dependent natural immunity in complement C3-deficient mice. *Nature* 390, 6665: 172-175.

Reich D, Patterson N, Ramesh V, De Jager PL, McDonald GJ, Tandon A, Choy A, Hu D, Tamraz B, Pawlikoshka L, Wasser-Fyr C, Huntsman S, Waliszewska A, Rossin E, Li R, Garcia M, Reiner A, Ferrell R, Cummings S, Kwok PY, Harris T, Zmuda JM, Ziv E. (2007) Admixture mapping of an allele affecting interleukin 6 soluble receptor and interleukin 6 levels. *Am J Hum Genet*, 80, 4: 716-726.

Rennick D, Hunte B, Holland G, Thompson-Snipes L. (1995) Cofactors are essential for stem cell factor-dependent growth and maturation of mast cell progenitors: comparative effects of interleukin-3 (IL-3), IL-4, IL-10, and fibroblasts. *Blood*, 85, 1: 57-65.

Rennick D, Yang G, Muller-Sieburg C, Smith C, Arai N, Takabe Y, Gemmell L. (1978) Interleukin 4 (B-cell stimulatory factor 1) can enhance or antagonize the factor-dependent growth of hemopoietic progenitor cells. *Proc Nat Acad Sci U S A*, 84, 19: 6889-6893.

Rennick DM, Lee FD, Yokota T, Arai KI, Cantor H, Nabel GJ. (1985) A cloned MCGF cDNA encodes a multilineage hematopoietic growth factor: multiple activities of interleukin 3. *J Immunol*, 134, 2: 910-914.

Rose-John S, Scheller J, Elson G, Johnes SA. (2008) Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer, *J Leukoc Biol*, 80, 2: 227-334.

Schernthaner GH, Hauswirth AW, Baghestanian M, Agis H, Ghannadan M, Worda C, Krauth MT, Printz D, Fritsch G, Sperr WR, Valent P. (2005) Detection of differentiation- and activation- linked cell surface antigens on cultured mast cell progenitors. *Allergy*, 60, 10: 1248-1255.

Schumacher JA, Elenitoba-Johnson KSJ, Lim MS. (2008) Detection of the c-KIT D816V mutation in systemic mastocytosis by allele-specific PCR. *J Clin Pathol*, 61, 1: 109-114.

Seelen MA, Roos A, Wieslander J, Mollnes TE, Sjöholm AG, Wurzner R, Loos M, Tedesco F, Sim RB, Garred P, Alexopoulos E, Turner MW, Daha MR. (2005) Functional analysis of the classical, alternative, and MBL pathways of the complement system: standardization and validation of a simple ELISA. *J Immunol Methods*, 296, 1-2: 187–198.

Shahbazi M, Ebadi H, Fathi D, Reshandel D, Mohamadhosseni M, Tahmasebi A, Shahbazi S, Zamani M, Rashibaghan A. (2010) HLA-DRB1\*1501 intensifies the impact of IL-6 promoter polymorphism on the susceptibility to multiple sclerosis in an Iranian population. *Mult Scler*, 16, 10: 1173-1177.

Smith C, Rennic D. (1986) Characterization of a murine lymphokine distinct from interleukin 2 and interleukin 3 possessing a T-cell growth factor activity and a mast cell growth factor activity that synergizes with IL-3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 6: 1857-1861.

Tan A, Westerman D, McArthur GA, Lynch K, Waring P, Dobrovic A. (2006) Sensitive detection of KIT D816V in patients with mastocytosis. *Clin Chem*, 52, 12: 2250-2257.



Tayal V, Kalra BS. (2008) Cytokines and anti-cytokines as therapeutics - An update. Eur J Pharmacol, 579, 1-3: 1-12.

Thompson-Snipes L, Dhar V, Bond MW, Mosmann TR, Moore KW, Rennick D. (1991) Interleukin-10: A Novel Stimulatory Factor for Mast Cells and Their Progenitors. J Exp Med, 173, 2: 507-510.

Ustum C, DeRemer DL, Akin C. (2011) Tyrosine kinase inhibitor in the treatment of systemic mastocytosis. Leuk Res, 35, 9: 1143-1152.

Valent P, Akin C, Speer WR, Mayerhofer M, Fodinger M, Fritsche- Polanz R, Sotlar K, Escribano L, Arock M, Horny HP, Metcalfe DD. (2005) Mastocytosis: pathology, genetics and current options for therapy. Leuk Lymphoma, 46, 1: 35-48.

Valent P, Sillaber C, Bettelheim P. (1991) The growth and differentiation of mast cells. Prog Growth Factor Res, 3, 1: 27-41.

Valent P, Sperr WR, Schwartz LB, Horny HP. (2004) Diagnosis and classification of mast cell proliferative disorders: delineation from immunologic diseases and non- mast cell hematopoietic neoplasms. J Allergy Clin Immunol, 114, 1: 3-11.

Volanakis JE (2002) The role of complement in innate and adaptive immunity. Curr Top Microbiol Immunol. 266: 41-56.

Walport MJ, Kevin A. Davies KA, Marina Botto M. (1998) C1q and Systemic Lupus Erythematosus. Immunobiology, 199, 2: 265-285.

Walter MR, Cook WJ, Bugg CE, Ealick SE, Zhao BG, Reichert P, Nagabhushan TL, Trotta PP, Cameron Jr. RP, Walter Jr. RL. (1992) Crystal structure of recombinant human interleukin-4. J Biol Chem, 267, 28: 20371-20376.

Yalcin S, Kayaalti Z, Söleymezoglu T. (2011) Role of interleukin-6 -174 G/C promoter polymorphism in trace metal levels of autopsy kidney and liver tissues. *Int J Hyg and Environ Health*, 214, 3: 219–224.

Zuraw BL. (1997) Urticaria, angioedema, and autoimmunity. *Clin Lab Med*, 17, 3: 559-569.

## 11. Saját publikációk jegyzéke

1. **Rausz E**, Szilágyi A, Nedoszytko B, Lange M, Nedoszytko M, Lautner-Csorba O, Falus A, Aladzsity I, Kokai M, Valent P, Marschalko M, Hidvégi B, Szakonyi J, Csomor J, Várkonyi J: Comparative analysis of IL6 and IL6 receptor gene polymorphisms in mastocytosis, Br J Haematol, 160, 2, 216-219, 2013.
2. Várkonyi J, **Rausz E**, Pánczél P, Sperlag M, Varga L., Farkas H, Csomor J, Füle T, Karadi I: Coexistent systemic mastocytosis and essential thrombocythemia complicated with monoclonal gammopathy and hypocomplementaemia, Cent Eur J Med, 7, 6, 742-746, 2012.
3. **Rausz E**: Szisztémás masztocitózis, Orvostudium, megjelenés alatt

## 12. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom a Semmelweis Egyetem „Molekuláris Orvostudományok” Doktori Iskola vezetőjének, Prof. Dr. Mandl Józsefnek, és a „Humán molekuláris genetika és géndiagnosztika alapjai” program vezetőjének, Prof. Dr. Falus Andrásnak, hogy doktori munkámhoz zöld utat adtak.

Doktori munkám elvégzésében témavezetőm, Dr. Várkonyi Judit szerepét szeretném hangsúlyozni, segítségé, tanácsai nélkül e disszertáció nem készülhetett volna el.

A nemzetközi beteganyag összegyűjtésében, a külföldi minták rendelkezésünkre bocsátásában nagy segítségünkre voltak Dr. Boguslaw Nedoszytko lengyel, és Dr. Peter Valent osztrák hematológus professzorok, akik nagylelkűségét ez úton is köszönjük.

A kutatómunkám során végzett molekuláris genetikai vizsgálatokat a Semmelweis Egyetem III. Belgyógyászati Klinika Kutatólaboratóriumában végeztük el, a laboratórium vezetője, Dr. Prohászka Zoltán irányítása mellett. Segítségét, gyakorlati javaslatait ez úton is köszönöm.

A Kutatólaboratórium munkatársai közül Aladzsity Istvánnak, és Dr. Szilágyi Ágnesnek tartozom hatalmas köszönettel; rajtuk kívül köszönöm továbbá Kókai Márta, Farkas Henriette, Varga Lilian segítségét is, akik nélkül a vizsgálatok és statisztikai értékelések nem készültek volna el.

Közvetlen munkatársaimnak, a Péterfy Sándor utcai Kórház II. Belgyógyászati Osztály („C” BEL) orvosainak - Dr. Süveges Erzsébet, Dr. Kocsi Győző, Dr. Szakály Eszter, Dr. Varga Erzsébet, Dr. Harangozó Edit - köszönöm, hogy a doktori iskola kurzusai, vizsgái alatt helyettesítésükkel biztosították a betegek folyamatos ellátását. A Péterfy Sándor utcai Kórház Orvosiigazgatójának, Dr. Szokolyi Miklósnak, és Igazgatójának, Dr. Sásdi Antalnak is köszönettel tartozom, amiért biztosította számomra a disszertáció megírásához szükséges feltételeket.

Végül, de természetesen nem utolsó sorban szeretném megköszönni családom támogatását és folytonos biztatását.