

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2566.

GÁL ZSÓFIA

A humán molekuláris genetika és a géndiagnosztika alapjai
című program

Programvezető: Dr. Szalai Csaba, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Szalai Csaba, egyetemi tanár

Terápiás célpontok és biomarkerek vizsgálata asztmában és allergiában

Doktori értekezés

Gál Zsófia

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Szalai Csaba, D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Vellainé Takács Krisztina, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Bohács Anikó, Ph.D., egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Lakatos Péter, D.Sc., egyetemi tanár

Tagok: Dr. Barta Imre, Ph.D., tudományos munkatárs
Dr. Pikó Henrietta, Ph.D., biológus

Budapest
2021

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	5
1. Irodalmi háttér	12
1.1. Bevezetés.....	12
1.2. Allergia.....	13
1.2.1. Immunpatogenezis.....	13
1.2.2. Genetikai háttér.....	16
1.2.3. Diagnosztika és kezelés	17
1.2.4. Allergén-specifikus immunterápia (SIT)	18
1.2.5. DesensIT projekt	19
1.2.6. Prevalencia.....	21
1.3. Asztma.....	21
1.3.1. Immunpatogenezis.....	21
1.3.2. Genetikai háttér.....	28
1.3.3. Diagnosztika és kezelés	32
1.3.4. Prevalencia.....	35
1.4. Krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD)	38
1.5. TEK gén és Tie2 útvonal	40
1.6. Neutrofil extracelluláris csapdák (NET-ek)	42
1.7. Hosszú nem-kódoló RNS-ek (lncRNS-ek).....	45
2. Célkitűzések	49
3. Módszerek.....	51
3.1. Biobank bemutatása	51
3.1.1. Teljes genom és jelölt gén asszociációs vizsgálatban résztvevő személyek jellemzői	51
3.1.2. Cirkuláló lncRNS vizsgálatban résztvevő személyek jellemzése	54
3.1.3. Plazma minták NET-szintjének mérésében résztvevő személyek jellemzői	56
3.2. Alkalmazott laboratóriumi technikák.....	59
3.2.1. Humán minták	59
3.2.2. Genomiális DNS izolálása	59
3.2.3. Teljes genom asszociációs vizsgálat (GWAS)	59
3.2.4. Jelölt gén asszociációs vizsgálat	60
3.2.5. RNS izolálás és reverz transzkripció	60

3.2.6.	<i>LncRNS PCR array és assay</i>	61
3.2.7.	<i>Egér-asztma modell vizsgálata</i>	61
3.2.8.	<i>Neutrofil granulociták izolálása</i>	62
3.2.9.	<i>Áramlási citométer alapú NET detektálás</i>	63
3.2.10.	<i>Konfokális lézer-pásztázó mikroszkópia</i>	63
3.3.	Bioinformatikai módszerek	64
3.3.1.	<i>Tie2 útvonal és a TEK gén vizsgálatában alkalmazott módszerek</i>	64
3.3.2.	<i>Neutrofil extracelluláris csapdák vizsgálata során alkalmazott statisztikai módszerek</i>	65
3.3.3.	<i>Cirkuláló lncRNS vizsgálatban alkalmazott biostatistikai módszerek</i>	66
4.	Eredmények	69
4.1.	Tie2 útvonal és a TEK gén szerepének vizsgálata.....	69
4.1.1.	<i>Felfedező kohorsz: Teljes genom asszociációs vizsgálat felnőttkori allergiás rhinitisben</i>	69
4.1.2.	<i>Replikációs kohorsz: Gén asszociációs vizsgálat felnőtt- és gyermekkori asztmában</i>	74
4.1.3.	<i>Angiopietin-Tie2 út lehetséges szerepének vizsgálata az asztma egérmodelljében</i>	80
4.2.	Neutrofil extracelluláris csapdák vizsgálata.....	84
4.2.1.	<i>Áramlási citométer alapú technika kísérleti beállítása</i>	84
4.2.2.	<i>NET-ek megjelenítése konfokális lézer-pásztázó mikroszkóp segítségével</i>	86
4.2.3.	<i>Humán plazma minták NET-szintjének összehasonlítása</i>	87
4.3.	Hosszú nem-kódoló RNS-ek vizsgálata.....	92
4.3.1.	<i>A felfedező kohorsz eredményei</i>	92
4.3.2.	<i>A replikációs vizsgálat eredményei</i>	96
4.3.3.	<i>LncRNS-ek vizsgálata biomarkerként</i>	101
4.3.4.	<i>A kiválasztott lncRNS-ek feltételezett funkciója</i>	103
5.	Megbeszélés	106
5.1.	Tie2 útvonal és a TEK gén szerepének vizsgálata.....	106
5.2.	Neutrofil extracelluláris csapdák szintjének vizsgálata.....	110
5.3.	Hosszú nem-kódoló RNS-ek vizsgálata	114
6.	Következtetések	120
7.	Összefoglalás	122
8.	Summary	123
9.	Irodalomjegyzék	124

10.	Saját publikációk jegyzéke	146
10.1.	A disszertációhoz kapcsolódó közlemények	146
10.2.	A disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények	147
11.	Köszönetnyilvánítás	148

Rövidítések jegyzéke

ACD-A - Acid citrate dextrose/ Savas citrát-dextróz

ACE2 - Angiotensin-converting enzyme 2/ Angiotenzin-konvertáló enzim 2

ACOS - Asztma - COPD Overlap Szindróma

ACTB - Actin Beta/ Béta-aktin

ADAM3 - A Disintegrin And Metalloproteinase Domain 3

AERD - Aspirin-exacerbated respiratory disease/ Aszpirin-által kiváltott légzőszervi megbetegedés

AHR - Airway hiperresponsiveness/ Légúri hiperreaktivitás

AIT - Allergen immunotherapy/ Allergén immunterápia

Akt1 - AKT Serine/Threonine Kinase 1/ protein kináz B

Ang - Angiopoietin

Angpt1(mouse) / ANGPT1(human) - Angiopoietin 1

Angpt2(mouse) / ANGPT2(human) - Angiopoietin 2

Angpt4(mouse)/ ANGPT4(human) - Angiopoietin 4

ANOVA - Analysis of variance/ Varianciaelemzés

APC - Antigen-presenting cell/ Antigén prezentáló sejt

ARDS - Acute respiratory distress syndrome/ Akut respirációs distressz szindróma

ARIA - Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma

AS - Antisense/ Antiszensz

B2M - β 2 microglobulin/ β 2 mikroglobulin

BALF - Bronchoalveolar lavage fluid/ Tüdőmosó folyadék

BMI - Body mass index/ Testtömegindex

BSA - Bovine serum albumin/Marha szérumalbumin

CI - Confidence interval/ Konfidencia intervallum

CNV - Copy-number variation/Kópiaszám variáció

COPD - Chronic obstructive pulmonary disease/ Krónikus obstruktív tüdőbetegség

COX - Cyclooxygenase/ Ciklooxigenáz

CR - Complement receptor/ Komplement receptor

CRP - C-reaktív protein

Ct - cycle threshold/ küszöbérték ciklusszám

CTCF - CCCTC-binding factor

DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole

DNS - deoxiribonukleinsav

dsDNS - double stranded/ dupla szálú DNS

ECP - Eosinophil cationic protein/ Eozinofil kationos fehérje

EDTA - Etilén-diamin-tetraecetsav

ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay

eNOS - endothelial nitric oxide synthase/ endotheliális nitrogén-monoxid szintáz

eQTL - expression quantitative trait loci/ expressziós QTL

eRNS - enhancer RNS

exRNS - extracelluláris RNS

FACS - Fluorescence-activated cell sorting/ Áramlási citométer

FBS - Fetal bovine serum/ Magzati borjúsavó

FcεRI - Fc epsilon Receptor I

FDR - False discovery rate/ Hamis felfedezési arány

FeNO - Kilélegzett levegő nitrogén-monoxid koncentrációja

FEV1 - forced expiratory volume in 1 second/ első másodpercben mért erőltetett kilégzési térfogat

FGFR2 - Fibroblast Growth Factor Receptor 2/ Fibroblaszt növekedési faktor receptor 2

FITC - Fluorescein isothiocyanate/ Fluoreszcein-izotiocianát

FN - False negative/ Hamis negatív

FOXP1 - Forkhead Box P1

FP - False positive/ Hamis pozitív

FVC - forced vital capacity/ erőltetett vitálkapacitás

GAS5 - Growth arrest-specific 5

GERD - Gastroesophageal reflux disease/ Gastro-oesophagealis reflux betegség

GINA - Global Initiative for Asthma

GO - Gene Ontology/ Gén Ontológia

GOLD - Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease

GSEA - Gene set enrichment analysis/ Génhalmaz feldúsulási elemzés

GWAS - Genome-wide association study/ Teljes genom asszociációs vizsgálat

H2 - Histone H2/ Hiszton H2

HNRNPU - Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein U

HNRNPU-AS1 - Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein U-antisense RNA 1

HWE - Hardy-Weinberg equilibrium/ Hardy-Weinberg egyensúly

ICS - Inhaled corticosteroids/ Inhalációs kortikoszteroidok

IgM - Immunoglobulin M

IL - Interleukin

ILC2 - Innate lymphoid cell 2/ 2-es típusú veleszületett limfoid sejt

INT - intronic

ISGF-3 - Interferon-stimulated gene factor 3

KASP - KBiosciences Competitive Allele-Specific PCR

Kdr(mouse)/ VEGFR2(human) - Vascular endothelial growth factor receptor 2/
Vaszkuláris endotheliális növekedési faktor receptor 2

LABA - Long-acting β_2 adrenoceptor agonists/ Hosszú hatású β_2 -agonista

LAMA - Long-acting muscarinic antagonist/ Hosszú hatású muszkarin-receptor
antagonista

LD - Linkage disequilibrium/ Kapcsoltsági egyenlőtlenség

LINC - long intergenic/ hosszú intergénikus

lncRNS - long non-coding/ hosszú nem-kódoló RNS

LogFC - log fold change/ logaritmikus FC

LPS - Lipopolysaccharide/ Lipopoliszacharid

LTRA - Leukotriene receptor antagonist/ Leukotrién receptor-antagonista

MAF - Minor allele frequency/ Minor allél frekvencia

MALAT1 - Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1

MBP - Major basic protein/ Fő bázikus protein

MEG3 - Maternally expressed 3

miR – micro

/ mikroRNS

MMP - Matrix metalloproteinase/ Mátrix metalloproteináz

MPO - Myeloperoxidase/ Myeloperoxidáz

mTOR - mammalian target of rapamycin

NADPH - Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate/ Nikotinamid-adenin-
dinukleotid foszfát

ncRNS - non-coding/ nem-kódoló RNS

NE - Neutrophil elastase/ Neutrofil elasztáz

NEAT1 - Nuclear Enriched Abundant Transcript 1

NET - Neutrophil extracellular trap/ Neutrofil extracelluláris csapda

Nfkb1(mouse)/ NFKB1(human) - Nuclear Factor Kappa B Subunit 1/ nukleáris faktor-kappa B

NLRP3 - NLR Family Pyrin Domain Containing 3

NO - Nitrogen monoxide/ Nitrogén-monoxid

Nos3(mouse)/ NOS3(human) - Nitric Oxide Synthase 3/ Nitrogén-oxid szintáz 3

NSAID - Non-steroidal anti-inflammatory drug/ Nem-szteroid tartalmú gyulladásgátló

OCS - Oral corticosteroids/ Orális kortikoszteroidok

OIP5-AS1 - Opa interacting protein 5-antisense RNA 1

OR - Odds ratio/ Esélyhányados

ORMDL3 - ORMDL Sphingolipid Biosynthesis Regulator 3

OVA - Ovalbumin

PAD - Peptidylarginine deiminase/ Peptidilarginin deimináz

PAR - Promoter-associated/ Promoter asszociált RNS

PBS - Phosphate-buffered saline/ Foszfátpufferolt sóoldat

PCR - Polymerase chain reaction/ Polimeráz láncreakció

PEF - Peak expiratory flow/ Kilégzési csúcsáramlás

PFA - Paraformaldehid

PFP - Platelet free plasma/ Vérlemezke-mentes plazma

PI3K - Phosphoinositide 3-kinase/ Foszfoinozitid-3-kináz

Pik3ca(mouse)/ PIK3CA(human) - Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha

piRNS - PIWI-interacting/ PIWI-asszociált RNS

PMA - Phorbol 12-myristate 13-acetate/ forbol-észter

ppb - parts per billion/ az egész rész milliárdod része

Ptprb(mouse)/ VE-PTP(humán) - Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type B/ Tirozin foszfatáz receptor B

RA - Rheumatoid arthritis

RAF - Risk allele frequency/ Kockázati allél frekvenciája

RN7SK - RNA Component Of 7SK Nuclear Ribonucleoprotein

RNS - ribonukleinsav

ROS - Reactive oxygen species/ Reaktív oxigéngyökök

RPLP0 - Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0

RQLQ - Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire

RSV - Respiratory syncitial vírus

RTSS - rhinoconjunctivitis total symptom score

SABA - Short-Acting β_2 -Agonist/ Rövid hatású β_2 -agonista

SCIT - Subcutaneous immunotherapy/ Szubkután immunterápia

siRNS - small interfering/ rövid interferáló RNS

SLE - Systemic lupus erythematosus/ Szisztémás lupus erythematosus

SLIT - Sublingual Immunotherapy/ Szublingvális immunterápia

SNORA73A - Small Nucleolar RNA, H/ACA Box 73A

snoRNS - small nucleolar/ kis nukleoláris RNS

SNP - Single nucleotide polymorphism/ Egyponos nukleotid-polimorfizmus

snRNS - small nuclear/ kis nukleáris RNS

SPT - Skin prick test/ bőrpróba

TAR/TERRA - Telomér-asszociált RNS

TEK - TEK Receptor Tyrosine Kinase

TGF - Transforming growth factor/ Transzformáló növekedési faktor

Th2 - T helper type 2/ 2-es típusú T-helper sejt

Tie2 - receptor tyrosine kinase 2/ tirozin kináz receptor

TLR - Toll-like receptor

TN - True negative/ Valós negatív

TNF - Tumor necrosis factor/ Tumor nekrozis faktor

TP - True positive / Valós pozitív

Treg - regulatory T cell/ regulációs T-sejt

tRNS - transfer/ transzfer RNS

TSLP - Thymic stromal lymphopietin/ Tímusz sztrómális limfopietin

TUG1 - Taurine Up-Regulated 1

VEGFA - Vascular endothelial growth factor A/ Vaszkuláris endoteliális növekedési faktor A

VE-kadherin - Vaszkuláris endoteliális kadherin

VE-PTP - Vascular endothelial-protein tyrosine phosphatase/ Vaszkuláris endoteliális protein-tirozinfoszfátáz

WA - Weighted accuracy/ Súlyozott pontosság

1. Irodalmi háttér

1.1. Bevezetés

A légúti betegségek között kiemelt szerepet töltenek be az allergiás megbetegedések, valamint az asztma és a COPD. Az elmúlt évtized során ezeknek a rendkívül heterogén betegségeknek az előfordulási gyakorisága nagy léptékű növekedést mutatott, mellyel a terápiás és differenciáldiagnosztikai módszerek nem tudtak lépést tartani.¹ Jelenleg nincs olyan differenciáldiagnosztikai marker, amellyel megbízhatóan lehetne megkülönböztetni az egyes asztma vagy COPD altípusokat egymástól², ráadásul ez utóbbi két betegség együttesen is előfordulhat, asztma-COPD szindrómát okozva, melynek biomarkerek segítségével történő elkülönítése a mai napig nem megoldott.³ A betegségek pontos diagnosztizálása elengedhetetlen a megfelelő terápia kiválasztása érdekében.

Szemben a monogénes betegségekkel, a komplex betegségek közé sorolható asztma, COPD és allergia kialakulásának hátterében számos minor hatású gén játszik szerepet, melyeknek csupán a töredékét sikerült eddig beazonosítani. A teljes genom asszociációs vizsgálat gyakorlatba való bevezetését követően a gének azonosításában jelentős előrelépést értek el.⁴ Ily módon azonosították a *TEK* gént (1.5. fejezet) is, amely vizsgálataink egyik fő célpontja és már több cikkben is összefüggésbe hozták asztmával és allergiás conjunctivitisszel.⁵

A neutrofil granulociták (1.6. fejezet) kiemelt szereppel bírnak mind az asztma, mind a COPD kialakulásában, hozzájárulva a krónikus gyulladás fenntartásához. A neutrofil granulociták képesek extracelluláris csapdákat létrehozni bizonyos trigger hatásra. A csapdák jelenlétét már asztmások tüdejében is kimutatták, viszont a kiváltó tényező és a súlyossággal való összefüggés még nem tisztázott.⁶

A kódoló génszekvenciák a humán genom 1,2%-át teszik ki, míg a többi szakasz fehérjét nem kódol. Ez a régebben „junk DNS”-ként emlegetett, de ma már bizonyítottan igen fontos szabályozó szereppel bíró DNS szakasz nem-kódoló RNS-sé íródhat át. A 200 bázispárnál hosszabb ilyen szakaszokat hosszú nem-kódoló RNS-eknek (lncRNS)

nevezzük (1.7. fejezet). Az lncRNS-ek expressziójának változása szerepet játszhat számos kórkép kialakulásában, beleértve a krónikus légzőszervi betegségeket is.⁷

A PhD munkám során a *TEK* gén, a neutrofil extracelluláris csapdák és a hosszú nem-kódoló RNS-ek szerepét vizsgáltam krónikus légzőszervi megbetegedésekben.

1.2. Allergia

Mind az asztma, mind az allergiás rhinitis, mely az allergia leggyakrabban előforduló formája, komplex, légúti gyulladással járó megbetegedések közé tartozó kórkép, melyek kialakulásában a környezet hatása mellett a genetikai tényezők is jelentős szerepet bírnak. Asztmában főként az alsó légutak krónikus, reverzibilis és epizodikus szűkülete, illetve gyulladása figyelhető meg.⁸ Allergia során a felső légutak, a bőr, a gyomor- és bélrendszer érintettsége tapasztalható.⁹

1.2.1. Immunpatogenezis

Allergia során az immunrendszer túlérzékenységi reakciója figyelhető meg a környezetben előforduló, jellemzően ártalmatlan anyagokkal/részecskékkel szemben. Minden olyan anyagot, ami túlérzékenységi reakciót vált ki allergénnek nevezünk (pl. pollen, atkák, spórák, állati szőr, rovarcsípés, latex, gyógyszerek, élelmiszerek, vegyszerek és nehézfémek). Számos allergiás megbetegedés létezik, többek között: urticaria, ekcéma, ételallergia, atópiás dermatitis, allergiás rhinitis, allergiás conjunctivitis és allergiás asztma.¹⁰ Munkám során ez utóbbi három betegséget érintő vizsgálatokat végeztem ezért a következőkben ezek kerülnek majd kifejtésre.

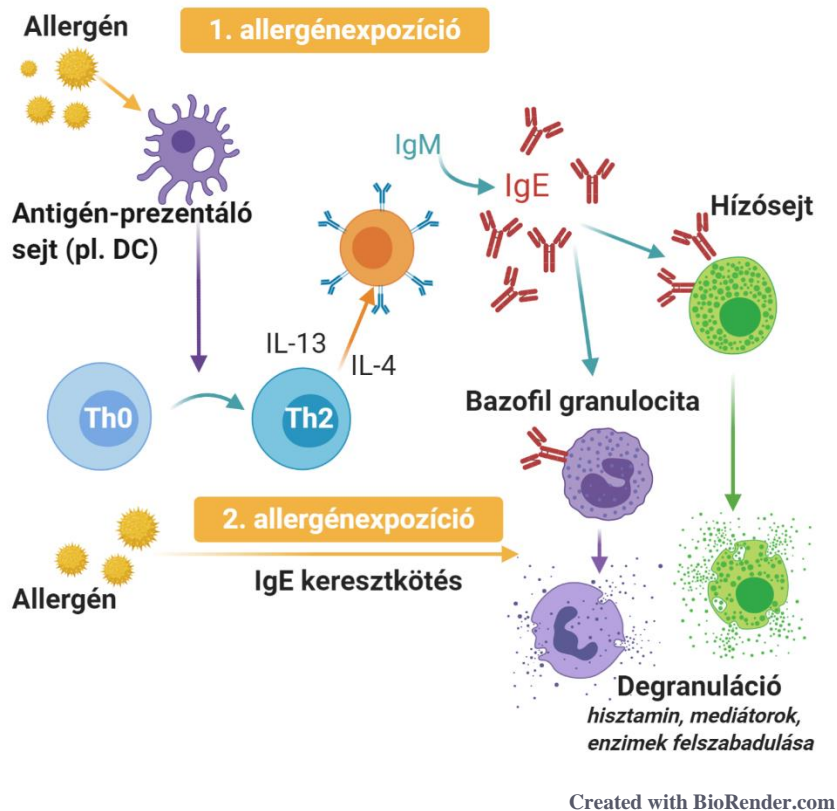
A patomechanizmus a legtöbb allergiás megbetegedésben hasonló, az eltérő manifesztációt az allergének eltérő típusai, különböző külső faktorok és a genetikai tényezők adják.

A folyamat első lépése a szenzitizáció (1. ábra), mely során az ártalmatlannak tűnő allergén a szervezet valamely első védelmi vonalán keresztül bejutva APC-k (antigén prezentáló sejtek: dendritikus sejtek, makrofágok, B-sejtek) aktiválásának segítségével naív helper T(Th0)-sejtek Th2-sejtek irányába történő differenciációját indukálja. Ezt követően három szignálút vonal aktiválódik különböző citokinek által^{11,12}:

1. A Th2-limfociták által szecernált **IL-4** (interleukin-4) (és IL-13) citokin olyan szignál a B-sejtek számára ami (IgM helyett) IgE antitesttermelésre serkenti azokat. Ez egy esszenciális lépés az allergiás légúti válaszreakció és a humorális immunválasz kiváltásában. Az IgE antitestek a véráramba kerülve nagy affinitással képesek Fc részükkel a hízósejtek és bazofil granulociták FcεRI-receptorához kötődni. Szenszitivációt követően (mely során az IgE-FcεRI kötés már kialakult), az allergénnel való újabb találkozás (az allergén molekula IgE-hez kapcsolódása) az FcεRI receptorral rendelkező sejtek degranulálódását indukálja. Ennek következtében elsősorban hisztamin, illetve más mediátorok, kemokinek, és citokinek szekretálódnak, amelyek azonnali típusú immunválaszt azaz 1-es típusú túlérzékenységi reakciót idéznek elő.¹³
2. A szintén Th2-sejtek által termelt **IL-13** főként a légutak mucos termeléséért felelős, mellyel befolyásolja a légúti hiperreaktivitást (AHR - airway hyperresponsiveness), mucos metapláziát és szöveti fibrózist előidézve. Emellett az eotaxin (eozinofil kemoattraktáns) kibocsátásáért felelős, illetve mivel receptorának az IL4-receptorral közös alegysége van, részt vesz a B-limfociták izotípus váltásában is.¹³
3. Az **IL-5** citokin a Th2-es sejtek (valamint hízósejtek és bazofil granulociták) által szecernálva az ún. késői fázisú reakcióban játszik szerepet. Az eozinofil granulociták fokozott érését és aktiválását váltja ki¹⁴, ami a tüdőbe jutva, károsítja a légúti epithelsejteket és a közöttük lévő intercelluláris kapcsolatokat, ezzel légúti hiperreaktivitást, krónikus gyulladást és perzisztáló asztmát idéz elő.¹⁵ Az azonnali típusú válaszreakciót követően a tünetek lecsengése figyelhető meg, azonban az allergénnel való találkozást követő 2-24 órában egy második, a tünetek eltérő mértékű fellángolását magába foglaló periódus jelentkezik. A lipoxigenáz és ciklooxygenáz útvonal aktiválódásának hatására lipidmediátorok és újabb Th2-es citokinek termelődnek, melyek fenntartják a gyulladási folyamatot. Emellett a kibocsátott IL-5 azon eozinofileket aktiválja, melyek felszínén az allergén-specifikus IgE-FcεRII alacsony affinitású kötés már létrejött, amelynek hatására további proinflammatorikus mediátorok (prostaglandinok, leukotriének, eozinofil peroxidáz, eozinofil kationos fehérjék (eosinophil cationic protein - ECP) és további IL-13 és IL-5 citokinek) szecernálódnak, melyek szövetkárosító

hatással bírnak és krónikus gyulladás fennállása esetén asztma kialakulásához vezethetnek.¹⁶

Az IL-4, IL-5, IL-13 citokinek által képviselt folyamatok külön-külön is képesek kiváltani az allergiás tüneteket, melynek következtében nem sikerült átütő sikert elérni csupán az egyik vagy másik citokin ellen irányuló antitest terápia kifejlesztése során.



1. ábra. Az allergén szenzitizáció folyamata (az ábra a BioRender.com segítségével készült)

A különböző mediátorok felszabadulása következtében kialakuló allergiás tünetek hátterében három fő mechanizmus áll^{16,17}:

1. **A kapillaris átteresztőképességének növekedése**, melynek következtében urticaria, gégeödéma, angioödéma, conjunctivitis, vérnyomásesés és azt követő kóma is kialakulhat.
2. **Fokozott mukozális szekréció**, ami hasmenéssel, hányással, illetve szénanáthás tünetekkel járhat.

3. **Az erőteljes simaizom-kontrakció** hörgőgörcsöt, hányingert, hasi görcsöt okozhat.

Anafilaxiának nevezzük, ha súlyos generalizált, tehát egyszerre több mint két szervrendszert érintő életveszélyes allergiás reakció alakul ki, mely azonnali, sürgősségi orvosi ellátást igényel. Megfelelő kezelés nélkül anafilaxiás sokkhoz vezethet, ami az előbb felsorolt tünetek mellett vérnyomáseséshez és keringés összeomláshoz vezetve kómás állapotot, illetve halált válthat ki.¹⁸

1.2.2. Genetikai háttér

Mind az allergia, mind az allergiás megbetegedések komplex kórképeknek tekinthetők, melyek kialakulásában nem csak a környezeti tényezők, hanem az öröklődés, génpolimorfizmusok, gén-gén kölcsönhatások is szerepet játszanak. Amennyiben egy személy, egyéni vagy családi hajlammal rendelkezik arra, hogy alacsony (normál esetben ártalmatlan) mennyiségű allergénnel szemben IgE antitest szekréció következzen be és erre a rhinitis, rhinoconjunctivitis, ekcéma, urticaria vagy asztma jellegzetes tüneteit produkálja, akkor atópiáról beszélhetünk. Az atópiás hajlam genetikai hátterét támasztja alá az a felfedezés, hogy azon családokban, ahol a szülők semmiféle atópiás kórképpel nem rendelkeznek, a gyermekek allergiás megbetegedésének valószínűsége 11-13%, míg ahol mindkét szülő atópiás betegségben szenved ez az érték az 50-70%-ot is elérheti.¹⁹ A 3. táblázatban (lásd 1.3.2. fejezet) a legjelentősebb atópiára hajlamosító gének (a teljesség igénye nélkül) láthatóak.

Korábbi megfigyelések alapján, magasabb hajlammal rendelkezik atópiára az, akinek az édesanyja is atópiás megbetegedésben szenved.²⁰ Ennek magyarázata jelenleg még nem ismert, bár több hipotézis is született ebben a témában. Van, amelyik az anyamagzat immunológiai egymásra hatásának tulajdonítja a jelenséget terhesség, illetve szoptatás alatt és van, amelyik genetikai imprintinget (mely szerint a szülőktől örökölt gének nem egyformán fejeződnek ki) feltételezve magyarázza a jelenséget, ami alapján azon gének közül amelyek atópiára hajlamosítanak inkább az anyaiak expresszálódnak.²¹

1.2.3. Diagnosztika és kezelés

Az allergia diagnózisának három lépését különböztethetjük meg⁹:

1. Az **anamnézis** felállítása, mely során az orvos a beteg tüneteit, annak okait és eddigi gyógyszeres kezelését, valamint a családi érintettséget térképezi fel.
2. **Fizikai vizsgálat**: allergia gyanú esetén a szemek, fülek, orr, torok, mellkas és bőr vizsgálata. Esetleges tüdőfunkció vizsgálat és röntgen.
3. **Allergia teszt** elvégzése, ami többek között történhet bőrpróbával (Skin Prick Test - SPT), patch teszttel vagy vérvizsgálattal, mely utóbbi során a specifikus IgE-ellenanyagot mutatják ki szelektíven a páciens mintájában.

A **bőrpróbához** az asszisztens, szakorvosi felügyelet mellett egy szabványos, 1 mm szúrásmélységű lándzsa segítségével gyakori allergénekből készült oldatokat juttat a bőr rétegei közé. Pozitív eredmény esetén lokális duzzanat és vörösség jelentkezik a szúrás helyén, mely az allergénnel szembeni ellenanyagtermelésre utal. Leginkább a légúti allergének (pollen, virágpór, háziporatka, fű- és fafélék, állatszőr) és rovarcsípés következtében kialakuló allergia mutatható ki.⁹

A **patch teszt** során a bőrrel kontaktusba kerülő anyagok által kiváltott allergia mutatható ki (ekcéma, kontakt dermatitis, urticaria). A vizsgálat során allergénnel átitatott laposkákát helyeznek a páciens hátára, amelyet általában egy napig kell rajta hagyni. Két-három nap, de bizonyos esetekben akár 1 hét múlva az eredmény leolvasható, ami hasonló képet mutat, mint a bőrpróba esetében.⁹

Specifikus IgE-ellenanyag mérése során a keringésben jelenlévő, allergén ellen termelődő IgE-ellenanyagot mutatják ki. Gyakori a fals pozitív eredmény.⁹

Bármelyik teszt pozitivitása önmagában nem diagnosztikus értékű és nem prediktálja az allergia súlyosságát, az allergia diagnózisához legalább a 3 felsorolt lépésből 2-nek pozitívnak kell lennie.⁹

Az allergia kezelése a tünetek súlyosságától, az anamnézistől és az allergia teszt eredményétől függ. Három fő irányvonalat különböztetünk meg⁹:

1. Az allergén elkerülése, amennyiben lehetséges.
2. Orvosi készítmények alkalmazása a tünetek enyhítésére: nazális kortikoszteroidok, antihisztamin készítmények, hízósejt stabilizátorok, dekongesztánsok

(vazokonstrukciót idéznek elő), kortikoszteroid kenőcsök és krémek, orális kortikoszteroidok és rohamoldószerként epinefrin alkalmazható.

3. Immunterápia (lásd 1.2.4. fejezet), ami jelenleg az egyetlen hosszútávú gyógymód az allergiára. Ez leghatékonyabban akkor alkalmazható, ha a páciens monoallergiás, tehát egy allergénre szenzitizálódott. Ez viszonylag ritka, mivel a keresztreaktivitás, illetve az egyre inkább Th2-es irányba és IgE-termelés felé eltolódott immunválasz révén a betegek egyre több allergén ellen produkálnak tüneteket. Az immunterápiának két fajtáját különböztetjük meg: a szubkután és a szublingvális immunterápiát. Leginkább pollen, állatszőr, poratka, rovarcsípés ellen hatásos, általában étel-, gyógyszer-, tollallergia, valamint ekcéma és csalánkiütés esetén hatástalan.

1.2.4. Allergén-specifikus immunterápia (SIT)

Allergia során a Th2-es citokinek (IL-4, IL-5, IL-13) fokozott termelődése és ennek hatásai figyelhetőek meg. Az immunterápia hatásmechanizmusa a Th2 túlsúly Th1-es irányba történő eltolásán alapul, mely során regulációs T-limfociták (Treg) termelődnek. A Treg-sejtek IL-10 és olyan további gyulladásgátló citokinek szekrécióját serkentik, mint például a TGF- β (transforming growth factor- β), ami a Th2-es immunválasz leszabályozásáért felelős. A termelődött IL-10 hatására az allergénspecifikus IgE-szint csökken, ezzel egyidőben pedig az IgG4-antitestek szintje emelkedik. Az IgG4-ellenanyag sztérikus gátló hatást fejt ki, mivel az allergén azon epitópjához képes kötődni, amelyhez az IgE is hozzákapcsolódna. Ily módon képes redukálni a mediátorok (hisztamin, leukotriének) és proinflammatorikus citokinek hízósejtekből, T-limfocitákból, illetve bazofil és eozinofil granulocitákból történő szekrécióját, megelőzve az allergiás tüneteket.²²

Az immunterápia két fő típusát különböztetjük meg, a szubkután (SCIT) és a szublingvális immunterápiát (SLIT). Ez utóbbi használata gyakoribb és biztonságosabb is, mivel a szubkután terápia lokális vagy szisztémás reakciót válthat ki, melyek tüneti megnyilvánulásai enyhétől az egészen súlyosig terjedő skálán mozoghatnak. SCIT esetén invazív formájában kapja meg a páciens az injekciót, ezzel ellentétben SLIT során nem-invazív módszert alkalmazva, nyelv alatti oldat vagy tableta formájában jut az allergén

allergoidja (kémiaailag módosított/legyengített vagy denaturált natív allergén) hordozóhoz kötve (pl. alumínium-hidroxid) a beteg szervezetébe. Ezen terápiás eljárás során kisebb az anafilaxia kockázata mint SCIT során, ezért nagyobb népszerűségnek örvend, azonban mellékhatások SLIT esetén is kialakulhatnak, például lokális (szájüregi) irritáció/duzzanat, bőrpír vagy gasztrointesztinális tünetek.²³ A kellemetlen mellékhatások következtében a kezelés során viszonylag jelentős lemorzsolódás tapasztalható. További hátrány, hogy a kezelés meglehetősen hosszú, 3 évig tart. Ez idő alatt minden évben az allergiaszezont megelőző 2 hónaptól kezdve annak végéig naponta alkalmazni kell a kezelést, mivel így alakítható ki az a tolerancia, ami képes az allergén hatását redukálni. Tehát a DesensIT projekt során, az augusztus-szeptemberi levegőbeni csúcskoncentrációval rendelkező parlagfű pollen elleni védekezés júniusban kezdődött, azért hogy mire a parlagfű pollen bejut a szervezetbe, addigra kialakuljon a megfelelő IgG4-immunválasz általi sztérikus gátlás, melynek következtében nincs hízósejt, bazofil, illetve eozinofil degranuláció, nem szabadulnak fel mediátorok, citokinek és tünetek sem alakulnak ki.^{22,23}

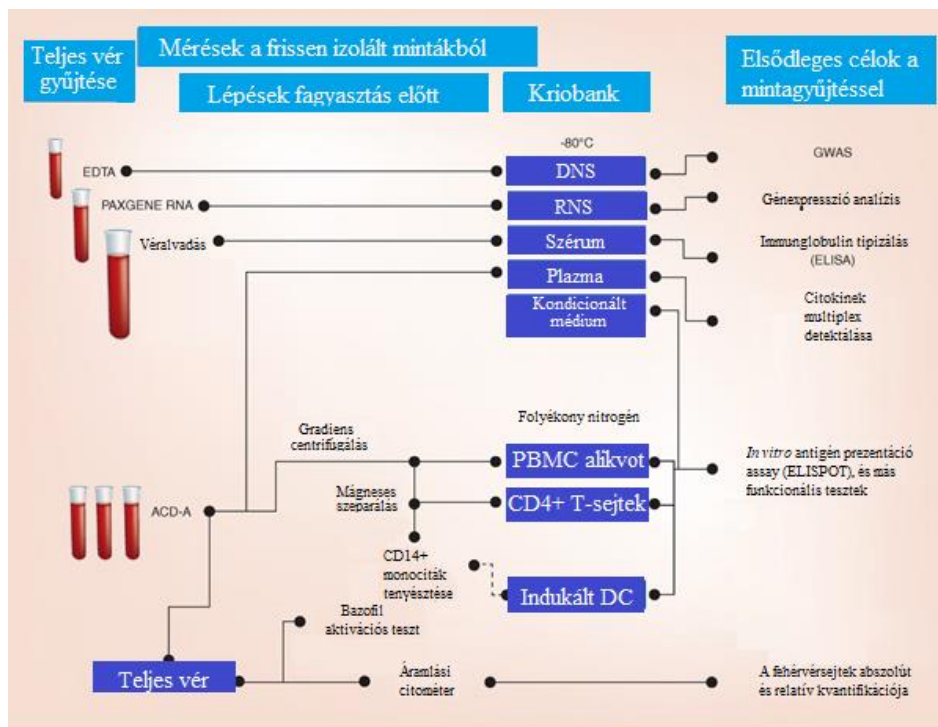
Az immunterápia kontraindikációjaként szerepel a súlyos asztma, illetve a szív- és érrendszeri megbetegedések megléte.²⁴

1.2.5. DesensIT projekt

Kutatócsoportunk 2012-ben indította útjára a DesensIT projektet, mely során 436 páciens kapott szublingvális allergénspecifikus immunterápiát. A terápia relevanciáját adja, hogy valóban megszüntetheti az allergiát, míg a többi készítmény csupán a tünetek enyhítésére szolgál. A vizsgálat célja olyan biomarkerek feltérképezése volt, melyek prognosztizálhatják a terápia sikerességét, illetve elősegíthetik a tünetek csökkenésének nyomon követését. A célkitűzések között szerepelt bioinformatikai fejlesztések kidolgozásával egy döntéstámogató rendszer létrehozása és az immunterápiás készítmény társadalombiztosítási támogatásának elnyerése.²³

A résztvevők 5 allergia járóbeteg ellátó központból lettek kiválasztva és diagnosztizált parlagfű allergiával (megerősítve allergén specifikus IgE vagy SPT által) és/vagy legalább 2 év augusztus-szeptemberi tünetsúlyosbodással rendelkeztek klinikai

anamnézisében, illetve a vizsgálatba beleegyeztek. A kezelés során gyűjtött adatok egyrészt betegszintűek (életkor, nem, BMI (testtömeg index), lakóhely stb.), valamint vizitszintűek (tünetek, kezelés részletei) voltak. A terápia alatt, mely 2012-től 2014-ig tartott, a páciensek betegnaplót („allergianaplót”) vezettek, mely szubjektív meglátásukon alapult (ami 1-10-ig terjedő skálán való értékeléseket jelentett).^{5,23} Minden résztvevő évente három, teljes vérmintát adott, tehát a 3 év során 9 minta/páciens gyűlt össze, melyeket immunológiai és genomikai mérések során vizsgáltunk tovább (2. ábra).



2. ábra. A vizsgálat során gyűjtött vérminták feldolgozása, vizsgálata²³, ACD-A: acid citrate dextrose, ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay, ELISPOT: enzyme-linked immune absorbent spot, GWAS: genome-wide association study/ teljes genom asszociációs vizsgálat, DC: dendritikus sejt, PBMC: perifériás vér mononukleáris sejtjei.

Parlagfű allergia

A parlagfű egy olyan gyomnövény, mely az *Asteraceae* családba és azon belül az *Ambrosia* nemzetségbe tartozik és a 20. század kezdetén került hazánkba Észak-Amerikából. Hazánkban leggyakoribb fajtája a *Ambrosia artemisiifolia*.²⁵ A parlagfű pollenkoncentrációja a legmagasabb értéket augusztus-szeptember hónapokban éri el. A parlagfű allergia az egyik leggyakoribb allergiák közé tartozik, az átlag szenzitizáció

prevalenciája Európában körülbelül 14% , míg Magyarországon ez az érték eléri az 54%-ot.²⁶ Magyarország a Köppen féle Cfb éghajlati régióhoz sorolandó, melyre kontinentális éghajlat, nyári magas hőmérséklet, alacsony páratartalom, egyenletes éves csapadékeloszlás jellemző, ami a parlagfű pollen fokozott terjedésének kedvez.²⁵ A klímaváltozás és az urbanizáció tovább segítette a parlagfű pollen terjedését. A kezelése (megfelelő gyógymód hiányában) jelentős orvosi és gazdasági terhet jelent az érintett országokban, ami új aggodalmakat vet fel a jövő számára. Ráadásul mivel ez egy meglehetősen allergén pollen ezért a későbbiekben asztmás tüneteket provokálhat.^{27,28}

1.2.6. Prevalencia

A 20. század elején az allergia még ritka betegségnek számított, azonban néhány évtized leforgása alatt már az európai populáció több mint fele szenved valamilyen típusú allergiában. Napjainkban az európai populáció 25%-a érintett allergiás rhinitisben, ami az allergiás megbetegedés leggyakoribb formája, a krónikus allergia pedig körülbelül 150 millió embert érint.^{1,29}

1.3. Asztma

1.3.1. Immunpatogenezis

Az asztma egy rendkívül heterogén betegségcsoport, melyen belül számos fenó- és endotípust különböztetünk meg aszerint, hogy³⁰

- mi a kiváltó tényező (fizikai aktivitás, vírusfertőzés, aszpirin, obezitás, pollen, élelmiszer, cigarettafüst stb.),
- milyen sejttani karakterisztika figyelhető meg az immunválasz során (eozinofil, nem-eozinofil, ILC2 (innate limfoid cell 2), Th2, nem-Th2 sejtek túlsúlya),
- milyen a kezelés hatékonysága (nehezen-kezelhető asztma (difficult-to-treat asthma), szteroid-rezisztens, szteroid-érzékeny),
- illetve milyen tünetek jelentkeznek (komorbiditás, súlyosság, FEV1 érték).

A fenó- és endotípus fogalma nem magától értetődő, ezért szükségesnek tartom ezen két fogalom értelmezését. Fenotípus alatt az egyén klinikai megjelenését értjük (tünetek, fizikai megnyilvánulás), míg endotípusnak nevezzük a betegség hátterében álló eltérő patomechanizmusok által létrehozott alcsoportokat.³¹

A hasonló klinikai tünetek ellenére a betegek nagyon eltérően reagálhatnak ugyanarra a terápiára attól függően, hogy a betegség mely endotípusába sorolhatóak, tehát milyen eltérő immunológiai folyamatok váltják ki az asztmás tüneteket. Ezzel a kutatási területtel napjainkban a precíziós medicina foglalkozik, azonban jelenleg nincs olyan biomarker, amely segítségével egyértelműen és megbízhatóan el lehetne különíteni az asztma endotípusokat egymástól.³⁰ Az asztma biomarker keresés jelenleg az egyik legfontosabb kutatási irányvonalat képviseli.

A tünetek, azonban minden endotípus esetén hasonlóak³⁰:

- zihálás
- sípolás
- köhögés
- mellkasi fájdalom, nehézlégzés
- megnövekedett mucus termelődés, nyálkahártyaödéma
- légszomj
- légúti hiperreaktivitás (AHR)

A tünetek leggyakrabban epizódokban és eltérő súlyossággal jelentkeznek. A tünetek korai felismerése kulcsfontosságú az asztma rohamok gyors és hatékony megszüntetése érdekében.

Túlnyomó többségében az asztmában reverzibilis légúti elváltozásról beszélhetünk, azonban a betegek egy részében irreverzibilis légúti remodeling alakul ki. Ez egy visszafordíthatatlan folyamat, amely a légúti simaizmok hipertrofiájával, hörgőfal megvastagodással, fibrózissal és az epithéliális kehelysejtek fokozott mucus termelődésével jár.³²

Az asztmát gyakran különböző komorbiditások kísérik, melyek lehetnek allergiás eredetűek (allergiás rhinitis, rhinosinusitis, atópiás dermatitis, ekcéma, conjunctivitis, ételallergia), illetve nem-allergiás eredetűek (gastro-oesophagealis reflux betegség - GERD, légúti infekciók, obesitás, pszichiátriai/metabolikus/neurológiai kórképek).³³ A komorbiditások jelenléte csökkenti az asztma kontrollálhatóságának valószínűségét.³⁴ Emellett virális infekciók (respiratory syncytial vírus - RSV, rhinovírus), illetve különböző allergéneknek, polleneknek és gyógyszerkészítményeknek (aszpirin, nem-

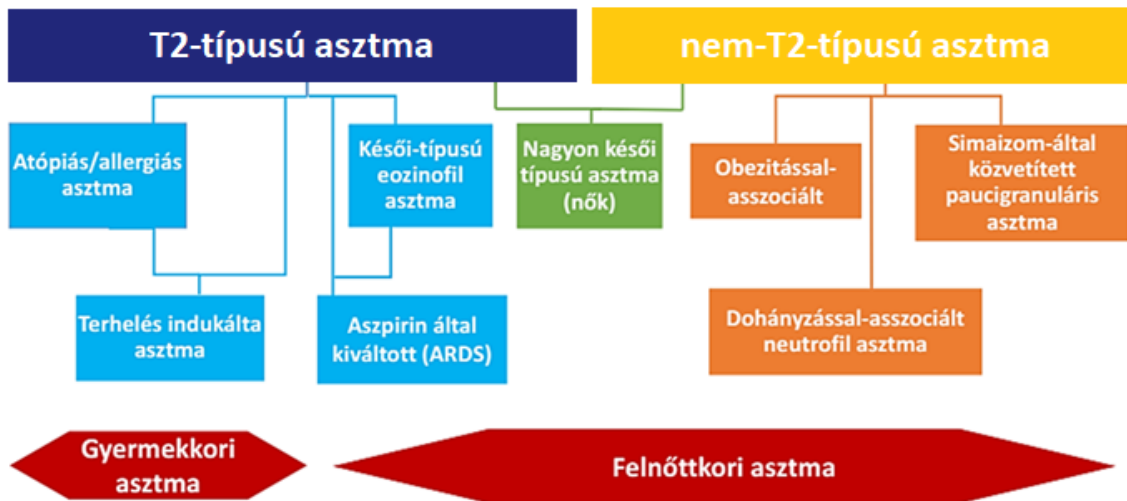
szteroid tartalmú gyulladásgátlók - NSAID) való kitettség szintén asztma exacerbációhoz (tünetek hirtelen jelentős mértékű súlyosbodásához) vezethet.⁸

Asztma csoportosítás, endotípusok

A kezdetben homogénnek gondolt betegségről már 1947-ben kiderült, hogy minimum két eltérő alcsoportra osztható aszerint, hogy atópiás/allergiás érintettség megfigyelhető-e és hogy a kiváltó tényező ismert-e.³⁵ Extrinsic, másnéven atópiás/allergiás asztma esetén, a kiváltó tényező ismert és főként gyerekkorban fordul elő, míg intrinsic asztma esetén (nem-allergiás asztma) a felnőtt korosztály fokozottabb érintettsége figyelhető meg és a kiváltó tényező gyakran ismeretlen. Az asztmások megközelítőleg 50%-a allergiás asztma csoportba sorolható.³⁶

Később, a gyulladás sejtbeli összetétele alapján eozinofil (>3% az eozinofil sejtek aránya) és nem-eozinofil asztma alcsoportokat hoztak létre. A köpet vagy hörgőnyálkahártya-biopszia minták citometriás vizsgálata során a nem-eozinofil csoport további alcsoportokra bontható a minta granulocitáinak százalékos aránya alapján, melyek: neutrofil ($\geq 64\%$ a neutrofil sejtek aránya), kevert granuláris (eozinofil és neutrofil sejtek száma is növekedett), illetve paucigranuláris (sem az eozinofil, sem a neutrofil sejtek száma nem növekedett) típusúak lehetnek.^{35,37}

Az asztmakutatásban nagy áttörést jelentett az IgE immunglobulin felfedezése, mely kiemelten fontos szerepet játszik az asztma patomechanizmusában. Ennek segítségével újabb immunfenotípusokat azonosítottak: Th2-magas („high”) és Th2-alacsony („low”) szubtypusokat³⁷, majd később ezeket T2-magas és T2-alacsony csoportokra módosították. A genetikai, genomikai és immunológiai módszerek rohamos fejlődésével egyre több és több endotípust különböztetnek meg. Ezek a teljesség igénye nélkül az alábbi ábrán láthatóak (3. ábra).⁸



3. ábra. Asztma endotípusok⁷

A **T2-típusú** asztmát további altípusokra oszthatjuk a kiváltó triggererek alapján, amely gyermekkorban leggyakrabban valamilyen **allergén és/vagy fizikai aktivitás** következtében alakul ki. Késő gyermekkorban vagy kora felnőttkorban ezekben a típusokban gyakran spontán remisszió (tünetmentesség) alakul ki, mely akár egész életen át fennmaradhat.⁸ Egy asztmás gyermekeket vizsgáló longitudinális kohorszban a populáció közel fele (48,6%-a) 12 éves korára remisszióba került.³⁸ A posztnatális korban számos környezeti tényező csökkentheti vagy növelheti az atópia, illetve asztma kialakulását (1. táblázat).

1. táblázat. A gyermekkori asztma kockázatát befolyásoló posztnatális környezeti tényezők³⁹

Emelkedett kockázat gyermekkori asztmára	Csökkent kockázat gyermekkori asztmára
Dohányfüstnek való kitettség	Mezőgazdasági környezetnek való kitettség
Légszennyezettségnek való kitettség	Anyatejes táplálás
Rhinovírus infekció	
Paracetamolnak való korai kitettség	
Széles spektrumú antibiotikumok használata	
Szilárd étrend korai bevezetése csecsemőkorban	

Az allergén által kiváltott IgE-mediált immunválasz egy öngerjesztő folyamatot hoz létre mely során Th2-es citokinek (IL-4, IL-5, IL-13), hisztamin, prosztaglandinok, leukotriének és egyéb mediátorok szabadulnak fel, melyek mind a légúti hámsejtek károsodása felé tolják el az egyensúlyt. Amennyiben ez a folyamat krónikussá válik, az eozinofil sejtek a tüdőbe áramolva, lokális degranulációjuk révén olyan fehérjéket szekretálnak (pl. MBP - major basic protein, ECP) amelyek szövetkárosító hatásuk mellett az E-kadherin és claudin-18 fehérjék degradációját előidézve, az epithelsejtek közötti tight-junction kapcsolatokat gyengítik. A csökkent barrier integritás pedig átjárhatóvá teszi a sejteket, így kedvezve az allergének bejutásának.³⁰

Az allergiás asztmának egyik jellemző kísérőtünete lehet az allergiás conjunctivitis, amelyre jellemző a szem pirossága, duzzanata, könnyezése, égő és viszkető érzés kíséretében. Ezek háttérében az allergén expozíciót követő hízósejtek degranulációja által kiszabaduló mediátorok (hisztamin, prosztaglandin) állnak. Az allergiás conjunctivitis atópiás kórkép, mely gyakran asztmával és/vagy rhinitisszel társul, de önálló betegségként is előfordul. Az ismételt allergén expozíció mindig kiváltja a tüneteket, tehát jelenleg nem gyógyítható, csupán a tüneteket enyhítő készítmények állnak a páciensek rendelkezésére. A betegséget a tünetek időbeni fennállásától függően szezonális és perenniális csoportra oszthatjuk.⁴⁰

A **késői-típusú eozinofil** asztma szintén a T2-es típusú asztma csoportjába sorolandó, emellett gyakran terápia-rezisztens és az egyik legsúlyosabb asztma szubtípus. Annak ellenére, hogy relatíve enyhe és atipikus tüneteket mutat, állandó légúti obstrukcióval és súlyos exacerbációval asszociál ezért rendkívül fontos a korai fázisban való felismerése. Mivel ezek a páciensek általában idősebbek mint a klasszikus atópiás asztmások ezért esetükben gyakori a téves COPD (krónikus obstruktív tüdőbetegség) diagnózis, melynek kezelése eltér az eozinofil asztma terápiájától.⁴¹

A késői-típusú asztma gyakran társul **aszpirin-által kiváltott** légzőszervi megbetegedéssel (AERD), ami egy klinikai tetrádot hoz létre, mely orrpolipózisból, eozinofil asztmából, krónikus rhinosinusitisből és COX-1 (ciklooxygenáz) inhibitorokra való szenzitivitásból áll. A COX-1 inhibitorok lehetnek aszpirin-tartalmú készítmények, illetve más nem-szteroid tartalmú gyulladásgátlók (NSAID) is, melyek szervezetbe jutása az AERD-ben szenvedő pácienseknél felső és alsó légúti válaszreakciót indukál, ezzel rhinitist, conjunctivitist, hörgőgörcsöt vagy hangrégsgörcsöt előidézve.⁴²⁻⁴⁴

A **nagyon késői típusú** asztmában főleg nők érintettek (71%-ban) és az átlagéletkor 50 év körüli egy klaszteranalízist végző kutatás alapján.⁴⁵ A publikációk jelentős része 50 évnél, míg más cikkek 65 évnél határozzák meg a cut-off értéket. Öregedés során a tüdő vesztít rugalmasságából és a tüdőfunkció csökken. A háttérben álló mechanizmusok még feltáratlanok, azonban számos kutatás kimutatta, hogy az idősebb generációban a Th1 és Th17 gyulladás következtében magas az indukált köpet neutrofil granulocita tartalma.⁴⁶ Ebben az asztma szubtípusban Th2 és nem-Th2 túlsúlyú háttérrel rendelkező páciensek egyaránt előfordulnak.

Régóta felismerték, hogy ugyan nem minden asztmás páciensben, de jelentős részükben a Th2-gyulladás felülszabályozott egy másik folyamat által. Ez a folyamat egy stimulust hoz létre a légúti epithelsejtekben, ami alarminok (IL-25, IL-33 és TSLP - thymic stromal lymphopoietin) termelődését idézi elő, ezzel serkentve az IL-4, IL-5, IL-13 citokinek és az eozinofil sejtek termelődését, mely az asztmára jellemző karakterisztikus légúti elváltozás kialakulásához vezet.³⁰ Ez a folyamat kontrollálható kortikoszteroid adásával.⁴⁷

Az **eozinofil asztmának** immunológiai hátterét tekintve, előfordulhat olyan típusa is melyben a Th2-sejtek és az IgE-immunglobulin szerepe elhanyagolható. Ez esetben az

elmúlt években felfedezett ILC2 sejtek játszanak kulcsfontosságú szerepet. Az ILC2 sejtek IL-25, IL-33 és TSLP hatására aktiválódnak és IL-5, valamint IL-13 citokineket szekretálnak, mellyel az eozinofil sejtek toborzását és bronchiális hiperreaktivitást indukálnak.⁴⁸ Ennek értelmében, ma már a T2 és nem-T2 típusú asztma elnevezés használata a helyénvalóbb.

A **nem-T2 típusú** asztmás megbetegedésben leginkább a felnőtt generáció érintett és a háttérben álló patomechanizmusok szignifikáns része még feltáratlan. A nem-IgE mediált asztma esetében a páciensek gyakran rezisztensek a kortikoszteroid kezelésre és más, hagyományostól eltérő terápiás megoldást igényelnek, mint például makrolid antibiotikumok szedése vagy speciális diéta. A nem-T2 típusú asztmába sorolható páciensek esetén különösen fontos a dohányzás abbahagyása.⁴⁹

A nem-T2 típusú asztma Th1 és/vagy Th17 sejtek aktivációjával asszociál és a Th1/Treg egyensúly felborulása figyelhető meg.⁵⁰ A folyamat emelkedett IL-8, IL-17A, neutrofil-elasztáz és MMP-9 termeléshez vezet.³⁰ A patogenezisben az NLRP3 (NLR Family Pyrin Domain Containing 3) inflammaszómának és az emelkedett IL-1 β -nak is szerepe van. A súlyos nem-eozinofil asztma kiváltó oka lehet atipikus bakteriális infekció, obesitás, dohányzás és a simaizmot érintő abnormalitások. Maga a neutrofil granulociták szerepe jelenleg is kérdéses, mivel a kortikoszteroid terápia off-target hatásaként a neutrofil sejtek emelkedése figyelhető meg. Ennek értelmében előfordulhat, hogy a magas neutrofil szint nem egyértelműen utal nem-T2 típusú asztmára, mivel az egyidejű terápia hatását mindenképpen figyelembe kell venni.^{30,50}

Az **obesitás** és az asztma kapcsolatára számos magyarázat létezik. Az állóképesség elvesztése asztmában gyakori, ami légszomjhoz hasonló tüneteket produkálhat és téves diagnózist eredményezhet. Elhízás során a tüdő funkcionális kapacitása megváltozik, amely másodlagos hatást gyakorol a légúti simaizmokra, illetve az elhízás szisztémás gyulladással asszociál, ami szintén az asztma kialakulásának kedvez. Az asztma diagnózist követő szteroid alkalmazás káros hatással bír, ugyanis gátolja a fogyást ezeknél a pácienseknél ezzel tovább súlyosbítva az obez tüneteket. Ezen okból kifolyólag nem minden esetben egyértelmű, hogy az obesitás vezet-e asztmás tünetek kialakulásához vagy a perzisztens asztma tünetek és exacerbációkat követő megnövelt szteroid dózis szedése vezet-e obesitáshoz.⁵¹

A **dohányfüst** feltehetőleg nem áll közvetlen kapcsolatban az asztma kialakulásának patomechanizmusával, azonban súlyos asztmával, gyakori exacerbációval és tüdőfunkció romlással asszociál. Az aktív dohányzás csökkenti a hiszton-deacetiláz 2 expresszióját foszfoinozítid-3-kináz (PI3K) aktiváció révén, ami csökkent glükokortikoid szenzitivitással jár.^{51,52} A dohányfüst károsítja a légutak nyálkahártyáját borító haj-szerű struktúrát, a ciliát, mely következtében a légutakban maradó mucus és irritáló ágensek pangása következik be, ezzel káros hatást kifejtve.⁵³

A **simaizom-által közvetített paucigranuláris** asztma alcsoportban a páciensek indukált köpetében, illetve vér mintájában egyaránt nem figyelhető meg gyulladásra utaló eozinofil és/vagy neutrofil sejtszámnövekedés. Ebből adódóan a gyulladásgátláson alapuló terápiák esetükben haszталannak minősülnek, az inhalációs kortikoszteroidok korlátozott hatással bírnak a légúti gyulladásos markerekre, ezért potenciálisan "szteroid-érzékeny" fenotípusként definiálják, amely a továbbiakban alternatív terápiák feltárását igényli. Ebben az esetben a légúti obstrukció a gyulladástól függetlenül alakul ki, melyet akár a légúti simaizom szöveti hipertrófiája is okozhat.⁴⁶

1.3.2. Genetikai háttér

Az asztma genetikai háttérét számos kutatás során megerősítették. Az ismétlődés kockázata annál nagyobb, minél több az érintettek száma egy családon belül. Egy érintett szülő esetén, a gyermek 25% eséllyel lesz beteg, míg mindkét szülő érintettsége esetén ez az érték már 50%. Ugyancsak a genetikai tényezők fontosságára utal az egypetéjű ikerpárok közötti konkordancia magasabb értéke a kétpetejű ikrekkel összehasonlítva. Az egypetéjű ikrek konkordanciája 75% körüli, ami azonban jelentős kilengést mutathat környezeti faktoroktól függően. Asztmára hajlamosító környezeti viszonyok esetén (pl. Anglia, Új-Zéland) magasabb %-os értéket kapunk, míg kevésbé hajlamosító környezetben alacsonyabbat.⁵⁴

2. táblázat. Az asztma kockázata az érintett rokonok függvényében⁵⁴

Érintett rokon	Asztma kockázat (%)
Nincs családi előzmény	5
Nagybácsi/Unokahug/Unokaöccs	10
Féltestvér	10
Édestestvér	25
Egyik szülő	25
Kétpetjű iker	35
Mindkét szülő	50
Egypetjű iker	75

Az asztma genetikai vizsgálata során azonban több, olyan nehézségekkel is szembe kell néznünk, mint¹⁹:

- a fenokópia jelensége (genetikai háttérű betegségek, genetikai háttér nélküli csak a környezeti tényezők hatására történő manifesztációját reprezentálja)
- a pleiotrópiával (azonos génvariációk különböző környezeti hatás jelenlétében eltérő manifesztációt eredményeznek)
- a genetikai heterogenitás (eltérő génvariációk, illetve gén-gén kölcsönhatások hasonló fenotípust hoznak létre)

A komplex betegségek, így az asztma genetikai hajlam vizsgálata során gyakran használt érték a λ_R (ahol az „R”, a rokonság mibenlétét jelöli, ami legtöbbször „s” azaz siblings/testvérek). Ez az érték egy arányszám, amely a családi hajlam és a populációs gyakoriság közötti viszonyt szemlélteti. Asztma esetében a λ_s érték 2, de kevésbé hajlamosító környezeti viszonyok között ez az érték a 7-et is elérheti. Allergia esetén ez az érték az asztmánál alacsonyabb mivel a populációs gyakoriság, illetve a hajlamosító környezeti faktorok mértéke is magasabb.¹⁹

Genomikai és genetikai módszerek tárházat hasznosítva körülbelül 20 genomrégiót azonosítottak, amelyek asztmával asszociáltak.¹⁹ Az alábbi (3. táblázat) táblázatban a

legfontosabb géneket tüntettem fel (a teljesség igénye nélkül) amelyek asztmás és atópiás megbetegedésben szerepet játszanak. Kiemelendő az *ADAM33* gén, amelyet elsőként azonosítottak hipotézismentes vizsgálat során pozicionális klónozással és azóta a jelenséget számos populációban megerősítették (kaukázusi, afrikai amerikai, hispán, kóreai, japán stb.).^{19,55} Az *ADAM33* mellett az *ORMDL3* gén az, amelyet a leggyakrabban hoztak kapcsolatba gyermekkori asztmával.^{19,56}

3. táblázat. Asztmában és atópiás megbetegedésben szerepet játszó legfontosabb gének, azok lokációja és feltételezett funkciói

Kromoszóma lokalizáció	Érintett gén	Asszociáló fenotípus	Feltételezett funkció
1q31.3	<i>DENND1B</i>	Gyerekkori asztma	Th1 és a Th2 citokin kaszkád befolyásolása ⁵⁷
2q14	<i>IL1</i> géncsalád	Asztma, atópia	Befolyásolja a gyulladásos választ ⁵⁸
2q33	<i>CTLA4</i>	Asztma, emelkedett IgE-szint	T-sejt aktiváció gátlás ⁵⁹
4q27	<i>IL2</i>	Asztma, allergia (szenzitizáció)	T- és B-sejtek működése és proliferációja ⁶⁰
5q31-q33	<i>IL4, IL13, GM-CSF</i>	AHR, asztma, magas IgE-szint	B-sejt izotípus váltás: IgM → IgE, Th2 immunválasz ^{61,62}
	<i>ADRB2</i>	Asztma	β ₂ -agonisták megkötése ⁶³
	<i>CD14</i>	Emelkedett IgE-szint	Bakteriális LPS receptor ^{64,65}
	<i>IL5</i>	Asztma, AHR	Eozinofil sejtek toborzása/differenciációja/túlélése/degranulációja, eotaxin (eozinofil kemoattraktáns) termelésének fokozása ¹⁴
6p21.3	<i>HLA-G</i>	Asztma, atópia	Immunválasz regulációja ^{66,67}
	<i>HLA-DQB1</i>	Asztma, atópia	(Speciális IgE/IgG antitestek) antigén prezentálás ^{68,69}
	<i>LTA</i>	Atópia, atópiás asztma	Sejtadhéziós molekulák/citokinek kifejeződésének indukálása ⁷⁰
	<i>TNF</i>	Asztma	Gyulladásos válasz továbbítása ⁷¹
9p24.1	<i>IL33</i>	Asztma, szénanátha	Epithelsejtek gyulladásához járul hozzá és növeli a hízósejtek degranulációját ⁷²
11q13	<i>MS4A2 (FcεRI-β)</i>	Asztma, atópia, maternális öröklődés	IgE receptor hízósejteken, bazofil granulocitákon és dentritikus sejteken ⁷³
16p21	<i>IL4R</i>	Asztma, atópia	IL-4 receptora (α alegysége IL-13-nak is) ⁷⁴
17q21	<i>ORMDL3</i>	Gyermekkori asztma	Sphingolipid szintézis gátlása tüdő epithelsejtekben ⁷⁵
20p13	<i>ADAM33</i>	Asztma	Bronchus kontraktilitás (AHR), bronchiális remodeling ⁵⁵

1.3.3. Diagnosztika és kezelés

Az asztma számos fenotípus révén megnyilvánulhat, azonban két jellegzetes tünet minden csoportban megfigyelhető, melyek alapján a diagnózis felállítása történik⁷⁶:

1. Az anamnézisben olyan légúti tünetek szerepelnek, mint: zihálás, nehézlégzés, mellkasi fájdalom, köhögés, melyek időbeni fennállása és intenzitása változó lehet
2. Változó kilégzési levegőáramlási obstrukció

Ez utóbbi megerősítése érdekében különböző légzésfunkciót mérő spirometriai tesztek elvégzése szükséges. A diagnózishoz FEV₁ és FEV₁/FVC (erőltetett vitálkapacitás) arány mérése szükséges, amely a diagnózis felállítása során legalább egyszer normál tartomány alatti értéket kell mutasson. Ez az érték FEV₁ esetén 80% alatti és FEV₁/FVC arány esetén pedig 0,7 alatti.⁷⁷ A légzésfunkció variabilitásának magasabb mértékűnek kell lennie, mint egészséges esetben. A variabilitás mérhetővé tétele egyrészt a FEV₁ érték mérésével történhet tüdőtagító (pl. szalbutamol) inhalálása előtt és után vagy 4 hetes gyulladásgátló kúra előtt és után. Az eltérés kóros esetben meghaladja a 12%-ot a két időpont között. Emellett metakolin- vagy mannitol-provokációs teszt is használható, mely a légutak görcsös beszűkülését okozza. Ilyenkor a FEV₁ érték 20%-ot meghaladó csökkenése informatív. Másik lehetőség szerint kóros, ha a PEF (kilégzési csúcsáramlás) érték átlagos egy napi variabilitása magasabb, mint 10%. Minél magasabb vagy minél többször jelentkezik a variabilitás, annál biztosabbak lehetünk az asztma diagnózisának helyességében.⁷⁶

A GINA (Global Initiative for Asthma) ajánlása alapján, súlyosság szerint az asztmát 5 csoportra oszthatjuk. A besorolás retrospektíven történik az igényelt terápia függvényében, amellyel a tünetek és az exacerbációk kontrollált állapotban tarthatóak. Az asztma terápiáját különböző szintű lépcsőkre oszthatjuk a tünetek súlyossága, gyakorisága, tüdőfunkció állapota és az exacerbációk gyakorisága alapján. A kezelés részletei az alábbi táblázatban láthatóak.^{76,78}

4. táblázat. Az asztma kezelésének terápiás lépcsői^{76,78}, ^δHa a fenntartó terápia: budesonide-formoterol vagy beclometasone-dipropionate-formoterol (BDP-form), LABA: hosszú hatású β_2 -agonista, SABA: rövid hatású β_2 -agonista, LTRA: leukotrién receptor-antagonista, OCS: orális kortikoszteroid, ICS: inhalációs kortikoszteroid

		1. lépcső	2. lépcső	3. lépcső	4. lépcső	5. lépcső
Asztma besorolás		Enyhe asztma (GINA1-2)		Mérsékelt asztma (GINA3)	Súlyos asztma (GINA4-5)	
Tünetek		Ha a tünetek kevesebb, mint kétszer jelentkeznek egy hónapban	Ha a tünetek kétszer vagy annál többször jelentkeznek egy hónapban, de nem naponta	Ha a tünetek legtöbb napon fennállnak, és éjszakai ébredléthez vezetnek egy vagy több alkalommal egy héten	Ha a tünetek a legtöbb napon fennállnak, és éjszakai ébredléthez vezetnek egy vagy több alkalommal egy héten, valamint tüdőfunkció romlás tapasztalható	Kontrollálatlan tünetek és/vagy exacerbációk a 4. lépcső kezelése mellett
Rohamoldó készítmények	Elsődleges	Szükség esetén alacsony dózisu ICS-formoterol (LABA)		Szükség esetén alacsony dózisu ICS-formoterol (LABA) ^δ		
	Alternatív	szükség esetén rövidhatásu β_2 -agonista (SABA)				
Fenntartó kezelésre való lehetőségek	Elsődleges	Szükség esetén alacsony dózisu ICS-LABA	Naponta alacsony dózisu ICS vagy ICS + LABA	Alacsony dózisu ICS+LABA	Közepes dózisu ICS+LABA	Magas dózisu ICS+LABA; fenotípus kivizsgáláa; igény szerint kiegészítő terápia: tiotropium, anti-IL5(5R)/IL4R/IgE terápia
	Alternatív	alacsony dózisu ICS-SABA	Naponta leukotrién receptor-antagonista (LTRA) vagy alacsony dózisu ICS+SABA	Közepes dózisu ICS, vagy alacsony dózisu ICS+LTRA	Magas dózisu ICS, kiegészítve tiotropiummal vagy LTRA-val	Kiegészítő alacsony dózisu OCS

Mivel a páciens gyakran súlyosság alapján nem lehet egyértelműen besorolni egy kategóriába, a GINA 2006-tól kezdődően az asztma kontrollálhatóságát helyezte a középpontba. Ha a kontroll szint nem megfelelő, akkor a kezelést módosítani kell (5. táblázat). Kontrollálhatóság alapján három kategóriát különböztethetünk meg: kontrollált, részlegesen kontrollált és nem kontrollált. Minden vizit során a kezelő orvos értékeli a páciens asztma kontroll szintjét és ez alapján kiválasztja a megfelelő terápiás lépcsőt és a kezelés módját.⁷⁹

5. táblázat. Az asztma besorolása kontrollálhatóság alapján⁷⁹, FEV1: az első másodpercben mért erőltetett kilégzési térfogat, PEF: kilégzési csúcscsúcsáramlás

Jellemzők	Kontrollált (felsoroltak mindegyike fennáll)	Részlegesen kontrollált (bármelyik héten bármelyik jelenléte esetén)	Nem kontrollált
Nappali tünet	Legfeljebb heti 2x	Gyakrabban, mint heti 2x	Bármelyik héten a részlegesen kontrollált asztma legalább három jellemzője fennáll
Éjszakai tünet/ébredés	Nincs jelen	Bármilyen gyakorisággal	
Fizikai aktivitás korlátozottsága	Nincs jelen	Bármilyen mértékű	
Rohamoldó használat	Legfeljebb heti 2x	Gyakrabban, mint heti 2x	
Tüdőfunkció (PEF vagy FEV1)	Normál	A kívánt érték vagy egyéni maximum <80%	
Kezelés	Fenntartás és legalacsonyabb megfelelő dózis megtalálása	A kontroll eléréséig a kezelés szintjének emelése	A kezelés szintjének emelése, míg elérjük a kontroll szintet; exacerbáció esetén annak kezelése

A legtöbb páciens a hagyományos kontrolláló (ICS+LABA) terápia segítségével jól kontrollált állapotban tartható, azonban a páciensek egy kisebb részénél ezek a készítmények nem hozzák el a várt állapotot, náluk további vizsgálatok és alternatív terápiás megoldások szükségesek. Nem-gyógyszeres kezeléssel alapuló lehetőségek közé tartozik a dohányzás absztinencia, dohányfüst kerülése, rendszeres fizikai aktivitás és a szennyezett ágéntől való távolmaradás.⁷⁶

Az alternatív módszerek közé tartoznak továbbá a biológiai terápiák, amelyek közül egyre több érhető el Magyarországon is:

- ❖ **Allergiás asztma** esetén ha perenniális atópia (pl. háziporlatka, állatok) és allergén indukálta tünetek, exacerbációk együttes jelenléte tapasztalható, az anti-IgE immunterápia (omalizumab/Xolair®) megoldást jelenthet. Csökkenti az exacerbációk számát, és elősegíti a tünetek kordában tartását, valamint javítja a tüdőfunkciót. Gyermekkori asztmában is használható.^{76,78}
- ❖ **Eozinofil asztma** jelenlétekor többféle biológiai terápia is szóba jöhet:
Az anti-IL-5 (mepolizumab/Nucala®) (reslizumab/Cinqair®), illetve IL-5R ellenanyag (benralizumab/Fasenra®) használatának kritériuma, hogy exacerbációk mellett a vér eozinofil sejtszám $\geq 0,3 \times 10^9/L$ (normál tartomány: $0,04-0,4 \times 10^9/L$) tartományba kell, hogy essen. Ezen készítmények kevésbé hatnak a tünetekre és a tüdőfunkcióra, azonban a súlyosbodások előfordulását csökkentik. Emellett alkalmazható anti-IL-4 (dupilumab) és IL-13 ellenanyag (lebrikizumab, tralokinumab) is, amennyiben az eozinofil sejtszám $\geq 0,15 \times 10^9/L$ vagy a FeNO (kilélegzett levegő nitrogén-monoxid tartalmának koncentrációja) értéke ≥ 25 ppb (parts per billion), ahol a normál tartomány 25 ppb alatt található. Ez utóbbiakkal kapcsolatban jelenleg még klinikai vizsgálatok zajlanak.^{76,78}

Nem-T2 asztma esetében szintén alternatív/nem hagyományos asztma terápia lehet szükséges. Ilyenkor szóba jöhet makrolid antibiotikumok vagy LAMA (hosszú hatású muszkarin-receptor antagonisták) alkalmazása, végső esetben pedig bronchialis thermoplasztika (hörgő-hőplasztika), azonban ennek hatékonysága jelenleg még vitatott.⁷⁶

Optimális esetben az asztma terápia személyre szabottan történik, figyelembe véve a kontrolláltság szintjét, az exacerbációhoz vezető kockázati tényezőket, a fenotípusos karakterisztikát, preferenciákat, az elérhető gyógyszeres terápiát, annak biztonságát és költségét.⁷⁶

1.3.4. Prevalencia

Világszerte egymilliárd ember szenved krónikus légúti betegségben, melyből az asztmában érintettek becsült száma 358 millió embert tesz ki.^{80,81} Európai országokban

az asztma prevalenciája 5-10% közé tehető, mely a környezeti adottságtól, populációs heterogenitástól és az egészségügyi rendszer állapotától függően kismértékben eltérhet. Az asztma a gyermekkor leggyakoribb krónikus megbetegedéseként van számontartva.⁸² A fiúkban pubertáskorig nagyobb eséllyel alakul ki gyermekkori asztma mint lányokban, melynek lehetséges magyarázata, hogy a fiúk kisebb átmérőjű légutakkal rendelkeznek 10 éves korukig, mint a velük egykorú lányok, ezért a légutak hiperreaktivitásra hajlamosabbak, emellett hormonális tényezők is közrejátszhatnak.^{47,83} Gyermekkori asztma esetében gyakori a tünetmentes időszak és alacsony a mortalitás. Felnőttkorban a nők hajlamosabbak asztmás megbetegedésre és az asztma állapota kevésbé stabil mint gyermekkorban.⁴⁷ Évente körülbelül 250.000 ember halálát okozza a betegség világszerte.⁸⁴

Magyarországon, a kutatócsoportunk által végzett felmérés alapján, az asztmás populáció 0,89%-a szenved súlyos asztmában, ami a nehezen kezelhető refrakter asztmának egy alcsoportja. A világon ez az érték 2,5-20% közé esik. Súlyos asztma csoportba soroljuk azokat a pácienseket, akik a ma elérhető terápiás és kezelési lehetőségek alkalmazása mellett sem tarthatóak kontrollált állapotban. Annak ellenére, hogy ez egy relatíve alacsony százalékos értéknek mondható, ezeknek a pácienseknek a folyamatos ellátása és terápiája hatalmas terhet jelent az egészségügy számára. Hazánkban a súlyos asztmában szenvedő páciensek átlagéletkora $56,4 \pm 13,4$ évre tehető és a nemek arányát tekintve 64%-uk nő. Az allergia prevalenciája a súlyos asztmás populációban 56,6% és a páciensek 72,1%-a perzisztens légúti obstrukciót (FEV1 - első másodpercben mért erőltetett kilégzési térfogat <80%) mutat, míg 37,9%-uk súlyos légúti obstrukciót (FEV1 \leq 60%). A súlyos asztmás populáció 33,6%-a igényel szisztémás kortikoszteroid fenntartó kezelést, 21,5%-a szalicilát-intoleranciában szenved és 43,2%-a rhinosinusitis (ormelléküreg-gyulladás) tüneteit mutatja. A részletek az alábbi 6. táblázatban tekinthetők meg⁸⁵:

6. táblázat. Súlyos asztma populáció klinikai jellemzői Magyarországon.⁸⁵

Karakterisztika	Populáció
n (Esetszám)	520
Életkor (átlag ± SD, év)	56,4 ± 13,4
Betegség időtartama (év)	22,2 ± 12,5
Legjobb FEV1 érték (%)	67,3 ± 19,5
Legrosszabb FEV1 érték (%)	39,3 ± 13,5
Nem (férfi/nő) (férfi %)	186/330 (36,0)
Betegség kezdete (gyermekkor (<12 év)/felnőttkor) (gyermekkor %)	65/453 (12,4)
Allergia igen/nem (igen %)	287/220 (56,6)
Szisztémás kortikoszteroid használat igen/nem (igen %)	175/345 (33,6)
Szalicilát-intolerancia igen/nem (igen %)	111/406 (21,5)
Rhinosinusitis igen/nem (igen %)	223/293 (43,2)

Hazánkban a tüdőgondozók által nyilvántartott asztmás betegek száma 2016-ban 300.000 körül volt, és az éves új megbetegedések száma, tehát az incidencia pedig 15-20.000 közé tehető.⁸⁴

Az asztma és allergia prevalencia növekedésének magyarázatára az elmúlt évtizedben több hipotézis is született.⁸⁶ A leghíresebb a tisztaság hipotézis, mely szerint a magzat születésekor Th2-irányba tolódott immunválasszal rendelkezik és a vírusokkal, illetve baktériumokkal való találkozás indukálja a Th1-es irányba történő elmozdulást. Higiénikus környezet, antibiotikumok és fertőtlenítők használata következtében ez a jelenség nem következik be, mely során a megmaradó Th2-es túlsúlyú állapot különböző immunrendszert érintő, atópiás, illetve allergiás kórképekre hajlamosít. A tisztaság hipotézishez szorosan kapcsolódik az Old Friends/ régi barátok hipotézis, mely azt állítja, hogy a bennünk élő mikroorganizmusok az evolúció során velünk együtt fejlődtek, azonban az elmúlt évek során megváltozott étkezési szokások, táplálkozás, illetve a különféle gyógyszerek hatására mikrobiomunk összetétele megváltozott. Ez az elváltozás pedig betegségekre hajlamosíthat.^{87,88} Az említett elméleteken kívül persze más magyarázat is lehetséges, többek között a környezetszennyezés szintén hozzájárul az allergiás asztma előfordulási gyakoriságának növekedéséhez (pl. a diesel kipufogógáz szén-részecskéi bizonyos pollenekkel kölcsönhatásba lépve asztmára hajlamosíthatnak).⁸⁹

1.4. Krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD)

A krónikus obstruktív tüdőbetegség 2020-ban a 4. helyet foglalta el a vezető halálokok listájában, azonban a 2021-es évre a 3. helyre lépett elő az előregedő populáció és a kockázati faktoroknak való folyamatosan fokozódó kitétség következtében.^{90,91} Egy vizsgálat (Global Burden of Disease Study) alapján 2016-ban 251 millió COPD-s beteget regisztráltak globálisan és 2015-ben 3,15 millió elhalálozásért volt felelős a betegség, ami az összes halálozás 5%-át jelenti az Egészségügyi Világszervezet adatai alapján.⁹² A legmagasabb prevalencia értékkel a 60 év feletti korosztály rendelkezik.⁹⁰

A COPD elsődleges oka (hajlamosító genetikai háttér jelenléte mellett) a dohányfüstnek való kitétség, akár aktív vagy passzív módon. Emellett egyéb kockázati tényezők is közre játszhatnak, például légszennyező anyagok hosszú távú belélegzése (tűzelőanyagok, por, szmog, vegyi anyagok, füst, irritáló szerek), gyakori gyermekkori alsólégúti infekciók vagy akár a gyermekkori asztma is fokozott kockázati besorolással bír.⁹² Kimutatták, hogy asztmás gyermekek magasabb eséllyel szenvednek COPD-ben felnőttkorukban, különösen ha fiatalkorukban dohányoztak, összehasonlítva azokkal akik nem szenvedtek gyermekkori asztmás megbetegedésben.⁹³

A COPD egy gyakori, megelőzhető és kezelhető betegség, melyet a légutak perzisztens és általában irreverzibilis szűkülete kísér, valamint olyan tünetek progresszív súlyosbodása, mint légzési nehézség, légszomj, köhögés és/vagy köpettermelés. Ahogyan az asztma, ez a betegség is rendkívül heterogén. Megfigyelték, hogy a kezelés nem minden páciensre hat azonos hatékonysággal, tehát a COPD esetén is megkülönböztethetünk szubfenotípusokat, melyek leggyakoribb csoportosítása (7. táblázat)³:

- Gyakori exacerbátor
- Emfizéma
- Asztma-COPD overlap szindróma - ACOS

7. táblázat. A COPD szubfenotípusai³

Fenotípus	Patofiziológiai tulajdonságok	Képzalkotási vizsgálat által kapott tulajdonság	Farmakoterápia
Gyakori exacerbátor	<ul style="list-style-type: none"> Évente két vagy több súlyosbodás Krónikus bronchitisz 	Hörgőfal megvastagodás	Inhalációs kortikoszteroid, Mucolytikum, (nyákoldó) Makrolid antibiotikum, Bronchodilatátor
Emfizéma	<ul style="list-style-type: none"> Parenchimális destrukció Domináns tünetek a testmozgás intoleranciája és a dyspnea Csökkent diffúziós kapacitás Exacerbációk alacsony aránya 	Tüdőtágulat, hörgőszűkület	Inhalációs kortikoszteroid (kevésbé hatásos), Bronchodilatátor, Oxigénkezelés (előrehaladottabb állapotban)
Asztma-COPD overlap szindróma (ACOS)	<ul style="list-style-type: none"> Nem teljes mértékben irreverzibilis légúti obstrukció Emelkedett eozinofil-sejtszám a köpetben Exacerbációk alacsony aránya Megőrzött diffúziós kapacitás 	Asztmára és COPD-re jellemző tulajdonságok is jelen vannak	Inhalációs kortikoszteroid Bronchodilatátor Egyéb asztmában és COPD-ben használt készítmények

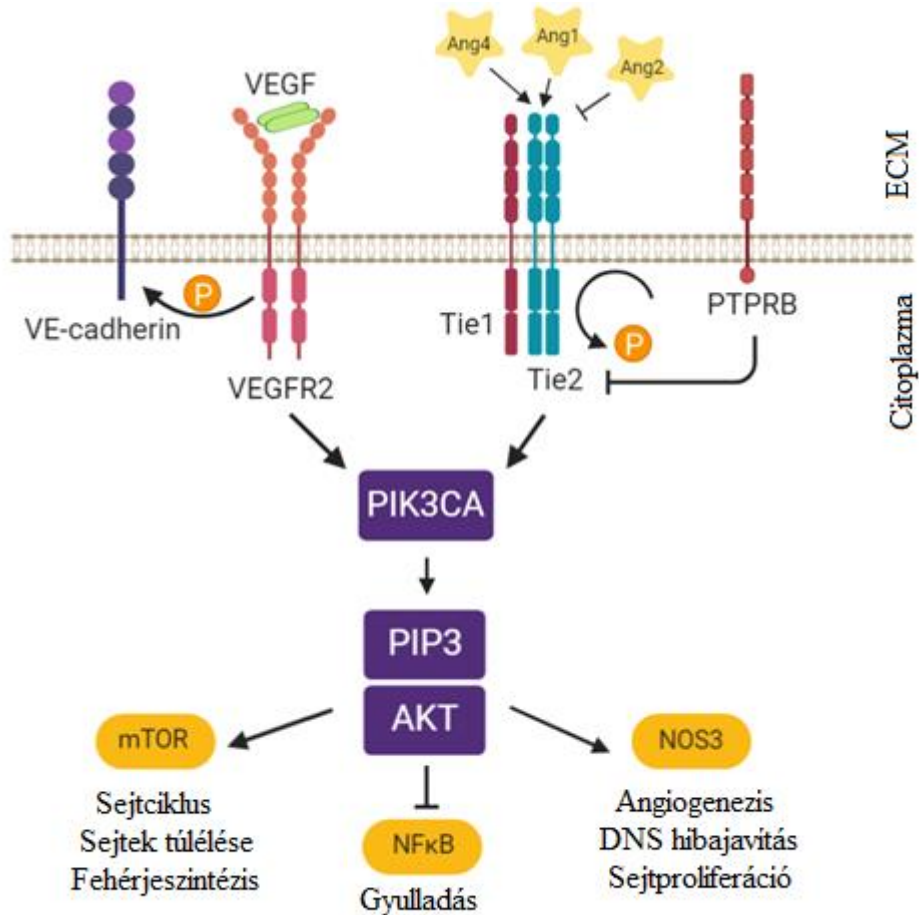
Diagnózisa a tünetek, spirometriás vizsgálat és az anamnézisben szereplő ártalmas részecskéknek, füstnek való kitétség megléte alapján történik. A 7. táblázatban szereplő csoportosítás mellett, a GOLD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) ajánlása alapján A, B, C, D csoportba is sorolhatjuk a COPD-s betegeket az exacerbációk jelenléte/hiánya, tüneteik, illetve a megfelelő farmakoterápia alapján.⁹⁰

A krónikus obstruktív tüdőbetegség nem gyógyítható, azonban a dohányzás felfüggesztésével, a káros gázok/füst elkerülésével és gyógyszeres terápiával a tünetek enyhíthetőek, javítható az életminőség és csökkenthető az elhalálozás kockázata.⁹²

1.5. *TEK* gén és Tie2 útvonal

A tudományos irodalom és korábbi vizsgálataink alapján feltételezhető, hogy a Tie2 útvonal résztvevői szerepet játszanak az allergiás conjunctivitis és az asztma kialakulásában.^{94,95}

A Tie2 fehérje egy tirozin kináz receptor, amely főleg a vaszkuláris endotheliális sejtek felszínén található meg és kulcsfontosságú szerepet játszik az érrendszer stabilitásában.⁹⁶ Emberekben három ismert ligandja található meg a receptornak: az Ang1 (angiopoietin 1), Ang2 és Ang4. Mindegyik ligand hasonló affinitással képes a Tie2 receptorhoz kötődni, azonban eltérő hatást váltanak ki (4. ábra). A leginkább tanulmányozott ligand az Ang1, amely kináz-aktivitás stimulálása révén, az mTOR (mammalian target of rapamycin) útvonalon keresztül sejtciklust képes aktiválni és a protein szintézist elősegíteni; továbbá az NfκB szignalizációs útvonal gátlása révén gyulladásgátló hatást fejt ki; illetve a NOS3 (nitrogén-monoxid szintáz 3) útvonal serkentése révén támogatja az angiogenezis, a DNS hibajavítás és a sejtproliferáció folyamatát. Ezek mellett promótálja az endothel sejtek túlélését a PI3K-Akt1 útvonal stimulációján keresztül, amely azonban megtörténhet emelkedett mennyiségű Ang2 jelenlétében is. A jelátvitel a PI3K-Akt1 útvonalon keresztül az eNOS (endotheliális nitrogén-monoxid szintáz) foszforilációt és ezáltal a NO (nitrogén-monoxid) termelődését is elősegíti.^{97,98}



Created with BioRender.com

4. ábra. A Tie2 útvonal szerepe (az ábra a BioRender.com segítségével készült)

Az Ang2 szerepe meglehetősen ellentmondásos, mivel bizonyos körülmények között Ang1 antagonistaként funkcionál, míg más esetben parciális agonistaként. Ebből adódóan az Ang2 is képes elősegíteni az angiogenezist, azonban antagonistaként hatva, az NfκB szignalizációs útvonalon keresztül gyulladáskeltő hatása is lehet.⁹⁹ Az Ang4 ligand kapcsolódása a Tie2 receptorhoz modulálja az Ang1 szignalizációt, illetve antimikrobiális hatást fejt ki.^{97,100}

A Tie2 tirozin kináz receptort a *TEK* gén kódolja, ami nagy mennyiségben expresszálódik a tüdőben és a szemben található Schlemm-csatorna endotheliumában, valamint fontos szerepe van a szem fejlődésében és a látás kialakulásában.¹⁰¹

A Tie2 fehérje a sejtközötti kapcsolatok normál kialakításában is részt vesz a VE-PTP (vaszkuláris endotheliális protein-tirozinfoszfátáz) fehérje segítségével, Ang1 ligand kapcsolódása esetén csökkenti az érfal permeabilitását.¹⁰² Amennyiben ez nem történik

meg, nő az érfal permeabilitása, több gyulladásos mediátor jut át az érfalon, ödémát, könnyezést (a szemben) és duzzanatot okozva.¹⁰³ Ezek alapján a Tie2 útvonalról feltételezhető, hogy szerepet játszik asztmás megbetegedésben és a különféle szem rendellenességekben, beleértve az allergiás conjunctivitist is.^{95,104}

1.6. Neutrofil extracelluláris csapdák (NET-ek)

A neutrofil granulociták a veleszületett immunrendszer legnagyobb mennyiségben előforduló effektor sejtjei. Az elmúlt évtizedek során fényt derítettek arra, hogy fagocitózis és degranuláció mellett extracelluláris csapdák létrehozásával, alternatív módon is képesek a szervezet védekezőmechanizmusainak sorát színesíteni. A neutrofil extracelluláris csapda képződését netózisnak nevezzük.¹⁰⁵ A NET fizikai és kémiai barriert is alkot, mely során a csapda kémiai alkotóelemei képesek megküzdeni a mikroorganizmusokkal, csapdába ejteni azokat és ezzel egyetemben elzárják tovaterjedésük útját.¹⁰⁶ A mikroorganizmusok mellett számos más tényező is képes kiváltani a netózist, többek között olyan gyulladásos citokinek, mint az IL-6, TNF- α (tumor nekrosis faktor-alfa) és az IL-8, mely utóbbi kettőnek az asztmában és a COPD-ben kiemelt szerepet tulajdonítanak. Emellett a lipopoliszacharid (LPS), Ca²⁺ ionofór, ionomycin, illetve a PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate) is triggerként hat a NET képződésére.¹⁰⁷ A PMA a leggyakrabban használt *in vitro* NETózis induktor, saját kísérleti beállításaink során mi is ezt a farmakológiai készítményt használtuk.

A neutrofil extracelluláris csapdák hálózatszerű struktúrát alkotnak, amely fő alkotója a dekonzenzált kromatin komplex (citrullinált hiszton és DNS) antimikrobiális peptidokkal dekorálva. A NET alkotóelemei lokalizáció alapján a következők lehetnek¹⁰⁸:

- Azurofil granulum: neutrofil elasztáz (NE), laktotranszferrin, azurocin, cathepsin G, myeloperoxidáz (MPO), leukocita proteináz 3, lizozim C, neutrofil defenzin 1
- Sejtmag: hiszton H2A, H2B, H3, H4
- Citoplazma: különböző kalciumkötő fehérjék
- Citoszkeleton: aktin, miozin, alfa-aktinin, plasztin-2, cytokeratin-10
- Peroxiszóma: kataláz
- Glikolitikus enzimek: alfa-enoláz, transzketoláz

A felsoroltak közül kiemelkedő jelentőségű a neutrofil elasztáz és a myeloperoxidáz, melyek leginkább specifikusak a neutrofil csapdákra. A neutrofil elasztáz egy szerin proteáz, ami virulencia faktor hasító és antibakteriális hatással bír^{106,109}, míg az MPO a hidrogén-peroxid átalakításában vesz részt, mely folyamat során antimikrobiális hatású hipoklórossav keletkezik.¹¹⁰

A NET képződése során a reaktív oxigéngyökök (ROS) keletkezése, NADPH (nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate) oxidáz vagy mitokondrium közreműködése révén, kulcsfontosságú szerepet tölt be a PAD (peptidilarginin deimináz), NE és MPO aktiválásában.¹¹¹ Az aktivált neutrofil elasztáz felelős a citoszkeleton és a sejtmagmembrán degradációjáért, ezzel lehetővé téve a sejtmag alkotók és a citoplazma keveredését. A PAD által aktivált hiszton deimináció folyamata, valamint az MPO és NE általi proteolitikus hasítás teszi lehetővé a kromatin dekonzenzációt.¹¹²

Az utóbbi évek kutatásai alapján a netózisnak alapvetően két formáját különböztetjük meg (8. táblázat) a kiváltó trigger, a neutrofil sejt integritása és a csapdaképződés ideje alapján. A klasszikus ún. „szuicid” netózis eltér a nekrozis és az apoptózis folyamatától. Ez esetben a ROS képződése NADPH oxidáz által következik be és kiváltó tényezője a tudomány mai állása alapján lehet PMA, (auto)antitestek és koleszterin kristályok. A csapdaképződés folyamata több órába is telhet és ahogyan a neve is mutatja, ebben az esetben a NET képződése során kamikaze módon, a sejt lizál.¹¹³

A „vitális” netózis esetén a ROS termelődése mitokondriális úton következik be, viszont a PAD enzim ROS képződése nélkül is aktiválódik. A folyamat jelentősen gyorsabb, mint a „szuicid” netózis, akár percek alatt is végbemehet. A NET képződését kiváltó stimulus ebben az esetben főként infekció, például a *Staphylococcus aureus* Gram-negatív baktérium, amely a TLR2 és a komplement receptorok (pl. CR3) együttes aktiválása révén indukálja a csapdaképződést, míg az *E. coli* baktérium közvetlenül vagy közvetett módon a TLR4 receptor aktiválása révén váltja ki ugyanezt. A folyamat során a dekonzenzáció DNS és az antimikrobiális peptidok vezikulákban szállítódnak a sejtmembrán felé, majd a vezikulatartalom kijutását követően a sejtmembrán integritása megmarad, a sejt nem lizál.^{113,114}

8. táblázat. *A netózis két fő típusának jellemzői*^{113,114}, ROS: reaktív oxigéngyökök, PMA: phorbol-12-myristate-13-acetate, NADPH: nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate

	„Szuicid” netózis	„Vitális” netózis
Trigger	PMA, (auto)antitest, koleszterin kristály	Baktérium, bakteriális produktum
ROS képződés	NADPH oxidáz	mitokondrium
Képződés ideje	több óra	néhány perc
A neutrofil sejt integritása	dezintegrálódik	integritás megmarad

A neutrofil csapdák kétélű fegyvert testesítenek meg, mivel ugyan fontos szerepet töltenek be a veleszületett immunrendszer tagjaként a patogének elleni küzdelemben, azonban a NET komponensek állandósult jelenléte, elégtelen eltávolítása, vagy fokozott képződése következtében szöveti destrukciót¹⁰⁵, légúti remodelinget, illetve mucos hiperszekréciót okozhatnak.¹¹⁵ Ezek alapján feltételeztük, hogy a NET-ek szerepet játszhatnak az asztma és COPD kialakulásában, tüneteinek súlyosságában.

A neutrofil asztma magas neutrofil pulmonáris infiltrációval és általában súlyosabb asztmával és alacsonyabb kortikoszteroid válaszkészséggel asszociál. Egy nemrégiben végzett kutatás alapján neutrofil típusú asztmában szenvedő páciensekben magas neutrofil sejtszám, IL-8 és neutrofil extracelluláris csapda szint volt kimutatható, habár a súlyossággal való asszociáció és a netózist kiváltó tényező asztmában még tisztázatlan. Hipotézisek alapján az IL-8 neutrofil kemotaktikus faktor egy potenciális trigger lehet.⁶

COPD esetében kimutatták, hogy a betegség lefolyása, a GOLD státusz és az exacerbációk gyakorisága asszociál a neutrofilia jelenlétével a tüdőben.^{115–117}

Néhány tanulmány megtalálható az irodalomban a NET-ek asztmában és COPD-ben történő vizsgálatával kapcsolatosan, azonban a mai napig nem található publikáció a NET-ek *in vivo* plazma szintjéről asztma, COPD, valamint ACOS esetében.

Asztma és COPD mellett a NET-ek káros hatását számos más fertőző és nem-fertőző kórképpel is kapcsolatba hozták pl. diabetes mellitus, rheumatoid arthritis (RA), tumorok, tuberkulózis, cisztás fibrózis, bakteriális pneumónia, akut respirációs distressz szindróma, szisztémás lupus erythematosus (SLE) és trombózis.^{109,113}

1.7. Hosszú nem-kódoló RNS-ek (lncRNS-ek)

Számos kutatás megerősítette, hogy a humán genom 70-90%-a íródik át RNS-é, azonban a fehérje-kódoló szekvenciák csupán ennek 1,2%-át teszik ki. A nem-kódoló RNS-ek (ncRNS) két fő csoportra oszthatóak hosszúságuk alapján, rövid nem-kódoló RNS (200 bp \geq) és hosszú nem-kódoló RNS (> 200 bp) csoportokra. A rövid/kisméretű ncRNS-ek közé tartozik például a tRNS (transzfer RNS), mikroRNS, siRNS (rövid interferáló RNS), piRNS (PIWI-asszociált RNS), snoRNS (kis nukleoláris RNS), snRNS (kis nukleáris RNS) és az exRNS (extracelluláris RNS).⁷

A hosszú nem-kódoló RNS-ek (a továbbiakban lncRNS) a legnagyobb és ezzel egyetemben a legkevésbé karakterizált csoport a nem-kódoló RNS-ek között.⁷ Az lncRNS-eket, aszerint hogy milyen pozícióban helyezkednek el a legközelebbi kódoló szekvenciához képest, többféle alcsoportba oszthatjuk^{118–120}:

- **antiszensz RNS** (antisense – AS): szensz mRNS-el komplementer szekvenciát tartalmaz, amelyhez való kötődése az mRNS szekvencia translációjának gátlását idézi elő. Kutatások alapján a gének legalább 50-70%-áról antiszensz transzkriptum is átíródik.¹²¹
- **hosszú intergenikus RNS** (long intergenic – LINC): két kódoló gén közötti hosszú szakaszból íródó RNS-ek.
- **kétirányú-promóter RNS** (bidirectional): ha a kódoló transzkriptum és az lncRNS átírása 1000 bp-nál közelebbi távolságban indul, ellentétes irányba.¹²²
- **enhanszer RNS** (enhancer - eRNS): enhancer régióról átíródó szekvencia.
- **promóter-asszociált RNS** (promoter associated – PAR): a transzkripció a promóter régió start pozíciójából vagy a promóter régió belülről indul.¹²³
- **telomér-asszociált RNS** (TAR/TERRA): a teloméraktivitást befolyásolja.
- **intronikus RNS** (intronic -INT): a gének intronjáról/nem-kódoló szekvenciájáról átíródó szakasz.

A hosszú nem-kódoló RNS-ek funkciója sokrétű lehet, kutatások alapján részt vesznek a sejtproliferáció és differenciáció, a programozott sejthalál és az immunválasz folyamatában. DNS-hez való kapcsolódásuk révén befolyásolják a transzkripció aktivitást (elősegítheti, illetve gátolhatja), RNS-hez való kötődési affinitásuk révén

mRNS-hez kapcsolódva befolyásolja a transláció és splicing végbemenetelét, illetve mikroRNS-ek esetében pedig gátolhatja azok funkcióját. Emellett fehérjéhez való kapcsolódása során felületet biztosít kromatin remodelingben résztvevő fehérjekomplexek kialakításához.^{124,125}

Az lncRNS-ek megváltozott expressziója szerepet játszhat különféle kórképek kialakulásában beleértve a krónikus légzőszervi betegségeket is. A legjelentősebb, eddig asztmával és COPD-vel kapcsolatban feltárt lncRNS-ek és azok feltételezett összefüggései a kórképekkel az alábbi táblázatban láthatóak (9. táblázat).

9. táblázat. A legjelentősebb lncRNS-ek asztmával és COPD-vel összefüggésben, PBMC: perifériás vér mononukleáris sejtei; „^” a megnövekedett, míg a „v” a csökkent expressziós szintre utal, mely az asszociációt mutatta

LncRNS	Elnevezés	Expresszió	Sejt/szövet	Faj	Kondíció	Feltételezett összefüggés	Célpont	Ref.
BCYRN1	Brain Cytoplasmic RNA 1	^	tüdőszövet	patkány	asztma	elősegíti a légúti simaizomsejtek proliferációját és migrációját	TRPC1	¹²⁶
PVT1	Plasmacytoma variant translocation 1	^	légúti simaizom	humán	súlyos asztma	a légúti simaizomsejtek proliferációjában és az IL-6 kibocsátás kontrollálásában vesz részt		¹²⁷
GAS5	Growth arrest specific-5		PBMC	humán	súlyos asztma	glükokortikoid kezelés befolyásolja az expressziós szintjét		¹²⁸
MEG3	Maternally Expressed 3	v	perifériás vér	humán	tüdőrák, asztma	immunszuppresszáns hatású		¹²⁹
NEAT1	Nuclear enriched abundant transcript 1	^	vérplazma	humán	asztma	befolyásolja az exacerbációk kialakulását, az asztma súlyosságát és csökkent légzésfunkcióval asszociál	miR-124	¹³⁰
MALAT1	Metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1	^	perifériás vér	humán	asztma	befolósolja a Th1/Th2 egyensúlyt a CD4+ T-sejtekben	miR-155	¹³¹
TUG1	Taurine Up-Regulated 1	^	légúti simaizom	patkány	asztma	elősegíti a légúti simaizomsejtek proliferációját és migrációját, csökkenti az apoptózist	miR-590-5p	¹³²
COPDA1	Chronic obstructive pulmonary disease associated lncRNA 1	^	tüdőszövet	humán	COPD	elősegíti a légúti simaizomsejtek proliferációját és a légúti remodeling folyamatát		¹³³
SCAL1	Smoke and cancer-associated lncRNA-1	^	tüdőszövet	egér	COPD, tüdőrák	a dohányfüst által kiváltott oxidatív stressz ellen véd		¹³⁴
SNHG5	Small Nucleolar RNA Host Gene 5	v	tüdőszövet	humán	COPD	a gyulladás és apoptózis folyamatát szabályozza	miR-132	¹³⁵
H19	Imprinted maternally expressed transcript	v	perifériás vér	patkány	COPD	IL-6, IL-8 és TNF- α szabályozásában vesz részt		¹³⁶

Az lncRNS mRNS-sel való összehasonlítása során felfedezték, hogy az lncRNS szövetspecifikusabb és önmagához képest jelentősebb expressziós eltérést mutat betegségek esetén, ennek következtében potenciális biomarkereknek tekinthetőek.¹³⁷

A betegséggel, illetve betegség endo-vagy fenotípussal asszociáló lncRNS-ek azonosítása kulcsfontosságú szerepet tölthet be a betegség patomechanizmusának feltárásában.

2. Célkitűzések

PhD munkám során a Klinikai genomika munkacsoport tagjaként célul tűztem ki az asztma és allergia hátterében álló patomechanizmusok vizsgálatát molekuláris genetikai és immunológiai módszerek segítségével. A munkacsoport fő célja olyan biomarkerek felderítése, amelyek kvantitatív vagy kvalitatív módon egyedi karakterisztikát mutatnak betegségek endotípusaiban, így segítséget nyújthatnak a differenciáldiagnosztika területén. A patomechanizmusok meghatározása új potenciális terápiás célpontok felderítését teszi lehetővé. A következőkben bemutatott doktori munka során több molekuláris szinten (DNS, RNS, fehérje) végeztünk vizsgálatokat.

Célkitűzéseim a következők voltak:

1. A DesensIT projekt során kapott GWAS eredmények újraértékelése a *TEK* gén kiemelt vizsgálatával felnőtt parlagfű allergiás populációban, majd az asztmával, illetve allergiás conjunctivitisszel legerősebb asszociációt mutató SNP-k (single nucleotide polymorphism) további genotipizálása és asszociációs tesztek elvégzése felnőtt, illetve gyermek asztmás populációban. Emellett terveink között szerepelt a *TEK* gén és a kapcsolódó Tie2 útvonal egyéb komponenseinek génextpressziós analízise ovalbumin (OVA)-szenzitizált asztma-egér modellben, az útvonal asztmában játszott szerepének felderítése érdekében.
2. Neutrofil extracelluláris csapdák áramlási citométerrel való kimutatására alkalmas módszer kifejlesztése. Ezt felhasználva, gyermek és felnőtt asztmás, kontroll, COPD és ACOS minták cirkuláló NET-szintjének meghatározása, majd potenciális asszociációk felderítése. A légúti betegségek egyes szubtypusainak összehasonlítása, súlyosság, FEV1 érték és gyógyszeres kezelés alapján. A mért eredmények validálása.
3. Felfedező kohorsz során 84, gyulladásos immunválaszban és autoimmunitásban szerepet játszó cirkuláló hosszú nem-kódoló RNS array-alapú vizsgálata felnőtt súlyos, illetve enyhe asztmás, COPD-s és kontroll mintákban. A kiértékelés során a legjelentősebb eltérést mutató, és irodalomkutatás alapján is relevánsnak

mondható lncRNS-ek expressziós szintű validálása egy kiterjesztett, már gyermek és allergiás mintákat is tartalmazó populáción. Emellett, a kiválasztott lncRNS-ek potenciális biológiai szerepének vizsgálata rendszerbiológiai analízissel.

3. Módszerek

3.1. Biobank bemutatása

A kutatásban való részvételhez minden vizsgált személy (vagy kiskorú esetében szülő/gondozó) írásos beleegyezését adta. A vizsgálatok a Magyar Etikai bizottság (Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottság, azaz ETT TUKEB, Esetszám: 3526-0/2010-1018EKU; 14666-1/2012/EKU; IF-980-9/2016) jóváhagyásával és a Helsink Deklarátumban megfogalmazott irányelveknek megfelelően zajlottak. Valamennyi, a bemutatott humán vizsgálatban résztvevő személy a magyar (kaukázusi) populációhoz tartozik, melyből a Központi Statisztikai Hivatal adatbázisa alapján körülbelül 5% roma származású volt.

3.1.1. Teljes genom és jelölt gén asszociációs vizsgálatban résztvevő személyek jellemzői

Ezen vizsgálat során tanulmányozott populáció több alcsoportból épült fel. A felfedező kohorszban a DesensIT projekt eredményeit elemeztük újra, tehát a résztvevők ezen része megegyezik a DesensIT projekt populációjával, amelyet az alábbi táblázat (10. táblázat) szemléltet. A vizsgálati csoportban minden alany allergiás rhinitisben szenvedett és 22%-uk (enyhe) asztma, 76%-uk conjunctivitis diagnózissal is rendelkezett. A conjunctivitis megállapítása RQLQ (Rhinoconjunctivitis Quality of Life Questionnaire) és RTSS (rhinoconjunctivitis total symptom score) pontszámok, gyógyszerhasználat és fizikai vizsgálat alapján történt szakorvos által. A vizsgálatban résztvevő személyek 5 magyarországi allergia járóbeteg központ közreműködésével kerültek kiválasztásra, melynek feltétele dokumentált parlagfű allergia és/vagy a klinikai anamnézisben szereplő legalább 2 éve fennálló, augusztus-szeptemberi csúcstünettel jelentkező allergiás tünetegyüttes volt. A parlagfű allergia diagnózisát SPT módszerrel és/vagy allergénspecifikus IgE-szint méréssel történt megerősítés előzte meg. Azok a páciensek voltak preferáltak, akik közepes-súlyos szezonális allergia tüneteit mutatták az ARIA (Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma) kritériumai alapján és a légzőszervi tüneteik az allergén elkerülése vagy megfelelő gyógyszeres terápia ellenére is zavaróak maradtak

a napi rutin tevékenységek és az éjszakai alvás tekintetében. A populáció 14-65 éves korú betegekből állt.

10. táblázat. Teljes genom asszociációs vizsgálatban résztvevő személyek demográfiai és klinikai jellemzői

	Demográfiai és klinikai jellemzők	Páciensek
	Esetszám (n)	306
	Férfi (n) (%)	136 (44,5)
	Nő (n) (%)	170 (55,5)
	Életkor (átlag ± SD, év)	39,2±12,3
Komorbiditások	Rhinitis (n (%))	306 (100)
	Asztma (n (%))	68 (22,1)
	Conjunctivitis (n (%))	232 (75,8)
	Atópiás dermatitis (n (%))	23 (7,5)
	Ételallergia (n (%))	24 (7,8)

A validáló populáció résztvevőinek jellemzői a 11. táblázatban láthatók, ahol 4 alcsoportot különböztettünk meg: gyermekkori asztma, felnőtt asztma, gyermek kontroll és felnőtt kontroll.

11. táblázat. A gén asszociációs vizsgálat populációjának jellemzői, GINA: Global Initiative for Asthma, FEV1: az első másodpercben mért erőltetett kilégzési térfogat

Klinikai és biológiai jellemzők	Gyermekkori asztma n=264	Felnőtt asztma n=237	Gyermek kontroll n=540	Felnőtt kontroll n=217
Életkor (átlag ± SD, év)	10,6 ± 3,8	50 ± 16,1	8,7 ± 4,0	30,4 ± 12,5
Nem (Férfi/Nő)	170/94	99/138	347/193	102/115
Komorbiditások:				
Conjunctivitis, igen(%)/nem	93 (35) /171	8 (10) /71		
Rhinitis, igen(%)/nem	165 (64) /99	42 (18) /195		
Rhinoconjunctivitis, igen(%)/nem	91 (34) /173	8 (3) /229		
GINA státusz:				
GINA 1-es besorolású személyek száma (%)	79 (30)	90 (38)		
GINA 2-es besorolású személyek száma (%)	159 (60)			
GINA 3-as besorolású személyek száma (%)	25 (10)			
GINA 4-5-ös besorolású személyek száma (%)	0	138 (58)		
FEV1 (%)				
80% alatt	0	161		
80% felett	11	74		

A validáló populáció összesen 1258 személyből áll, melynek 64%-a gyermek és 36%-a felnőtt. A gyermek populáció vizsgálata során 264 asztmás mintát vizsgáltunk, amelyeket a Heim Pál Gyermekkorház Allergológiai Osztályának közreműködésével gyűjtöttünk. Négyezerötvennégy felnőtt mintából 237 asztmás megbetegedésben szenvedett és gyűjtésük az alábbi intézmények közreműködésével valósult meg: Országos Korányi Pulmonológiai Intézet és Semmelweis Egyetem Pulmonológiai

Klinika. Az asztma diagnózisa a GINA által meghatározott iránymutatásokat⁷⁷ betartva szakorvos által történt. Az asztmás populáció 101 tagja, orvosi diagnózis alapján allergiás conjunctivitisben is szenvedett.

A felnőtt conjunctivitisben szenvedő asztmások alacsony száma miatt csak a gyermekek vettek részt a validáló vizsgálat conjunctivitist érintő részének statisztikai elemzésben. A FEV1 értékeket az asztmás betegek tüdőfunkciójának becslésére használtuk, két intervallumot vizsgálva, melyek a 80% alatti és feletti tartományt képviselték. Minél alacsonyabb a FEV1 %-os értéke, a tüdőfunkció annál inkább károsodott. Az allergiás státuszt az allergén-specifikus szérum IgE-szint vagy SPT módszer alapján határoztuk meg.

A kontroll gyermekek mintái a Budai Gyermekkorház Ortopédiai Osztályáról és a Heim Pál Gyermekkorház Urológiai Osztályáról származtak. A kontrollok nem mutattak asztma és/vagy allergia tüneteket, és nem szorultak gyógyszeres kezelésre. A felnőtt kontrollok mind egészséges véradó személyek voltak.

3.1.2. Cirkuláló lncRNS vizsgálatban résztvevő személyek jellemzése

A hosszú nem-kódoló RNS-ek vizsgálata szintén két szakaszból állt. Az első fázisban 24 felnőtt páciens vérmintáját használtuk fel. A felfedező populációt 4 csoportra osztottuk, melyek mindegyikében 6 személy szerepelt. A kategóriák a következők voltak: kontroll, enyhe-középsúlyos asztma (GINA1-3), súlyos asztma (GINA4-5) és COPD. A betegek toborzása és a minták gyűjtése az Országos Korányi Pulmonológiai Intézet Asztma ambulanciájának és a Semmelweis Egyetem Pulmonológiai Klinikájának közreműködésével valósult meg. Az asztma diagnózisa és GINA besorolása a Global Initiative for Asthma iránymutatásai alapján történt, mely korábban már kifejtésre került (lásd. 1.3.3. fejezet). A COPD diagnózisa a Global Initiative for Obstructive Lung Diseases által megfogalmazott alapelvek szerint történt (lásd. 1.4. fejezet). A felnőtt kontrollcsoport minden tagja egészséges donor volt. A felfedező populációban résztvevő személyek karakterisztikája az alábbi, 12. táblázatban látható.

12. táblázat. Az IncRNS vizsgálat felfedező populációjának jellemzői, FEV1: az első másodpercben mért erőltetett kilégzési térfogat

	Kontroll n=6	Enyhe- középsúlyos asztma n=6	Súlyos asztma n=6	CODP n=6
Életkor (átlag \pm SD, év)	36,7 \pm 12	46 \pm 19	53,7 \pm 19	58,5 \pm 12
Nem (Férfi/Nő)	3/3	3/3	0/6	3/3
Eozinofil sejtszám [%] (átlag \pm SD)	-	4,4 \pm 5	6,9 \pm 6	1,8 \pm 3
Neutrofil sejtszám [%] (átlag \pm SD)	-	67 \pm 29	61,4 \pm 6	74 \pm 11
FEV1 [%] (átlag \pm SD)	-	88,8 \pm 21	72,8 \pm 26	59 \pm 26
Allergiás rhinitis (igen/nem)	0/6	3/3	5/1	1/5

A vizsgálat második szakaszában validálásra kerültek az első fázis során kapott eredmények egy kibővített populációban. A replikációs kohorsz során 163 ember perifériás vérmintáját elemeztük. A populáció 11 asztmás gyermek mintát tartalmazott, melyet a Heim Pál Gyermekkorház Allergológiai Osztályának hozzájárulása révén vizsgálhattunk, valamint 95 felnőtt asztmás és 9 COPD-s mintát, amelyeket az Országos Korányi Pulmonológiai Intézet és a Semmelweis Egyetem Pulmonológiai Klinikájának közreműködésével gyűjtöttünk. A felnőtt asztmás betegek közel 33%-a súlyos asztmában (GINA4-5) szenvedett, míg 64 páciens enyhe-középsúlyos GINA1-3 besorolású asztma diagnózissal rendelkezett. A felnőtt allergiás rhinitisben szenvedő személyek és mintáik a DesensIT projekt során gyűjtött minták közül kerültek kiválasztásra, melynek kritériumai a 3.1.1 fejezetben olvashatóak részletesen.

A kontrollcsoport 23 egészséges személyből állt, mintáikat a Heim Pál Gyermekkorház Fül-Orr-Gégészeti Osztályának és egészséges donoroknak köszönhetjük.

13. táblázat. Az IncRNS vizsgálat validáló populációjának jellemzése, FEV1: az első másodpercben mért erőltetett kilégzési térfogat

	Gyermek kontroll	Gyermekkori asztma	Felnőtt kontroll	Felnőtt asztma	COPD	Allergiás rhinitis
Esetszám (n)	16	11	7	95	9	25
Életkor (átlag ± SD, év)	9,6 ± 2	13,5 ± 4	36,4 ± 11	48,3 ± 13	61,6 ± 12	43,5 ± 11
Nem (Férfi/Nő)	8/8	9/2	3/4	39/56	4/5	10/15
Enyhe-középsúlyos/Súlyos asztma	-	11/0	-	64/31	-	-
Eozinofil sejtszám [%] (átlag ± SD)	-	3,7 ± 3	-	5,2 ± 4	3,8 ± 5	-
Neutrofil sejtszám [%] (átlag ± SD)	-	50,4 ± 25	-	60,7 ± 31	67,2 ± 33	-
FEV1 [%] (átlag ± SD)	-	110,4 ± 16	-	85,8 ± 21	64,3 ± 3	106,4 ± 13
Allergiás rhinitis (igen/nem)	0/16	10/1	0/7	74/21	3/6	25/0

3.1.3. Plazma minták NET-szintjének mérésében résztvevő személyek jellemzői

A vizsgálatban résztvevő COPD-ben, ACOS-ban vagy asztmában szenvedő páciensek mintáinak gyűjtése az Országos Korányi Pulmonológiai Intézet Asztma ambulanciájának (32 minta), a Heim Pál Gyermekkorház Allergológiai Osztályának (17 minta), és a Semmelweis Egyetem Pulmonológiai Klinikájának (26 minta) közreműködésével történt. A páciensek a mintavétel idejében nem voltak exacerbációs állapotban. Az asztma és a COPD diagnózisa az előbbi alfejezetekben leírt módon történt szakorvos által. ACOS esetében a betegek mind asztmára, mind COPD-re jellemző tüneteket is mutattak, diagnózisa a GINA és GOLD általi útmutatások alapján történt. Az asztma karakterisztika, azaz a kontrolláltsági szint besorolása az 5. táblázatban megfigyelhető kritériumok alapján történt. Gyógyszerhasználat során 2 csoportot különítettünk el, az egyikben minden személy alkalmanként használt SABA (rövid hatású β_2 -agonista - rohamoldó) készítményt, míg a másik csoportban a rendszeresen ICS-t használó páciensek kaptak helyet.

A kontrollcsoport 23 egyén mintáját tartalmazta, amelyek gyűjtése az lncRNS vizsgálati populációhoz hasonlóan a Heim Pál Gyermekkorház Fül-Orr-Gégészeti és Urológiai Osztályának, valamint egészséges donoroknak köszönhetően valósult meg.

14. táblázat. A NET-ek vizsgálata során analizált populáció részleges információi, FEV1: az első másodpercben mért erőltetett kilégzési térfogat, GINA: Global Initiative for Asthma, SABA: rövid hatású β_2 -agonista, ICS: inhalációs kortikoszteroid

	Gyermek kontroll	Gyermekkori asztma	Felnőtt kontroll	Felnőtt asztma	COPD	ACOS
Esetszám (n)	11	17	12	46	6	6
Életkor (átlag \pm SD, év)	9,4 \pm 3,7	11,5 \pm 3,9	35,1 \pm 11,2	51,0 \pm 13,2	68,3 \pm 10,2	61 \pm 7,6
Nem (Férfi/Nő)	10/1	13/4	4/8	14/32	2/4	4/2
GINA státusz						
GINA 1 (%)		7 (41)		1 (2)		
GINA 2 (%)		6 (35)		2 (4)		
GINA 3 (%)		4 (24)		15 (33)		
GINA 4 (%)		0		8 (18)		
GINA 5 (%)		0		19 (42)		
FEV1						
FEV1 <80%		0		18	4	3
FEV1 >80%		13		19	1	2
Asztma karakterisztika						
Kontrollált		15		10	1	1
Részlegesen kontrollált		2		24	0	1
Nem kontrollált		0		6	1	2
Gyógyszerhasználat						
SABA alkalmankénti használata (alacsony dózisu ICS használata mellett vagy nélkül)		8		21	0	2
ICS napi használata (önmagában vagy kombináltan)		6		16	3	3

3.2. Alkalmazott laboratóriumi technikák

3.2.1. Humán minták

A perifériás vérminták EDTA (etilén-diamin-tetraecetsav) tartalmú csőben kerültek levételre és felhasználásig (DNS izolálás) -20°C -on tároltuk azokat.

RNS izolálás céljából speciális *PAXgene Blood RNA Tube* (PreAnalytiX, Qiagen, Venlo, The Netherlands) elnevezésű csövet használtunk, melyet, vérvételt követően 8-10 alkalommal megforgattunk és minimum 2 óra szobahőmérsékleten történő inkubációt követően -20°C -on tároltuk.

A neutrofil extracelluláris csapdák *in vivo* vizsgálata vérlemezke-mentes plazma (PFP - platelet free plasma) mintákból történt. A vérminták nátrium-citrát tartalmú csövekben kerültek levételre, majd két egymás utáni 15 perces 2500 RCF-en történő centrifugálási lépést követően a felülúszót -70°C -on tároltuk.

3.2.2. Genomiális DNS izolálása

A gén asszociációs vizsgálat során 1564 személy teljes vérmintájából szeparáltunk genomi DNS-t *QIAamp DNA Blood Midi kit* (Qiagen, Maryland, USA) segítségével manuálisan, a gyártó utasításait követve, továbbá a DesensIT projekt mintái az *iPrep PureLink gDNA Blood kit* felhasználásával *iPrep Purification Instrument* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) segítségével, automatizálva kerültek izolálásra.

3.2.3. Teljes genom asszociációs vizsgálat (GWAS)

A DesensIT projekt²³ genomikai analízise *Genome-Wide Human SNP Array 6.0* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) felhasználásával készült, amely hozzávetőlegesen 1.8 millió genetikai marker (körülbelül 906.000 SNP és 946.000 CNV (kópiaszám variáció)) azonosítását teszi lehetővé. Ezen vizsgálat során a *TEK* génben 112 SNP-t értékeltük és a kapott eredményeket jelölt gén asszociációs vizsgálat során validáltuk.

3.2.4. Jelölt gén asszociációs vizsgálat

A vizsgálatok az rs3739542, rs994934, rs622232, rs638203, rs7034505 SNP-k esetében a *KBiosciences Competitive Allele-Specific PCR (KASP) version 4.0* genotipizáló rendszer (LGC Genomics, Berlin, Germany) használatával, manuálisan történtek *ABI 7900HT Fast Real-Time PCR* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) berendezés alkalmazásával. A KASP technológia egy fluorescens, kompetitív allélspecifikus PCR (polimeráz láncreakció) reakción alapuló végpont genotipizálási módszer. Az Assay Mix egy SNP-re specifikus oldat, amely 2 darab allélspecifikus forward és egy reverz primert tartalmaz. A Master Mix Taq polimerázt, két fluorescensen jelölt primert és két FRET (fluorescens rezonancia elektron transzfer) kazettát tartalmazó puffer oldat. A FRET kazetták (HEX és FAM) az oldatban quencherhez (kioltó) kapcsolt állapotban vannak jelen, specifikusan kötődnek a farok komplementer szekvenciákhoz és eltérő hullámhosszon emittálnak.

A hatodik vizsgált SNP (rs3824410) mérése *TaqMan SNP Genotyping Assay* és *Master Mix* (Applied Biosystems) felhasználásával történt. A TaqMan és KASP rendszer azonos módszeren alapul, de különböző kísérleti elrendezést alkalmaznak.

3.2.5. RNS izolálás és reverz transzkripció

RNS izolálás céljából a teljes vérminták *PAXgene Blood RNA Tube* speciális csőben kerültek levételre, az intracelluláris RNS stabilizálása és a gyors RNS degradáció elkerülése érdekében.

Az RNS szeparálást 2 órás inkubáció előzte meg szobahőmérsékleten a megfelelő mértékű kioldás érdekében. Az izolálás a *PAXgene Blood RNA Kit* használatával történt, gyártói utasítások alapján. Az ezt követő koncentrációmérés *NanoDrop ND-1000 spektrofotométer* (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) segítségével történt, amely során az RNS tisztasága is megállapításra került, mégpedig az A260/A280 hányados értéke alapján. Azok a minták voltak elfogadható tisztaságúak, melyek esetén ennek a hányadosnak az értéke 1,8-2,2 közé esett.

A hosszú nem-kódoló RNS vizsgálat felfedező populációjának méréséhez szükséges RNS amplifikációja (az alacsony mennyiségű izolált RNS mennyiség miatt) és reverz

transzkripciója *RT2 PreAMP cDNA Synthesis Kit* (Qiagen, Hilden, Germany) használatával történt. A replikációs vizsgálat mérése *High Capacity RNA-to-cDNA Kit* (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) felhasználásával valósult meg.

3.2.6. LncRNS PCR array és assay

Az lncRNS vizsgálat első fázisában feltérképező méréseket végeztünk a *Human RT2 lncRNA PCR Array* (LASH-004Z, Qiagen, Hilden, Germany) panel segítségével, amely 84 előzetesen validált primerpárt tartalmazott olyan specifikus lncRNS génekre, melyek részt vesznek autoimmun folyamatokban és a gyulladásos immunválaszban. Az array ezek mellett tartalmazott 5 primerpárt referencia génekre (SNORA73A, RPLP0, RN7SK, ACTB, B2M), 3-3 primerpárt a reverz transzkripció és a PCR reakció ellenőrzésére és 1-et a humán genomiális DNS kontamináció detektálására. A real-time PCR reakció az *Applied Biosystems 7900HT* készülék segítségével zajlott 96 lyukú plate formátumban *RT2 SYBR Green ROX qPCR Master Mix* (Qiagen, Hilden, Germany) használatával a gyártó ajánlása alapján.

A replikációs kohorszban 6 kiválasztott hosszú nem-kódoló RNS és 2 referencia gén expresszióját vizsgáltuk *TaqMan Non-coding RNA Assay* (JPX: Hs0139517_g1; AC016629.8: Hs03678951_m1; HNRNPU: Hs00402532; OIP5-AS1: Hs01587687_g1; RP11-282O18.3: Hs00416786_m1; RP11-325K4.3: Hs01594146_s1) és *Gene Expression Assay* (B2M: Hs99999907_m1; RPLP0: Hs00420895_gH), valamint *Gene Expression Master Mix* (mind Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) felhasználásával. A mérések során minden minta duplikátumban szerepelt, pozitív és negatív kontrollokkal egyetemben. A PCR reakció 10 μ l térfogatban, 384 lyukú plate formátumban ment végbe, ugyanazon real-time PCR készülék alkalmazásával, mint amelyet a felfedező vizsgálatban használtunk.

3.2.7. Egér-asztma modell vizsgálata

Munkacsoportunk által korábban előállított ovalbumin-indukált egér-asztma modell vizsgálata során *Agilent Whole Mouse Genome Oligo Microarray 4x44K chip* (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) által kapott eredményeket használtuk fel kontroll és

allergizált állatok izolált tüdőszövetére jellemző génexpressziós profil összehasonlítása érdekében. A tüdőszövetből történő RNS izolálás *RNeasy oszlopok* (Qiagen, Valencia, CA, USA) által valósult meg. Az állatmodell részletes leírása és az array mérés, valamint a kutatás akkori eredménye egy nyilvánosan elérhető doktori disszertációban, illetve publikációban¹³⁸ már leírásra került, ezért csak nagyvonalakban fejteném ki, és az eredmények bemutatásakor a saját vizsgálat szempontjából érdekes eredményekre szorítkoznék.

Az egérmodell előállítása során 6-8 hetes, nőstény, patogénmentes BALB/c egerekből indultunk ki. Három egércsoportot szenzitizáltunk, melynél minden csoport 6 egerből állt. Ovalbumin, alumínium-hidroxid és PBS (foszfátpufferolt sóoldat) tartalmú intraperitoneális oldat injektálásával kezeltük őket a 0. és 14. napon. A kontroll/nem szenzitizált egércsoport kizárólag PBS és alumínium-hidroxid kombinációját kapta. Az egerek a 28., 29. és 30. napon 1%-os OVA aeroszolt (PBS-ben) vagy csupán PBS-t (kontrollok) lélegeztek be 20 percen át egy műanyag kamrában. A 28. és a 30. napon 4 óra elteltével az első, és a harmadik allergén provokációt követően az 1-es, és 2-es csoport egereit ketamin és xilazin injekcióval altattuk el és a tüdőszövetet további analízis céljából eltávolítottuk. A 31. napon, 24 órával a harmadik allergén provokációt követően a 3. egércsoport és a kontrollcsoport egyedei esetében is altatásra, majd tüdőszövet eltávolításra került sor.

3.2.8. Neutrofil granulociták izolálása

A plazma NET mérések során szükség volt az áramlási citométer paraméteres beállítására, amelyhez elengedhetetlen volt a neutrofil granulociták izolálása, és PMA általi stimulációja, majd használata pozitív kontrollként.

A neutrofil sejtek szeparálása sűrűség gradiens módszerrel történt, 5%-os dextrán és percoll (63%-os és 72%-os) oldat felhasználásával, EDTA tartalmú vérvételi csövekből kiindulva. A szeparált granulocitákhoz PMA (100X) és 2% BSA (szarvasmarha szérum albumin - bovine serum albumin) oldatot pipettáztunk, majd 4 órás 37°C-on történő inkubáció következett. Centrifugálási lépést követően specifikus antitesteket és DNS festéket tartalmazó oldattal kezeltük a felülúszót (lásd 3.2.9. fejezet).

3.2.9. Áramlási citométer alapú NET detektálás

A NET-ek kimutatása *anti-MPO FITC* (anti-human mouse IgG, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) és *rabbit anti-histone H3 (citrulline R2 + R8 + R17)* (ab5103, Abcam, Cambridge, UK) antitestek alkalmazásával, valamint egy nagy affinitású nukleinsav festék, a *SYTOX Red dead cell stain* (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) parallel használatával történt. Az anti-hisztin H3 antitest jelöletlen voltából fakadóan egy szekunder antitest (*rabbit IgG PE-conjugated antibody*, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) használatára is szükség volt a detektálás érdekében. Minden antitestet 1:700 hígításban alkalmaztunk. A mintákat első lépésben hígítottuk PFA (4% 0,22 µm szűrt paraformaldehid) oldattal, majd egy FACS (Fluorescence-activated cell sorting) csőbe pipettáztuk az említett antitestekkel és nukleinsav festékekkel (leszámítva a szekunder antitestet) együtt. Tizenöt perc sötétben, szobahőmérsékleten történő inkubáció után a szekunder antitest is hozzáadásra került, majd újabb 15 perc inkubáció következett. Az oldathoz ezután szűrt, 1%-os PBS oldatot és *PKH26 Reference Microbeads* (Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Germany) gyöngyöket adtunk, a mérések kvantitatívra tétele érdekében. Azért, hogy elkerüljük az aspecifikus kötődésből származó torzítást minden mintához készítettünk egy háttérmérést is, amely oldatban a minta mellett csak a szekunder antitest volt megtalálható. Pozitív eredményként csak a hármas pozitív, tehát MPO/Sytox Red/Histone pozitív eseményeket azonosítottuk. A mérések *BD FACSCalibur* (BD Biosciences) készüléken zajlottak. Az áramlási citométer optimalizálása és a kapuzási stratégiák van der Pol et al. 2018-as cikke alapján történtek.

3.2.10. Konfokális lézer-pásztázó mikroszkópia

A neutrofil extracelluláris csapdák jelenlétének megerősítése érdekében a PFP mintákat konfokális lézer-pásztázó mikroszkóp segítségével vizsgáltuk. A mintaelőkészítés során hasonló jelöléseket használtunk, mint az áramlási citométerrel történő mérés során. Első lépésként 10µl trombocitamentesített plazma mintát cseppentettünk speciális tárgylemezre (*MilliCell EZ tárgylemez*, Merck-Millipore), majd 10 perc szobahőmérsékleten történő száradást követően 4% 0,22 µm szűrt PFA oldattal fixáltuk a mintákat (20 percig szobahőmérsékleten). Három egymást követő 1% PBS-el

történő mosás után 5% BSA-val történt a blokkolás, majd 30 perces inkubálási lépés következett. A szarvasmarha-magzati szérum (FBS) lehetséges NET tartalma miatt BSA-t használtunk, így elkerülve az ebből adódó hamis pozitív eredményt. A tárgylemezen lévő mintákat ezután elsődleges antitestekkel (*mouse monoclonal anti-MPO FITC* (BD Biosciences) és *rabbit polyclonal anti-histone H3* (ab5103, Abcam)) kezeltük, melyek 5% BSA oldat segítségével 1:100 hígításban kerültek alkalmazásra. Egy órán át tartó szobahőmérsékleten, sötétben zajló inkubáció után három egymást követő 5% BSA-val történő mosás következett. Ezt követően a tárgylemezre pipettáztuk a másodlagos antitesteket is (*F(ab')₂-goat anti-mouse IgG (H+L) konjugálva eFluor 570-al* (eBioscience) - 1:200 hígításban és *goat anti-rabbit IgG konjugálva ATTO647N-el* (Sigma-Aldrich) - 1:500 hígításban), majd 1 órán át pihenni hagytuk szintén szobahőmérsékleten, sötétben. Kétszeri 1% PBS-el és két desztillált vízzel való mosást követően a tárgylemezeket DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) tartalmú fedőlemezzel fedtük be (*Prolong Diamond* (Invitrogen)). A minták vizsgálata *Lecia SP8 konfokális lézer-pásztázó mikroszkóppal* történt (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

3.3. Bioinformatikai módszerek

3.3.1. Tie2 útvonal és a TEK gén vizsgálatában alkalmazott módszerek

A DesensIT projekt GWAS eredményeinek újraelmezése során 112 SNP-t vizsgáltunk, amelyek a *TEK* genomi régióján belülre, illetve attól ± 6 kb távolságra estek. Az SNP-eket Hardy-Weinberg egyensúly (HWE) (p -érték $>0,01$), call rate („hívás arány”, amely egy SNP során kapott genotipizálás sikerességére utal) ($> 80\%$ call rate), valamint minor allél frekvencia (MAF $>0,02$) értékek alapján tovább szűkítettük, végül 104 SNP felelt meg a kritériumoknak. A kiválasztott 104 SNP közül a vizsgálat második fázisában azon polimorfizmusokat elemeztük tovább egy bővített populáción, amelyek a legerősebb asszociációt (nominálisan szignifikáns p -értéket) mutatták asztmával vagy allergiás conjunctivitisszel összefüggésben.

Az allélfrekvenciát és a Hardy-Weinberg egyensúly fennállását egy *online DeFinetti HWE szoftverrel* (Helmholtz Zentrum München, Institut für Humangenetik, <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>), Khi-négyzet (χ^2) próba segítségével számoltuk ki,

a HWE-től való szignifikáns eltérést pedig p-érték $<0,01$ megállapításával határoztuk meg. A nyers eredmények elemzése az *SPSS v19* (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) szoftver segítségével történt. Logisztikus regresszió módszerével értékeltük a *TEK* genotípusok és asztma, illetve allergiás conjunctivitis asszociációját nemre és korra illesztve.

A kapcsoltsági egyenlőtlenség (Linkage disequilibrium – LD) és a haplotípus blokkok elemzése során a *Haploview v4.2 szoftver* (Broad Institute, Cambridge, Maine, USA) volt a segítségünkre, míg a különböző haplotípus asszociációs tesztek Pearson-féle Khi négyzet (χ^2) próba segítségével kerültek kiértékelésre.

Az asztma-egér modell vizsgálata során kapott microarray adatok a *GeneSpring 9.02 program* (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) segítségével lettek kiértékelve. A statisztikai analízis *R statisztikai szoftver* (version 3.5.1., R Core Team, 2018) segítségével történt. A génexpressziós adatok összehasonlítása az egyes csoportok között, illetve a kontrollokhöz viszonyítva t-próba alkalmazásával történt. A kiválasztott 10 Tie2 útvonalban szerepet játszó gén (*Angpt1; Angpt2; Angpt4; Tek; Nfkb1; Kdr* (humán *VEGFR2* génnek felel meg); *Pik3ca; Akt1; Nos3; Ptprb* (humán *VE-PTP* gént reprezentálja)) logFC (log₂ transformed fold change) értéke is meghatározásra került. A többszörös tesztelésből adódó hibalehetőséget (FDR - hamis felfedezési arány) Benjamini-Hochberg korrekció számításával kompenzáltuk, $p < 0,05$ érték figyelembe vételével.

3.3.2. Neutrofil extracelluláris csapdák vizsgálata során alkalmazott statisztikai módszerek

A statisztikai elemzések az *R statisztikai program* segítségével kerültek kiértékelésre. A vizsgálati csoportok közötti különbségek feltárása egyszempontos varianciaanalízis (ANOVA) módszerével valósult meg, F-eloszlás használatával. Az ANOVA módszer két vagy több csoport átlagának összehasonlítására alkalmas. Az alcsoportok összehasonlítása Student-féle páros t-próbával történt, normál eloszlást feltételezve, melynek nullhipotézise alapján a csoportátlagok megegyeznek. A p-értékeket a hamis felfedezési arány korrekciója (FDR) érdekében Benjamini-Hochberg módszerrel korrigáltuk, amelyet követően csak a 0,05 alatti p-értéket tekintettünk statisztikailag szignifikánsnak. A NET-szintek és FEV1 értékek viszonyát Pearson-féle korrelációs együtthatójának kiszámításával értékeltük, mely a két változó közötti

kapcsolat erősségét mutatja. Az eredmények grafikus megjelenítéséhez szintén a már említett *R statisztikai programot* használtunk.

3.3.3. Cirkuláló lncRNS vizsgálatban alkalmazott biostatistikai módszerek

Génexpresszió analízis

A számítások *R statisztikai szoftver* segítségével készültek, melyben a normalizált RNS expresszió szintjét az alábbi képlet alapján számoltuk:

$$2^{-\Delta Ct}$$

$$\Delta Ct = Ct(\text{RNS}) - (Ct) \overline{(\text{normalizáló faktor})}$$

$Ct(\text{RNS})$: egy kiválasztott gén küszöbértéke

$(Ct) \overline{(\text{normalizáló faktor})}$: a normalizáló gének küszöbértékének számtani átlaga

A felfedező populációban alkalmazott előre elkészített specifikus Human RT2 lncRNA PCR Array panel 5 referencia génre (*ACTB*, *B2M*, *RPLP0*, *RN7SK*, *SNORA73A*) specifikus primerpárt tartalmazott. Az 5 referencia gén expressziós átlagát, mint normalizáló faktort használtuk a számítások során. A referencia gének közül validálásra a *B2M* és *RPLP0* géneket választottuk ki, mert ezek mutatták a legkisebb szórást a minták között. Az lncRNS expressziós különbségek a Limma csomag által kerültek kiértékelésre¹³⁹, amelyben minden egyes lncRNS-hez lineáris modellt illesztettünk a betegek alcsoportja alapján. Ezt követően a moderált t-statisztika értékét és a differenciális expresszió log-transzformált esélyét empirikus bayesi-moderáció segítségével számítottuk ki. A vizsgálat eredményeként kapott nominális p-értékeket többszörös hipotézisvizsgálási korrekciós módszerrel módosítottuk, Benjamini-Hochberg eljárást alkalmazva. Expressziós különbséget állapítottunk meg ott, ahol a korrigált p-érték 0,05 alatti értéket mutatott.

lncRNS-ek vizsgálata, mint diagnosztikai markerek

A hat kiválasztott lncRNS elemzése, mint diagnosztikai marker krónikus légúti betegségekben, Naïve Bayes-modelllek létrehozásával történt az *R szoftver e1071*

csomagjának használatával.¹⁴⁰ Az osztályozás a normalizált expressziós értékeken alapul különböző lncRNS-eket, illetve azok kombinációját figyelembe véve:

1. minden lncRNS önmagában
2. együtt a 6 lncRNS
3. csak azon lncRNS-ek figyelembe vétele, melyek az adott összehasonlításban szignifikánsan eltérő expressziót produkáltak

Mivel a páciensek száma jelentős szórást mutatott az alcsoportok között, az osztályozási modell során súlyozott pontosságot (weighted accuracy - WA) számoltunk az alábbi képlet szerint:

$$\text{weighted accuracy} = \frac{1}{2} \left(\frac{TP}{TP + FN} + \frac{TN}{TN + FP} \right)$$

ahol az összehasonlítás egyik csoportját „pozitívként”, míg a másik csoportot „negatívként” jellemeztük és a TP rövidítés (true positive) a valódi pozitív csoport tagjainak számára (hány esetben állította a modell egy pozitív esetről, hogy az pozitív), a TN a valódi negatív csoport tagjaira utal. FP a hamis (false) pozitív, FN pedig a hamis negatív esetek számát jelöli a tévesztési mátrixban. Ez a formula segít abban, hogy értékeljük az osztályok pontosságát és mintaszámtól függetlenül egyformán vegyük azokat figyelembe.

Minden modell esetén kiszámítottuk a tévesztési mátrix értékét egy keresztvalidációs sémával, úgynevezett „leave-one-out” elv alapján. Ebben a megközelítésben egy adott összehasonlításban kihagyunk egy mintát és az összes többi minta felhasználásával tanítottuk a modellt. Ezt követően megjósoltuk a kimaradt minta osztályát egy alapértelmezett 0,5-ös cut-off értékhatár segítségével, és összehasonlítottuk az adott minta előre jelzett osztálynevezésével. Ennek az eljárásnak minden egyes lépése megadott egy-egy elemet a tévesztési mátrixból, amely alapján a fent leírt módon kiszámítottuk a súlyozott pontosságot.

Az lncRNS-ek feltételezett funkcióinak előrejelzése

Először az lncRNS-gének hálózatát alakítottuk ki, három különböző adatbázis adatait összevetve: GTEx adatbázis (szövetspecifikus transzkripció adatok); LncTarD

adatbázis (kísérletesen validált lncRNS célgéneket tartalmaz); STRING adatbázis (fehérje-fehérje interakciós adatok). A létrehozott hálózat csomópontjai géneket (lncRNS, kódoló és nem-kódoló géneket), a csomópontokat összekötő élek pedig funkcionális kapcsolatot képviselnek. Ezután a hat lncRNS mindegyikéből indítottunk hálózati terjedési algoritmust, véletlenszerű sétát újraindítással, az egyes lncRNS-ek által szabályzott gének kvantitatív rangsorolására. Ezt követően génhalmaz feldúsulási elemzést (Gene set enrichment analysis - GSEA) végeztünk a funkcionálisan releváns útvonalak és a Gene Ontology (GO) kifejezések azonosítására.

A statisztikai számítások Dr. Gézsi András segítségével valósultak meg.

4. Eredmények

4.1. Tie2 útvonal és a *TEK* gén szerepének vizsgálata

A projekt során a Tie2 útvonal és a *TEK* gén variációinak összefüggését vizsgáltuk asztmával és allergiás conjunctivitisszel. A vizsgálat első fázisában a DesensIT (felnőtt allergiás rhinitis) populációban vizsgáltuk a *TEK* génben található SNP-k asszociációját conjunctivitisszel és asztmával, majd az eredmények kiértékelését követően a kísérlet második szakaszában 6 SNP validálására került sor egy bővebb populációban, mely felnőtt és gyermek asztmás minták mellett egészséges kontroll mintákat is tartalmazott. Ezt követően asztma-egér modell segítségével nyert minták génexpressziós mintázatát vizsgáltuk meg azon géneket figyelembe véve, melyek az Angiopoietin-Tie2 útvonalban szerepet játszanak.

4.1.1. Felfedező kohorsz: Teljes genom asszociációs vizsgálat felnőttkori allergiás rhinitisben

A felfedező vizsgálat során teljes genom asszociációs vizsgálat eredményeit elemeztük olyan betegekből álló vizsgálati csoportban, amely diagnosztizált mérsékelt súlyos, illetve súlyos parlagfű allergiás páciensekből állt.²³ A populáció jellegzetességei és adatai a 10. táblázatban láthatók. GWAS során a *TEK* génben 112 SNP genotipizálása valósult meg, majd a 3.3.1. fejezetben részletezett kritériumok miatt végül 104 SNP-t vizsgáltunk conjunctivitisszel és asztmával kapcsolatban. A felnőtt allergiás vizsgálati csoport 75,8%-a conjunctivitisben, 22,1%-a asztmában szenvedett, mint társbetegség.

Először az allél és genotípus eloszlásokat vizsgáltuk azon személyekben, akik a conjunctivitis jellegzetes tüneteit mutatták, összehasonlítva azon páciensekkel, akik ilyen tünetekkel nem rendelkeztek, majd több szempontot is figyelembe véve az 5 legerősebb (nominálisan szignifikáns) asszociációt mutató SNP-t kiválasztottuk validálásra. Az allélfrekvenciák összehasonlításának eredményeit a 15. táblázat tartalmazza. A conjunctivitisszel rendelkező vs. nem rendelkező betegek közötti allélfrekvenciák összehasonlításában összesen 6 SNP érte el a korrigálatlan szignifikancia szintet, ahol a p-érték <0,05. Az rs1590254 SNP kizárásra került, mert a kontroll és eset csoportban is

közel 0%-os gyakorisággal fordult elő. A legalacsonyabb p-értéket ($p=0,0048$) az rs7034505 SNP esetében kaptuk.

15. táblázat. Allélfrekvencia vizsgálat nominálisan szignifikáns eredményei conjunctivitisszel összefüggésben

SNP	Asszociáló allél	Eset; Kontroll csoport frekvenciái	Khí-négyzet próba	p-érték
rs622232	A	0,444; 0,321	3,919	0,0477
rs7034505	A	0,492; 0,330	7,966	0,0048
rs994934	C	0,271; 0,160	4,285	0,0384
rs3739542	C	0,342; 0,217	4,7	0,0302
rs638203	G	0,667; 0,409	5,03	0,0249
rs1590254	T	0,055; 0,000	5,999	0,0143

A genotípuseloszlás elemzése során az eredmények alapján megvizsgáltuk a *TEK* gén kapcsoltági egyenlőtlenség (LD) térképét is, mely alapján összesen 17 haplotípust azonosítottunk, és tanulmányoztuk azok conjunctivitishez való lehetséges asszociációját, azonban az elemzés során egyetlen haplotípus sem mutatott összefüggést.

A genotípus vizsgálatok során recesszív (R; 22 vs. 12+11 genotípusok, ahol a 2 a kockázati allélt jelenti); domináns (D; 22+12 vs. 11) és additív (A; 11 vs. 12 vs. 22) modellt alkalmaztunk. Domináns modellnek nevezzük azt, ha az allélváltozat már egy kópia jelenlétében is befolyásolja a fenotípust, tehát heterozigóta és homozigóta formában egyaránt kifejti hatását. Recesszív modell esetén az allélvariáns két kópiában való jelenlétére van szükség a hatás kiváltásához, míg additív modell esetén az allélok hatása összeadódik.

Jelen esetben 15 modell (16. táblázat) érte el a korrigálatlan szignifikanciaszintet és a legerősebb asszociációt az rs638203 mutatta recesszív modell esetén ($p=0,006$; OR (odds ratio/esélyhányados)= 7,8 (95% CI (konfidencia intervallum): 1,80-33,77)). Kiemelve láthatóak azok a génvariációk, amelyeket további analízisre választottunk ki.

16. táblázat. Genotípus vizsgálat során kapott nominálisan szignifikáns eredmények (conjunctivitisben), Modell: R-recesszív A-additív D-domináns, OR: odds ratio/esélyhányados, CI: konfidencia intervallum, kiemelve láthatóak a validálásra kiválasztott SNP-k

SNP	Fenotípus	Modell	OR	CI	p-érték
rs638203	Conjunctivitis	R	7,8	1,80-33,77	0,00601
rs7034505	Conjunctivitis	A	1,85	1,17-2,94	0,00857
rs7034505	Conjunctivitis	D	2,28	1,18-4,43	0,01471
rs7873161	Conjunctivitis	R	3,00	1,17-7,67	0,02178
rs6475966	Conjunctivitis	R	2,97	1,17-7,55	0,0224
rs4601425	Conjunctivitis	A	0,58	0,36-0,93	0,02312
rs622232	Conjunctivitis	D	2,13	1,11-4,08	0,02351
rs12554723	Conjunctivitis	R	0,33	0,12-0,91	0,03136
rs1590254	Conjunctivitis	A	4,35	1,11-16,98	0,03446
rs1014049	Conjunctivitis	D	2,00	1,05-3,82	0,03599
rs7873161	Conjunctivitis	A	1,62	1,03-2,54	0,03734
rs3739542	Conjunctivitis	R	3,02	1,06-8,56	0,03814
rs3739542	Conjunctivitis	A	1,60	1,01-2,51	0,04352
rs4601425	Conjunctivitis	R	0,44	0,19-0,99	0,04593
rs994934	Conjunctivitis	A	1,86	1,01-3,41	0,04677

Az eredmények alapján az alábbi 5 SNP került kiválasztásra: rs3739542; rs994934; rs622232; rs638203; rs7034505 amelyeket egy kibővített vizsgálati csoportban elemeztünk tovább.

A conjunctivitis vizsgálatához hasonló genotípuseloszlás elemzésére sor került (17. táblázat) asztmával kapcsolatban is, ahol egyetlen variáció (rs3824410) mutatott nominálisan szignifikáns értéket két esetben is, melyek az additív és a domináns modell voltak. Emellett az allélfrekvenciák tekintetében, ezen variációban szignifikáns eltérés volt kimutatható az asztmás és nem asztmás populáció között ($p = 0,008$; $OR = 0,51$ (95% CI: 0,30-0,84)). Ezen eredmények alapján az SNP ritka (T) alléljának hordozása az allergiás populációban közel felére csökkentheti az asztma kialakulásának kockázatát. Az

rs3824410 variáns, mint hatodik SNP további asszociációs vizsgálatra lett kiválasztva az előzőekben felsorolt 5 SNP mellett.

17. táblázat. Genotípus vizsgálat során kapott nominálisan szignifikáns eredmények (asztmában), Modell: A-additív D-domináns, OR: odds ratio/esélyhányados, CI: konfidencia intervallum

SNP	Fenotípus	Modell	OR	CI	p-érték
rs3824410	Asztma	A	0,49	0,29-0,83	0,00775
rs3824410	Asztma	D	0,51	0,29-0,90	0,02068

A kiválasztott SNP-k genotípus eloszlása, a Hardy-Weinberg egyensúly, call rate és kockázati allél frekvencia értékei (RAF), a szignifikanciaszintek az asszociáló fenotípussal (p-érték), illetve egyéb tulajdonságok a 18. táblázatban láthatóak. Az összes SNP genotípuseloszlása megfelelt a HWE-nek, így a variációk alkalmasak a további értékelésre.

18. táblázat. GWAS során kapott, validálásra kiválasztott SNP-k tulajdonságai és eredményei, Call Rate:a genotipizálás sikeressége, RAF: risk allele frequency, HWE: Hardy-Weinberg egyensúly, Genotípus 11; 12; 22: ahol 2 a ritka allélnak felel meg

SNP	Allél	Pozíció	Funkció	Call Rate	HWE p-érték	Genotípus 11 (%)	Genotípus 12 (%)	Genotípus 22 (%)	RAF	p-érték
rs7034505	A/G	chr9:27151396	intron	98,56	0,6955	52,4496	38,3285	7,7810	0,5336(G)	0,0086
rs3739542	T/G	chr9:27172840	intron	98,56	0,1371	4,0346	38,3285	56,1960	0,2734(G)	0,0233
rs994934	A/G	chr9:27170310	intron	98,85	0,3610	34,2940	45,8213	18,7320	0,2354(G)	0,0304
rs622232	C/T	chr9:27118709	intron	99,42	0,9519	28,8184	49,5677	21,0375	0,4213(T)	0,0222
rs638203	C/T	chr9:27203136	intron	98,56	0,3162	22,7666	46,3977	29,3948	0,5391(T)	0,0060
rs3824410	G/T	chr9:27173062	intron	100	0,5688	61,3833	34,5821	4,0346	0,2133(T)	0,0078

4.1.2. Replikációs kohorsz: Gén asszociációs vizsgálat felnőtt- és gyermekkori asztmában

A vizsgált populáció adatai a 11. táblázatban tekinthetők meg részletesen. Először a kiválasztott SNP-k asszociációját vizsgáltuk gyermek- és felnőttkori asztmával (19. táblázat), majd conjunctivitisszel (20. táblázat) kapcsolatban. A conjunctivitis, mint társbetegség csupán gyermekkori asztmában került elemzésre, a felnőttkori asztmában jelenlévő csekély esetszám ($n=8$) miatt ezt a csoportot kizártuk az analízisből. Ahogyan a táblázatokból látható egyik allél sem mutatott direkt összefüggést a fenotípusokkal a beteg vs. egészséges kontroll összehasonlítások során.

19. táblázat. A replikációs kohorsz során végzett gén asszociációs vizsgálat eredményei asztmában, MAF: minor allél frekvencia, Genotípus 11: gyakori allélra homozigóták; Genotípus 12: heterozigóták; Genotípus 22: kockázati allélra nézve homozigóták, OR: odds ratio/esélyhányados, CI: konfidencia intervallum

	SNP	Fenotípus	MAF	Genotípus 11	Genotípus 12	Genotípus 22	Allélfrekvencia különbségek	
				n(%)	n(%)	n(%)	p	OR (95% CI)
Gyermekkor asztma	rs7034505	Jelen	0,47	56 (26)	114 (54)	42 (20)	0,51	0,93 (0,74-1,16)
		Hiányzik	0,49	132 (27)	247 (50)	118 (23)		
	rs3739542	Jelen	0,3	120 (51)	92 (39)	24 (10)	0,44	0,91 (0,72-1,16)
		Hiányzik	0,32	235 (46)	226 (45)	48 (9)		
	rs994934	Jelen	0,23	132 (58)	86 (38)	9 (4)	0,91	1,02 (0,78-1,32)
		Hiányzik	0,23	294 (59)	181 (36)	22 (5)		
	rs622232	Jelen	0,46	58 (32)	80 (44)	43 (24)	0,56	0,93 (0,73-1,19)
		Hiányzik	0,48	119 (26)	250 (54)	97 (20)		
	rs638203	Jelen	0,5	58 (26)	111 (49)	56 (25)	0,41	1,10 (0,88-1,37)
		Hiányzik	0,47	140 (28)	256 (50)	112 (22)		
	rs3824410	Jelen	0,21	152 (64)	71 (30)	14 (6)	0,42	1,12 (0,85-1,47)
		Hiányzik	0,19	317 (66)	141 (29)	21 (5)		
Felnőttkor asztma	rs7034505	Jelen	0,49	52 (24)	119 (55)	47 (21)	0,93	1,01 (0,77-1,32)
		Hiányzik	0,49	52 (25)	112 (53)	46 (22)		
	rs3739542	Jelen	0,28	120 (52)	92 (40)	18 (8)	0,75	1,05 (0,78-1,41)
		Hiányzik	0,27	112 (52)	89 (42)	13 (6)		
	rs994934	Jelen	0,23	136 (61)	70 (32)	16 (7)	0,19	1,25 (0,89-1,75)
		Hiányzik	0,19	123 (64)	64 (33)	5 (3)		
	rs622232	Jelen	0,46	57 (26)	123 (56)	38 (18)	0,37	1,14 (0,86-1,05)
		Hiányzik	0,43	58 (30)	107 (55)	29 (15)		
	rs638203	Jelen	0,45	47 (21)	112 (49)	70 (30)	0,23	1,18 (0,90-1,54)
		Hiányzik	0,49	55 (26)	95 (45)	59 (29)		
	rs3824410	Jelen	0,2	147 (66)	71 (31)	9 (3)	0,22	1,26 (0,87-1,83)
		Hiányzik	0,16	116 (69)	48 (29)	3 (2)		

20. táblázat. Gén asszociációs vizsgálat allergiás conjunctivitisszel a replikációs kohorszban, MAF: minor allél frekvencia, Genotípus 11: gyakori allélra homozigóták; Genotípus 12: heterozigóták; Genotípus 22: kockázati allélra nézve homozigóták, OR: odds ratio/ esélyhányados, CI: konfidencia intervallum

	SNP	Fenotípus	MAF	Genotípus 11	Genotípus 12	Genotípus 22	Allél-frekvencia különbségek	
				n(%)	n(%)	n(%)	p	OR (95% CI)
Allergiás conjunctivitis	rs7034505	Jelen	0,44	21 (31)	34 (50)	13 (19)	0,337	0,84 (0,59-1,20)
		Hiányzik	0,48	167 (26)	327 (51)	147 (23)		
	rs3739542	Jelen	0,31	43 (49)	35 (40)	10 (11)	0,941	1,01 (0,56-1,44)
		Hiányzik	0,31	312 (47)	283 (43)	62 (10)		
	rs994934	Jelen	0,25	41 (56)	27 (37)	5 (7)	0,425	1,17 (0,80-1,74)
		Hiányzik	0,22	385 (59)	240 (37)	26 (4)		
	rs622232	Jelen	0,54	12 (21)	29 (50)	17 (29)	0,105	1,37 (0,94-2,01)
		Hiányzik	0,46	165 (28)	301 (51)	123 (21)		
	rs638203	Jelen	0,46	23 (31)	35 (47)	17 (22)	0,613	0,92 (0,65-1,29)
		Hiányzik	0,48	175 (27)	332 (50)	151 (23)		
	rs3824410	Jelen	0,22	51 (60)	31 (36)	3 (4)	0,469	1,16 (0,78-1,71)
		Hiányzik	0,19	418 (66)	181 (29)	32 (5)		

Azonban amikor a gyermekkori asztmás populáción belül vizsgáltuk az rs622232 SNP-t, annak ritka allélja összefüggést mutatott conjunctivitisszel ($p = 0,027$; OR = 1,65 (95% CI: 1,06-2,57)), míg amikor a két nemet külön vizsgáltuk, az rs622232 variáció csak fiúkban asszociált conjunctivitisszel mégpedig domináns ($p=0,004$; OR =4,76 (95% CI: 1,54-14,75)) és allélikus módon is (21. táblázat). Ezzel ellentétben szintén különválasztva a nemeket, az rs7034505 SNP ritka alléljának hordozása 2,43-szorosára növeli a conjunctivitis kialakulásának valószínűségét lányokban. Ezen SNP ritka alléljára nézve

homozigóta [GG] személyek 5,46-szoros kockázati értékkel rendelkeznek conjunctivitisre, mint a gyakori allélra nézve homozigóták [AA].

21. táblázat. Asszociációs vizsgálat szignifikáns eredményei és statisztikai adatai allergiás conjunctivitisszel a replikációs kohorszban
 MAF: minor allél frekvencia, Genotípus 11: gyakori allélra homozigóták; Genotípus 12: heterozigóták; Genotípus 22: kockázati allélra nézve homozigóták; OR: odds ratio/ esélyhányados, CI: konfidencia intervallum, nominálisan szignifikáns értékek pirossal jelölve

Fenotípus		SNP	Fenotípus	MAF	Genotípus 11	Genotípus 12	Genotípus 22	Allél-frekvencia különbségek		Recesszív modell 11 + 12 vs. 22		Domináns modell 11 vs. 12 + 22		11 vs. 22	
					n(%)	n(%)	n(%)	p	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)
Allergiás conjunctivitis	Fiú	rs622232	Jelen	0,57	4 (12)	21 (62)	9 (26)	0,024	1,92 (1,09-3,04)	0,533	1,34 (0,53-3,37)	0,004	4,76 (1,54-14,75)	0,027	4,13 (1,11-15,29)
			Asztma conjunctivitis nélkül	0,41	33 (39)	34 (40)	18 (21)								
	Lány	rs7034505	Jelen	0,67	3 (12)	11 (42)	12 (46)	0,012	2,43 (1,20-4,90)	0,034	2,96 (1,06-8,12)	0,066	3,38 (0,88-13,02)	0,019	5,46 (1,24-24,10)
			Asztma conjunctivitis nélkül	0,46	15 (31)	21 (47)	11 (22)								

22. táblázat. Asszociációs tesztek szignifikáns eredményei asztmával a replikációs kohorszban, MAF: minor allél frekvencia, Genotípus 11: gyakori allélra homozigóták; Genotípus 12: heterozigóták; Genotípus 22: kockázati allélra nézve homozigóták, OR: odds ratio/ esélyhányados, CI: konfidencia intervallum, nominálisan szignifikáns értékek pirossal jelölve

Fenotípus		SNP	Fenotípus	MAF	Genotípus 11	Genotípus 12	Genotípus 22	Allél-frekvencia különbségek		Recesszív modell 11 + 12 vs. 22		Domináns modell 11 vs. 12 + 22		11 vs. 22	
					n(%)	n(%)	n(%)	p	OR(95% CI)	p	OR(95% CI)	p	OR(95% CI)	p	OR(95% CI)
Felnőtt asztma	Allergiás nem-	rs3824410	Súlyos	0,16	70 (71)	26 (26)	3 (3)	0,009	0,48 (0,27-0,84)	0,086	0,29 (0,07-1,28)	0,022	0,45 (0,22-0,90)	0,041	0,23 (0,05-1,04)
			Enyhe	0,29	27 (52)	20 (38)	5 (10)								
	Allergiás	rs3824410	Súlyos	0,15	22 (73)	7 (23)	1 (4)	0,026	0,39 (0,17-0,91)	0,283	0,31 (0,03-2,93)	0,03	0,33 (0,12-0,91)	0,155	0,22 (0,02-2,10)
			Enyhe	0,31	19 (48)	17 (42)	4 (10)								

A felnőtt asztmás populációt vizsgálva, az rs3824410 SNP ritka alléljának hordozása negatívan asszociált a súlyos asztma kialakulásval, tehát csökkentette kialakulásának valószínűségét (domináns modell: $p=0,022$; OR = 0,45 (95% CI: 0,22-0,90)). Amikor tovább szűkítettük a vizsgálati csoportot a felnőtt allergiás asztmás páciensekre, a rs3824410 variáció ritka allélja szintén alacsonyabb rizikóval asszociált súlyos asztmára allélikus szinten és domináns módon egyaránt (22. táblázat).

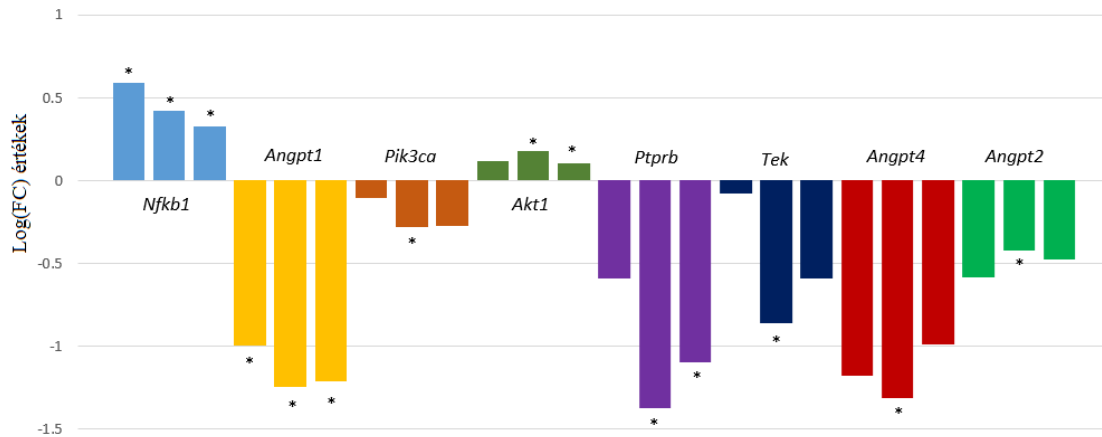
A hat kiválasztott SNP között szintén vizsgáltuk a kapcsoltsági egyenlőtlenség mértékét, azonban ezek nem voltak LD-ben egymással (a maximális $r^2=0,11$ volt az SNP-párok között), ezért nem végeztünk haplotípuselemzést.

4.1.3. Angiopietin-Tie2 út lehetséges szerepének vizsgálata az asztma egérmodelljében

Az asztma-egér modell részletes leírása és a tüdő szövettani változása a 3.2.7. fejezetben, illetve Tölgyesi és munkatársai által publikált közleményben¹³⁸ olvashatóak. Röviden, a 0. és 14. napon történő intraperitoneális OVA szenzitizáció, majd a 28. napon bekövetkező allergén inhaláció markáns neutrofil granulocita és makrofág infiltrációt idézett elő, ami az első csoportba tartozó egerek BALF (bronchoalveolaris lavage folyadék) mintáiból kimutatható volt. A kezdeti neutrofil gyulladás gyengült a szenzitizáció során, majd a folyamat végére szinte teljesen eltűnt (3. csoport mintájának analízise alapján) és helyét Th2-es típusú eozinofil légúti gyulladás és hiperreaktivitás vette át. A 31. napon, a 3. csoportba tartozó egerek légúti ellenállás vizsgálatakor metakolin indukált AHR volt kimutatható az asztma-egér modelleken a kontrollokhöz képest.

Az OVA szenzitizált állatokból álló csoport mintáiból microarray segítségével 44.000 transzkriptom génexpressziós elemzését végeztük el, majd összehasonlítottuk a megfelelő kontrollokkal. Az 1. csoportban 533, a 2. csoportban 1554, a 3. csoportban pedig 1134 transzkriptom mutatott szignifikánsan eltérő, több mint kétszeres expressziós szintet a kontrollcsoporthoz viszonyítva.¹³⁸

Célunk az Angiopoietin-Tie2 útvonal résztvevőinek génexpressziós vizsgálata volt a feltételezett asztmában betöltött szerepük felderítése érdekében. Összesen 10 gén mintázatát vizsgáltuk a 3 OVA szenzitizált csoportban és a hozzájuk tartozó kontrollokban: *Angpt1*; *Angpt2*; *Angpt4*; *Tek*; *Nfkb1*; *Kdr*; *Pik3ca*; *Akt1*; *Nos3*; *Ptprb*.



5. ábra. Asztma-egér modell génexpresszió változásának vizsgálata (logFC) az első, második és harmadik OVA szenzitizált csoportban (sorrendben) a megfelelő kontrollcsoporthoz viszonyítva (azon gének vannak feltüntetve, melyek legalább egy összehasonlítás során szignifikáns eltérést mutattak), *szignifikáns eredmény

Az egyes génekhez tartozó logFC értékek az expressziós szint különbségét szemléltetik szenzitizált és kontrollcsoportok között. Az 5. ábrán azokat a géneket és logFC értékeiket ábrázoltuk, melyek legalább egy összehasonlításban szignifikánsan eltérő expressziót mutattak (csillaggal jelölt). Összességében a 10 gén közül 8 mutatott szignifikáns változást az expressziós szintet tekintve az asztma kiváltásának folyamata során. Számszerűsítve, a logFC és a korrigált p-értékek a 23. táblázatban láthatóak. Az értékek alapján megállapítható, hogy két kivétellel (*Nfkb1* és *Akt1*) az összes ábrázolt Tie2 útvonalban szerepet játszó gén kifejeződése csökkent a légúti hiperreaktivitás és az eozinofil granulocita infiltrációjának kialakulása során. A *Tek* gén expressziója a megfelelő kontrollcsoporthoz képest az 1. csoportban mérsékelten csökkent, míg a 2. csoportban már szignifikáns csökkenést mutatott és szintén alacsonyabb (bár nem szignifikáns) szinten maradt a 3. csoportban. Az *Angpt1* gén expressziója minden csoportban statisztikailag szignifikánsan csökkent, míg az *Nfkb1* gén expressziója minden csoportban szignifikáns növekedést mutatott. Ez megfelel annak a megfigyelésnek, hogy a *Tek* és *Angpt1* gének termékei csökkentik az *Nfkb1* expresszióját. Az *Nfkb1* gén az NF-

κ B transzkripciós faktor DNS-kötő részét kódolja, ami egy központi fehérje és számos immunfolyamatban részt vesz, többek között a tüdő asztmatikus gyulladásában is.^{141,142}

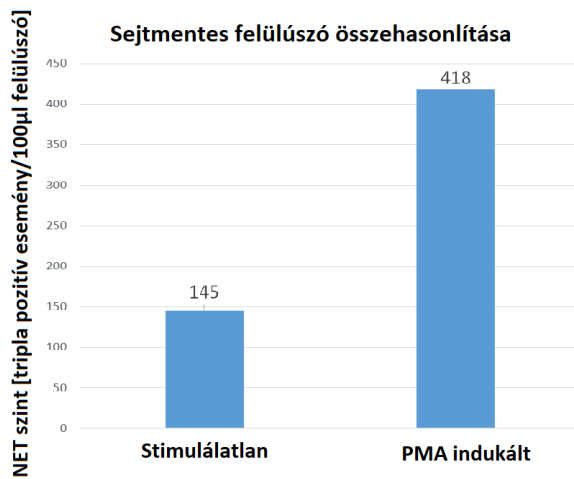
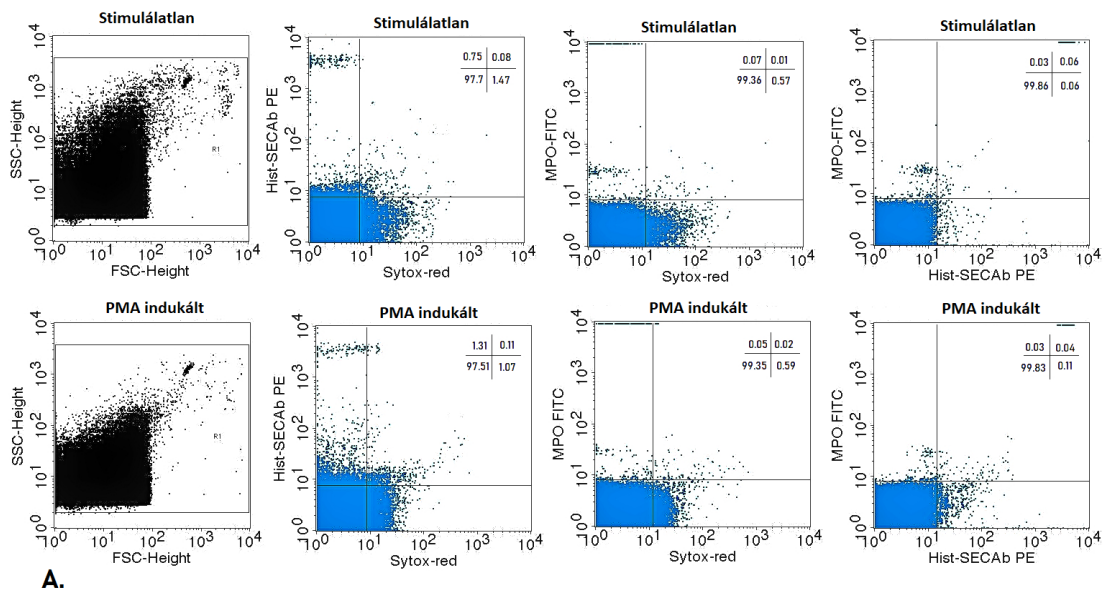
23. táblázat. Asztma-egér modell génexpresszió változásának vizsgálata során kapott eredmények (logFC, p-érték) az első, második és harmadik csoportban, kontrollcsoporthoz viszonyítva, a szignifikáns értékek pirossal jelölve

Csoport	logFC	korrigált p-érték	Gén neve
1	0,034805	0,167901	<i>Akt1</i>
2	0,052775	0,009645	<i>Akt1</i>
3	0,03155	0,030493	<i>Akt1</i>
1	-0,30075	0,032256	<i>Angpt1</i>
2	-0,37575	0,008514	<i>Angpt1</i>
3	-0,365	0,045447	<i>Angpt1</i>
1	-0,17573	0,080876	<i>Angpt2</i>
2	-0,128	0,008374	<i>Angpt2</i>
3	-0,14298	0,052	<i>Angpt2</i>
1	-0,35508	0,191889	<i>Angpt4</i>
2	-0,396	0,040605	<i>Angpt4</i>
3	-0,29725	0,051073	<i>Angpt4</i>
1	0,017775	0,48862	<i>Kdr</i>
2	0,1125	0,310027	<i>Kdr</i>
3	0,19075	0,171927	<i>Kdr</i>
1	0,17725	0,020069	<i>Nfkb1</i>
2	0,12625	0,004575	<i>Nfkb1</i>
3	0,09875	0,032251	<i>Nfkb1</i>
1	0,061975	0,204722	<i>Nos3</i>
2	-0,02388	0,520578	<i>Nos3</i>
3	-0,03393	0,267752	<i>Nos3</i>
1	-0,03231	0,245533	<i>Pik3ca</i>
2	-0,08423	0,004147	<i>Pik3ca</i>
3	-0,08328	0,06416	<i>Pik3ca</i>
1	-0,17775	0,057825	<i>Ptprb</i>
2	-0,41375	0,004996	<i>Ptprb</i>
3	-0,33075	0,039282	<i>Ptprb</i>
1	-0,02339	0,546839	<i>Tek</i>
2	-0,2585	0,004631	<i>Tek</i>
3	-0,17913	0,061841	<i>Tek</i>

4.2. Neutrofil extracelluláris csapdák vizsgálata

4.2.1. Áramlási citométer alapú technika kísérleti beállítása

A kísérleti beállításhoz szorosan hozzátartozott a pozitív kontroll beállítása, tehát annak vizsgálata, hogy mérhetőek-e a neutrofil extracelluláris csapdák áramlási citométerrel, milyen kapuzási technika szükséges, illetve milyen mintázatot kapunk a jelenlétük esetén. Ehhez PMA indukált és indukálatlan neutrofil granulocita sejteket használtunk, melyeket friss vérmintából izoláltunk. Centrifugálást követően kinyertük a sejtmentes felülúszót, majd összehasonlítottuk a kezelt és kezeletlen sejtek felülúszójának NET tartalmát a 3.2.9. fejezetben említett festési és jelölési lépéseket követően. Három különböző jelölést használtunk: anti-MPO antitestet, citrullinált-hisztin ellenes antitestet, valamint egy Sytox Red nevű DNS festéket. A 6A. ábrán a mérés során kapott dot plot-ok láthatóak, amelyek első ábráján a mintában található mikrovezikula nagyságot megközelítő képződmények méret és granuláltság szerinti eloszlásban láthatóak, míg a többi ábrán két jelölés egyidőben történő detektálásának eredménye figyelhető meg (a kettős pozitív események a jobb felső kvadránsban láthatóak). Könnyen belátható, hogy a dupla pozitív értékek halmazában nincs szabad szemmel észrevehető különbség, míg a hármas pozitív események megjelenítése során (6B. ábra) közel háromszoros NET-szint különbség fedezhető fel a kezelt és kezeletlen sejtek felülúszója között. Ezen megfigyelés eredményeképpen, vizsgálataink során csak a hármas pozitív eseményeket vettük figyelembe.

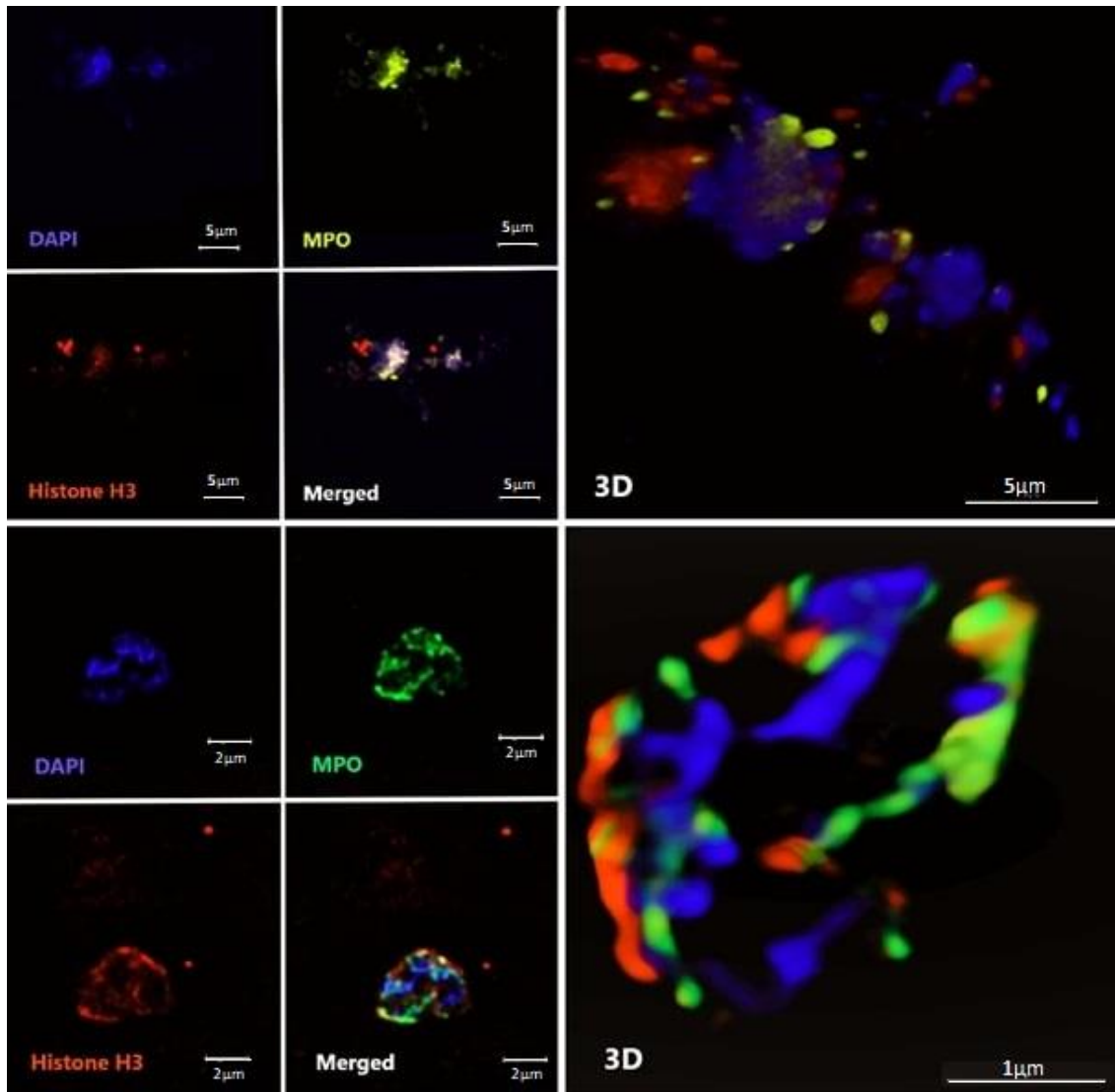


6. ábra. Az áramlási citométer műszeres és kísérletes beállítása során kapott eredmények, **A.** A kettős pozitív eseményeket mutató dot blot-ok, **B.** Hármás pozitív események száma stimulátlan és PMA indukált mintában

4.2.2. NET-ek megjelenítése konfokális lézer-pásztázó mikroszkóp segítségével

A neutrofil extracelluláris csapdák jelenlétét (nem PMA indukált) plazma mintákban egy független módszer segítségével is igazolni akartuk. Elsőként ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) módszert dolgoztunk ki, viszont ezzel a módszerrel legfeljebb két NET alkotót tudtunk egyszerre mérni és a FACS mérés alapján ez nem tűnt megbízhatónak, ezért a jelenlétük igazolására konfokális lézer-pásztázó mikroszkópot használtunk. Számos tudományos cikkben vizualizálták a neutrofil csapdákat izolált, majd ezt követően stimulált neutrofil granulociták által előidézve, azonban jelen tudásunk szerint sejtmentes plazma mintából indukációs lépés nélkül megjelenített NET még nem került publikálásra.

Két mintát vizsgáltunk meg, egy asztmás és egy egészséges kontroll személytől származó plazma mintát. A minták feldolgozása során ugyanazon célpontok jelölése történt meg, mint az áramlási citométerrel történő mérés esetén. A NET jelenlétét akkor tekintettük igazoltnak, ha a 3 jelölés (citrullinált hiszton, MPO, DNS) átfedett egymással. Az alábbi (7. ábra) ábrán kézzel jelenítettük meg a DAPI festék kötődését, ami a DNS tartalomra utal; pirossal a citrullinált hiszton jelenlétét, míg sárga és zöld színnel az MPO tartalom látható. A NET-ek 3 dimenzióban való ábrázolása az ábra jobb oldalán látható. Az eredmények alapján a NET jelenlétét stimulálatlan sejtmentes plazma mintákban igazoltnak tekinthetjük.

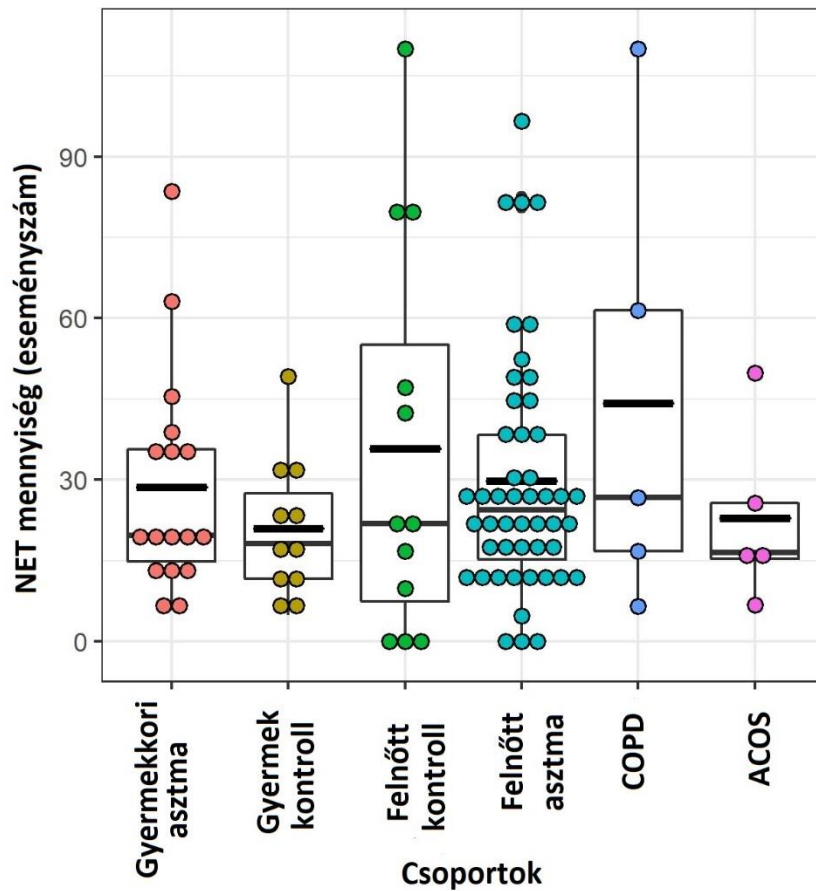


7. ábra. Neutrofil extracelluláris csapdák konfokális lézer-pásztázó mikroszkóp segítségével megjelenítve, Histone H3, DAPI, MPO: jelölések külön ábrázolva, Merged: a jelölések együtt megjelenítve, 3D: három dimenziós megjelenítés

4.2.3. Humán plazma minták NET-szintjének összehasonlítása

A vizsgálat során elemzett mintákat 6 csoportba soroltuk: felnőtt és gyermekkori asztma, felnőtt és gyermek kontroll, COPD, valamint ACOS. Először a különböző csoportokba tartozó minták NET-szintjének átlagát hasonlítottuk össze (8. ábra), azonban a csoportátlagok nem tértek el egymástól szignifikánsan. Érdekes módon a felnőtt kontrollcsoport mutatta a legnagyobb szórást, ami alapján feltételezhetjük, hogy az egészséges emberek véráramában is találhatóak cirkuláló NET-ek, egyes esetekben egészen nagy mennyiségben. Ennek egy feltételezett okai lehetnek az ún. silent infekciók,

amelyek aktiválják a veleszületett immunrendszert, beleértve a NETóvizist, elősegítve ezzel a kórokozó ágens eliminációját a tünetek megjelenése nélkül.

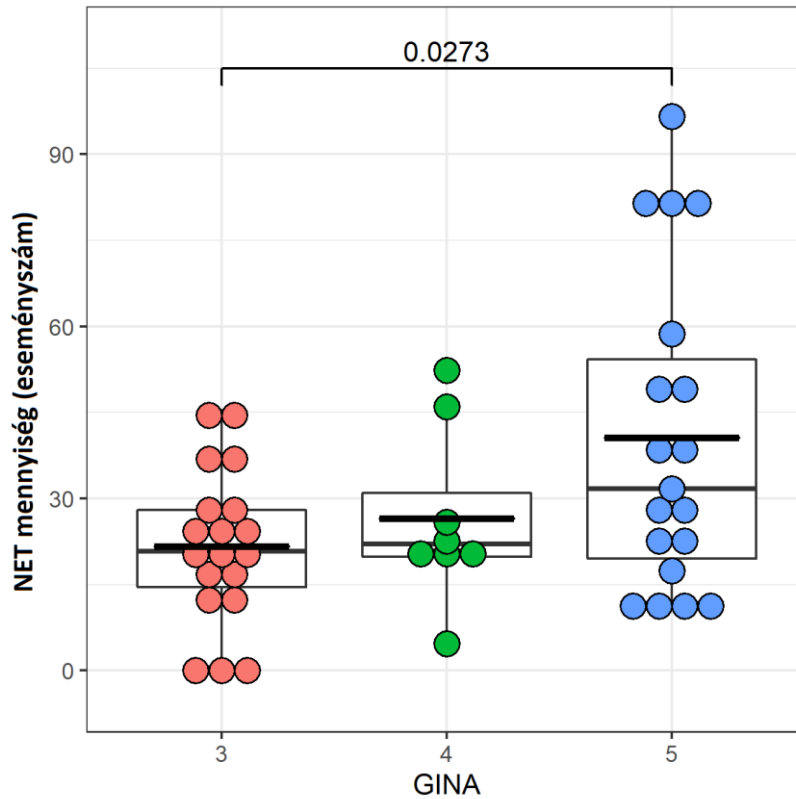


8. ábra. A NET mennyisége mintánként és az egyes csoportokban (csoportátlagokkal)

Ezt követően azt vizsgáltuk meg, hogy az egyes alcsoportok között van-e NET-szintekben mérhető különbség asztma státusz (GINA), kontrollálhatóság, FEV1 érték, illetve gyógyszeres kezelés függvényében.

A GINA irányelveit követve, az asztmás pácienseket a tünetek súlyossága és a betegség terápiája alapján 5 csoportra osztottuk (kezelőorvos besorolása alapján). A betegek jelentős hányada GINA3, 4, illetve 5 kategóriába volt besorolható, ezért ez az összehasonlítás látható az ábrán is (9. ábra). Az általunk vizsgált populációban 19 ember került GINA3 besorolású csoportba, 8 GINA4 kategóriába és 19 személy tartozott a GINA5 kategóriába (14. táblázat). A GINA csoportok közötti átlag NET mennyiségeket hasonlítottuk össze, és ahogy a 9. ábrán is látható a súlyossággal parallel emelkedő NET

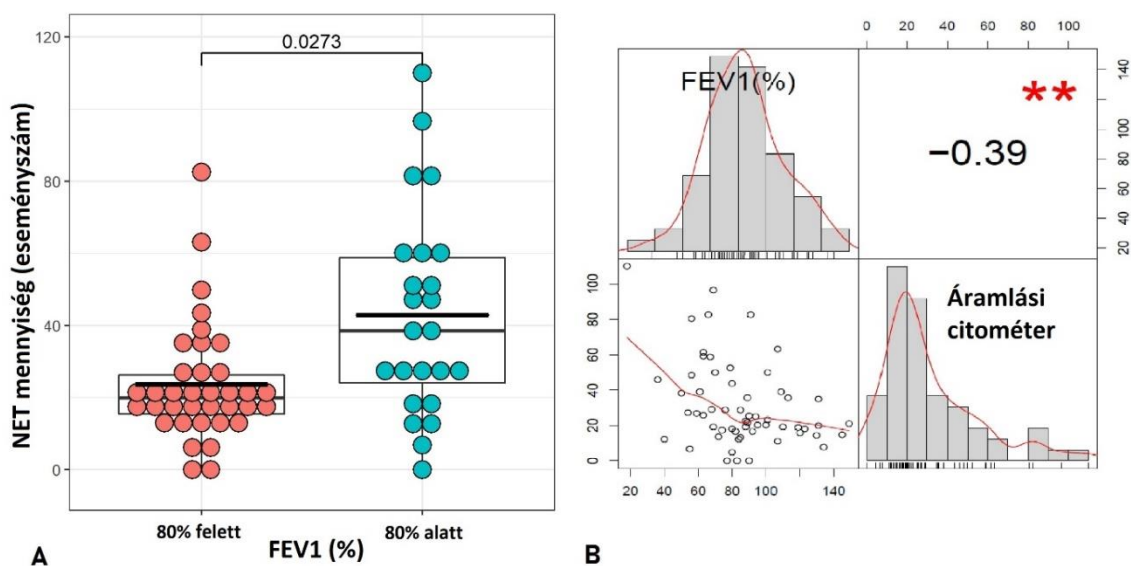
átlagértékeket kaptunk, illetve a GINA3 és 5 besorolás között szignifikáns eltérést tapasztaltunk (korrigált $p=0,027$).



9. ábra. Az asztmás páciensek NET-szintjének alakulása GINA besorolás alapján, GINA: Global Initiative for Asthma

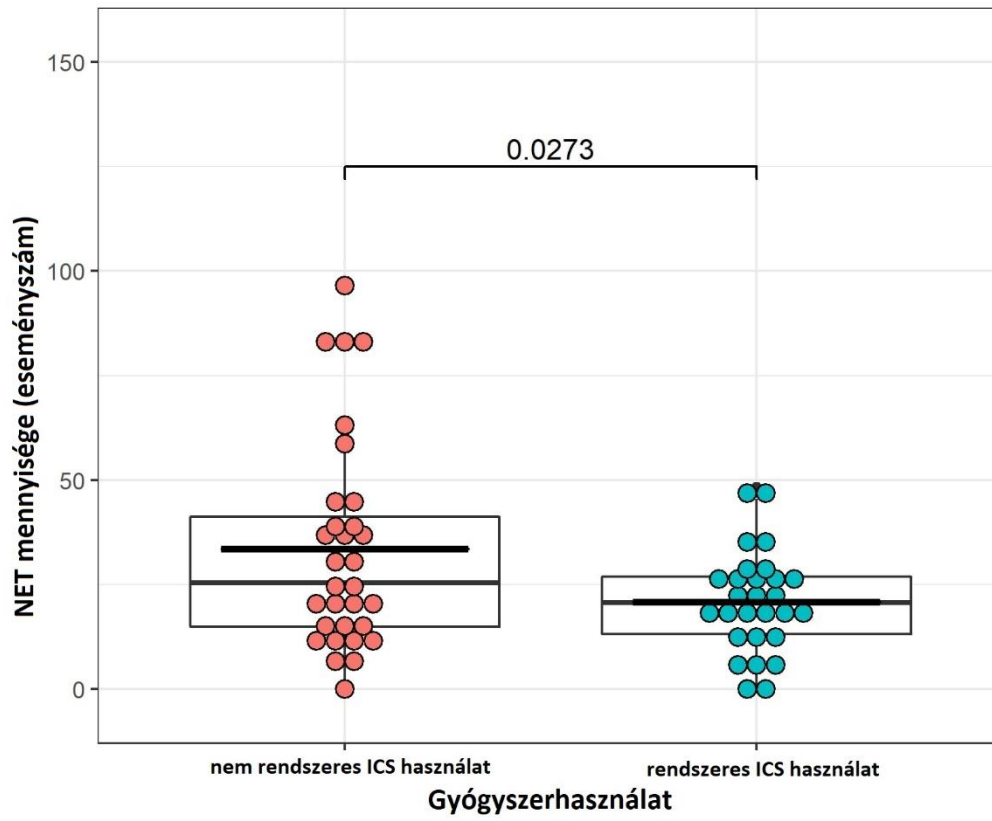
Ezt követően a kontrolláltság és a légúti obstrukció állapotára utaló FEV1 értékeket vizsgáltuk meg súlyossági besorolásra való tekintet nélkül. A pácienseket FEV1 %-os értékük alapján két kategóriába soroltuk: FEV1 <80% és FEV1 >80%. A NET eseményszámokat a két csoportban a 10A. ábrán jelenítettük meg. A 80% feletti érték jobb légzésfunkcióra utal. Szignifikáns eltérést tapasztaltunk (korrigált $p = 0,027$) a két kategória között, a magasabb átlag NET-szint rosszabb tüdőfunkcióval asszociált.

Mivel a FEV1 érték egy folytonos változó ezért a Pearson-féle korrelációs koefficiens kiszámítását is elvégeztük, ezzel feltárva a FEV1 értékek és NET-szint közötti relációt. A 10B. ábrán látható az elemzés eredménye, mely alapján statisztikailag szignifikáns negatív korreláció ($r = -0,39$, $p = 0,002$) fedezhető fel. Ennek megfelelően minél alacsonyabb a FEV1 érték (rosszabb tüdőfunkció), annál magasabb a NET-szintje.



10. ábra. FEV1 értékek vizsgálata a NET-szinttel összefüggésben, A. A FEV1 <80% és FEV1 >80% csoportba tartozó páciensek diszkrét összehasonlítása, B. FEV1 és NET mennyiség közötti korreláció vizsgálata, FEV1: az első másodpercben mért erőltetett kilégzési térfogat, 10.B. részben látható a FEV1 hisztogram a bal felső negyedben, az áramlási citométerrel mért NET-szintek alapján készült hisztogram pedig a jobb alsó kvadránsban. A bal alsó részen látható a mintákhoz tartozó FEV1 és NET korreláció vizsgálata során készült scatter plot (illesztett vonallal), ahol egy kör egy mintát reprezentál, míg a jobb felső négyzetben a Pearson-féle korrelációs koefficiens értéke figyelhető meg (a csillagok a viszony szignifikáns voltát jelképezik).

A légzésfunkció értékek vizsgálata mellett, a gyógyszerhasználat alapján történő elemzést is elvégeztük. Azt vizsgáltuk, hogy vajon a specifikus gyógyszerek használata befolyásolja-e a véráramban mérhető NET mennyiségét. A pácienseket két csoportba soroltuk: (1) azon páciensek, akik alkalmanként használtak rövid-hatású béta-agonistát (SABA) alacsony dózisú inhalációs kortikoszteroid (ICS) belélegzése mellett vagy nélkül; (2) páciensek, akik napi szinten használtak ICS-t önmagában vagy más készítménnyel kombinációban (hosszú hatású β_2 -agonista - LABA, LAMA, leukotrién receptor antagonistá - LTRA, teofillin vagy esetleg SABA). Az eredmények alapján (11. ábra) elmondható, hogy a folyamatosan használt ICS alacsony plazma NET-szinttel asszociál ($p = 0,016$, korrigált $p = 0,027$). A NET mennyisége szignifikánsan magasabb volt azok között, akik nem alkalmaztak rendszeresen inhalációs kortikoszteroidot szemben azokkal, akik igen.



11. ábra. A gyógyszerhasználati szokások összefüggése a NET-szinttel, ICS: inhalációs kortikoszteroid

4.3. Hosszú nem-kódoló RNS-ek vizsgálata

4.3.1. A felfedező kohorsz eredményei

A szűrővizsgálat során 24 felnőtt személy lncRNS expressziós mintázatát elemeztük, akiket további 4 csoportba osztottunk: enyhe-középsúlyos asztma (GINA 1-3), súlyos asztma (GINA 4-5), COPD és egészséges kontrollcsoport. Minden csoportban 6 személy szerepelt (12. táblázat). A felfedező vizsgálat során egy előre elkészített és validált panelt használtunk, ami 84 autoimmunitásban és immunválaszban szerepet játszó lncRNS-re specifikus primerpárt tartalmazott, valamint referencia génekre specifikus primereket és kontrollokat egyaránt.

A kiértékelést megelőzően minőségi paraméterek vizsgálata zajlott, ami alapján nem megfelelés miatt egy COPD-s páciens mintáját kizártuk a további analízisből.

Nem találtunk a nemek között egyik csoportban sem szignifikánsan eltérő expressziót mutató lncRNS-t, azonban a panelen volt két olyan lncRNS, amiről irodalomkutatás során kiderült, eredendően csak az egyik nemben expresszálódik:

1. *XIST*: nőkben az X-inaktivációban játszik szerepet¹⁴³
2. *NAV2-AS5*: főként a herében expresszálódik

Emiatt ezt a két lncRNS-t kizártuk a további elemzésből. Érdekes módon a *JPX* gén az X-inaktivációs központban (XIC) található és a *XIST* gén aktivációjáért felelős¹⁴³, mégsem mutat nemtől függő eltérést az expresszió tekintetében.

Az lncRNS expressziókat a referenciagének küszöbértékének átlagával normalizáltuk, majd minden lncRNS esetében kiszámítottuk a ΔC_t értékét. Ezt követően, az lncRNS-ek relatív expressziós szintje került összehasonlításra a különböző csoportok között az allergiás státusz figyelembevételével (allergiás vs. nem-allergiás). Így összesen 13 összehasonlítást vizsgáltunk (24. táblázat), mely során 27 lncRNS átlag expressziós szintje mutatott nominálisan szignifikáns ($p < 0,05$) eltérést valamely két csoport között. A legtöbb eltérés súlyos asztma vs. enyhe asztma összehasonlítás során mutatkozott, ahol 84 lncRNS-ből 22 mutatott nominálisan szignifikáns eltérő expressziót. A legtöbb eltérést mutató összehasonlítások a 12. ábrán láthatóak.

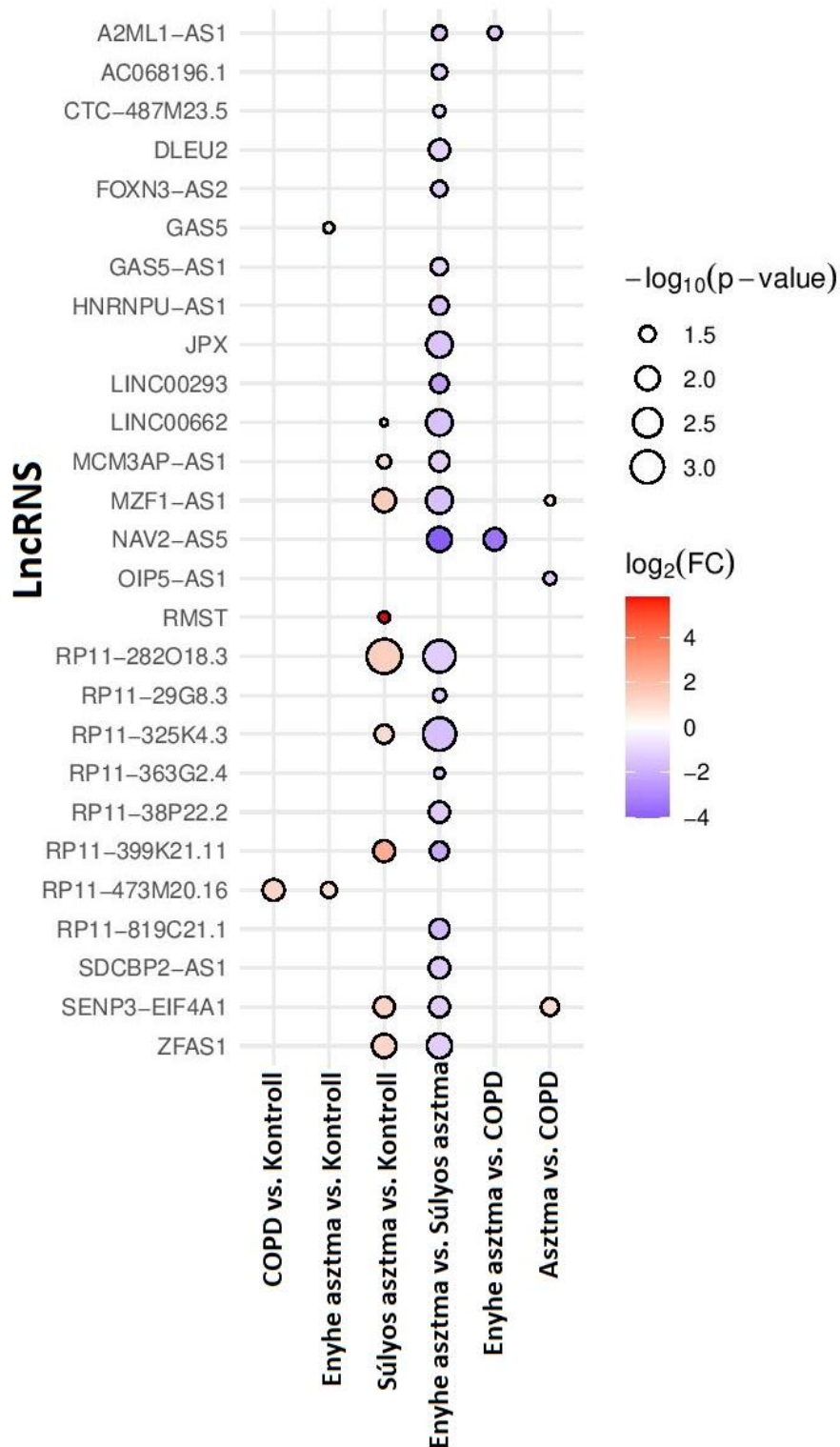
24. táblázat. A felfedező kohorsz csoport összehasonlításai és az eltérő expressziót mutató lncRNS-ek, a validálásra kiválasztott lncRNS-ek pirossal kiemelve

Összehasonlítások	Szignifikánsan eltérő expressziót mutató lncRNS-ek száma	Szignifikánsan eltérő expressziót mutató lncRNS-ek
COPD vs. Kontroll	1	<i>RP11-473M20.16</i>
Enyhe asztma vs. Kontroll	2	<i>RP11-473M20.16, GAS5</i>
Súlyos asztma vs. Kontroll	9	<i>LINC00662, MCM3AP-AS1, MZF1-AS1, RMST, RP11-282O18.3, RP11-325K4.3, RP11-399K21.11, SENP3-EIF4A1, ZFAS1</i>
Asztma vs. Kontroll	3	<i>RMST, RP11-282O18.3, RP11-473M20.16</i>
Allergiás asztma vs. Nem-allergiás asztma	0	-
Allergiás enyhe asztma vs. Nem-allergiás enyhe asztma	1	<i>RP6-24A23.7</i>
Allergiás súlyos asztma vs. Nem-allergiás súlyos asztma	1	<i>RP11-282O18.3</i>
Enyhe asztma vs. Súlyos asztma	22	<i>A2ML1-AS1, AC068196.1, CTC-487M23.5, DLEU2, FOXN3-AS2, GAS5-AS1, HNRNPU-AS1, JPX, LINC00293, LINC00662, MCM3AP-AS1, MZF1-AS1, RP11-282O18.3, RP11-29G8.3, RP11-325K4.3, RP11-363G2.4, RP11-38P22.2, RP11-399K21.11, RP11-819C21.1, SDCBP2-AS1, SENP3-EIF4A1, ZFAS1</i>
COPD vs. Súlyos asztma	9	<i>GAS5-AS1, LINC00293, LINC00662, MZF1-AS1, RP11-282O18.3, RP11-29G8.3, RP11-325K4.3, SENP3-EIF4A1, SENP3-EIF4A1, ZFAS1</i>
Enyhe asztma vs. COPD	1	<i>A2ML1-AS1</i>
Allergiás asztma vs. COPD	0	-
Nem-allergiás asztma vs. COPD	4	<i>MZF1-AS1, OIP5-AS1, RP11-282O18.3, SENP3-EIF4A1</i>
Asztma vs. COPD	3	<i>MZF1-AS1, OIP5-AS1, SENP3-EIF4A1</i>

A hosszú nem-kódoló RNS-ekről az irodalomban meglehetősen kevés információ található, azonban korábbi tanulmányokban már az *OIP5-ASI* és *HNRNPU-ASI* lncRNS-ekről kimutatták, hogy közvetett összefüggésben állnak eozinofil asztmával.^{144,145} Méréseink során az *OIP5-ASI* COPD-ben expresszáldott magasabb mértékben asztmához képest, míg a *HNRNPU-ASI* magasabb expressziót mutatott súlyos asztmában enyhe asztmához képest. Az *RP11-282O18.3*, *RP11-325K4.3*, *JPX* és *MZF1-ASI* lncRNS-ek szintén szignifikánsan felülexpresszáldtak súlyos asztmában, enyhe asztmához képest, valamint a *JPX* kivételével a kontrollcsoporthoz viszonyítva is.

Irodalomkutató, adatbázis-elemzés és saját vizsgálatunk eredményei alapján 6 hosszú nem-kódoló RNS-t választottunk ki validálásra, melyek a következők voltak: *OIP5-ASI*, *HNRNPU-ASI*, *RP11-325K4.3*, *JPX*, *RP11-282O18.3*, *AC016629.8* később átnevezve *MZF1-ASI*-re.

Itt szeretném megjegyezni, hogy a vizsgálat során elemzésre került *HNRNPU-ASI*-ként feltüntetett lncRNS a frissített adatbázisok alapján képes fehérjévé átíródni, ezáltal valószínűsíthető, hogy jelen esetben egy fehérjekódoló gén vizsgálata történt. Az egyszerűség kedvéért lncRNS-ek közé soroljuk és *HNRNPU*-ként említjük a továbbiakban. Emellett elmondható, hogy a génről átíródó fehérje képes DNS-hez és RNS-hez kapcsolódni, valamint részt vesz ribonukleoprotein komplexek létrejöttében. Funkciója hasonló az lncRNS-hez, ezen okból kifolyólag, és mivel RNS vizsgálat történt úgy gondoljuk a *HNRNPU* vizsgálata során kapott értékek egyaránt használhatóak.



12. ábra. A legtöbb szignifikáns eltérést mutató összehasonlítás és azok expressziós szintváltozása ($\log_2(FC)$), valamint p -értékének negatív logaritmus, minél sötétebb a kör alakzatot kitöltő árnyalat, annál nagyobb expressziós szintváltozás tapasztalható és minél nagyobb a kör átmérője, annál kisebb az összefüggésre jellemző p -érték

4.3.2. A replikációs vizsgálat eredményei

A vizsgálat során 163 mintát vontunk be az elemzésbe, melyet 6 további csoportra osztottunk (13. táblázat). Gyermek (n=16) és felnőtt kontroll (n=7), gyermekkori asztma (n=11) és felnőtt asztma (n=95), COPD (n=9), valamint allergiás rhinitis (n=25) kategóriák lettek kialakítva, melyek közül a gyermek populáció és az allergiás rhinitis csoport új megközelítésnek számított a felfedező kohorszhoz viszonyítva. Ezek mellett az asztma társbetegségeként jelenlévő allergia státuszt és a betegség súlyosságát (GINA 1-3, 4-5) is figyelembe vettük. Ezen csoportosításoknak köszönhetően végül 10 alcsoportot, illetve az ezek közötti génexpressziós eltéréseket vizsgáltuk. A szignifikáns (korrigált p-érték <0,05) eredmények a 25. táblázatban láthatóak.

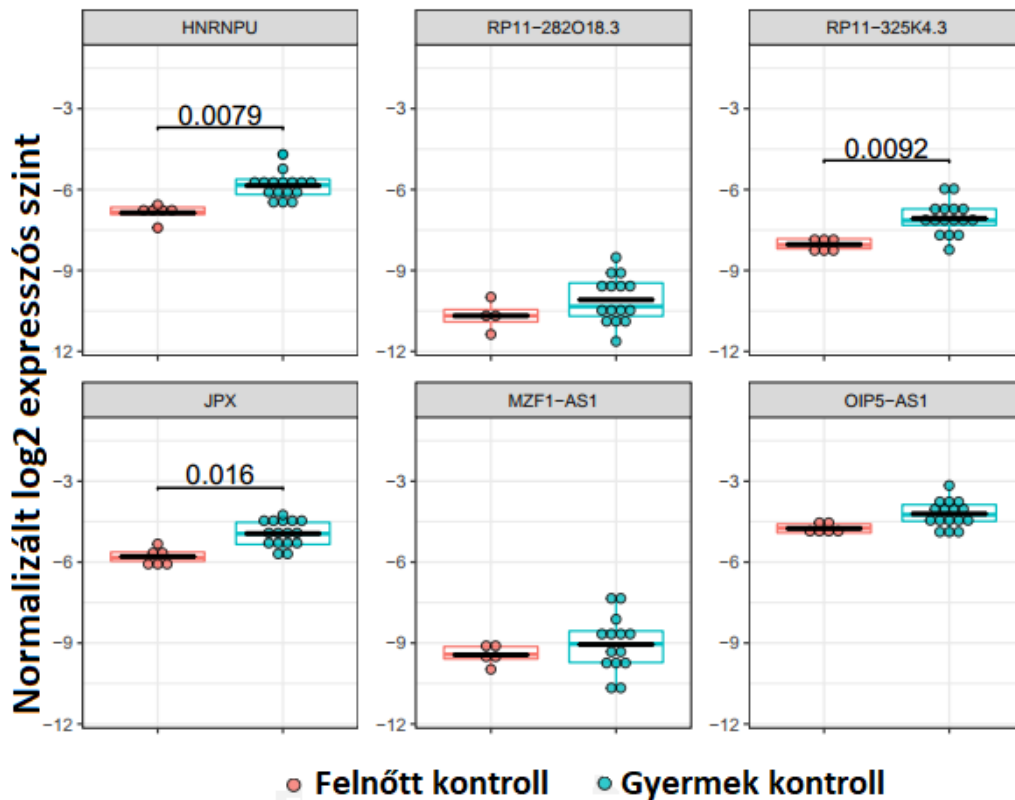
25. táblázat. A validáló vizsgálat során szignifikáns eltérést mutató összehasonlítások és lncRNS-ek

Összehasonlítás	lncRNS	LogFC	korrigált p-érték
Felnőtt allergiás rhinitis vs. Felnőtt COPD	<i>RP11-325K4.3</i>	1,16	0,0002
	<i>OIP5-ASI</i>	0,83	0,0013
	<i>JPX</i>	0,93	0,0013
	<i>HNRNPU</i>	0,72	0,01
	<i>MZF1-ASI</i>	0,91	0,01
Felnőtt allergiás asztma vs. Felnőtt nem-allergiás asztma	<i>RP11-325K4.3</i>	0,71	0,0007
	<i>HNRNPU</i>	0,67	0,0007
	<i>OIP5-ASI</i>	0,37	0,0374
Felnőtt allergiás rhinitis vs. Felnőtt allergiás asztma	<i>OIP5-ASI</i>	0,38	0,0423
Felnőtt asztma vs. Felnőtt COPD	<i>RP11-325K4.3</i>	0,82	0,0092
Gyermek kontroll vs. Felnőtt kontroll	<i>HNRNPU</i>	1,01	0,0079
	<i>RP11-325K4.3</i>	0,96	0,0092
	<i>JPX</i>	0,85	0,0162
Felnőtt allergiás rhinitis vs. Felnőtt asztma	<i>OIP5-ASI</i>	0,56	0,0005
	<i>HNRNPU</i>	0,43	0,0211
	<i>JPX</i>	0,41	0,0226
Felnőtt allergiás rhinitis vs. Felnőtt nem-allergiás asztma	<i>OIP5-ASI</i>	0,74	0,0003
	<i>HNRNPU</i>	0,76	0,0007
	<i>RP11-325K4.3</i>	0,69	0,0025
	<i>RP11-282O18.3</i>	0,54	0,0365
	<i>JPX</i>	0,44	0,0365
Felnőtt allergiás rhinitis vs. Felnőtt kontroll	<i>OIP5-ASI</i>	1,11	0,0002
	<i>JPX</i>	1,17	0,0003
	<i>RP11-325K4.3</i>	1,18	0,0003
	<i>HNRNPU</i>	1,10	0,0004
	<i>RP11-282O18.3</i>	1,11	0,0058
	<i>MZF1-ASI</i>	0,74	0,0360

A 25. táblázat legalsó sorában látható, hogy a felnőtt allergiás rhinitis vs. felnőtt kontroll összehasonlítás során kaptuk a legjelentősebb és legtöbb eltérést. Mind a 6 általunk vizsgált lncRNS szignifikánsan magasabb szinten expresszálódott felnőtt allergiában kontrollokhoz képest. E mellett az *RP11-282O18.3* kivételével mindegyik lncRNS allergiás rhinitisben mutatott szignifikánsan emelkedett expressziós mintázatot COPD-vel szemben. Felnőtt asztma és COPD között egyetlen lncRNS mutatott különbséget, az

RP11-325K4.3, mely szignifikánsan magasabb normalizált expressziós szintet mutatott asztmában COPD-hez képest.

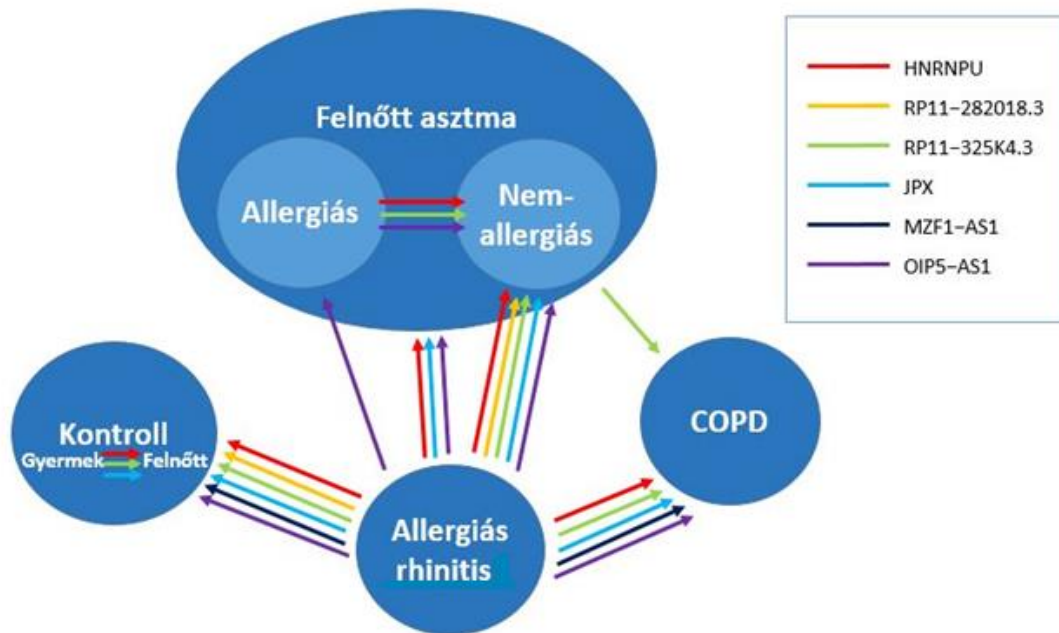
Érdekes módon a gyermek és felnőtt kontrollok között is találtunk expressziós különbséget mutató nem-kódoló RNS-eket (*HNRNPU*, *RP11-325K4.3*, *JPX*), ezért a két korcsoportot egyben vizsgáló összehasonlításokat kizártuk az elemzésből (13. ábra).



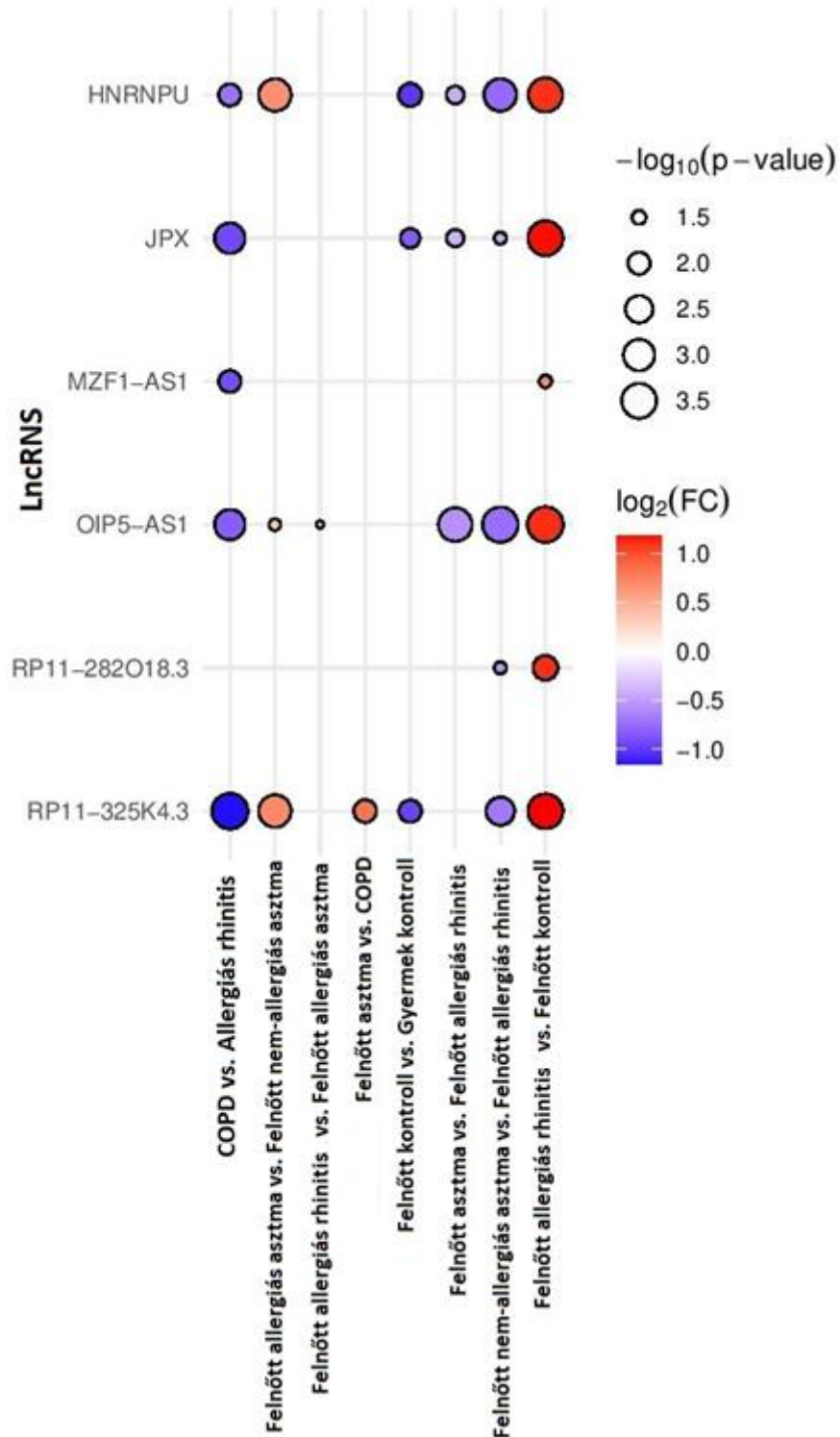
13. ábra. Normalizált expressziós szintek a felnőtt és gyermek kontrollcsoportban lncRNS-ekre lebontva

Az *OIP5-AS1* átlag expressziója minden esetben szignifikánsan magasabb szintet mutatott abban a csoportban, ahol az allergia jelen volt önmagában vagy társbetegség formájában. Emellett az *OIP5-AS1* magasabb átlag expressziót mutatott allergiás rhinitisben szenvedő alanyok esetén, mint allergiás asztmás páciensekben. Allergiás rhinitisben 5 lncRNS (*RP11-325K4.3*, *OIP5-AS1*, *JPX*, *HNRNPU*, *MZF1-AS1*) fejeződött ki szignifikánsan magasabb mértékben, mint COPD-ben, 3 (*OIP5-AS1*, *HNRNPU*, *JPX*) asztmával szemben, 5 (*OIP5-AS1*, *HNRNPU*, *RP11-325K4.3*, *RP11-282O18.3*, *JPX*) nem-allergiás asztmához képest. Allergiás és nem-allergiás asztma csoport között három lncRNS (*RP11-325K4.3*, *HNRNPU*, *OIP5-AS1*) mutatott alacsonyabb korrigált p-értéket mint 0,05. Mindhárom RNS emelkedett expresszióját tapasztaltuk allergiás asztmában,

nem-allergiás asztmához viszonyítva. Az eredményekről két összefoglaló ábra is megtekinthető (14. és 15. ábra).



14. ábra. A szignifikáns értékek összefoglaló ábrázolása, a nyilak iránya a csökkenő normalizált expressziós szint felé mutat, míg a nyilak színe az egyes lncRNS-eket jelöli



15. ábra. A legjelentősebb összehasonlítások során kapott logaritmusos FC és p-értékek ábrázolása, minél sötétebb a kör alakzatot kitöltő árnyalat, annál nagyobb expressziós szintváltozás tapasztalható és minél nagyobb a kör átmérője, annál kisebb az összefüggésre jellemző p-érték

A kiértékelés során nem találtunk szignifikáns eltérést a gyermekkori asztma és gyermek kontrollcsoportok között.

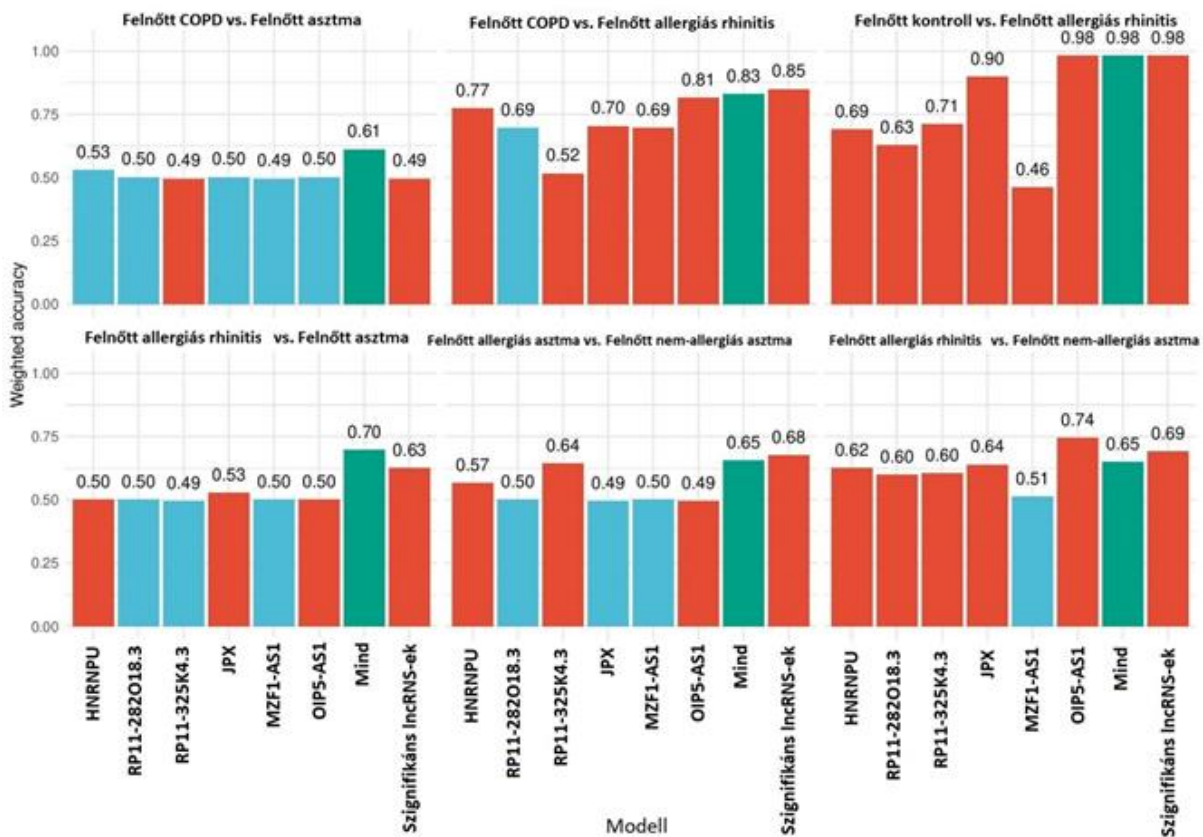
A replikációs kohorszban szintén megvizsgáltuk a súlyosság alapján kategorizált csoportok közötti expressziós szintváltozásokat, azonban a felfedező vizsgálattal ellentétben itt nem találtunk szignifikánsan eltérő expressziót mutató lncRNS-t. E mellett elemeztük a tüdőfunkciós értékek (FEV1 <80% vs. FEV1 >80%), inhalált kortikoszteroid használat (rendszeres vs. nem rendszeres) és kontrollálhatóság (kontrollált vs. nem kontrollált) alapján történő csoportosítás expressziós szintkülönbségét, azonban nem találtunk szignifikáns eltérést. Ezt követően vizsgáltuk, hogy az lncRNS expresszió összefüggést mutat-e a vérben található eozinofil és neutrofil sejtek %-os arányával, azonban korrelációt itt sem találtunk.

4.3.3. LncRNS-ek vizsgálata biomarkerként

A következőkben azt akartuk kiderteni, hogy vajon ezek az lncRNS-ek használhatóak-e differenciáldiagnosztikai vagy diagnosztikai biomarkerként önmagukban vagy kombinációban a tanulmányozott légúti betegségekben.

A 17. ábrán a vizsgálat eredményei láthatóak, amelyek Naïve Bayes-modellek segítségével készültek. Három modellt vizsgáltunk:

1. Az lncRNS-eket magukban (16. ábrán összehasonlításonként az első 6 oszlop)
2. Együtt az összes lncRNS-t (16. ábra: Mind (7. oszlop))
3. Csak azon lncRNS-ek figyelembevétele, melyek szignifikáns eltérést mutattak az adott összehasonlításban (16. ábra: Szignifikáns lncRNS-ek (8. oszlop))



16. ábra. A súlyozott pontosság (weighted accuracy - WA) értéke különböző modellek (1, 2, 3) esetén, a kék szín az összehasonlítás során szignifikáns eltérést nem mutató lncRNS-ekre, a narancssárga a szignifikáns eltérést mutató lncRNS-ekre, a zöld pedig az összes lncRNS együttes figyelembevételére utal

Az allergiás rhinitis vs. felnőtt kontroll összehasonlításban érték el mindhárom modellben a legmagasabb súlyozott pontossági értéket. Ebben az összehasonlításban az *OIP5-AS1* (1), az összes lncRNS együtt (2), illetve csak a szignifikáns lncRNS-ek (3) figyelembe vételével egyaránt 0,98 súlyozott pontossági értéket kaptunk, feltételezhetően az *OIP5-AS1* magas diszkriminatív értékének köszönhetően.

COPD vs. allergiás rhinitis összehasonlítása során a legjobb pontosságot a 3. modell használata esetén kaptuk, azaz az összehasonlításban szignifikánsan eltérő (*RP11-325K4.3*, *OIP5-AS1*, *JPX*, *HNRNPU*, *MZF1-AS1*) lncRNS-ek közreműködésével (WA = 0,85). Ezen két összehasonlítás mellett, felnőtt allergiás és nem-allergiás asztma vizsgálatoknál kaptunk még olyan eredményt, ahol a 3. modell vizsgálatával érték el a legmagasabb WA értéket (WA=0,68), bár ez alacsonyabb az előző kettő felsorolt pontossági értékhez viszonyítva.

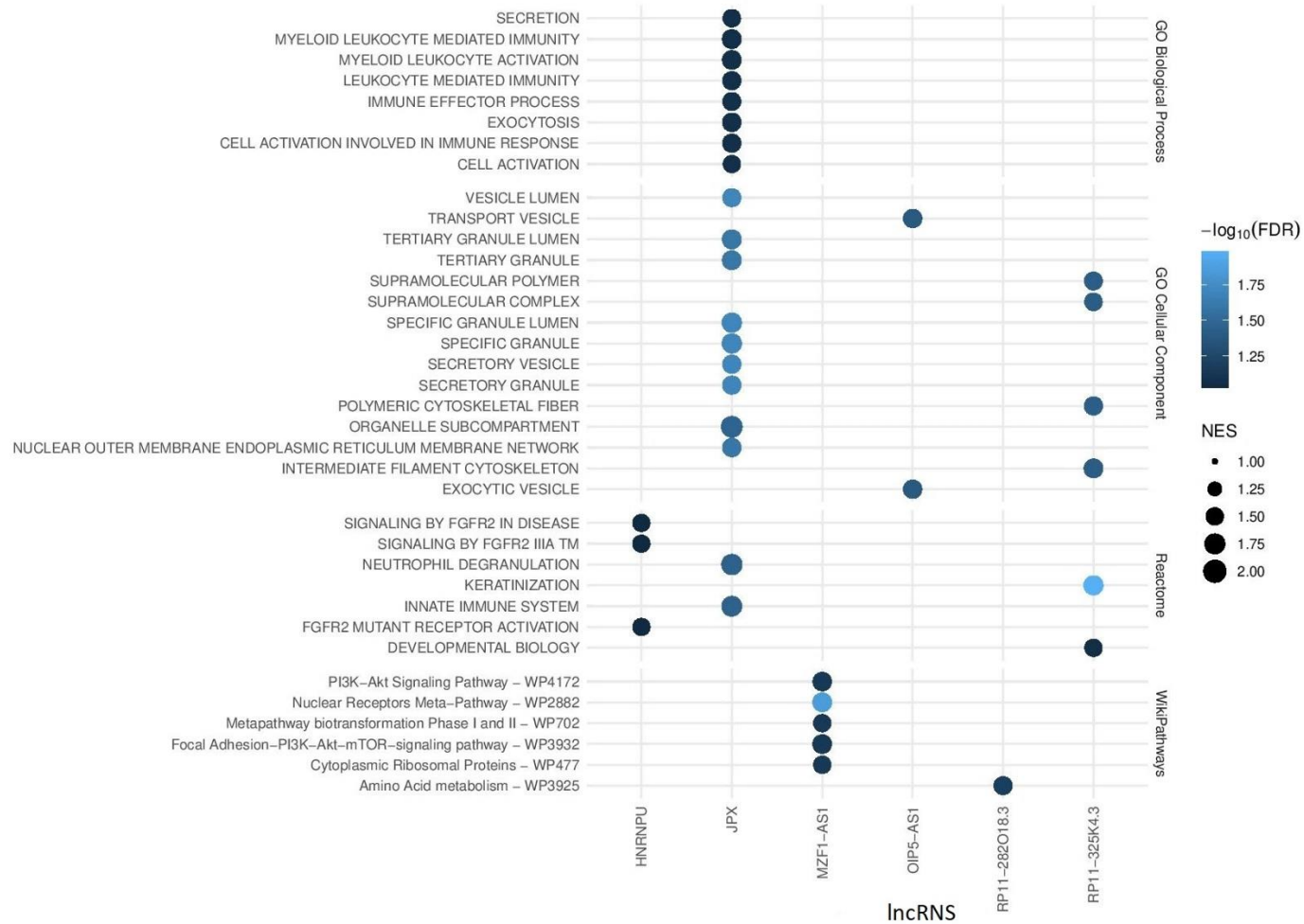
Két esetben a 6 lncRNS kombinációjával szignifikánsan magasabb teljesítményt értünk el, mint az egyedi lncRNS-ek alkalmazásakor vagy csak a szignifikánsak használatakor. A felnőtt allergiás rhinitis vs. asztmás páciensek összehasonlításakor a legjobb modell az egyedi lncRNS-ek (*JPX*) felhasználásával 0,53 WA-t eredményezett, azonban az összes lncRNS-t kombinációban egyesítve a WA értéke 0,7 volt. Hasonlóképpen, felnőtt COPD vs. felnőtt asztma összehasonlítás esetén a legjobb egyéni (*HNRNPU*) modell pontossága 0,53, míg a teljes modellt alkalmazva 0,61 volt.

Más esetekben azoknak az lncRNS-eknek a kombinációja, amelyek statisztikailag szignifikáns expresszióbeli különbséget mutattak az összehasonlításban (3. modell), valamivel magasabb teljesítményt eredményezett, mint a teljes modell (2. modell). Ez a helyzet fordult elő a felnőtt COPD és a felnőtt allergiás rhinitisben szenvedő betegek összehasonlítása (WA=0,85 a harmadik modell és 0,83 a második modell esetében), valamint a felnőtt allergiás asztmás és nem-allergiás asztmás betegek összehasonlítása során is (WA=0,65 a teljes és 0,68 a csökkentett modell esetében).

Hat összehasonlítás közül háromban az *OIP5-AS1* lncRNS rendelkezett a legmagasabb diszkriminatív értékkel, továbbá, a felnőtt allergiás rhinitis és nem-allergiás asztma összehasonlítás során ez a hosszú nem-kódoló RNS érte el a legmagasabb WA értéket az összes modell közül (WA=0,74), ami 5 százalékkal volt magasabb, mint a második legjobb modell.

4.3.4. A kiválasztott lncRNS-ek feltételezett funkciója

Számos lncRNS-hez ma még nem tudunk egyértelmű funkciót vagy funkciókat társítani, ezért célul tűztük ki, hogy *in silico* módszer segítségével prediktáljuk a validálásra kiválasztott lncRNS-ek biológiai funkcióját és a háttérben álló folyamatokat. A prediktált funkció becslése fehérjék, lncRNS-ek és gének közötti interakció feltérképezésével történt, amely alapján történő GSEA elemzés hozzásegített a funkcionálisan releváns útvonalak és a génontológiai kifejezések azonosításához (a módszer leírása a 3.3.3. fejezetben olvasható). Az eredmények a 17. ábrán tekinthetők meg.



13. ábra. A kiválasztott lncRNS-ek rendszerbiológiai elemzésének eredményei a kapcsolódó funkcionális biológiai mechanizmusok azonosítására, FDR: false discovery rate, NES: normalized enrichment score, a pontok színe a GSEA eredményének statisztikai szignifikanciáját jelöli, a pontok mérete pedig a lncRNS normalizált feldúsulási pontszámát jelzi egy prediktált célpont esetén.

A vizsgálat során a *HNRNPU* hatása igazolódott az *FGFR2* és ehhez kapcsolódó szignálútvolnalokban, nevezetesen az *FGFR2* IIIA TM útvonalban (FDR = 0,094), az *FGFR2* mutáns receptor aktiválódásban (FDR = 0,094) és az *FGFR2* szignalizációban betegség esetén (FDR = 0,094).

A *JPX* predikció vizsgálata során számos olyan, immunrendszerhez kapcsolódó folyamatot tártunk fel, mint a sejtaktiváció folyamata az immunválaszban (FDR = 0,084), az effektor folyamatban való részvétel (FDR = 0,084), a veleszületett immunrendszer (FDR = 0,035) és neutrofil degranuláció (FDR = 0,035).

A predikció alapján az *MZF1-AS1* főként olyan útvonalakat befolyásol, amelyek a sejtciklus szabályozásában és a sejtek differenciálódásában, proliferációjában és növekedésében vesznek részt, pl. PI3K – Akt – mTOR jelátviteli út (FDR = 0,071) és a sejtmagreceptorok útvonala (FDR = 0,014).

Az *OIP5-AS1* esetében a módszer nem azonosított biológiai folyamatokat vagy útvonalakat, azonban a predikció alapján azok a gének, amelyek transzport vezikulák, például exocitotikus vezikulák sejtkomponenseivel asszociálnak, szignifikánsan feldúsultak a prediktált célgének között (FDR = 0,04).

Az *RP11-282O18.3* előrejelzéseink szerint az aminosav-anyagcserét befolyásolja (FDR = 0,063).

Az *RP11-325K4.3* feltételezhetően befolyásolja a fejlődési folyamatokat, például a keratinizációt (FDR = 0,01).

A hat lncRNS feltételezett és prediktált funkciói között statisztikailag szignifikáns (FDR <0,1) átfedést nem találtunk.

5. Megbeszélés

5.1. Tie2 útvonal és a *TEK* gén szerepének vizsgálata

A vizsgálat során a *TEK* gén variációinak hatását vizsgáltuk gyermek és felnőtt asztmában és allergiás conjunctivitisben, illetve azon belül egyes alpopulációkban. Emellett elvégeztük egy asztma-egér modell génexpressziós vizsgálatát a Tie2 és ahhoz kapcsolódó útvonalakban résztvevő génekre összpontosítva.

Az első publikáció, amely a *TEK* gén szerepét hangsúlyozta asztmában 2017-ben látott napvilágot. Ez a cikk egy több GWAS vizsgálatot átívelő metaanalízis értékelése, melyben 3 lókuszt azonosítottak asztmával összefüggésben európai származású amerikai populációban. A 9p21.2 lókuszt négy, egymással LD-ben lévő SNP-t és három gént ível át, melyek közül az asszociációra legrelevánsabb jelölt a *TEK* gén volt. A *TEK* gén által kódolt Tie2 tirozin kináz receptor központi regulációs szerepet tölt be az angiogenezis és az érrendszer remodeling folyamatában. Annak ellenére, hogy a szignifikáns variánsok relative messze helyezkednek el a *TEK* géntől, kapcsoltsági egyenlőtlenségben vannak egy, a *TEK* génben előforduló misszensz variációval. Azonban asztmában a releváns szöveteket figyelembe véve nem találtak expressziós QTL (eQTL) hatást.⁹⁴

Egy másik publikáció a Tie2 receptort kódoló *TEK* gén expressziójának összefüggését hangsúlyozza vaszkuláris barrier működéssel kapcsolatban ARDS (akut respirációs distressz szindróma) populációban. A *TEK* gén expressziójának csökkenése összefüggést mutatott az érpermeabilitás növekedésével. Három, intron régióban található eQTL SNP-t (rs3780315, rs581724, rs7876024) azonosítottak a *TEK* génben, melyek ugyan egymással nem voltak LD-ben, mindegyik alacsonyabb *TEK* génexpresszióval asszociált HapMap3 sejtvonalonban.¹⁴⁶

Kutatócsoportunk kezdetben ezt a három eQTL variációt vizsgálta meg a *TEK* génben gyermekkori asztmával és különböző allergiás megbetegedésekkel kapcsolatban. Vizsgálatunk alapján egyik SNP sem mutatott közvetlen asszociációt asztmával, viszont azon asztmások, akik az rs581724 SNP minor alléljára nézve homozigóta genotípussal rendelkeztek szignifikánsan magasabb hajlamot mutattak allergiás conjunctivitis kialakulására.¹⁴⁷

Jelen vizsgálat során 112 SNP-t vizsgáltunk meg a *TEK* génben enyhe asztmával és mérsékelten súlyos-súlyos allergiás conjunctivitisszel kapcsolatban felnőtt parlagrafü allergiás populációban, majd ezt követően 6 kiválasztott variációt teszteltünk egy független gyermek és felnőtt asztmás és kontroll mintákat tartalmazó populációban. Az rs3824410 variáció vizsgálataink során szoros összefüggést mutatott asztmával, allergiás rhinitis populációban, majd a replikációs kohorsz során súlyos asztmával kapcsolatban is felnőtt asztmás populációban. Mindkét esetben a ritka T allél jelenléte szignifikánsan csökkentette az asztma/súlyos asztma kialakulásának kockázatát hasonló esélyhányados értékeket mutatva (allergiás rhinitis populáció: OR=0,51; felnőtt asztma: OR=0,48; felnőtt allergiás asztma: OR=0,39). Ezek az eredmények összhangban vannak azzal az Almoguera és társai által tett előzetes feltételezéssel, miszerint a *TEK* gén szerepet játszik az asztma kialakulásában európai eredetű populációban, azonban jelenleg a pontos mechanizmus még nem ismert, amely által az rs3824410 SNP hatást gyakorolhat az asztma kialakulására vagy súlyosságának befolyásolására. Bioinformatikai eszközök és adatbázisok elemzése alapján nem áll kapcsoltsági egyenlőtlenségben egyetlen gyakori variánsal sem az európai populációban, mely arra utalhat, hogy független hatással bír. Elhelyezkedését tekintve DNáz hiperszenzitív helyen, nyitott kromatin régióban található, emellett két transzkripciós faktor kötőhelyét módosítja, melyek névszerint az ISGF-3 (interferon-stimulated gene factor 3) és CTCF.¹⁴⁸⁻¹⁵⁰ Az SNP variáció egy kevésbé konzervált nukleotidot érint, ennek ellenére valószínűsíthető, hogy befolyásolja a kötődés erejét vagy időtartamát. Mindkét transzkripciós faktor szerepét vizsgálták és összefüggésbe hozták már asztmával.^{151,152} Számos olyan lókuszt tártak fel asztma hajlamosító régióként, mely tartalmaz CTCF motívumot.¹⁵³

A felfedező populációban vizsgált *TEK* génben megtalálható 112 SNP-ből az allergiás conjunctivitisszel legerősebb összefüggést mutató variációkat (5 SNP) tovább vizsgáltuk. A vizsgálat második fázisában a conjunctivitist csak gyermek populációban vizsgáltuk, mivel a túl kevés felnőtt minta statisztikailag kevésbé megbízható eredményt szolgáltatott volna. A variációk a két nemben eltérő eloszlást mutattak allergiás conjunctivitisszel összefüggésben. A férfi nem predominanciája pubertás előtt egy jól ismert jelenség allergiás conjunctivitisben, melynek hátterében feltételezések szerint a nemi hormonok is jelentős szerepet játszanak.¹⁵⁴ Az allergiás conjunctivitis gyakrabban fordul elő a fiatal generációban, különösen a 4-12 éves korosztályt érinti.¹⁵⁵

Az rs622232 SNP gyermekkori asztmás populációban a fiúkban mutatott asszociációt allélikus és domináns módon conjunctivitisszel kapcsolatban viszonylag magas esélyhányados értékkel, míg az rs7034505 variáció minor allél homozigóta formában való jelenléte lányokban emelkedett kockázattal asszociált. Mindkét SNP intronban található és az adatbázisban történő vizsgálatuk alapján funkciót nem tudunk társítani hozzájuk. Az rs7034505 variáció 4 SNP-vel áll LD-ben, melyek közül egy, a FOXP1 transzkripció faktor kötőhelyét változtatja meg. A FOXP1 transzkripcionális represszorként működik és a retinában is expresszálódik, emellett a tüdő epitheliumának differenciálódásában játszik fontos szerepet.¹⁵⁶ Az LD-ben álló 4 SNP és conjunctivitis között eddig még nem mutattak ki összefüggést.¹⁵⁰ Az rs622232 SNP szintén LD-ben van egy másik ismert, funkcióval még nem annotált variációval (rs621786; $r^2 > 0,8$).¹⁵⁰

A *TEK* gén és a kapcsolódó Tie2 útvonal szerepét egér-asztma modellben is megvizsgáltuk. A génexpressziós vizsgálat során 10 génből 8 mutatott szignifikáns eltérést az AHR és Th2-típusú allergiás légúti gyulladás provokációja és kiváltása során, a megfelelő kontrollokhoz viszonyítva (5.ábra). Ez alapján elmondható, hogy a Tie2 útvonal szerepe asztmában és allergiás conjunctivitisben további megerősítést nyert. Az asztmát vizsgáló génexpressziós tanulmányok során a mérés általában egy időpontban történik, emberek esetében leggyakrabban az asztma kialakulását követően exacerbációs időszakon kívül, egerekben pedig ha az AHR és a légúti gyulladás már manifesztálódott. Vizsgálataink során 3 időpontban elemeztük a gének kifejeződésének mértékét, két intraperitoneális OVA szenzitizációt követően a 28. napi első allergén inhalálás után, a 30. napi harmadik inhalációs provokációt követően, illetve a 31. napon. Ennek segítségével a tüdőt érintő génexpressziós változások időben nyomon követhetővé váltak.

Az *Nfkb1* mindhárom időpontban szignifikáns expresszió emelkedést mutatott a kontrollokhoz képest, ami nem meglepő, hiszen az NF- κ B pleiotróp transzkripció faktor egyik alegységét kódolja. Az NF- κ B transzkripció faktor egy csomóponti („hub”) fehérje, amely szinte minden sejttípusban jelen van. Ez a komplex fehérje számos funkciót lát el a szervezetben (gyulladás, immunitás, differenciáció, sejtnövekedés, apoptózis és tumorigenezis), többek között az asztmatikus gyulladás folyamatában is részt vesz a tüdőben.^{141,157}

A *Tek* és az *Angpt1* gének expressziója (*Angpt2* és *Angpt4* génekkel párhuzamosan) az asztma-egér modellekben alacsonyabb expressziót mutatott mindhárom mérési pontban a megfelelő kontrollokhoz viszonyítva. A Tie2 receptor központi szerepet játszik a vaszkuláris stabilitásban és kináz aktivitása révén (Ang1 ligand kötődése által) gyulladásellenes és érstabilizáló hatást fejt ki (pl. *NFKB1* gátlás).¹⁰¹ Ebből kiindulva az alacsonyabb Tie2 expresszió, alacsony Ang1 expresszióval együtt elősegítheti a gyulladás fokozódását és gyengítheti a tüdő epithélszövetek barrier funkcióját, ezzel növelve az érpermeabilitás mértékét. Az allergén szenzitizáció szintén értágulatot és fokozott érpermeabilitást idéz elő, amely az inhalált allergének bejutásának kedvez. Ezen folyamatok feltételezhetőleg hozzájárulnak az aktivált immunsejtek környező szövetekbe történő migrációjához a tüdőben, ezáltal az allergiás légúti gyulladás karakterisztikus tüneteit okozva. Ez a konklúzió összhangban van az irodalomban található eredményekkel, melyben az Ang1 expresszió és Tie2 foszforiláció mértéke csökken az OVA kezelt egerek tüdejében, ezért az Ang1 valamiféle védő funkciót tölthet be légúti gyulladással és AHR-el szemben.¹⁵⁸

A *Ptprb* a Tie2 negatív regulátora, melyen keresztül a sejtproliferációt gátolja. Alapvető fontosságú az endothel sejtek integritásának megőrzéséhez és a VE-kadherin adhezív funkciójához.¹⁵⁹ A *Ptprb* gén kifejeződése redukálódott a folyamat során.

Bár a Tie2 útvonal intenzív kutatási terület, a résztvevő gének és a kapcsolódó útvonalak pontos szerepe a különböző sejtekben, betegségekben és folyamatokban még korántsem tisztázott.^{96–100,104}

A felfedező és replikációs vizsgálat során nominális p-értékekkel dolgoztunk, mely eredmények magukban rejtik a kockázatot arra, hogy egy esetleges későbbi korrekció során elveszne a szignifikáns asszociáció a relatíve kevés vizsgált SNP-nek és páciensnek köszönhetően. Ennek ellenére a bizonyítékok a *TEK* szerepére meglehetősen meggyőzőek, hiszen több független populációt és SNP-t vizsgálva is kaptunk szignifikáns asszociációt humán mintákban. A Tie2 útvonal funkciója, a független populációkon végzett asszociációs vizsgálatok eredményei és az állatmodell génexpressziós vizsgálatának eredményei mind erősítik egymást, alátámasztva a *TEK* gén potenciális szerepét az asztma patogenezisében.

Conjunctivitis esetén kevesebb eredményt kaptunk viszont számos független, az irodalomban is megtalálható publikáció szolgált bizonyítékot a *TEK* szerepére ezen kórkép esetén is (többek között a kutatócsoport egy korábbi publikációja⁹⁵). A gén jelentős mértékben expresszálódik a tüdőben és a szemben. A *TEK* gén variációit már összefüggésbe hozták több szemet érintő megbetegedéssel és a Tie2 útvonal kiemelt kutatási terület olyan kórképek esetén, mint a choroidális és szubretinális neovaszkularizáció, makula-ödéma vagy diabéteszes retinopátia.^{160–162}

Összességében elmondható, hogy eredményeink további bizonyítékot szolgáltatnak a Tie2 útvonal és a *TEK* gén szerepére asztmában és allergiás conjunctivitisben. A *TEK* gén és a kapcsolódó génvariációk potenciális terápiás célpontok lehetnek az említett betegségekben.

5.2. Neutrofil extracelluláris csapdák szintjének vizsgálata

Jelen vizsgálatban egy áramlási citométer alapú módszert dolgoztunk ki a neutrofil extracelluláris csapdák mennyiségi és minőségi értékeléséhez stimulálatlan sejtmentes plazma frakcióból. A NET-ek jelenlétének megerősítése és vizualizálása konfokális lézerpásztázó mikroszkóp segítségével történt. Az eredmények kiértékelése során nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a betegcsoportok közötti átlag NET-szintben, azonban eredményeink alapján a betegség súlyossága, a FEV1 érték és a rendszeres inhalációs kortikoszteroid használata hatással van rá.

A NET-ek képződését már korábbi tanulmányokban is vizsgálták. Egy kutatás a vírusfertőzés által kiváltott asztma exacerbáció molekuláris történéseit vizsgálta és azt találták, hogy emberekben a dsDNS (duplaszálú DNS) kibocsájtásának mennyisége vírusfertőzés után korrelál a Th2-es típusú asztma súlyosbodásának mértékével. Egerekben kiváltott légúti hiperreaktivitás vizsgálatokor a rhinovírusfertőzés stimulálta a netózissal asszociált dsDNS-ek kibocsájtását.¹⁶³

Később, indukált köpetmintában a NET alkotóit és az extracelluláris DNS mennyiségét elemezve felfedezték, hogy a netózis emelkedett számban megy végbe asztmában és COPD-ben egészséges kontrollcsoporthoz képest. A sejtösszetételt elmezve arra is fényt derítettek, hogy neutrofil gyulladás jelenlétében szignifikánsan magasabb

koncentrációban vannak jelen a NET alkotóelemei asztmában és COPD-ben, mint nem neutrofil gyulladás során.¹⁶⁴ Feltételezéseink alapján a keringésben jelenlévő neutrofil sejtek mennyisége arányos a netózis jelenségének mértékével, azonban egy másik tanulmány során a különböző asztma endotípusok (neutrofil vs. eozinofil vs. paucigranuláris stb.) nem mutattak a vér neutrofil szintjét tekintve szignifikáns eltérést.¹⁶⁵ Egy másik kutatás a vér neutrofil sejt számának emelkedett szintjét detektálta COPD-ben egészséges kontrollokhoz viszonyítva.¹⁶⁶ A mintáinkhoz számos információt tudunk társítani, azonban az eozinofil és neutrofil sejt számáról nem voltak adataink, így ezek nem kerültek sem bemutatásra, sem elemzésre ezen vizsgálat keretei között.

Kutatások alapján szignifikánsan magasabb IL-8 szint (neutrofil kemoattraktáns) mérhető asztmások BALF mintáiban kontrollokhoz képest.¹⁶⁷ Az emelkedett IL-8 expresszió a légutak simaizom sejtjeiben netózis indukáló hatása révén hozzájárul az asztma súlyosságához.¹⁶⁸ Azt is tudjuk, hogy a NET alkotója, a neutrofil elasztáz, az IL-8 génexpresszióra nézve stimuláló hatással bír (IL-1 receptor-asszociált kináz szignalizációs útvonal révén).¹⁶⁹ Ezek alapján egy alternatív hipotézis lehet, hogy az asztmában emelkedett IL-8 magasabb mértékben indukál netózist, az NE jelenléte további IL-8 képződést indukál, ami fokozva a szöveti gyulladást, további neutrofileket vonz.

A kiértékelés során nem találtunk szignifikáns eltérést a gyermekkori asztma és kontroll, felnőtt asztma és kontroll, valamint COPD és ACOS csoportok plazma NET-szintjének összehasonlításakor. Az eredmények alapján a netózis egészséges szervezetben is végbemehet, egyesekben ráadásul jelentősen emelkedett mértékben, ami arra utalhat, hogy valamilyen ún. „silent” infekció megy végbe a szervezetben, ami aktiválja a veleszületett immunrendszert beleértve a netózist, így elősegítve a fertőző ágens eliminációját, még a tünetek kialakulását megelőzően.

Számos betegségben fedezték már fel a NET-ek emelkedett koncentrációját, ami feltételezhetően hozzájárul a kórkép patogeneziséhez, fokozott képződése vagy csökkent lebontása révén. Mivel hálózatos szerkezetével fizikai gátat képez, elősegíti a trombózis és az érgyulladás kialakulását. Túlzott mennyisége olyan szisztémás betegségekkel asszociál, mint például a diabetes mellitus, asztma, COPD, ARDS és SLE.^{113,170-172} A kórképek esetén a gyulladás folyamata vezethet emelkedett netózis jelenséghez, ami az

erekben magas NET-szintet eredményez és tovább súlyosbíthatja a betegség lefolyását. Azonban úgy tűnik, hogy a krónikus légúti betegségek során a NET képződése főként a tüdőt érinti ezért jelentős mennyiségben nem detektálhatók a vérkeringésben.

Ezzel ellentétben, amikor a betegségcsoporton belüli alpopulációkat vizsgáltuk, a keringésben jelenlévő NET-szint több esetben is szignifikáns eltérést mutatott. Méréseink alapján a súlyosabb GINA besorolású asztma emelkedettebb NET koncentrációval asszociált, mint a kevésbé súlyos tünetekkel társult asztma. A plazma NET-szintje és a FEV1 értékek között szignifikáns negatív korrelációt detektáltunk. Ez utóbbi eredmény egy lehetséges magyarázata lehet annak a megfigyelésnek, hogy a károsodott tüdőfunkció, alacsony szintű szisztémás gyulladással és magas CRP (C-reaktív protein) értékkel asszociál. Továbbá azt is kimutatták, hogy a szérum CRP-szint szignifikáns negatív hatással bír az FVC és FEV1 értékekre.¹⁷³ A NET és CRP közötti reláció további vizsgálata során szívelégtelenségben szenvedő betegek esetén azt találták, hogy a CRP molekula koncentráció-dependens módon indukálja a NET szintézisét.¹⁷⁴ Ezek alapján egy lehetséges hipotézis lehet, hogy a károsodott tüdőfunkció szisztémás gyulladáshoz és magas CRP-szinthez vezet, ami netózis indukáló hatással bír. Tovább nehezíti az interpretációt, hogy nincs konszenzus a tudományos irodalomban azt illetően, hogy a szisztémás gyulladás vezet károsodott tüdőfunkcióhoz vagy fordítva.¹⁷⁵ Szintén további vizsgálatokat igényel annak feltárása, hogy az emelkedett NET-szint hozzájárul-e a károsodott tüdőfunkcióhoz vagy a betegség patomechanizmusához, létrehozva ezzel egy örögi kört.

Kutatásunk során a netózis és gyógyszerhasználat kapcsolatát is elemeztük. Mai tudomásunk szerint, eddig még egyetlen publikáció sem vizsgálta a NET képződést *in vivo* ICS kezelés során emberben. Eredményeink alapján, az átlag NET-szint a plazmában szignifikánsan alacsonyabb azokban a páciensekben, akik rendszeresen használtak inhalációs kortikoszteroidot azokkal szemben, akik nem rendszeresen vagy egyáltalán nem használtak ilyen készítményt.

Ezzel ellentétben, egy korábbi tanulmányban *in vitro* netózis vizsgálata során, a NET-ek nem-szteroid gyulladásgátló készítményre szenzitívek voltak, azonban a glükokortikoid kezelés hatástalannak bizonyult a NET csökkentése szempontjából.¹⁷⁶ Később lovak, mint kísérleti állatok vizsgálatakor, Vargas és munkatársai kimutatták a

glükokortikoidok PMA-indukált NET csökkentő hatását *in vitro* súlyos asztmás lovak tüdejében, bár ezt emberekben még nem sikerült igazolni.¹⁷⁷

Egy másik publikációban, a reaktív oxigéngyökök szerepét taglalják, ahol egészséges emberek vizsgálata során rávilágítottak a csökkent ROS képződésre intravénás dexametazon (szteroid) injekciót követően.¹⁷⁸ Mivel a ROS szerves részét képezi a neutrofil extracelluláris csapdák képződésének, ezért csökkenése a NET-szint redukcióját vonhatja maga után.¹⁷⁹ Elképzelhető, hogy az abszorbált ICS a keringésbe jutva gátolja a ROS képződést ezzel egyidejűleg a netózis folyamatát, amivel alacsony NET-szintet idéz elő. Természetesen ez a hipotézis további megerősítésre szorul.

Irodalomkutatás alapján nem magyarázható egyértelműen az inhalációs kortikoszteroid rendszeres használatának összefüggése az alacsonyabb plazma NET-szinttel. Vizsgálatunk során, ellentétben az eddigi tanulmányokkal, stimulálatlan *in vivo* keringő NET-szintet vizsgáltunk sejtmentes plazma frakcióban. A NET-szintet befolyásoló ICS hatása pedig jól vizsgálható a perifériás vérből származó plazma mintából, ugyanis az inhalált vagy szájon át bevitt kortikoszteroid végső soron a szisztémás keringésbe kerül.¹⁸⁰

Jelenleg számos kutatás célozza a NET-ek, mint terápiás célpontok felderítését főként autoimmun betegségek (SLE, vasculitis, diabetes mellitus, RA) kapcsán. Elsősorban olyan molekulák tesztelése zajlik a NET gátlása érdekében, amelyek a netózis folyamatában szerepet játszó molekulákat gátolják. Például ROS, MPO, PAD(4) vagy NADPH oxidáz gátlására irányuló kutatások már folyamatban vannak, azonban egyelőre a legtöbb igen káros mellékhatással jár, ami nem tekinthető váratlan fordulatnak figyelembe véve a tényt, hogy a netózis a szervezet védekezőmechanizmusának egy fontos pillére. Talán a leggyakrabban használt NET inhibitor a DNáz, azonban ez nem a netózist gátolja, hanem a már képződött NET-et degradálja. Előnye, hogy már használják a készítményt klinikumban és nincs toxikus hatása. Kutatások során, azonban mégsem bizonyult hatékonynak, ugyanis a hisztonra, elasztázra és a többi NET alkotóra igen kevés hatással bír, amelyek szintén hozzájárulnak a gyulladás kialakulásához.¹¹³

Az általunk kidolgozott áramlási citometriás NET mérési módszer Gavillet és társai által alkalmazott, vér sejtszuspenzióval végzett módszerén alapul.¹⁸¹ A módszert sejtmentes plazma frakcióra adaptáltuk, és az intézetünk munkatársai által már korábban

publikált^{182,183}, valamint van der Pol és munkatársai által publikált¹⁸⁴ cikkek alapján, extracelluláris vezikula mérettartományt használtunk a NET-ek mennyiségi meghatározásához. Ellentétben Gavillet és mtsi. által használt módszerrel, ahol csupán citrullinált H3 hiszton és MPO által festett dupla pozitív partikulumokat vettek figyelembe, kutatócsoportunk a hármas pozitív értékeket vette számításba, melynél az MPO, a citrullinált hiszton és a szabad DNS jelölése egy pontban volt megtalálható, ezzel tovább növelve a mérés specificitását.

PMA indukált izolált neutrofil granulociták sejtmentes felülúszóját mint pozitív kontrollt vizsgálva, jelentősebb eltérést találtunk a triplapozitív események között indukált és nem-indukált neutrofilek felülúszóját vizsgálva, a duplapozitív események számához viszonyítva. Emellett sikeresen igazoltuk az *in vivo* cirkuláló NET-ek jelenlétét konfokális lézer-pásztázó mikroszkóp használatával az átfedő DNS festék, MPO és citrullinált hiszton ellenes antitestek kimutatásával.

A kidolgozott áramlási citometriás módszer akár a klinikumban is alkalmazható, új lehetőségként az *in vivo* cirkuláló NET-ek biomarkerként történő kimutatására. Amennyiben további vizsgálatok is megerősítik az inhalációs kortikoszteroidok NET-csökkentő hatását akkor ez a jelenség kihasználható lehetne olyan kórképekben, ahol a netózis folyamata szerepet játszik a betegség patogenezisében.

5.3. Hosszú nem-kódoló RNS-ek vizsgálata

Az lncRNS-ek vizsgálata során kétlépcsős megközelítést alkalmaztunk. Első körben 84 gyulladáshoz kapcsolódó immunválaszban és autoimmunitásban szerepet játszó hosszú nem-kódoló RNS expresszióját vizsgáltuk krónikus légúti betegségben szenvedő páciensek perifériás vérmintájában. Ezt követően irodalomkutatás, adatbáziselemzés és eredményeink kiértékelése alapján, a csoportok között eltérő expressziós mintázatot mutató lncRNS-ek közül hatot kibővített populációban vizsgáltunk tovább. A számos eltérés között azonosítottuk az OIP5-AS1 lncRNS-t, amely magas diszkriminációs erővel bírt a súlyos allergiás és nem-allergiás páciensek megkülönböztetését tekintve.

Vizsgálatunk alatt néhány publikáció már született ebben a témában, ahol egyes lncRNS-ek expressziós eltéréseit vizsgálták és azonosították több krónikus légutakat

érintő megbetegedésben, különösen asztmában. Néhány ilyen lncRNS a mi vizsgálatunkban is szerepelt, azonban nem találtunk különbséget a *TUG1*, *MALAT1*, *MEG3* és *NEAT1* expresszióját vizsgálva az egyes csoportok között, melyek más publikációkban asztmával asszociációt mutattak.^{130–132,185} Az eltérő eredmény adódhat a viszonylag alacsony mintaszámból (6 enyhe asztma, 6 súlyos asztma és 6 kontroll), illetve abból a tényből is, hogy nem tüdőből származó mintát vizsgáltunk, hanem perifériás vérmintát. Mivel azonban a perifériás vér alkalmasabb arra, hogy benne biomarkereket vizsgáljunk, a cikkekben szereplő lncRNS-ek valószínűleg nem alkalmasak általános asztma biomarkernek. Ettől függetlenül valószínűsíthető, hogy szerepet játszanak az asztma patogenezisében szövetspecifikus módon vagy egy bizonyos asztma endotípus, illetve kezelési válasz érzékeny biomarkerei lehetnek.

A *GAS5* és antiszensz RNS-ének (*GAS5-AS1*) kifejeződését vizsgálva bizonyos összehasonlításokban szignifikáns eltéréseket kaptunk, viszont a mérsékelt szignifikáns nominális p-érték (ami csak alig volt alacsonyabb a szignifikancia határértéknél), illetve az akkor még rendelkezésünkre álló irodalmi adatok hiányában nem került kiválasztásra a kísérlet második fázisához. Később, azonban kimutatták a *GAS5* magasabb expresszióját ovalbumin-indukált asztmás patkányokban és a *GAS5* expressziójának gátlása pedig csökkentette a légúti hiperreaktivitás kialakulását. Ezen kutatás, illetve az általunk kapott vizsgálat eredményei együttesen a *GAS5* asztmában betöltött lehetséges szerepére hívják fel a figyelmet.¹⁸⁶

A kiválasztott lncRNS-ek expresszióját egy, már gyermekeket és allergiás rhinitisben szenvedő pácienseket is tartalmazó kibővített populáción vizsgáltuk tovább. A legtöbb és legjelentősebb eltérést a kontroll vs. allergiás rhinitis csoportok között kaptuk, mely során az összes szelektált RNS szignifikánsan magasabb expressziót mutatott az allergiás rhinitisben szenvedő páciensek csoportjában. Az *OIP5-AS1*, *HNRNPU*, illetve a *JPX* a leginkább tanulmányozott gén az összes közül. Az expresszió elemzés mellett három biológiai hálózat kombinációja segítségével bioinformatikai elemzést végezve prediktáltuk az lncRNS-ek lehetséges szerepét és a kapcsolódó GO kifejezéseket.

Az *OIP5-AS1* egy konzervált gén (zebrahal, egér és humán genom vizsgálata által meghatározva), ami szivacsoként köti meg az RNS-eket és mikroRNS-eket, fenntartja a sejtproliferációt, regulálja a mitózist és számos daganattípusban onkogénként vagy

tumorszupresszorként funkcionálhat attól függően milyen mRNS-en keresztül hat.^{187–190} Hepatocelluláris karcinómában a megnövekedett *OIP5-AS1* expresszió csökkent miR-3163 expresszióval asszociál melynek eredményeképpen a *VEGFA* szintje megnő, így befolyásolva a tumorgenezis és angiogenezis folyamatát.¹⁹⁰ Az *OIP5-AS1* érdekes módon a miR-200b-hez kapcsolódva az *ACE2* expresszióját regulálja, ami a COVID-19 egyik receptora, azonban ennek hatását a fertőzésre még nem tanulmányozták.¹⁹¹ Néhány publikációban az *OIP5-AS1* ko-expresszióját mutatták ki olyan eozinofil asztmával asszociáló gének esetében, mint a *IL2RB*, *IL2RG*, *IL5RA*, *IL7R*, *Jak2*, *Stat2*, *Stat5A*, *TLSP*, *Ccl3*, és *Cxcl8*,^{144,145} azonban allergiás rhinitisszel kapcsolatban még nem vizsgálták. Bioinformatikai elemzésünk során a transzport és exocitotikus vezikulákkal annotált gének jelentősen feldúsultak az *OIP5-AS1* célgénjei között. Vizsgálatunk alapján az *OIP5-AS1* átlagos expressziós szintje szignifikánsan magasabb szintet mutatott minden olyan összehasonlításban, ahol az allergia jelen volt akár kísérőtűnet akár önálló betegség formájában pl. allergiás rhinitis vs. COPD vagy allergiás asztma vs. nem-allergiás asztma, de mind közül a legmagasabb szintet allergiás rhinitisben mértük.

A *HNRNPU* gén esetében a helyzet egy kissé komplikáltabb. Adatbázisokban a gén nevének számos szinonímája megtalálható és korábban számos transzkriptjét tartották nyilván, ami erről a génről képződik, de fehérjévé nem íródik át. A *HNRNPU-AS1* antiszensz transzkriptumról is úgy vélték, hogy egy nem-kódoló transzkriptum, ezért lncRNS-ként került fel az előre legyártott array-re, amelyet mérésünk során alkalmaztunk. Időközben azonban kimutatták, hogy fehérje íródik át a génről, majd az adatbázisokból eltávolították, és manapság már mint *HNRNPU* kódoló génként szerepel.¹⁹² Ezt figyelembe véve a vizsgálat során egy fehérje-kódoló gén elemzése történt meg. A fehérje funkciója sok szempontból hasonlít az lncRNS-ek szervezetben betöltött szerepéhez. A fehérje képes nukleinsavhoz kötődni, részt vesz a ribonukleoprotein komplex kialakításában a sejtmagban, és fontos szerepet játszik a három-dimenziós genom szerveződésében is.^{193,194} Emellett számos más folyamatban is szerepet játszik, többek között a veleszületett immunrendszer szabályozásában, sejtproliferációban és olyan kórképek kialakulásában, mint a tumorok vagy a már említett eozinofil asztma.^{144,145,195–197} A predikciós elemzés során a *HNRNPU* számos *FGFR2* útvonallal asszociált, ami szintén a fejlődés során betöltött szerepére utal.

A legismertebb lncRNS a kiválasztottak közül, a *JPX*. Ez a nem-kódoló RNS molekuláris kapcsolóként működik az X-inaktiváció folyamatában nőkben, de daganatok kialakulásával is kapcsolatba hozták, ahol egyes ráktípusokban onkogénként másokban tumorszuppresszorként fejt ki hatását.^{143,198} A vizsgálatunk során elvégzett hálózatelemzés alapján a *JPX* több olyan immunrendszerrel kapcsolatos folyamatra is hatással van, mint az immun effektor folyamatok, sejtaktiváció az immunválaszban és neutrofil degranuláció.

Az *MZF1-ASI* hosszú nem-kódoló RNS transzkripcionális regulátorként működik közre a prolin szintézisében és a neuroblasztóma progressziójában, és emellett olyan útvonalakkal asszociál, amelyek a sejt differenciációjában, fejlődésében, proliferációjában és metabolizmusában játszanak szerepet.¹⁹⁹ Legjelentősebb mennyiségben a tüdőben expresszálódik.²⁰⁰

Ami az *RP11-325K4.3* és *RP11-282O18.3* lncRNS-eket illeti, jelenleg nem áll rendelkezésünkre sem adatbázisokból nyerhető, sem publikációk során feltárt információ. Bioinformatikai analízis során az *RP11-325K4.3* fejlődés során zajló folyamatokkal, míg az *RP11-282O18.3* aminosav metabolizmussal asszociált.

A vizsgált lncRNS gének kifejeződésének mértéke ugyan nem különbözött a gyermekkori asztma és gyermek kontrollcsoport között, néhány nem-kódoló RNS (*HNRNPU*, *RP11-325K4.3*, *JPX*) esetén szignifikánsan magasabb expressziós szintet tapasztaltunk gyermekekben felnőttekhez képest (ennek megfelelően az elemzés során nem alkalmaztunk összevont korcsoportos elemzést). Mivel a *HNRNPU* és a *JPX* a sejtproliferációban játszik szerepet, emelkedett szintjük a gyermekek vérmintájában a fejlődés során betöltött szerepükre utal. Az *RP11-325K4.3* funkcióját tekintve még nincs elfogadott konszenzus az irodalomban, de emelkedett szintje gyermekekben szintén a fejlődésbeli folyamatokban való részvételre utalhat, melyet funkcionális predikció során is sikerült kimutatnunk. Érdeemes megemlíteni, hogy az *RP11-325K4.3* lncRNS volt az egyetlen, amelynek expressziós mintázata szignifikánsan eltért felnőtt asztma és COPD között.

Egy tanulmány szerint, ami felnőttkorban az lncRNS-ek expressziójának életkorral-asszociált (20 és 79 éves kor között) változását vizsgálta különböző humán szövetekben, nincs olyan hosszú nem-kódoló RNS a keringésben, amely korfüggő

expressziót mutatna.²⁰¹ Feltételezhető, hogy a felnőttkor elérését követően a vérben keringő lncRNS-ek expressziós mintázata nem változik jelentős mértékben, így kortól függetlenül használhatóak biomarkerként. Természetesen, ez a feltételezés további vizsgálatokat igényel több mintából álló diverz populáció elemzésével.

Eredményeink közül talán a legérdekesebb, hogy mind a hat kiválasztott cirkuláló hosszú nem-kódoló RNS szignifikánsan különböző expressziós mintázatot mutatott a felnőtt kontroll vs. allergiás rhinitis összehasonlítás során. Jelen tudásunk szerint, egészen eddig egyetlen cikk sem foglalkozott a humán vérben található lncRNS expressziós mintázattal allergiás rhinitisben. A vizsgálat során arra is kíváncsiak voltunk, hogy ezek az lncRNS-ek együtt, vagy külön-külön milyen diszkriminatív erőt képviselnek, használhatóak-e biomarkerként. Azokat az összehasonlításokat elemeztük, ahol legalább egy szignifikáns eltérést már kimutattunk. A kiértékelés Naïve Bayes-modell segítségével történt, amellyel a kiválasztott lncRNS-ek három modell szerint kerültek értékelésre: (1) önmagukban, (2) az összes lncRNS együttevve, illetve (3) csak a szignifikáns eltérést mutatók. Néhány esetben hiába kaptunk szignifikáns p-értéket az expressziós eloszlások vizsgálatakor, a Naïve Bayes-i tesztelés során a diszkriminatív erő mértéke alacsony volt a magas, minták közötti szórás miatt (pl. *RP11-325K4.3* esetében a COPD vs. asztma összehasonlítás (korrigált p-érték = 0.0092; WA = 0,49) és COPD vs. allergiás rhinitis (korrigált p-érték = 0,0002; WA = 0,52). Ezen esetekben az adott lncRNS nem alkalmazható biomarkerként, azonban a betegségek vagy azok egyes endotípusainak patomechanizmusában szerepet játszhat.

Más esetekben az lncRNS-ek egyedül vagy kombinációban meglehetősen magas megkülönböztető értéket mutattak. A WA érték kiszámítása során a legmagasabb értéket a felnőtt kontroll vs. allergiás rhinitis összehasonlításakor kaptuk. Az *OIP5-ASI* és *JPX*, 0,98 és 0,9 WA értéket mutattak külön-külön, a hat lncRNS együttes használata pedig 0,98-as WA értéket ért el. Bár a COPD-s páciensek 30%-a allergiás rhinitis tüneteit is mutatja társbetegségként, a WA szintén emelkedett értéket mutatott COPD vs. allergiás rhinitis összehasonlításakor (*OIP5-ASI*: WA=0,81; csak a szignifikáns lncRNS-ek kombinációja: WA=0,85). Allergiás asztma vs. nem-allergiás asztma vizsgálatok egyik modell sem volt képes 70% feletti pontossággal megkülönböztetni a két csoportot (a legmagasabb WA érték 0,68 volt ha csak a szignifikáns lncRNS-eket vesszük figyelembe), azonban mivel jelenleg nincs olyan biomarker ami ezt a két asztma

endotípust egyértelműen meg tudná különböztetni, érdemes lehet ezek további vizsgálata.²⁰²

Habár az allergiás rhinitis diagnózisa ma már elég megbízható (tünetek, bőrpróba, allergén-specifikus IgE), még mindig nincs olyan objektív biomarker, amely képes a tünetek nyomonkövetésére allergénspecifikus immunterápia során. Jelenleg a klinikai értékelés a szubjektív klinikai és immunológiai paraméterek változásán alapul. Több, különböző algoritmust dolgoztak már ki a tünetek és gyógyszerelés pontosítására, azonban ma még egyik sem általánosan elfogadott.²³

Természetesen nem lehet egyértelműen kijelenteni, hogy az *OIP5-AS1*, *JPX* vagy a kiválasztott 6 lncRNS kombinációja hasznos biomarkerek az AIT-ben, de mindenképpen érdemes tesztelni őket. A hat lncRNS közül öt esetben mértünk több, mint kétszeres expressziós szintváltozást a kontrollcsoporthoz képest. Az *OIP5-AS1* különösen ígéretes jelöltnek tűnik, mivel az expressziós szintje relatíve kis szórást mutatott rhinitis és kontrollcsoporton belül, illetve a diszkriminatív ereje még önmagában is kiemelkedően magas volt (WA=0,98). Meg kell azonban említeni, hogy a minták gyűjtése májusban és júniusban történt, míg a parlagfű csúcsidénye Magyarországon augusztus és október közé tehető. Jelenleg még nem tudni, hogy ezen lncRNS-ek keringésben mérhető szintje korrelál-e a tünetek súlyosságával, illetve, hogy hogyan változik az immunterápia során, azonban a szignifikánsan emelkedett expressziójuk alapján arra következtethetünk, hogy részt vesznek az allergiás rhinitis patomechanizmusában, amely feltételezés ha bizonyítást nyer, potenciális új gyógyszer-célpontok lehetnek. Köztudott, hogy az allergia tüneteinek többségéért a FcRI és allergén-specifikus IgE közötti kereszt-kötés felelős, amely a hízósejtekből és bazofil granulocitákból felszabaduló gyulladáshoz vezető mediátorok exocitózist okozza. Bioinformatikai elemzésünk szerint az *OIP5-AS1* a transzport és exocitotikus vezikulák sejtkomponenseivel asszociál. Az *OIP5-AS1* magasabb szintje ezen vezikulák fokozott mennyiségére utalhat allergiás betegekben. Amennyiben további vizsgálatok során is sikerül ezt igazolni, új terápiás vagy gyógyszer-célpont lehet.

6. Következtetések

Tie2 útvonal és a *TEK* gén szerepének vizsgálata

- Az rs622232 SNP jelenléte gyermekkori asztmás populációban, fiúkban megnövelte az allergiás conjunctivitis kialakulásának kockázatát domináns és allélikus módon
- az rs7034505 variáció minor alléljának homozigóta formában való jelenléte lányokban emelkedett allergiás conjunctivitis kockázattal asszociált
- az rs3824410 variáció minor T alléljának jelenléte csökkenti a súlyos asztma kialakulásának rizikóját felnőtt (allergiás) asztmás populációban
- asztma-egér modell vizsgálata során a *Tek* és *Angpt1* gén alulexpresszáldott kontrollokhoz képest, míg a proinflammatorikus *Nfkb1* expressziója szignifikánsan emelkedett
- a Tie2 útvonal és *TEK* gén szerepe asztmában és allergiás conjunctivitisben további bizonyítást nyert
- a Tie2 útvonal, a *TEK* gén és a kapcsolódó génvariációk potenciális terápiás célpontok lehetnek asztmában és allergiás conjunctivitisben.

Neutrofil extracelluláris csapdák vizsgálata

- Kidolgoztunk egy új áramlási citométer alapú mérési technikát a neutrofil extracelluláris csapdák mennyiségi értékeléséhez, amely akár a klinikumban is alkalmazható
- nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a betegcsoportok közötti átlag NET-szintben
- az asztma súlyossággal parallel emelkedő NET átlagértéket kaptunk
- a légzésfunkció FEV1 értéke negatív korrelációt mutatott a NET-szinttel
- az inhalációs kortikoszteroidok NET-csökkentő hatásúak lehetnek, mely jelenség kihasználható lehetne olyan kórképekben, ahol a netózis folyamata szerepet játszik a betegség patogenezisében.

Hosszú nem-kódoló RNS-ek vizsgálata

- A felfedező kohorszban 27 lncRNS mutatott nominálisan szignifikáns eltérést legalább egy összehasonlításban
- mind a hat, replikációs vizsgálatra kiválasztott (*OIP5-ASI*, *HNRNPU*, *RP11-325K4.3*, *JPX*, *RP11-282O18.3*, *MZF1-ASI*) lncRNS szignifikánsan magasabb szinten expresszáldott felnőtt allergiás rhinitisben kontrollokhoz képest
- gyermek és felnőtt kontrollcsoport között 3 lncRNS (*HNRNPU*, *RP11-325K4.3* és *JPX*) mutatott expressziós különbséget
- allergiás asztmában az *RP11-325K4.3*, *HNRNPU* és *OIP5-ASI* lncRNS-ek szignifikánsan magasabb expressziót mutattak nem-allergiás asztmával szemben
- felnőtt asztma és COPD között egyetlen lncRNS mutatott különbséget, az *RP11-325K4.3*, mely szignifikánsan magasabb normalizált expressziós szintet mutatott asztmában COPD-vel szemben, azonban a nagy minták közötti szórás miatt differenciáldiagnosztikára nem alkalmas
- az *OIP5-ASI* átlag expressziója minden esetben szignifikánsan magasabb szintet mutatott abban a csoportban, ahol az allergia jelen volt önmagában vagy társbetegség formájában, valamint a biomarkerként történő vizsgálata során a legmagasabb diszkriminatív erővel rendelkezett
- az *OIP5-ASI*, *JPX* vagy a kiválasztott 6 lncRNS kombinációja hasznosnak bizonyulhat AIT nyomkövetésére.

7. Összefoglalás

A *TEK* gén és a Tie2 útvonal összefüggéseit asztmával és allergiás conjunctivitisszel kapcsolatban vizsgálva, asszociációs tesztek végezve, a gén 2 SNP-je gyermek asztmás populációban conjunctivitisre hajlamosított, míg egy másik SNP csökkentette a súlyos asztma kialakulásának kockázatát a felnőtt asztmás populációban. Asztmás egérmodell segítségével kimutattuk a *Tek* és *Angpt1* gének expressziójának szignifikáns csökkenését, míg a proinflammatorikus *Nfkb1* expressziója szignifikánsan emelkedett kontrollcsoporthoz képest. Eredményeink további bizonyítékokat szolgáltatnak a Tie2 útvonal, a *TEK* gén és variációi szerepére asztmában és allergiás conjunctivitisben. A gén és az ahhoz kapcsolódó útvonalak mindkét betegség lehetséges terápiás célpontjai lehetnek a jövőben.

A neutrofil extracelluláris csapdák szerepet játszhatnak az asztma és a COPD kialakulásában. Jelenlétük stimulálatlan sejtmentes plazma mintából kimutatható konfokális lézer-pásztázó mikroszkóp segítségével. A keringő NET-ek *in vivo* kvantitatív kimutatására egy áramlási citometrián alapuló módszert dolgoztunk ki, mely akár klinikai körülmények között is alkalmazható. A NET-ek szintje szignifikáns összefüggést mutatott az asztma súlyosságával, és negatívan korrelált a FEV1 légzésfunkció értékkel. A gyógyszerhasználat vizsgálata során az ICS NET-csökkentő hatását detektáltuk, mely ha megerősítést nyer akkor felhasználható lehetne olyan betegségekben, amelyekben a NET képződése hozzájárul a kórkép patogeneziséhez.

Nyolcvannégy hosszú nem-kódoló RNS expresszióját vizsgáltuk asztmás, COPD-s és kontroll mintákból álló felfedező populációban. Hat lncRNS-t választottunk ki további kibővített populáción történő elemzésre, melyben gyermek és allergiás rhinitises minták is helyet kaptak. Mind a 6 lncRNS expressziója szignifikánsan magasabb volt felnőtt allergiás rhinitisben kontrollokhoz képest. Biomarker vizsgálat során az *OIP5-AS1* és *JPX* rendelkezett a legmagasabb diszkriminatív értékkel. Ez alapján felhasználhatóak lehetnének akár az AIT nyomonkövetésére is. A keringő lncRNS-ek csoportok közötti expressziós eltérései biomarkerekként alkalmazhatóak és asztmában, COPD-ben, illetve allergiában betöltött szerepükre utalnak, mely alapján ezekben a betegségekben potenciális terápiás célpontok lehetnek.

8. Summary

Examining the associations between the *TEK* gene and the Tie2 pathway in relation to asthma and allergic conjunctivitis using association tests, 2 SNPs of the *TEK* gene predisposed to conjunctivitis in the pediatric asthmatic population, while another SNP reduced the risk of severe asthma in the adult asthmatic population. Examining an asthmatic mouse model, significantly decreased expression of *Tek* and *Angpt1* was detected, while the expression of proinflammatory *Nfkb1* was significantly increased. Our results provide further evidence that the Tie2 pathway, the *TEK* gene and its variations may play a role in asthma and allergic conjunctivitis. The gene and its associated pathways might be potential therapeutic targets for both diseases in the future.

Neutrophil extracellular traps may play a role in the development of asthma and COPD. Their presence can be detected from an unstimulated cell-free plasma sample using a confocal scanning microscope. A method, based on flow cytometry, has been developed for the quantitative evaluation of *in vivo* circulating NETs, which can be used even in clinical settings. The level of NETs was significantly correlated with asthma severity and negatively correlated with the value of FEV1. During the evaluation of medical useage, NET-lowering effect of ICS was detected, if it will be confirmed, could be used in diseases in which the formation of NET contributes to the pathogenesis.

The expression of 84 long non-coding RNAs was examined in a population of asthmatic, COPD, and control samples. Based on the results and literature data, 6 lncRNAs were selected for further analysis in an expanded population that included pediatric and allergic rhinitis samples. Expression of all 6 lncRNAs was significantly higher in adult allergic rhinitis compared to controls. In the study of lncRNAs as biomarkers, *OIP5-AS1* and *JPX* had the highest discriminant value in allergic rhinitis vs. control comparison. Based on this, they could even be used to monitor allergen-specific immunotherapy. Differences between groups in the expression of circulating lncRNAs can be used as biomarkers and suggest their role in asthma, COPD, and allergy, which makes them applicable in these diseases as potential therapeutic targets.

9. Irodalomjegyzék

1. Calderon MA, Demoly P, Gerth Van Wijk R, Bousquet J, Sheikh A, Frew A, Scadding G, Bachert C, Malling HJ, Valenta R, Bilo B, Nieto A, Akdis C, Just J, Vidal C, Varga EM, Alvarez-Cuesta E, Bohle B, Bufe A, Canonica WG, Cardona V, Dahl R, Didier A, Durham SR, Eng P, Fernandez-Rivas M, Jacobsen L, Jutel M, Kleine-Tebbe J, Klimek L, Lötvall J, Moreno C, Mosges R, Muraro A, Niggemann B, Pajno G, Passalacqua G, Pfaar O, Rak S, Senna G, Senti G, Valovirta E, Van Hage M, Virchow JC, Wahn U, Papadopoulos N. (2012) EAACI: A European Declaration on Immunotherapy. Designing the future of allergen specific immunotherapy. *Clin Transl Allergy*. 2:20.
2. Carr TF, Kraft M. (2018) Use of biomarkers to identify phenotypes and endotypes of severe asthma. *Ann Allergy, Asthma Immunol*. 121:414–20.
3. Segreti A, Stirpe E, Rogliani P, Cazzola M. (2014) Defining Phenotypes in COPD: An Aid to Personalized Healthcare. *Mol Diagnosis Ther*. 18:381–388.
4. Hofker MH, Fu J, Wijmenga C. (2014) The genome revolution and its role in understanding complex diseases. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 1842:1889–95.
5. Gál Z, Gézsi A, Molnár V, Nagy A, Kiss A, Sultész M, Csoma Z, Tamási L, Gálffy G, Bálint BL, Póliska S, Szalai C. (2020) Investigation of the Possible Role of Tie2 Pathway and TEK Gene in Asthma and Allergic Conjunctivitis. *Front Genet*. 11:128.
6. Cheng OZ, Palaniyar N. (2013) NET balancing: a problem in inflammatory lung diseases. *Front Immunol*. 4:1.
7. Schlosser K, Hanson J, Villeneuve PJ, Dimitroulakos J, McIntyre L, Pilote L, Stewart DJ. (2016) Assessment of Circulating LncRNAs Under Physiologic and Pathologic Conditions in Humans Reveals Potential Limitations as Biomarkers. *Sci Rep*. 6:36596.
8. Holgate ST, Wenzel S, Postma DS, Weiss ST, Renz H, Sly PD. (2015) Asthma.

- Nat Rev Dis Prim. 1:1–22.
9. Allergy Diagnosis | AAFA.org Available at: <https://www.aafa.org/allergy-diagnosis/>.
 10. Gilles S, Akdis C, Lauener R, Schmid-Grendelmeier P, Bieber T, Schäppi G, Traidl-Hoffmann C. (2018) The role of environmental factors in allergy: A critical reappraisal. *Exp Dermatol*. 27:1193–200.
 11. Bjermer L, Westman M, Holmström M, Wickman MC. (2019) The complex pathophysiology of allergic rhinitis: Scientific rationale for the development of an alternative treatment option. *Allergy, Asthma Clin Immunol*. 15:1–15.
 12. Sin B, Togias A. (2011) Pathophysiology of allergic and nonallergic rhinitis. *Proc Am Thorac Soc*. 8:106–14.
 13. Gour N, Wills-Karp M. (2015) IL-4 and IL-13 signaling in allergic airway disease. *Cytokine*. 75:68–78.
 14. Pelaia C, Paoletti G, Puggioni F, Racca F, Pelaia G, Canonica GW, Heffler E. (2019) Interleukin-5 in the Pathophysiology of Severe Asthma. *Front Physiol*. 10:1514.
 15. Shahana S, Kampf C, Roomans GM. (2002) Effects of the cationic protein poly-L-arginine on airway epithelial cells in vitro.
 16. Galli SJ, Tsai M, Piliponsky AM. (2008) The development of allergic inflammation. *Nature*. 454:445–54.
 17. Yamauchi K, Ogasawara M. (2019) The role of histamine in the pathophysiology of asthma and the clinical efficacy of antihistamines in asthma therapy. *Int J Mol Sci*. 20:1733.
 18. Boden SR, Wesley Burks A. (2011) Anaphylaxis: A history with emphasis on food allergy. *Immunol Rev*. 242:247–57.
 19. Szalai C, Antal P, Falus A, Oberfrank F. *Orvosi Genomika És Bioinformatika*, Szalai C (ed), Semmelweis Egyetem, 2012: 125-150.
 20. Doull IJM. (1996) Maternal inheritance of atopy? *Clin Exp Allergy*. 26:613–5.

21. Cookson WOCM, Young RP, Sandford AJ, Moffatt MF, Shirakawa T, Sharp PA, Faux JA, Le Souef PN, Julier C, Lathrop GM, Nakumura Y, Hopkin JM. (1992) Maternal inheritance of atopic IgE responsiveness on chromosome 11 q. *Lancet*. 340:381–4.
22. Piconi S, Trabattoni D, Rainone V, Borgonovo L, Passerini S, Rizzardini G, Frati F, Iemoli E, Clerici M. (2010) Immunological effects of sublingual immunotherapy: clinical efficacy is associated with modulation of programmed cell death ligand 1, IL-10, and IgG4. *J Immunol*. 185:7723–30.
23. Molnár V, Nagy A, Tamási L, Gálffy G, Böcskei R, Bikov A, Czaller I, Csoma Z, Krasznai M, Csáki C, Zsigmond G, Csontos Z, Kurucz A, Kurucz E, Fábos B, Bálint BL, Sasvári-Székely M, Székely A, Kótyuk E, Kozma GT, Cserta G, Farkas A, Gál Z, Gézsi A, Millinghoffer A, Antal P, Szalai C. (2017) From genomes to diaries: a 3-year prospective, real-life study of ragweed-specific sublingual immunotherapy. *Immunotherapy*. 9:1279–94.
24. Pitsios C, Demoly P, Bilò MB, Gerth van Wijk R, Pfaar O, Sturm GJ, Rodriguez del Rio P, Tsoumani M, Gawlik R, Paraskevopoulos G, Ruëff F, Valovirta E, Papadopoulos NG, Calderón MA. (2015) Clinical contraindications to allergen immunotherapy: an EAACI position paper. *Allergy*. 70:897–909.
25. Makra L, Juhász M, Béczi R, Borsos E. (2005) The history and impacts of airborne Ambrosia (Asteraceae) pollen in Hungary. *Grana*. 44:57–64.
26. Ariano R, Berra D, Chiodini E, Ortolani V, Cremonese LG, Mazzarello MG, Galdi E, Calosso C, Ciprandi G. (2015) Ragweed allergy: Pollen count and sensitization and allergy prevalence in two Italian allergy centers. *Allergy Rhinol*. 6:177–83.
27. Chen KW, Marusciac L, Tamas PT, Valenta R, Panaitescu C. (2018) Ragweed Pollen Allergy: Burden, Characteristics, and Management of an Imported Allergen Source in Europe. *Int Arch Allergy Immunol*. 176:163–80.
28. Bonini M, Ceriotti V. (2019) Ragweed story: from the plant to the patient. *Aerobiologia (Bologna)*.:1–4.

29. The European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI). (2015) Advocacy Manifesto Tackling the Allergy Crisis in Europe-Concerted Policy Action Needed.
30. Kuruvilla ME, Lee FEH, Lee GB. (2019) Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease. *Clin Rev Allergy Immunol.* 56:219–33.
31. Garudadri S, Woodruff PG. (2018) Targeting chronic obstructive pulmonary disease phenotypes, endotypes, and biomarkers. *Ann Am Thorac Soc.* 15:S234–8.
32. Tamási L, Balikó Z, Bálint B, Bártfai Z, Bauknecht É, Böszörményi Nagy G, Gálffy G, Herjavec I, Horváth I, Losonczy G, Márk Z, Müller V, Somfay A, Szilasi M. (2012) Az asztma diagnosztikájának, kezelésének és gondozásának alapelvei felnőttkorban. *Med Thorac.* LXV.5.:307–28.
33. Ledford DK, Lockey RF. (2013) Asthma and comorbidities. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 13:78–86.
34. ten Brinke A, Sterk PJ, Masclee AAM, Spinhoven P, Schmidt JT, Zwinderman AH, Rabe KF, Bel EH. (2005) Risk factors of frequent exacerbations in difficult-to-treat asthma. *Eur Respir J.* 26:812–8.
35. Svenningsen S, Nair P. (2017) Asthma endotypes and an overview of targeted therapy for asthma. *Front Med.* 4:158.
36. Finotto S. (2019) Resolution of allergic asthma. *Semin Immunopathol.* 41:665–74.
37. Nagy BL. (2017) Az asthma bronchiale fenotípusai. *Orv Hetil.* 158:491–8.
38. To T, Gershon A, Wang C, Dell S, Cicutto L. (2007) Persistence and remission in childhood asthma: A population-based asthma birth cohort study. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 161:1197–204.
39. Wu C-C, Chen R-F, Kuo H-C. (2012) Different Implications of Paternal and Maternal Atopy for Perinatal IgE Production and Asthma Development. *Clin Dev Immunol.* 2012:132142.

40. La Rosa M, Lionetti E, Reibaldi M, Russo A, Longo A, Leonardi S, Tomarchio S, Avitabile T, Reibaldi A. (2013) Allergic conjunctivitis: A comprehensive review of the literature. *Ital J Pediatr.* 39:18.
41. De Groot JC, Storm H, Amelink M, De Nijs SB, Eichhorn E, Reitsma BH, Bel EHD, Brinke A Ten. (2016) Clinical profile of patients with adult-onset eosinophilic asthma. *ERJ Open Res.* 2:00100–2015.
42. Laidlaw TM. (2019) Clinical updates in aspirin-exacerbated respiratory disease. *Allergy Asthma Proc.* 40:4–6.
43. Lee RU, Stevenson DD. (2010) Aspirin-exacerbated respiratory disease: Evaluation and management. *Allergy, Asthma Immunol Res.* 3:3–10.
44. Kennedy JL, Stoner AN, Borish L. (2016) Aspirin-exacerbated respiratory disease: Prevalence, diagnosis, treatment, and considerations for the future. *Am J Rhinol Allergy.* 30:407–13.
45. Moore WC, Meyers DA, Wenzel SE, Teague WG, Li H, Li X, D'Agostino R, Castro M, Curran-Everett D, Fitzpatrick AM, Gaston B, Jarjour NN, Sorkness R, Calhoun WJ, Chung KF, Comhair SAA, Dweik RA, Israel E, Peters SP, Busse WW, Erzurum SC, Bleeker ER. (2010) Identification of asthma phenotypes using cluster analysis in the severe asthma research program. *Am J Respir Crit Care Med.* 181:315–23.
46. Tliba O, Panettieri RA. (2019) Paucigranulocytic asthma: Uncoupling of airway obstruction from inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 143:1287–94.
47. Trivedi M, Denton E. (2019) Asthma in children and adults—what are the differences and what can they tell us about asthma? *Front Pediatr.* 7:256.
48. Lambrecht BN, Hammad H. (2015) The immunology of asthma. *Nat Immunol.* 16:45–56.
49. Hirano T, Matsunaga K. (2018) Late-onset asthma: Current perspectives. *J Asthma Allergy.* 11:19–27.
50. Chang HS, Lee TH, Jun JA, Baek AR, Park JS, Koo SM, Kim YK, Lee HS, Park

- CS. (2017) Neutrophilic inflammation in asthma: mechanisms and therapeutic considerations. *Expert Rev Respir Med.* 11:29–40.
51. Fleming L, Heaney L. (2019) Severe Asthma—Perspectives From Adult and Pediatric Pulmonology. *Front Pediatr.* 7:389.
 52. Ito K, Lim S, Caramori G, Chung KF, Barnes PJ, Adcock IM. (2001) Cigarette smoking reduces histone deacetylase 2 expression, enhances cytokine expression, and inhibits glucocorticoid actions in alveolar macrophages. *FASEB J.* 15:1110–2.
 53. Tilley AE, Walters MS, Shaykhiev R, Crystal RG. (2015) Cilia Dysfunction in Lung Disease. *Annu Rev Physiol.* 77:379–406.
 54. Thomsen SF. (2015) Genetics of asthma: an introduction for the clinician. *Eur Clin Respir J.* 2:24643.
 55. Holgate ST, Davies DE, Powell RM, Holloway JW. (2005) ADAM33: A Newly Identified Gene in the Pathogenesis of Asthma. *Immunol Allergy Clin North Am.* 25:655–68.
 56. Moffatt MF, Kabesch M, Liang L, Dixon AL, Strachan D, Heath S, Depner M, Von Berg A, Bufe A, Rietschel E, Heinzmann A, Simma B, Frischer T, Willis-Owen SAG, Wong KCC, Illig T, Vogelberg C, Weiland SK, Von Mutius E, Abecasis GR, Farrall M, Gut IG, Lathrop GM, Cookson WOC. (2007) Genetic variants regulating *ORMDL3* expression contribute to the risk of childhood asthma. *Nature.* 448:470–3.
 57. Sleiman PMA, Flory J, Imielinski M, Bradfield JP, Annaiah K, Willis-Owen SAG, Wang K, Rafaels NM, Michel S, Bonnelykke K, Zhang H, Kim CE, Frackelton EC, Glessner JT, Hou C, Otieno FG, Santa E, Thomas K, Smith RM, Glaberson WR, Garris M, Chiavacci RM, Beaty TH, Ruczinski I, Orange JS, Allen J, Spergel JM, Grundmeier R, Mathias RA, Christie JD, von Mutius E, Cookson WOC, Kabesch M, Moffatt MF, Grunstein MM, Barnes KC, Devoto M, Magnusson M, Li H, Grant SFA, Bisgaard H, Hakonarson H. (2010) Variants of *DENND1B* Associated with Asthma in Children. *N Engl J Med.* 362:36–44.

58. Whelan R, Kim C, Chen M, Leiter J, Grunstein MM, Hakonarson H. (2004) Role and regulation of interleukin-1 molecules in pro-asthmatic sensitised airway smooth muscle. *Eur Respir J.* 24:559–67.
59. Munthe-Kaas MC, Håkon Carlsen K, Helms PJ, Gerritsen J, Whyte M, Feijen M, Skinningsrud B, Main M, Ng Man Kwong G, Lie BA, Lødrup Carlsen KC, Undlien DE. (2004) CTLA-4 polymorphisms in allergy and asthma and the TH1/T H2 paradigm. *J Allergy Clin Immunol.* 114:280–7.
60. Boonpiyathad S, Pornsuriyasak P, Buranapraditkun S, Klaewsongkram J. (2013) Interleukin-2 levels in exhaled breath condensates, asthma severity, and asthma control in nonallergic asthma. *Allergy Asthma Proc.* 34:e35-41.
61. Zhang JH, Zhang M, Wang YN, Zhang XY. (2019) Correlation between il-4 and il-13 gene polymorphisms and asthma in uygur children in xinjiang. *Exp Ther Med.* 17:1374–82.
62. Saha S, Doe C, Mistry V, Siddiqui S, Parker D, Sleeman M, Cohen ES, Brightling CE. (2009) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression in induced sputum and bronchial mucosa in asthma and COPD. *Thorax.* 64:671–6.
63. Liang SQ, Chen XL, Deng JM, Wei X, Gong C, Chen ZR, Wang ZB. (2014) Beta-2 adrenergic receptor (ADRB2) gene polymorphisms and the risk of asthma: A meta-analysis of case-control studies. *PLoS One.* 9:e104488.
64. Zhou T, Huang X, Ma J, Zhou Y, Liu Y, Xiao L, Yuan J, Xie J, Chen W. (2019) Association of plasma soluble CD14 level with asthma severity in adults: A case control study in China. *Respir Res.* 20:19.
65. Virchow JC, Julius P, Matthys H, Kroegel C, Luttmann W. (1998) CD14 expression and soluble CD14 after segmental allergen provocation in atopic asthma. *Eur Respir J.* 11:317–23.
66. Murdaca G, Contini P, Negrini S, Ciprandi G, Puppo F. (2016) Immunoregulatory role of HLA-G in allergic diseases. *J Immunol Res.* 2016:6865758.

67. White SR, Loisel DA, McConville JF, Stern R, Tu Y, Marroquin BA, Noth I, Ober C. (2010) Levels of soluble human leukocyte antigen-G are increased in asthmatic airways. *Eur Respir J.* 35:925–7.
68. Li X, Howard TD, Zheng SL, Haselkorn T, Peters SP, Meyers DA, Bleecker ER. (2010) Genome-wide association study of asthma identifies RAD50-IL13 and HLA-DR/DQ regions. *J Allergy Clin Immunol.* 125:328-335.e11.
69. Gao J, Lin Y, Qiu C, Liu Y, Ma Y, Liu Y. (2003) Association between HLA-DQA1, -DQB1 gene polymorphisms and susceptibility to asthma in northern Chinese subjects. *Chin Med J (Engl).* 116:1078–82.
70. Randolph AC, Lange C, Silverman EK, Lazarus R, Weiss ST. (2005) Extended haplotype in the tumor necrosis factor gene cluster is associated with asthma and asthma-related phenotypes. *Am J Respir Crit Care Med.* 172:687–92.
71. Berry M, Brightling C, Pavord I, Wardlaw A. (2007) TNF- α in asthma. *Curr Opin Pharmacol.* 7:279–82.
72. Ding W, Zou GL, Zhang W, Lai XN, Chen HW, Xiong LX. (2018) Interleukin-33: Its emerging role in allergic diseases. *Molecules.* 23:1–16.
73. Sharma S, Ghosh B. (2009) Promoter polymorphism in the MS4A2 gene and asthma in the Indian population. *Int Arch Allergy Immunol.* 149:208–18.
74. Massoud AH, Charbonnier LM, Lopez D, Pellegrini M, Phipatanakul W, Chatila TA. (2016) An asthma-associated IL4R variant exacerbates airway inflammation by promoting conversion of regulatory T cells to TH17-like cells. *Nat Med.* 22:1013–22.
75. Das S, Miller M, Broide DH. (2017) Chromosome 17q21 Genes ORMDL3 and GSDMB in Asthma and Immune Diseases. *Adv Immunol.* 135:1–52.
76. Decker R. (2020) Global Initiative for Asthma Asthma Management and Prevention for Adults and Children Older than 5 Years - a Pocket Guide for Health Professionals Available at: www.ginasthma.org.
77. Global Initiative For Asthma. (2019) Global Strategy for Asthma Management

- and Prevention. Available at: <https://ginasthma.org/wp-content/uploads/2019/06/GINA-2019-main-report-June-2019-wms.pdf>.
78. Ildikó H, Zsuzsanna C, Gábor K. (2019) Az asthma bronchiale és biológiai kezelése - Asthma and its biological treatment. *Magy Tudomány*. 180:1297–303.
 79. Csoma Z, Szalai C. (2012) Az asztma kezelése és genetikai háttere. 4:1–9.
 80. World Health Organisation. (2007) *Global Surveillance, Prevention and Control of CHRONIC RESPIRATORY DISEASES. A Comprehensive Approach.*, Jean Bousquet, Nikolai Khaltsev (eds).
 81. World Health Organization. Asthma. Available at: <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/asthma>.
 82. Braman SS. (2006) The Global Burden of Asthma. *Chest*. 130:4S-12S.
 83. Naeem A, Silveyra P. (2019) Sex Differences in Paediatric and Adult Asthma. *Eur Med J (Chelmsford, England)*. 4:27–35.
 84. Az Emberi Erőforrások Minisztériuma Szakmai irányelve az asztma diagnosztikájának, kezelésének és orvosi gondozásának alapelveiről felnőttkorban; 2018 EüK 13 szám EMMI szakmai irányelv Available at: http://www.hbcs.hu/uploads/jogszabaly/2761/fajlok/EMMI_szakmai_iranyelve_astma.pdf.
 85. Csoma Z, Gál Z, Gézsi A, Herjavec I, Szalai C. (2020) Prevalence and characterization of severe asthma in Hungary. *Sci Rep*. 10:9274.
 86. Campbell DE, Mehr S. (2015) Fifty years of allergy: 1965-2015. *J Paediatr Child Health*. 51:91–3.
 87. Bendiks M, Kopp MV. (2013) The relationship between advances in understanding the microbiome and the maturing hygiene hypothesis. *Curr Allergy Asthma Rep*. 13:487–94.
 88. Ege MJ. (2017) The hygiene hypothesis in the age of the microbiome. *Ann Am Thorac Soc*. 14:S348–53.
 89. Knox RB, Suphioglu C, Taylor P, Desai R, Watson HC, Peng JL, Bursill LA.

- (1997) Major grass pollen allergen Lol p 1 binds to diesel axhaust particles: Implications for asthma and air pollution. *Clin Exp Allergy*. 27:246–51.
90. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (2020) Available at: www.goldcopd.org.
 91. GOLD report 2021 Available at: https://goldcopd.org/wp-content/uploads/2020/11/GOLD-REPORT-2021-v1.1-25Nov20_WMV.pdf.
 92. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) Available at: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-\(copd\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chronic-obstructive-pulmonary-disease-(copd)).
 93. Hayden LP, Cho MH, Raby BA, Beaty TH, Silverman EK, Hersh CP. (2018) Childhood asthma is associated with COPD and known asthma variants in COPDGene: A genome-wide association study. *Respir Res*. 19:209.
 94. Almoguera B, Vazquez L, Mentch F, Connolly J, Pacheco JA, Sundaresan AS, Peissig PL, Linneman JG, McCarty CA, Crosslin D, Carrell DS, Lingren T, Namjou-Khales B, Harley JB, Larson E, Jarvik GP, Brilliant M, Williams MS, Kullo IJ, Hysinger EB, Sleiman PMA, Hakonarson H. (2017) Identification of four novel loci in Asthma in European American and African American Populations. *Am J Respir Crit Care Med*. 195:456–63.
 95. Fodor LE, Gézsi A, Gál Z, Nagy A, Kiss A, Bikov A, Szalai C. (2018) Variation in the TEK gene is not associated with asthma but with allergic conjunctivitis. *Int J Immunogenet*. 45:102–8.
 96. Zhang Y, Kontos CD, Annex BH, Popel AS. (2019) Angiopoietin-Tie Signaling Pathway in Endothelial Cells: A Computational Model. *iScience*. 20:497–511.
 97. Brindle NPJ, Saharinen P, Alitalo K. (2006) Signaling and functions of angiopoietin-1 in vascular protection. *Circ Res*. 98:1014–23.
 98. Karar J, Maity A. (2011) PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. *Front Mol Neurosci*. 4:51.
 99. Thurston G, Daly C. (2012) The complex role of angiopoietin-2 in the

- angiopoietin-Tie signaling pathway. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2:a006650.
100. Augustin HG, Young Koh G, Thurston G, Alitalo K. (2009) Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin - Tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10:165–77.
 101. Saharinen P, Eklund L, Alitalo K. (2017) Therapeutic targeting of the angiopoietin-TIE pathway. *Nat Rev Drug Discov.* 16:635–61.
 102. Fukuhara S, Sako K, Noda K, Nagao K, Miura K, Mochizuki N. (2009) Tie2 is tied at the cell-cell contacts and to extracellular matrix by Angiopoietin-1. *Exp Mol Med.* 41:133–9.
 103. Erickson KK, Sundstrom JM, Antonetti DA. (2007) Vascular permeability in ocular disease and the role of tight junctions. *Angiogenesis.* 10:103–17.
 104. Souma T, Tompson SW, Thomson BR, Siggs OM, Kizhatil K, Yamaguchi S, Feng L, Limviphuvadh V, Whisenhunt KN, Maurer-Stroh S, Yanovitch TL, Kalaydjieva L, Azmanov DN, Finzi S, Mauri L, Javadiyan S, Souzeau E, Zhou T, Hewitt AW, Kloss B, Burdon KP, Mackey DA, Allen KF, Ruddle JB, Lim SH, Rozen S, Tran-Viet KN, Liu X, John S, Wiggs JL, Pasutto F, Craig JE, Jin J, Quaggin SE, Young TL. (2016) Angiopoietin receptor TEK mutations underlie primary congenital glaucoma with variable expressivity. *J Clin Invest.* 126:2575–87.
 105. Kaplan MJ, Radic M. (2012) Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J Immunol.* 189:2689–95.
 106. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 303:1532–5.
 107. Hoppenbrouwers T, Autar ASA, Sultan AR, Abraham TE, Van Cappellen WA, Houtsmuller AB, Van Wamel WJB, Van Beusekom HMM, Van Neck JW, De Maat MPM. (2017) In vitro induction of NETosis: Comprehensive live imaging comparison and systematic review. *PLoS One.* 12:e0176472.
 108. Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W,

- Brinkmann V, Jungblut PR, Zychlinsky A. (2009) Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog.* 5:e1000639.
109. Porto BN, Stein RT. (2016) Neutrophil Extracellular Traps in Pulmonary Diseases: Too Much of a Good Thing? *Front Immunol.* 7:311.
 110. Akong-Moore K, Chow OA, von Köckritz-Blickwede M, Nizet V. (2012) Influences of Chloride and Hypochlorite on Neutrophil Extracellular Trap Formation. *PLoS One.* 7:e42984.
 111. Papayannopoulos V. (2018) Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol.* 18:134–47.
 112. Petretto A, Bruschi M, Pratesi F, Croia C, Candiano G, Ghiggeri G, Migliorini P. (2019) Neutrophil extracellular traps (NET) induced by different stimuli: A comparative proteomic analysis. *PLoS One.* 14:e0218946.
 113. Jorch SK, Kubes P. (2017) An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. *Nat Med.* 23:279–87.
 114. Yipp BG, Kubes P. (2013) NETosis: How vital is it? *Blood.* 122:2784–94.
 115. Liu T, Wang F-P, Wang G, Mao H. (2017) Plasma NET levels in chronic lung diseases: Role of Neutrophil Extracellular Traps in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Chin Med J (Engl).* 130:730–6.
 116. Singh D, Agusti A, Anzueto A, Barnes PJ, Bourbeau J, Celli BR, Criner GJ, Frith P, Halpin DMG, Han M, López Varela MV, Martínez F, Montes de Oca M, Papi A, Pavord ID, Roche N, Sin DD, Stockley R, Vestbo J, Wedzicha JA, Vogelmeier C. (2019) Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease: the GOLD science committee report 2019. *Eur Respir J.* 53:1900164.
 117. Patel AR, Patel AR, Singh S, Singh S, Khawaja I. (2019) Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease: The Changes Made. *Cureus.* 11:e4985.
 118. Perry MM, Tsitsiou E, Austin PJ, Lindsay MA, Gibeon DS, Adcock IM, Chung

- KF. (2014) Role of non-coding RNAs in maintaining primary airway smooth muscle cells. *Respir Res.* 15:58.
119. Mishra K, Kanduri C. (2019) Understanding long noncoding RNA and chromatin interactions: What we know so far. *Non-coding RNA.* 5:54.
 120. Nagy Z, Szabó DR, Zsippai A, Falus A, Rácz K, Igaz P. (2012) A hosszú, nem kódoló RNS-ek jelentősége a daganatbiológiában. *Orv Hetil.* 153:1494–501.
 121. Morrissy AS, Griffith M, Marra MA. (2011) Extensive relationship between antisense transcription and alternative splicing in the human genome. *Genome Res.* 21:1203–12.
 122. Wu Z, Liu X, Liu L, Deng H, Zhang J, Xu Q, Cen B, Ji A. (2014) Regulation of lncRNA expression. *Cell Mol Biol Lett.* 19:561–75.
 123. Yan BX, Ma JX. (2012) Promoter-associated RNAs and promoter-targeted RNAs. *Cell Mol Life Sci.* 69:2833–42.
 124. Malik B, Feng F. (2016) Long noncoding RNAs in prostate cancer: Overview and clinical implications. *Asian J Androl.* 18:568–74.
 125. Narożna B, Langwiński W, Szczepankiewicz A. (2017) Non-Coding RNAs in Pediatric Airway Diseases. *Genes (Basel).* 8:348.
 126. Zhang X, Ma L, Guo Y, Gao S, Zhao L, Li X, Tang X, Cheng D, Zhang L, Chen Z. (2016) Effect of BCYRN1 on proliferation and migration of airway smooth muscle cells in rat model of asthma. *Natl Med J China.* 96:3751–6.
 127. Austin PJ, Tsitsiou E, Boardman C, Jones SW, Lindsay MA, Adcock IM, Chung KF, Perry MM. (2017) Transcriptional profiling identifies the long noncoding RNA plasmacytoma variant translocation (PVT1) as a novel regulator of the asthmatic phenotype in human airway smooth muscle. *J Allergy Clin Immunol.* 139:780–9.
 128. Zhang Q, Wu D. (2019) Long non-coding RNA growth arrest specific-5: a potential biomarker for diagnosis of severe asthma. *Respirology.* 24:58–9.
 129. Feng Y, Yang C, Yan W. (2020) Expression of lncRNA MEG3 in asthma with

- different phenotypes and its relationship with course of disease. *Exp Ther Med.* 19:2211.
130. Li X, Ye S, Lu Y. (2020) Long non-coding RNA NEAT1 overexpression associates with increased exacerbation risk, severity, and inflammation, as well as decreased lung function through the interaction with microRNA-124 in asthma. *J Clin Lab Anal.* 34:e23023.
 131. Liang Z, Tang F. (2020) The potency of lncRNA MALAT1/miR-155/CTLA4 axis in altering Th1/Th2 balance of asthma. *Biosci Rep.* 40.
 132. Junling Lin, Xiaokai Feng, Jun Zhang, Zhaohui Tong. (2019) Long Noncoding RNA TUG1 Promotes Airway Smooth Muscle Cells Proliferation and Migration via Sponging miR-590-5p/FGF1 in Asthma - PubMed. *Am J Transl Res.* 11:3159.
 133. Zheng M, Hong W, Gao M, Yi E, Zhang J, Hao B, Liang C, Li X, Li C, Ye X, Liao B, He F, Zhou Y, Li B, Ran P. (2019) Long noncoding RNA COPDA1 promotes airway smooth muscle cell proliferation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 61:584–96.
 134. Zhang H, Sun D, Li D, Zheng Z, Xu J, Liang X, Zhang C, Wang S, Wang J, Lu W. (2018) Long non-coding RNA expression patterns in lung tissues of chronic cigarette smoke induced COPD mouse model . *Sci Rep.* 8:7609.
 135. Shen Q, Zheng J, Wang X, Hu W, Jiang Y, Jiang Y. (2020) LncRNA SNHG5 regulates cell apoptosis and inflammation by miR-132/PTEN axis in COPD. *Biomed Pharmacother.* 126:110016.
 136. Zhang J, Liu J, Ju P, Ren C, Ma Z, Jiang F. (2019) Regulation and mechanisms of lncRNA H19 in COPD. *Int J Clin Exp Med.* 12:11141–8.
 137. Chen L, Zhang YH, Pan X, Liu M, Wang S, Huang T, Cai YD. (2018) Tissue expression difference between mrnas and lncrnas. *Int J Mol Sci.* 19:3416.
 138. Tölgyesi G, Molnár V, Semsei ÁF, Kiszél P, Ungvári I, Pócza P, Wiener Z, Komlósi ZI, Kunos L, Gálffy G, Losonczy G, Seres I, Falus A, Szalai C. (2009) Gene expression profiling of experimental asthma reveals a possible role of

- paraoxonase-1 in the disease. *Int Immunol.* 21:967–75.
139. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK. (2015) Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 43.
 140. Meyer D, Dimitriadou E, Hornik K, Weingessel A, Leisch F, Chang C-C, Lin C-C. (2019) E1071: Misc Functions of the Department of Statistics, Probability Theory Group (Formerly: E1071), TU Wien.
 141. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun S-C. (2017) NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther.* 2:17023.
 142. Jiang T, Gao L, Guo J, Lu J, Wang Y, Zhang Y. (2012) Suppressing inflammation by inhibiting the NF- κ B pathway contributes to the neuroprotective effect of angiotensin-(1-7) in rats with permanent cerebral ischaemia. *Br J Pharmacol.* 167:1520–32.
 143. Tian D, Sun S, Lee JT. (2010) The long noncoding RNA, Jpx, Is a molecular switch for X chromosome inactivation. *Cell.* 143:390–403.
 144. Zhu Y-J, Mao D, Gao W, Hu H. (2018) Peripheral whole blood lncRNA expression analysis in patients with eosinophilic asthma. *Medicine (Baltimore).* 97:e9817.
 145. Zhu Y, Mao D, Gao W, Han G, Hu H. (2019) Analysis of lncRNA expression in patients with eosinophilic and neutrophilic asthma focusing on LNC-000127. *Front Genet.* 10:141.
 146. Ghosh CC, David S, Zhang R, Berghelli A, Milam K, Higgins SJ, Hunter J, Mukherjee A, Wei Y, Tran M, Suber F, Kobzik L, Kain KC, Lu S, Santel A, Yano K, Guha P, Dumont DJ, Christiani DC, Parikh SM. (2016) Gene control of tyrosine kinase Tie2 and vascular manifestations of infections. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 113:2472–7.
 147. Fodor LE, Gézsi A, Gál Z, Nagy A, Kiss A, Bikov A, Szalai C. (2018) Variation in the TEK gene is not associated with asthma but with allergic conjunctivitis. *Int J Immunogenet.* 45:102–8.

148. Boyle AP, Hong EL, Hariharan M, Cheng Y, Schaub MA, Kasowski M, Karczewski KJ, Park J, Hitz BC, Weng S, Cherry JM, Snyder M. (2012) Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. *Genome Res.* 22:1790–7.
149. Matys V. (2006) TRANSFAC(R) and its module TRANSCompel(R): transcriptional gene regulation in eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 34:D108–10.
150. Machiela MJ, Chanock SJ. (2015) LDlink: A web-based application for exploring population-specific haplotype structure and linking correlated alleles of possible functional variants. *Bioinformatics.* 31:3555–7.
151. Duerr CU, Mccarthy CDA, Mindt BC, Rubio M, Meli AP, Pothlichet J, Eva MM, Gauchat JF, Qureshi ST, Mazer BD, Mossman KL, Malo D, Gamero AM, Vidal SM, King IL, Sarfati M, Fritz JH. (2016) Type I interferon restricts type 2 immunopathology through the regulation of group 2 innate lymphoid cells. *Nat Immunol.* 17:65–75.
152. Schmiedel BJ, Seumois G, Samaniego-Castruita D, Cayford J, Schulten V, Chavez L, Ay F, Sette A, Peters B, Vijayanand P. (2016) 17q21 asthma-risk variants switch CTCF binding and regulate IL-2 production by T cells. *Nat Commun.* 7.
153. Pascoe CD, Obeidat M, Arsenault BA, Nie Y, Warner S, Stefanowicz D, Wadsworth SJ, Hirota JA, Jasmine Yang S, Dorscheid DR, Carlsten C, Hackett TL, Seow CY, Paré PD. (2017) Gene expression analysis in asthma using a targeted multiplex array. *BMC Pulm Med.* 17:189.
154. Chen W, Mempel M, Schober W, Behrendt H, Ring J. (2008) Gender difference, sex hormones, and immediate type hypersensitivity reactions. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 63:1418–27.
155. Dupuis P, Prokopich CL, Hynes A, Kim H. (2020) A contemporary look at allergic conjunctivitis. *Allergy, Asthma Clin Immunol.* 16:5.
156. FOXP1 Gene Available at: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=FOXP1>.

157. NFKB1 Gene - GeneCards | NFKB1 Protein | NFKB1 Antibody Available at: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NFKB1>.
158. Simoes DCM, Vassilakopoulos T, Toumpanakis D, Petrochilou K, Roussos C, Papapetropoulos A. (2008) Angiopoietin-1 protects against airway inflammation and hyperreactivity in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 177:1314–21.
159. PTPRB Gene - GeneCards | PTPRB Protein | PTPRB Antibody Available at: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PTPRB>.
160. Campochiaro PA. (2015) Molecular pathogenesis of retinal and choroidal vascular diseases. *Prog Retin Eye Res*. 49:67–81.
161. Campochiaro PA, Peters KG. (2016) Targeting Tie2 for Treatment of Diabetic Retinopathy and Diabetic Macular Edema. *Curr Diab Rep*. 16:126.
162. Tan GS, Cheung N, Simó R, Cheung GCM, Wong TY. (2017) Diabetic macular oedema. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 5:143–55.
163. Toussaint M, Jackson DJ, Swieboda D, Guedán A, Tsourouktsoglou T-D, Ching YM, Radermecker C, Makrinioti H, Aniscenko J, Bartlett NW, Edwards MR, Solari R, Farnir F, Papayannopoulos V, Bureau F, Marichal T, Johnston SL. (2017) Host DNA released by NETosis promotes rhinovirus-induced type-2 allergic asthma exacerbation. *Nat Med*. 23:681–91.
164. Wright TK, Gibson PG, Simpson JL, McDonald VM, Wood LG, Baines KJ. (2016) Neutrophil extracellular traps are associated with inflammation in chronic airway disease. *Respirology*. 21:467–75.
165. Zhang X-Y, Simpson JL, Powell H, Yang IA, Upham JW, Reynolds PN, Hodge S, James AL, Jenkins C, Peters MJ, Lin J-T, Gibson PG. (2014) Full blood count parameters for the detection of asthma inflammatory phenotypes. *Clin Exp Allergy*. 44:1137–45.
166. Xiong W, Xu M, Zhao Y, Wu X, Pudasaini B, Liu J. (2017) Can we predict the prognosis of COPD with a routine blood test? *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. Volume 12:615–25.

167. Nocker RET, Schoonbrood DFM, Van de Graaf EA, Hack E, Lutter R, Jansen HM, Out TA. (1996) Interleukin-8 in airway inflammation in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Int Arch Allergy Immunol.* 109:183–91.
168. Cahilog Z, Zhao H, Wu L, Alam A, Eguchi S, Weng H, Ma D. (2020) The Role of Neutrophil NETosis in Organ Injury: Novel Inflammatory Cell Death Mechanisms. *Inflammation.* 43:2021–32.
169. Devaney JM, Greene CM, Taggart CC, Carroll TP, O’Neill SJ, McElvaney NG. (2003) Neutrophil elastase up-regulates interleukin-8 via toll-like receptor 4. *FEBS Lett.* 544:129–32.
170. Jeremic I, Djuric O, Nikolic M, Vlajnic M, Nikolic A, Radojkovic D, Bonaci-Nikolic B. (2019) Neutrophil extracellular traps-associated markers are elevated in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int.* 39:1849-1857.
171. Bryk AH, Prior SM, Plens K, Konieczynska M, Hohendorff J, Malecki MT, Butenas S, Undas A. (2019) Predictors of neutrophil extracellular traps markers in type 2 diabetes mellitus: associations with a prothrombotic state and hypofibrinolysis. *Cardiovasc Diabetol.* 18:49.
172. Rajendran V, Uppoor A. (2018) A perspective on NETosis in diabetes and periodontal diseases. *J Indian Soc Periodontol.* 22:290–3.
173. Baines KJ, Backer V, Gibson PG, Powel H, Porsbjerg CM. (2015) Impaired lung function is associated with systemic inflammation and macrophage activation. *Eur Respir J.* 45:557–9.
174. Vulesevic B, Lavoie SS, Neagoe P-E, Dumas E, Räkel A, White M, Sirois MG. (2019) CRP Induces NETosis in Heart Failure Patients with or without Diabetes. *ImmunoHorizons.* 3:378–88.
175. Hart JE, Goldstein R, Walia P, Teylan M, Lazzari A, Tun CG, Garshick E. (2017) FEV1 and FVC and systemic inflammation in a spinal cord injury cohort. *BMC Pulm Med.* 17:113.
176. Lapponi MJ, Carestia A, Landoni VI, Rivadeneyra L, Etulain J, Negrotto S,

- Pozner RG, Schattner M. (2013) Regulation of Neutrophil Extracellular Trap Formation by Anti-Inflammatory Drugs. *J Pharmacol Exp Ther.* 345:430–7.
177. Vargas A, Boivin R, Cano P, Murcia Y, Bazin I, Lavoie J-P. (2017) Neutrophil extracellular traps are downregulated by glucocorticosteroids in lungs in an equine model of asthma. *Respir Res.* 18:207.
178. Dandona P, Mohanty P, Hamouda W, Aljada A, Kumbkarni Y, Garg R. (1999) Effect of dexamethasone on reactive oxygen species generation by leukocytes and plasma interleukin-10 concentrations: A pharmacodynamic study. *Clin Pharmacol Ther.* 66:58–65.
179. Nishinaka Y, Arai T, Adachi S, Takaori-Kondo A, Yamashita K. (2011) Singlet oxygen is essential for neutrophil extracellular trap formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 413:75–9.
180. Dahl R. (2006) Systemic side effects of inhaled corticosteroids in patients with asthma. *Respir Med.* 100:1307–17.
181. Gavillet M, Martinod K, Renella R, Harris C, Shapiro NI, Wagner DD, Williams DA. (2015) Flow cytometric assay for direct quantification of neutrophil extracellular traps in blood samples. *Am J Hematol.* 90:1155–8.
182. Kovács ÁF, Láng O, Turiák L, Ács A, Kőhidai L, Fekete N, Alasztics B, Mészáros T, Buzás EI, Rigó J, Pállinger É, Pállinger É. (2018) The impact of circulating preeclampsia-associated extracellular vesicles on the migratory activity and phenotype of THP-1 monocytic cells. *Sci Rep.* 8:5426.
183. Sódar BW, Kovács Á, Visnovitz T, Pállinger É, Vékey K, Pocsfalvi G, Turiák L, Buzás EI. (2017) Best practice of identification and proteomic analysis of extracellular vesicles in human health and disease. *Expert Rev Proteomics.* 14:1073–90.
184. van der Pol E, Sturk A, van Leeuwen T, Nieuwland R, Coumans F, Mobarrez F, Arkesteijn G, Wauben M, Siljander PR -M, Sánchez-López V, Otero-Candelera R, Ramón LA, Dolz S, Vila V, Mackman N, Geddings J, Mullier F, Bailly N, Han J -Y, Kwaan HC, Weiss IM, Buzás EI, Pállinger E, Harrison P, Kraan J,

- Hedley BD, LazoLangner A, Enjeti A, Norris PJ, Paris C, Susen S, Bonnefoy A, Delorme I, Chandler WL, Hau C, Aass HCD, Connor D, Wu X, Dragovic R, Uotila LM, Lacroix R, Robert S. (2018) Standardization of extracellular vesicle measurements by flow cytometry through vesicle diameter approximation. *J Thromb Haemost.* 16:1236–45.
185. Feng Y, Yang C, Yan W. (2020) Expression of lncRNA MEG3 in asthma with different phenotypes and its relationship with course of disease. *Exp Ther Med.* 19:2211.
186. Zhang X, Tang X, Li N, Zhao L, Guo Y, Li X, Tian C, Cheng D, Chen Z, Zhang L. (2018) GAS5 promotes airway smooth muscle cell proliferation in asthma via controlling miR-10a/BDNF signaling pathway. *Life Sci.* 212:93–101.
187. Ulitsky I, Shkumatava A, Jan CH, Sive H, Bartel DP. (2011) Conserved function of lincRNAs in vertebrate embryonic development despite rapid sequence evolution. *Cell.* 147:1537–50.
188. Smith KN, Starmer J, Miller SC, Sethupathy P, Magnuson T. (2017) Long Noncoding RNA Moderates MicroRNA Activity to Maintain Self-Renewal in Embryonic Stem Cells. *Stem Cell Reports.* 9:108–21.
189. Zhi XH, Jiang K, Ma YY, Zhou LQ. (2020) OIP5-AS1 promotes the progression of gastric cancer cells via the miR-153-3p/ZBTB2 axis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 24:2428–41.
190. Shi C, Yang Q, Pan S, Lin X, Xu G, Luo Y, Zheng B, Xie X, Yu M. (2020) LncRNA OIP5-AS1 promotes cell proliferation and migration and induces angiogenesis via regulating miR-3163/VEGFA in hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol Ther.*:1–11.
191. Xie W, Wu D, Ren Y, Jiang Y, Zhang H, Yang S, Sheng S. (2020) OIP5-AS1 Attenuates Microangiopathy in Diabetic Mouse by Regulating miR-200b/ACE2. *World Neurosurg.* 139:e52–60.
192. HNRNPU-AS1 gene symbol report | HUGO Gene Nomenclature Committee Available at: <https://www.genenames.org/data/gene-symbol->

report/#!/hgnc_id/27651.

193. Lu Y, Liu X, Xie M, Liu M, Ye M, Li M, Chen X-M, Li X, Zhou R. (2017) The NF- κ B-Responsive Long Noncoding RNA FIRRE Regulates Posttranscriptional Regulation of Inflammatory Gene Expression through Interacting with hnRNPU. *J Immunol.* 199:3571–82.
194. Zhang L, Song D, Zhu B, Wang X. (2019) The role of nuclear matrix protein HNRNPU in maintaining the architecture of 3D genome. *Semin Cell Dev Biol.* 90:161–7.
195. Shen L, Hu X, Chen T, Shen G, Cheng D. (2019) Integrated network analysis to explore the key mRNAs and lncRNAs in acute myocardial infarction. *Math Biosci Eng.* 16:6426–37.
196. Dolcino, Tinazzi, Puccetti, Lunardi. (2019) Long Non-Coding RNAs Target Pathogenetically Relevant Genes and Pathways in Rheumatoid Arthritis. *Cells.* 8:816.
197. Zhang X, Liang Z, Zhang Y, Dai K, Zhu M, Wang J, Hu X. (2020) Comprehensive analysis of long non-coding RNAs expression pattern in the pathogenesis of pulmonary tuberculosis. *Genomics.* 112:1970–7.
198. Pan J, Fang S, Tian H, Zhou C, Zhao X, Tian H, He J, Shen W, Meng X, Jin X, Gong Z. (2020) LncRNA JPX/miR-33a-5p/Twist1 axis regulates tumorigenesis and metastasis of lung cancer by activating Wnt/ β -catenin signaling. *Mol Cancer.* 19:9.
199. Fang E, Wang X, Yang F, Hu A, Wang J, Li D, Song H, Hong M, Guo Y, Liu Y, Li H, Huang K, Zheng L, Tong Q. (2019) Therapeutic Targeting of MZF1-AS1/PARP1/E2F1 Axis Inhibits Proline Synthesis and Neuroblastoma Progression. *Adv Sci.* 6:1900581.
200. MZF1-AS1 MZF1 antisense RNA 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100131691>.
201. Marttila S, Chatsirisupachai K, Palmer D, de Magalhães JP. (2020) Ageing-associated changes in the expression of lncRNAs in human tissues reflect a

- transcriptional modulation in ageing pathways. *Mech Ageing Dev.* 185:111177.
202. Baos S, Calzada D, Cremades-Jimeno L, De Pedro MÁ, Sastre J, Picado C, Quiralte J, Florido F, Lahoz C, Cárdbaba B. (2019) Discriminatory molecular biomarkers of allergic and nonallergic asthma and its severity. *Front Immunol.* 10:1051.

10. Saját publikációk jegyzéke

10.1. A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

Első szerzős közlemények:

1. **Gál Z**, Gézsi A, Molnár V, Nagy A, Kiss A, Sultész M, Csoma Z, Tamási L, Gálffy G, Bálint BL, Póliska S, Szalai C. Investigation of the Possible Role of Tie2 Pathway and *TEK* Gene in Asthma and Allergic Conjunctivitis. *Front Genet.* 2020 Feb 27;11:128. doi: 10.3389/fgene.2020.00128. Erratum in: *Front Genet.* 2020 Jul 10;11:702. PMID: 32180797; PMCID: PMC7057532.
IF: 3,258
2. **Gál Z**, Gézsi A, Pállinger É, Visnovitz T, Nagy A, Kiss A, Sultész M, Csoma Z, Tamási L, Gálffy G, Szalai C. Plasma neutrophil extracellular trap level is modified by disease severity and inhaled corticosteroids in chronic inflammatory lung diseases. *Sci Rep.* 2020 Mar 9;10(1):4320. doi: 10.1038/s41598-020-61253-2. Erratum in: *Sci Rep.* 2020 Jul 31;10(1):13182. PMID: 32152402; PMCID: PMC7062787.
IF: 3,998
3. **Gál Z***, Gézsi A*, Semsei ÁF, Nagy A, Sultész M, Csoma Z, Tamási L, Gálffy G, Szalai C. Investigation of circulating lncRNAs as potential biomarkers in chronic respiratory diseases. *J Transl Med.* 2020 Nov 10;18(1):422. doi: 10.1186/s12967-020-02581-9. PMID: 33168013; PMCID: PMC7653503.
IF: 4,124

* Megosztott elsőszerzős közlemény

Társszerzős közlemények:

1. Molnár V, Nagy A, Tamási L, Gálffy G, Böcskei R, Bikov A, Czaller I, Csoma Z, Krasznai M, Csáki C, Zsigmond G, Csontos Z, Kurucz A, Kurucz E, Fábos B, Bálint BL, Sasvári-Székely M, Székely A, Kótyuk E, Kozma GT, Cserta G, Farkas A, **Gál Z**, Gézsi A, Millinghoffer A, Antal P, Szalai C. From genomes to diaries: a 3-year prospective, real-life study of ragweed-specific sublingual immunotherapy. *Immunotherapy*. 2017 Nov;9(15):1279-1294. doi: 10.2217/imt-2017-0093. PMID: 29130793.
IF: 2,964
2. Csoma Z, **Gál Z**, Gézsi A, Herjavec I, Szalai C. Prevalence and characterization of severe asthma in Hungary. *Sci Rep*. 2020 Jun 9;10(1):9274. doi: 10.1038/s41598-020-66445-4. PMID: 32518278; PMCID: PMC7283249.
IF: 3,998

10.2. A disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények

1. Fodor LE, Gézsi A, Ungvári L, Semsei AF, **Gál Z**, Nagy A, Gálffy G, Tamási L, Kiss A, Antal P, Szalai C. Investigation of the Possible Role of the Hippo/YAP1 Pathway in Asthma and Allergy. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2017 May;9(3):247-256. doi: 10.4168/aair.2017.9.3.247. PMID: 28293931; PMCID: PMC5352576.
IF: 4,157
2. Fodor LE, Gézsi A, **Gál Z**, Nagy A, Kiss A, Bikov A, Szalai C. Variation in the TEK gene is not associated with asthma but with allergic conjunctivitis. *Int J Immunogenet*. 2018 Jun;45(3):102-108. doi: 10.1111/iji.12365. Epub 2018 Apr 18. PMID: 29667338.
IF: 1,130

11. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani mindenekelőtt témavezetőmnek, Dr. Szalai Csabának, aki hasznos tanácsaival, segítőkészségével és önzetlen támogatásával hozzájárult sikeres munkámhoz és szakmai fejlődésemhez. Köszönöm neki a bizalmat és a bátorítást.

Köszönettel tartozom Dr. Buzás Editnek, az Intézet jelenlegi vezetőjének, aki lehetőséget biztosított, hogy a Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézetben végezhessem munkámat.

Hálával tartozom Féléné Dr. Semsei Ágnesnek az elengedhetetlen szakmai tanácsokért és Sándorné Vángor Mónikának a laboratóriumi munkák és gyakorlati problémák során nyújtott végtelen segítségéért és precizitásáért. Köszönöm Dr. Gézsi Andrásnak a bioinformatikai és statisztikai útvesztőkben nyújtott segítséget és azt a rengeteg munkát, amivel elősegítette a kutatás eredményességét. Továbbá köszönettel tartozom a Klinikai genomika munkacsoport minden tagjának, hogy barátságos légkörben dolgozhattam és sok felejthetetlen élményt gyűjthettem.

Köszönettel tartozom Dr. Pállinger Évának és Fekete Nórának az áramlási citometria világába való bevezetésért, szakmai tanácsokért, iránymutatásért és segítségért, amellyel a netózis projekt során támogattak.

Hálával tartozom Dr. Visnovitz Tamásnak a konfokális lézer-pásztázó mikroszkóp használata során nyújtott segítségéért és úgyszintén köszönettel tartozom az intézet minden további munkatársának, akiktől az évek során számtalan hasznos tanácsot és segítséget kaptam.

Külön szeretném megköszönni Dr. Antal Péter, Dr. Molnár Viktor, Dr. Nagy Adrienne, valamint Dr. Bálint Bálint kiemelkedő szerepét a DesensIT projekt során.

Köszönöm Dr. Csoma Zsuzsannának, Dr. Gálffy Gabriellának, Dr. Tamási Lillának, Dr. Nagy Adriennek és Dr. Sultész Monikának a rendelkezésemre bocsájtott mintákat és a szakmai tanácsokat.

Végül szeretnék köszönetet mondani a családomnak és barátaimnak, akik minden nehézségben mellettem álltak, irányt mutattak és bátorítottak.