

A bisphosphonat kezelés hatása a csontok fibrosus dysplasiájára

DEFINÍCIÓ: Az első WHO definíció 1972-ben született, melyet később többször módosítottak. A legutóbbi, 1981-es meghatározás szerint a fibrosus dysplasia a csontok benignus, tumorszerű elváltozása, melyre az örvényes lefutású kötőszöveti nyálábok és az érett-éretlen csontgerendák jellemzőek.

A csontok fejlődési zavaráról, az osteoblastok kóros differenciálódásáról van szó, melynek következtében az érett csontszövet helyét rostos kötőszövet foglalja el, melyben újonképzett fonatos szerkezetű csontszigetek helyezkednek el.

TÖRTÉNETI ÁTTEKINTÉS: A fibrosus dysplasia fogalmát először 1936-ban használta Jaffe egy cikkében, melyben felhívja a figyelmet arra, hogy a kórképet nem szabad összetéveszteni a hyperparathyreoidizmussal. 1936-37-ben McCune és Albright is több alkalommal írta le a betegség több csonton való előfordulását, „café-au-lait” bőrpigmentációval és pubertas praecoxal együtt. 1938-ban Lichtenstein is ezzel a kifejezéssel írta le az ismeretlen etiológiájú elváltozást. A későbbiekben számos szerző foglalkozott a betegséggel endokrin zavart sejtve a háttérben, és szerzőtől függően sokféle megnevezést kapott (osteodystrophia-osteitis-fibrosa, osteitis deformans disseminata, ostitis fibrosa, féloldalas Recklinghausen csontbetegség). Napjainkban a fibrosus dysplasia (FD) elnevezést használjuk.

EPIDEMIOLOGIA: A fibrosus dysplasia az összes csontdaganat 2,5%-át, a benignus elváltozások 5-7%-át teszi ki. Schajowitz megfigyelésében 222 monostotikus (egy csontot érintő) esetre 36 poliosototikus (több végtagra kiterjedő) esett. Monostotikus formában a férfi-nő arány 1:1, poliosototikus formában 2:1. Egymillió lakosra kb. három fibrosus dysplasiás elváltozás jut. A betegség megjelenésének ideje leggyakoribb fiatal korban, maximuma a 16-20 év közti populációban van. Az átlagos felismerési életkor férfiak esetében 20 év, nők esetében 22 év.

ETIOLÓGIA: A kórkép eredete sokáig ismeretlen volt, ill. endokrin okokat sejtettek a háttérben. 1986-ban a Clinical Genetics című orvosi lapban közölték először azt a feltételezést, miszerint a fibrosus dysplasia letális génmutáció eredménye, mely csak szöveti mozaicizmus útján biztosítja a beteg életben maradását. A mutáció szomatikus, mely a zygóta barázdálódása során minél később jön létre, annál kisebb egységekre terjed ki, vagyis a laesio annál kisebb területet foglal el, és a tünetek is annál enyhébbek. Az etiológiára és a tünetek kifejlődésének patomechanizmusára a humán genom feltérképezése adta meg végül a választ.

A sejt működés szabályozása leggyakrabban a sejtek által termelt különböző kémiai anyagok- ligandok - szekréciója útján valósul meg, mely molekulák más sejtek receptoraihoz kötődve intracelluláris jelátviteli reakciókat indítanak el. A betegség oka a jelátvitelben szerepet játszó, intracellulárisan sejtmembránhoz kötött, stimulációs trimer G-protein α -láncának szerkezetváltozása, mely a fehérje tartós aktivációját okozza. A G_{α} alegységet a GNAS1 gén kódolja. A mutáció ezen gén 201-es kodonján jön létre, az esetek felében Arginin-Cystein, másik felében Arginin-Hisztidin aminosav cserével. A betegség esetében a szignál transzdukciós útvonal ad magyarázatot a tünetek sokszínűségére. A ligand bekötése a receptorához a jel, melynek következtében ehhez a komplexhez intracellulárisan kapcsolódik a trimer G_{α} -fehérje, ami egy stimulációs hatású protein. Három alegységből áll (α , β , γ), melyek közül az α , inaktivált állapotban GDP-t köt. A kapcsolódás után helyére GTP kerül, majd a G_{α} -lánc leválik a másik két alegységről, és az adenil-ciklázhoz kapcsolódik, fokozva annak ATP-ből cAMP-t képző hatását. A pontmutáció eredményeként, a jel átadása után a G_{α} -lánc nem képes GDP-t visszakötni, így inaktiválódni sem. A tartós aktiváció következtében a cAMP-dependens protein kináz rendszer folyamatos foszforilálással számos enzimátikus utat serkent. A FD-s sejtekben felszaporodik a cAMP szintje és az általa mediált géntranszkripció fehérjék koncentrációja (CREB-P, c-fos protoonkogének). A cAMP-dependens protein kinázok (PKA) a fehérjéket szerin/treonin oldalláncuk OH-csoportján foszforilálják, melyek ezután metabolikus utakat, növekedési és differenciálódási folyamatokat, ill. a sejtek szinte minden folyamatát regulálják. Nem csak meglévő fehérjék aktivitását képesek szabályozni, hanem a transzkripció sebességének befolyásolásával egyes enzimek mennyiségét is. A PKA által foszforilált CREB-P (cAMP respons element binding protein) a DNS cAMP által szabályozott gének promoterén elhelyezkedő CRE-hez (cAMP responsiv element) kötődik.

Ez által olyan komplexek képződése kezdődik meg az osteoblastok proliferációs fázisában, amik elnyomhatják a normális osteoblast differenciációban fontos osteocalcin szintet. Ennek következménye a nem mineralizálódó, éretlen csontszövet. Másrészt olyan IL-6 fehérje szintetizálódik nagy mennyiségben, ami osteoclast aktivációt okoz, így a csontok corticalisának elvékonyodásához ill. a csont expanziójához vezet. Harmadrészt olyan enzimek hatását is fokozhatják esetenként, melyek következményei különböző hormonális túlműködések lesznek. A fenti folyamatok alapján megmagyarázható a McCune-Albright szindróma (MAS) tüneteinek változatossága, az endokrin érintettség és a tünetek súlyossága attól függően, hogy az érintett szövetekben milyen arányban vannak jelen mutált és nem mutált gének (milyen mértékű a mozaicizmus). A tünetek megjelenési helye és jellege pedig attól függ, hogy a mutáció milyen stádiumban érte a zygótát, és annak mekkora hányadát érintette. Bizonyos embrionalis kórnál hamarabb bekövetkező pontmutáció pedig letális kimenetelű.

Fibrosus dysplasiával együtt járó egyéb kórformák:

- **Bőrelváltozások**

„Café au lait” szerű foltok, térképszerűen egyenetlen határral. Predilekciós helyek a lumbalis csigolyák középvonala, a far és a tarkó. Gyakran a betegséggel azonos oldalon, ill. a csontlaesio fölött helyezkednek el. Az elváltozást a mutáns Gs-protein okozza a bőr melanocytáinak aktiválásával, melyeket normál körülmények közt a melanocyt-stimuláló hormon (MSH) termel.

- **Endokrinopátiák**

A hypophysisben a mutáns G-protein stimuláló hatása az alábbi tüneteket okozza:

1. A növekedési hormont elválasztó sejteket stimulálva, a létrejövő GH túlsúly gyermekkorban *gigantizmust*, felnőttkorban *acromegaliát* okoz.
2. Az adenocorticotrop hormon (ACTH) túlsúlya *Cushing betegséget* hoz létre.
3. A TSH túlprodukció *hyperthyreosishoz* vezet.
4. Ugyanakkor a hypophysisben a mutáció eredményeként gátlódhat a gonadotropinokat elválasztó sejtek működése, amelyeket egészségesekben a GnRH szabályoz. Pulzáló elválasztódása fokozza a gonadotropinok (FSH, LH) elválasztását, de folyamatos hatása gátló jellegű. A eredmény hypogonadotrop hypogonadismus lesz.
5. Az ovariumokban a mutált protein ösztrogén szekréciót hoz létre, ami lányokban gonadotropinoktól független pubertas praecoxhoz vezet.
6. A fiúkban a herék túlzott tesztoszteron kiválasztása fogja ugyanezt a tünetet okozni.
7. A pajzsmirigy TSH stimulálta sejtjeire hatva a G-protein fokozott pajzsmirigyhormon kiválasztással *hyperthyreosist* hoz létre.
8. A mellékvesékre hatva, azokban adenoma fejlődhet ki.

- **McCune-Albright szindróma**

Jellegzetes triász a polyostotikus FD, „café au lait” foltok és az endokrinopátiák közül a pubertas praecox. Járhat ezen kívül egyéb endokrinopátiával is, de ez nem obligát. A háromból két tünet megléte elegendő a diagnózis felállításához. Az állapot a korai embriogenezisben létrejött G-protein mutáció eredménye, mely létrehozza a szöveti mozaicizmust, így a látszólag egymástól független endokrin hatásokat. A szindrómában szenvedő betegek közt, megfigyelések szerint, gyakrabban fordul elő a hirtelen halál. Ennek oka lehet a szív sejtjeinek autostimulációja, mely arrythmiához vezet. Előfordulhat még *hypophosphataemiás rachitis* és *osteomalatia* is a hyperphosphaturia miatt, továbbá *thymus hyperplasia*, *acut pancreatitis*, *gastrointestinalis polyp*, máj és epeúti betegségek.

- **Mazabraud syndroma**

A sceletalis fibrosus dysplasia és a lágyrészek myxomájának együttes előfordulásáról Henschen számolt be először 1926-ban. Ő, majd Krogius később a multiplex myxomák mellett még „osteitis fibrosáról” ír. Mazabraud ismételten beszámol a kórképről, foglalkozik az etiopathogenesisével, így az irodalomban elterjedt a Mazabraud szindróma elnevezés is. A kórkép rendkívül ritka, ezidáig csak mintegy két tucat Mazabraud szindrómás betegről számoltak be az irodalomban.

Rendszerint polyostoticus fibrosus dysplasiás nőbetegeknél jelentkeznek az érintett csontok körüli izomzatban multifocalis intramuscularis myxomák, melyek kezelés nélkül enormis méreteket érhetnek el. Endocrin rendellenességek is társulhatnak a szindrómához. Bár az irodalomban leírnak osteosarcoma, fibrosarcoma kialakulását a fibrosus dysplasia talaján e kórképben is, a szerzők saját eseteiknél a hosszú utánkövetési idő alatt (átlag 31 év) sem észleltek malignus transzformációt. Okamoto 2000-ben közzétett genetikai tanulmányában 6 Mazabraud syndromás beteg intramuscularis myxomájának elemzésekorl 5 esetben a myxomában is megtalálta a FD etiológiájában indító szerepet játszó pontmutációt. Ilyen irányú cikk az irodalomban eddig csak ez jelent meg.

CYTOGENETIKAI DIAGNOSZTIKA: A Gs fehérje expressziója a c-fos protoonkogén növekedett expressziójához vezet. A c-fos protoonkogén magfehérjéket kódol, és a sejteket növekedésre serkenti. Normális csontmintákban, illetve fibrosus dysplasiás betegek egészséges csontmintáiban nem mutatható ki c-fos expresszió. Fibrosus dysplasiás csontmintákban viszont expresszáldott a protoonkogén. A sejtek, melyek expresszálták, a csontvelőben lévő fibroblasztok voltak. A c-fos expressziója valószínűleg a fokozott adenil cikláz aktivitás következménye. Az éretlen csontgerendák a c-fos akciójának következtében képződnek. Vizsgálatok történtek arra irányultan, hogy a c-fos expresszió mennyire specifikus a fibrosus dysplasiára. Paget kórban expresszáldott c-fos, de nem a velőüri fibroblasztokban, hanem a csontfelszínen lévő osteoclastokban. D-vitamin rezisztens angolkóros osteogenesis imperfectás betegek csontmintáiban nem volt detektálható a c-fos. Tehát a fibrosus dysplasiás csontmintákból származó fibroblastokban expresszáldó c-fos protoonkogén a betegségre specifikus. Osteosarcomás betegekben a c-fos szintén emelkedett. Jelenléte fibrosus dysplasiában a malignus átalakulás első lépését jelentheti.

MŰTÉTI TERÁPIA: Számos szerző véleménye az, hogy műtét akkor indokolt, ha a betegség nagyfokú deformitást okoz, fájdalommal jár, illetve törés veszélye áll fent. A sebészi kezelés célja a csont megerősítése és további deformitások kialakulásának megelőzése. Többféle műtéti megoldást lehet alkalmazni.

Spongiosa plastica: az eljárás során az excochleatit követően spongiosával töltjük fel a laesio helyét, majd autológ vagy homológ corticospongiosus idommal (crista idom, fibula) erősítjük meg a csont külső felszínét. A spongiosus csont helyét azonban hamar ismét fibrosus szövet veszi át. A corticalis lécek, melyek mechanikailag erősítik a csontot, tovább megmaradnak. Lemezes osteosynthesis: lényege, hogy a fémlemez közvetlenül a csontfelszínre illesztjük, és furataiba csavarokat helyezünk. Fibrosus dysplasiában azonban a tapasztalatok szerint a puha, kötőszövetesen elfajult csont alkalmatlan erre a rögzítési módra. A csavarok kilazulnak, a lemez nem ad stabilitást a csontnak, mely a rögzítés ellenére tovább deformálódik, akár el is törik. Az Ortopédiai Klinika fibrosus dysplasiás beteganyagában 12 AO lemezes osteosynthesis történt, melyből egynél suppurációs, kettőnél kilazulós, hatnál görbületi progresszió és kilazulós szövődmény következett be. Intramedulláris felfúrásos szegezés: ez a műtéti módszer szoros csont-fém kapcsolatot hoz létre, mivel az implantátum dinamikusan a velőür szűkületébe ékelődik. A homokóra formájú velőüreget csőszerűvé fúrjuk, így a velőürszeg hosszabb szakaszon feszül bele. A szeg proximalis és distalis végein lévő furatokba a csonton keresztül reteszcsavarokat vezethetünk be. Ezzel a módszerrel hossz- és oldalirányú, valamint rotációs stabilitást érünk el. A terhelés eloszlása biomechanikailag kedvezőbb, mint a lemezes osteosynthesisnél, és nem engedi meg a deformitás progresszióját. Az Ortopédiai Klinika fibrosus dysplasiás beteganyagában négy esetben történt velőürszegezés, eddig egy esetben sem volt szövődmény.

HIPOTÉZIS:

1. Mind a postmenopausalis, mind a senilis osteoporosis kezelésében évtizedes tapasztalat van bisphosphonat kezeléssel. A bisphosphonátok gátolják az osteoclastok indukálta osteolysist és elősegítik az oteoblastos csont újdonszövetképződést.

2. A csontok fibrosus dysplasiájában (FD) is hasonló kóros mechanizmusok játszódnak le -csökkent osteoblast és fokozott oteoclast aktivitás, létrehozva a betegségre jellemző kóros szöveti jeleget.

3. Feltételezésünk szerint a bisphosphonátok a fibrosus dysplasia esetében is az osteoporosis kezelése során megismert támadáspontokkal és mechanizmussal hatnak, ami alapján – bisphosphonát adását követően- várható a fibrosus dysplasiában észlelt, osteoid is tartalmazó laza kötőszövet kiérése, mineralizációja, a széli területeken a csontlebontás csökkenése, az osteoclastok

aktivitásának csökkenése. Ezáltal a puhább csont keményebbé válik, biomechanikai tulajdonságai javulnak, csökken a törésveszély, a törések gyakorisága, ill. a csont progresszív deformációja.

4. Keressük továbbá a fibrosus dysplasiás csontban zajló patológiai folyamatok és a genetikai meghatározottság közötti kapcsolatot. A betegség pontmutációs eredete ismert, annak pontos helye is meghatározott. Kérdésként merül fel, hogy ez a pontmutáció milyen további génexpressziós változásokat okoz, vagy indít el a fibrosus dysplasiás szövetben, ill. kimutatható-e egyáltalán az egészséges csonttól eltérő génaktivitás változás.

5. A vizsgálat várható haszna:

- megismerjük a fibrosus dysplasiás szövetben zajló génexpressziós változásokat
- megismerjük a bisphosphonát adása után kimutatható génexpressziós változásokat
- megismerjük a bisphosphonát adása után észlelhető morfológiai változásokat (labor, rtg, ODM, szövettani metodikák)
- csontsűrűség növekedést érhetünk el a fibrosus dysplasiával érintett területeken
- javulnak az érintett csont biomechanikai tulajdonságai
- csökken a törési kockázat és a törési gyakoriság

KONZERVATÍV TERÁPIA: A nemzetközi irodalomban 1994-óta közölnek terápiás tapasztalatokat intravénás és/vagy per os bisphosphonát kezelések eredményeiről. Liens D. és munkatársai 1994-ben közöltek eredményeket 9 súlyos tüneteket mutató fibrosus dysplasiás beteg kapcsán. Közülük 4 férfi, 5 nő, 8 polyostoticus, 1 monostotikus eset. Átlagos életkoruk 33 év volt, 8 felnőtt és egy 13 éves gyermek. Intravénás formában kaptak 3 napon keresztül napi 60 mg pamidronátot. Az egy kezelésre eső dózis 180 mg volt. A gyermek 1mg/tskg Pamidronát dózist kapott. A kezelést félévente ismételték, 18-48 hónapon át. A secunder hyperparathyreosis elkerülése érdekében minden kezelés után 500-1500 mg/nap Ca-ot és 800-1200 IU/nap D2-vitamint kaptak. Félévente készítették natív röntgenfelvételt, labort (seCa, seP, seALP, seOsteocalcin, vizeletCa, vizelet hydroxyprolin), valamint mérték a fájdalom intenzitásának változását. Az eredmény a fájdalom csökkenése, a röntgenen 6 betegnél progresszív változást észleltek a kortikális vastagodásában és a velőür kitelődésében, 3 esetben a változás pozitív irányú volt, de kisebb mértékű. Valamint csökkent a seALP és az ürített hydroxyprolin. Per os kezelésre natrium-alendronát (Fosamax) tablettát kapnak a betegek, melyből hetente egyszer egy 70 mg hatóanyag tartalmú tablettát kell bevenni. A terápia két-három évig tart. A betegek állapotát meghatározott szempontok alapján követték után, féléves kontrollvizsgálatok alkalmával. Az utánkövetési szempontok az alábbiak:

- A fájdalom intenzitása
- Natív röntgen
- Osteodensitometria
- Laborparaméterek (SeCa, SeP, ALP, SeOsteocalcin, Sekollagén keresztkötések, SeD2-vitamin, vizelet Ca, Ca/P hányados, hydroxyprolin)

Nemzetközi statisztikák szerint a pamidronát csökkentette a fájdalom és a gyulladással járó tünetek intenzitását is. A radiológiai utánkövetés szerint 2 év alatt az osteolyticus területek feltöltődtek, csontosodásnak indultak, a corticalis vastagabb, ellenállóbb lett. A laborparaméterek is javuló tendenciát mutattak, a Se ALP, SeCa, Seosteocalcin és a vizelet hydroxyprolin szintje, ha magasabb volt a kiindulási érték, csökkent. A bisphosphonátok (BP) kémiai szerkezete a csontmineralizáció endogén szabályozójának, a szerves pirofoszfátnak a szerkezetéhez hasonlítanak: míg a pirofoszfátban két foszfát csoportot foszfoanhidrid kötés köt össze (P-O-P), addig a BP-ok két foszfát csoportja között oxigénatom helyett szénatom helyezkedik el (P-C-P). Ez a kötés sokkal stabilabb, ellenáll a hidrolízisnek és a bontást végző pirofoszfátázoknak. A középen elhelyezkedő szénatomhoz kovalens kötéssel különféle oldalláncok kapcsolhatók, így tehető hatékonyabbá a vegyület. A BP-ok leghatásosabb változataiban az oldalláncok egy vagy több nitrogén atomot is tartalmaznak (amino-bisfoszfátok = alendronát, pamidronát, ibandronát, olpandronát). A BP-ok a csonttal való nagy affinitásuknak köszönhetően gyorsan eltűnnek a vérből és a csont hydroxiapatit ásványi felszínéhez kötődnek. Ide kötődve az osteoclastok „bekebelezik” a bisfoszfátot, mely végül az osteoclastok lysisét okozza. Ezen kívül a gyógyszernek osteoclast érést gátló hatása is van, valamint tumoros szövetben antiangiogenetikus hatással is rendelkezik.

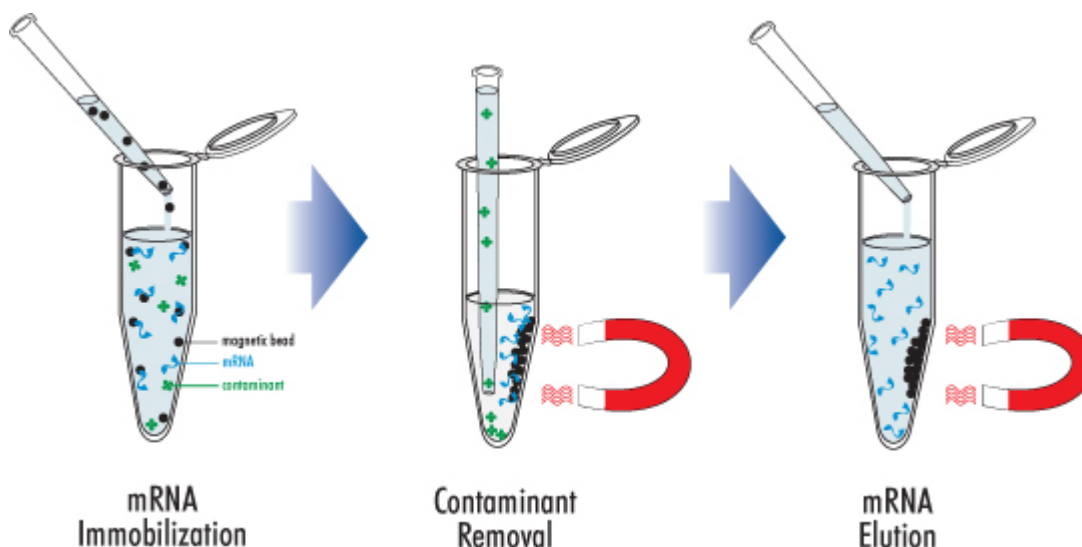
A MUNKA MENETE, CÉLKITŰZÉSEK: Meghatároztuk a kezelésbe bevenni kívánt betegcsoportot: 18 éven felüli nők és férfiak vegyesen, részben már egyéb módon kezelt (műtéti megoldások), részben új felismert esetek. Az eddigi munka során 20 fibrosus dysplasiás csontmintát nyertünk ki. Ebből egy megsemmisült (elveszett), a 19 maradóból 11 betegnél BP kezelés előtt, 8 betegnél BP kezelés után vettük a mintát. 2 beteg gyermekkorú volt, így őket kezelni nem volt módunkban (protokoll szerint kizárási

kritérium), de a műtét során kivett szövet használható volt, mint „nem kezelt” minta. Mind a két gyermeknél excochleatio és spongiosa kitöltés történt. 9 további betegről az OGYI és TUKEB engedéllyel rendelkező, ill. az OTKA által támogatott program keretében 1,5 év alatt gyűjtöttük be a kezelés előtti mintákat, amelyeket a szövettani diagnózis felállítása érdekében elvégzett biopszia során nyertünk. A 8 BP kezelés utáni minta 4 olyan betegről származik, akikenél még 2001-ben kezdtük meg a kezelést a nemzetközi tapasztalatok alapján, felvilágosításuk és beleegyezésük után. A 6 betegből (2001-es kezdés) 4 esetben sikerült minimál invazív úton, beleegyezésükkel FD-s szöveti mintát venni. A másik 4 kezelt minta már a 9, kezelési programba bevont betegről származik (a fennmaradó 5 betegből 3 esetben még tart az egy éves kezelés, 2 beteg pedig nem egyezett bele ismételt minta adásába). A 2001-ben kezelés alá vont 6 betegnél 1,5-2 évig pamidronáttal (Aredia), 60 mg/nap/3 napig dózisban, félévente ismétlődően végeztük a terápiát, majd per os alendronátra tértünk át (Fosamax), melyet 1x10 mg/nap dózisban folyamatosan adtunk még 1-1,5 évig. Az ellenőrzéseket folyamatosan végeztük. A protokoll alapján kezelt 9 betegnél a Fosamax tbl. 1x70 mg/hét dózisú kiszerezését alkalmaztuk. A vizsgálatok algoritmusát és a kezelési protokollt a protokoll 1.sz. melléklete tartalmazza. A kutatásban résztvevő betegek számára kiadott tájékoztatókat a 2/a és 2/b mellékletek tartalmazzák.

A biopsziával nyert csontmintákat folyékony nitrogénben porítjuk el, hogy a törés közben a minta ne meledgedjen fel és, így az RNS ne bomoljon le. Az elporított csontmintát lízis pufferben oldjuk fel, mely anyag a sejtmembránt tönkre teszi, így kiszabadul az RNS a sejtéből. Ezután centrifugáljuk az oldatot, így a felülúszóban marad a nukleinsav. Ezt a felülúszót mágneses gyöngyökre szívjuk át, melyek felszínéhez oligo-dezoxi-timidin (oligo-dt) molekulák vannak kötve. Ezek az oligo-dt molekulák csak az mRNS-hez kötődnek, mert az érés során csak az mRNS kap a 3' végén poli-adenil (poli-A) farkat, a többi RNS típus nem. Ez csak az mRNS-re jellemző, így a nukleinsav elegyből a számunkra szükséges mRNS tisztítható ki. Ezt követően az mRNS-ből reverz transzkripcióval cDNS-t hozunk létre, mely sokkal stabilabb, mint az RNS.

Az mRNS ad információt a sejtben aktuálisan átíródó fehérjéről. A különböző mintákban található mRNS mennyiségek jelzik, hogy az adott mintában milyen fehérje szintetizálódik és milyen mennyiségben ill. intenzitással. Real-time PCR során felszaporítjuk az adott cDNS-eket, melyek bizonyos fehérjéket kódoló géneket jellemeznek, és ezen fehérjék minősége és mennyisége jellemzi a szövetmintát. A Real-time PCR során fluoreszcencia intenzitásokat mérünk. Minél nagyobb az adott génről átíródott mRNS mennyisége, annál erősebb lesz a fluoreszcens jel, tehát a mintában annál több ilyen fehérje keletkezett.

A csontbiopsziás mintákat az I.sz. Belgyógyászati Klinika biológiai laborjában és a Gödöllői Agrártudományi egyetem genetikai laborjában vizsgáljuk, 120 csonthoz kapcsolt gén vonatkozásában.

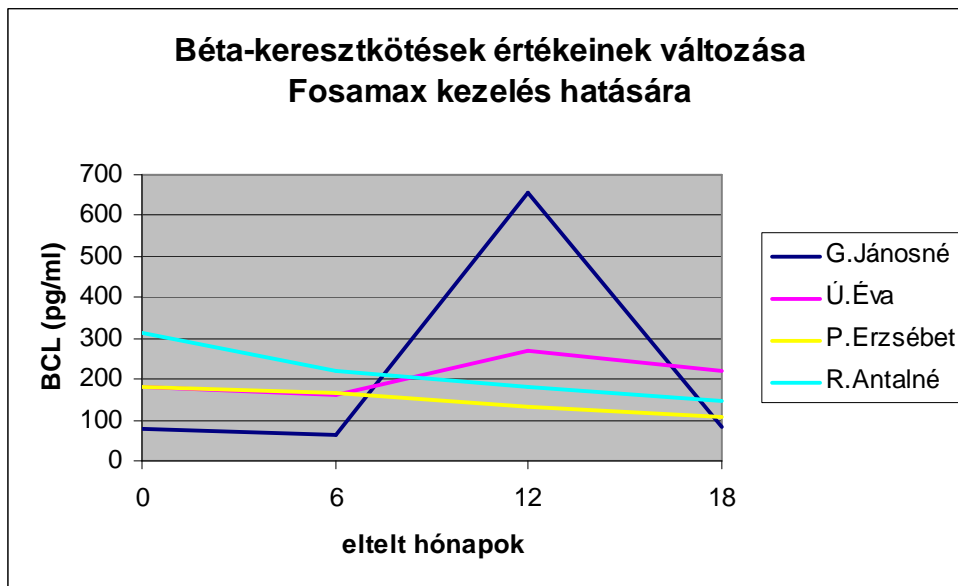
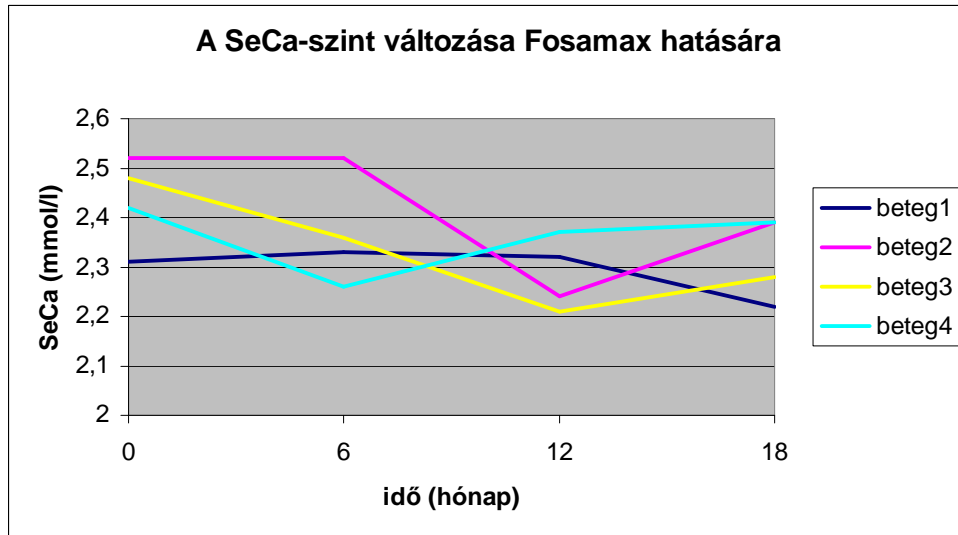


mRNS izolálás oligo-dt gyöngyökkel

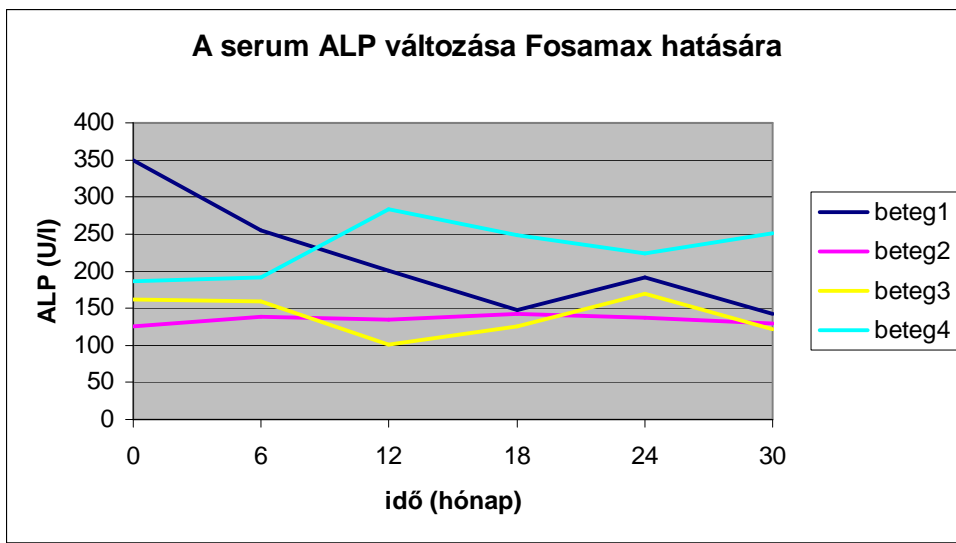
EREDMÉNYEK:

1. Labor paraméterek

A szérum kalcium szint végig normál tartományon belül mozog, minimális csökkenést mutat.

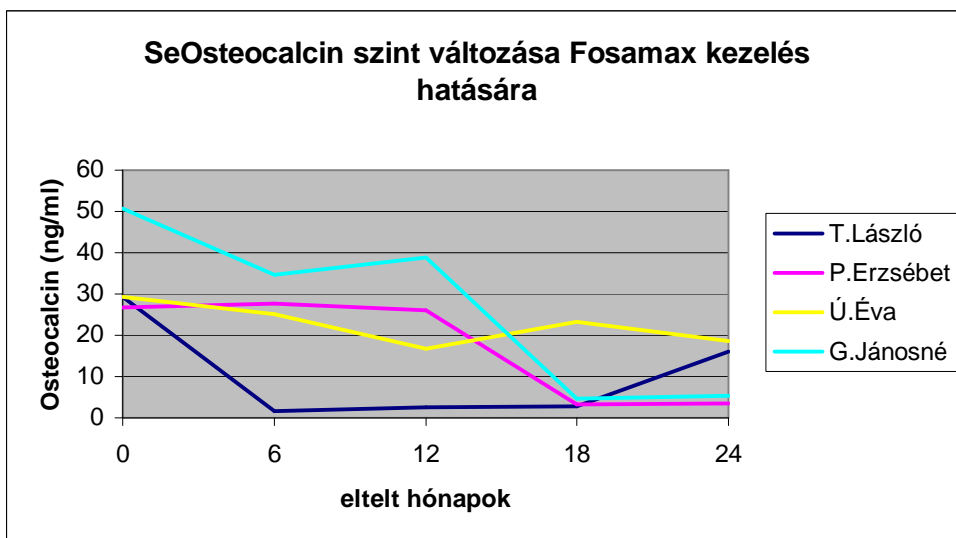


A kollagén keresztkötések csökkenése is minimális. (A kiugró lelet nagy valószínűséggel mérési hiba lehet)



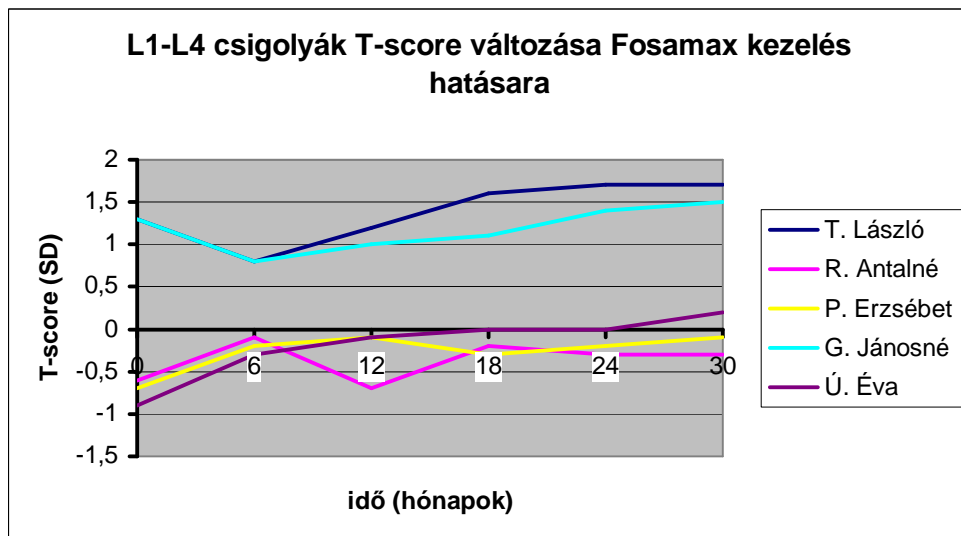
A szérum alkalikus foszfatáz nagyobb mértékű csökkenést mutat, ha a kiindulási érték magasabb

A szérum osteocalcin szint lassú és kismértékű, de folyamatos csökkenést mutat.

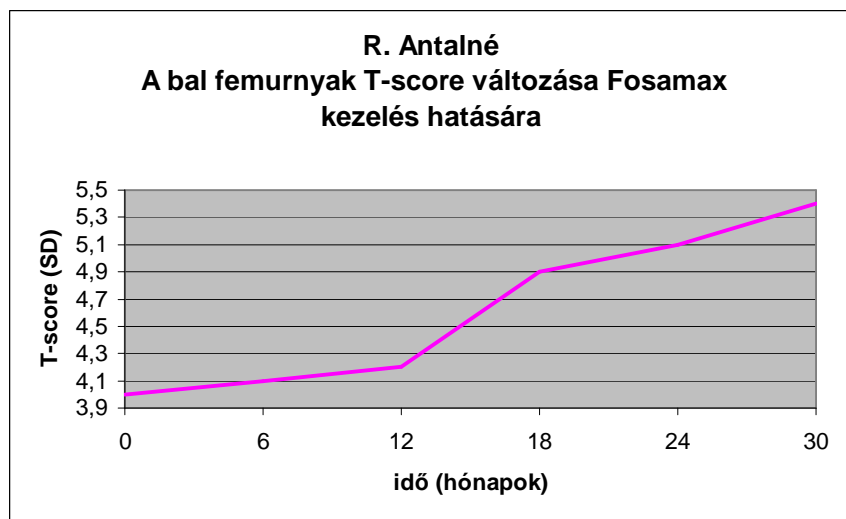


2. OSTEODENSITOMETRIA

A csontsűrűség vizsgálat során a teljes test, a lumbalis gerinc, mindkét combnyak, valamint a laesio denzitását is mértük félévente. A Lunar gépek (korábban „Expert”, most „Prodigy”) segítségével speciális vizsgálatot alkalmaztunk az elváltozás megfigyelésére: a csontban lévő fibrosus dysplasiás területet felosztottuk több kis kockányi, mindig reprodukálható, standard területre és minden vizsgálat alkalmával ugyanoda helyeztük vissza az azonos méretű kockákat. A „kis kockákon” belüli denzitásváltozást hasonlítottuk össze, kizárva ezzel az egészséges csont denzitásának zavaró hatását. Az eredmény a teljes test, és az egészséges részek megfigyelésével kapcsolatban enyhe denzitás emelkedés volt, míg a fibrosus dysplasiás részeken a denzitás emelkedése nem volt megfigyelhető.



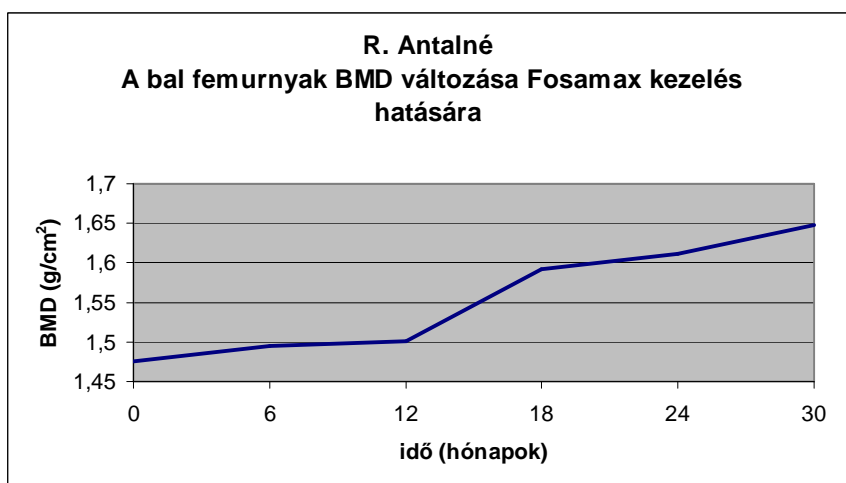
A lumbális csigolyák denzitása a kezelés alatt enyhe emelkedést mutat.



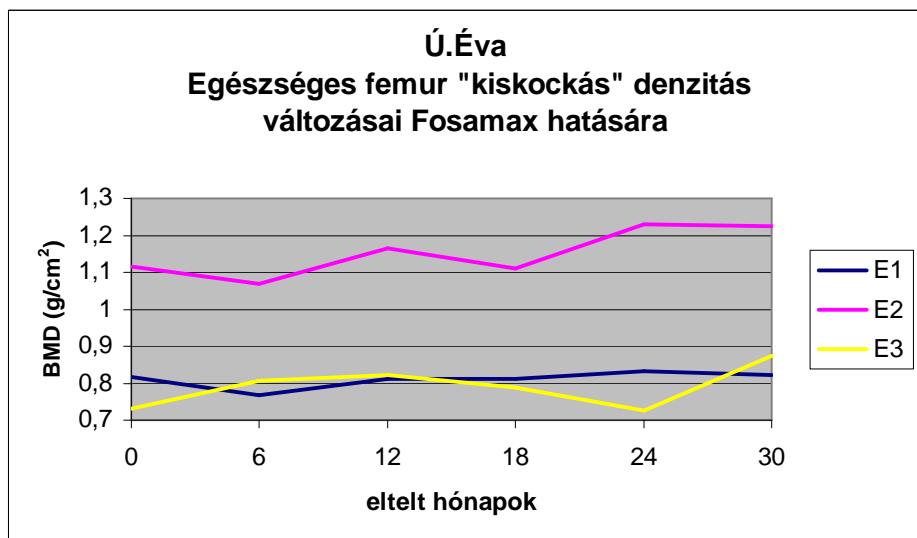
(a)

(c)

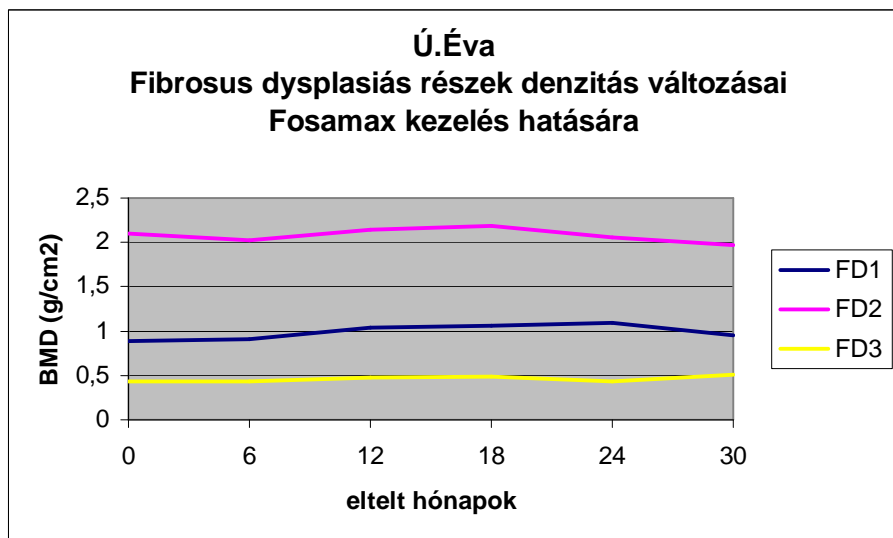
(b)



51 éves nőbeteg bal femurnyakán lévő elváltozásának T-score (a) és BMD (b) grafikonja a csontsűrűség emelkedését mutatja 2,5 év alatt. c): az elváltozás röntgen képe.



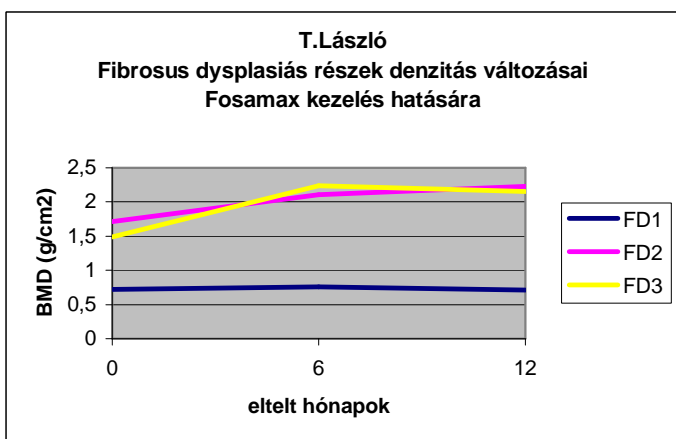
(a)



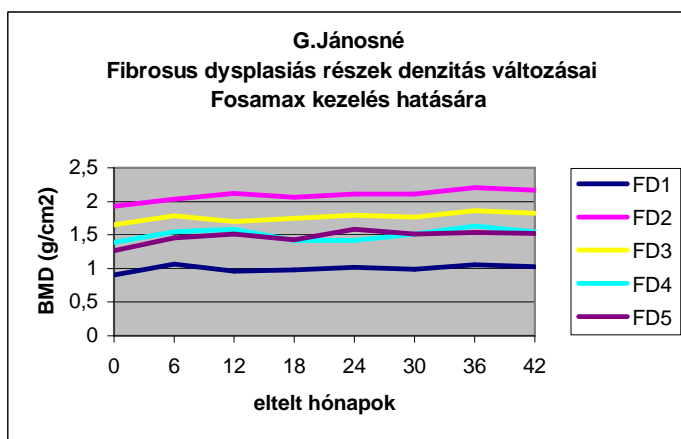
(b)

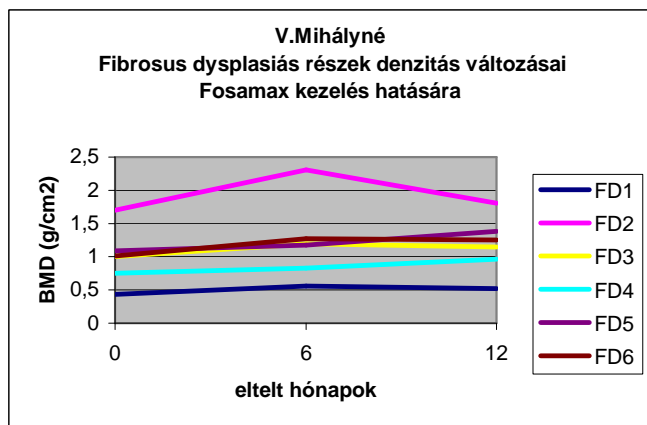
27 éves nőbeteg egészséges femurján a denzitás a kezelés hatására minimális mértékű emelkedést mutatott (a), míg a beteg részeken a denzitás mértéke nem változott (b).

(a)

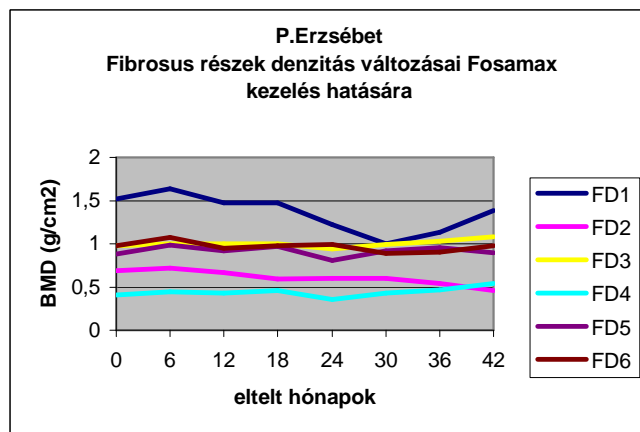


(b)



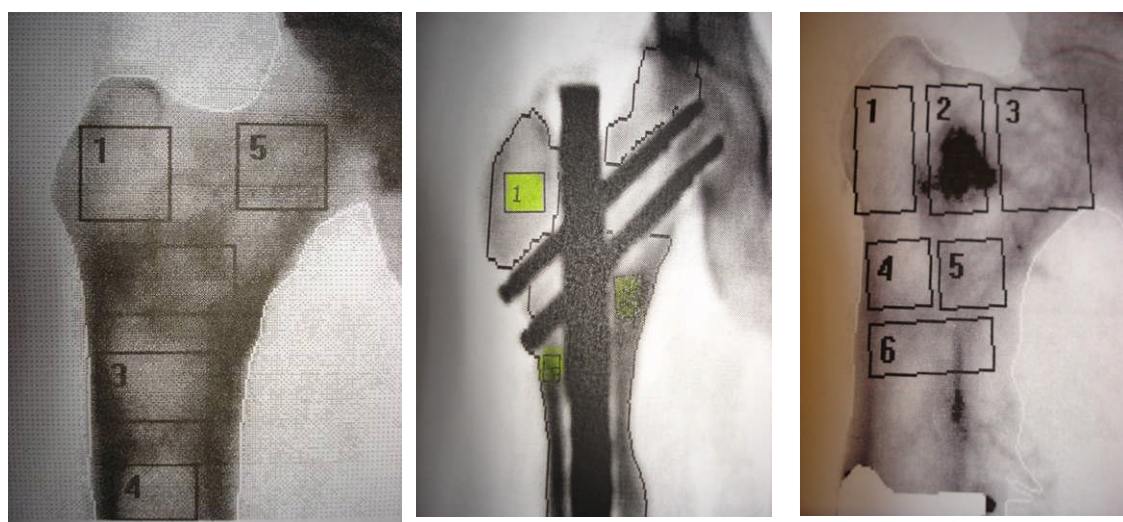


(c)



(d)

A fibrosus dysplasiás részek denzitásának mértéke egyik esetben sem mutat változást a Fosamax kezelés hatására (a, b, c és d).

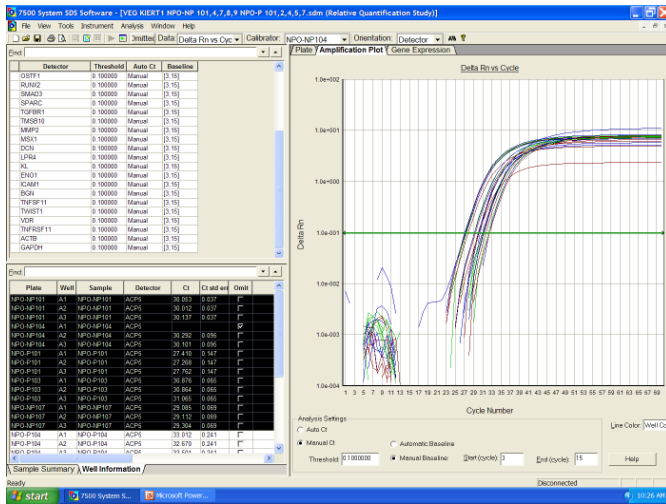


A fibrosus dysplasiás területek felosztása a reprodukálható „kis kockás” módszerrel

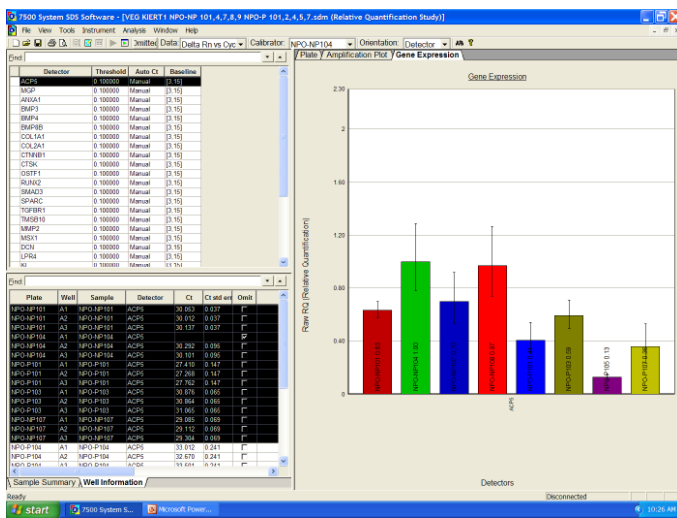
3. GENETIKA

PCR protokoll: A valós idejű PCR reakciókat egy ABI 7500 realtime PCR készüléken futtatjuk le. A készülékbe 96 lyukú PCR lemezre, 3-3 párhuzamossal helyezzük a vizsgálandó mintákat. 120 gén vizsgálatát terveztük, amelyek jelen ismeretein alapján a csontépítés – bontás és anyagcserében szerepet játszanak (A gén névsor rendelkezésre áll). Minden egyes lemezen kontrollként beta-Actin és GAPDH háztartási gének kifejeződését is vizsgáljuk, melyekhez a relatív mennyiségi kiértékelést igazítjuk. 30 különböző mintából azonosítjuk 120 gén kifejeződését 3 párhuzamossal, ami 30x120x3 azaz 10.800 PCR mintát illetve 115 db 96 lyukú mintalemezt feltételez.

A PCR reakciók lefutása után az egyes mintalemezeket az ABI RelQuant szoftverével értékeljük ki. Az esetlegesen kiszóró pontok eltávolítása után minden egyes géntermékre kiszámoljuk az adott mintában párhuzamosan futó háztartási gének vonatkozó relatív mennyiségeket, amiket a másik mintában hasonló módszerrel kiszámolt gén pár értékéhez viszonyítunk (DDcT módszer alkalmazása). Szükséges feltétel, hogy a 3 párhuzamos PCR reakció (legfőképpen a kontroll gének tekintetében) meglehetősen kis szórással rendelkezzen.



Különböző mintákban eltérően kifejeződő gén valósídejű PCR reakcióinak eredményei



Különböző mintákban eltérően kifejeződő gén grafikusán ábrázolva

Eredmények: A fibrosus dysplasias és egészséges egyének génextpressziós eredményeinek összehasonlítása Mann-Whitney U teszt alkalmazásával

Táblázatban foglaltuk össze a vizsgálatban szereplő 11 egyén 120 génjének expressziós arányait (Fold change FD/PRAE) és szignifikancia értékeit (p). A vizsgálatban szignifikánsan megváltozott expressziót mutató 22 gént ($p \leq 0,05$) piros színnel emeltük ki. A további, jelentősen alulexpresszáldó géneket késsel jelöltem. A vizsgált gének az osteogenesisben és csontmetabolizmusban fontos genetikai útvonalakhoz (TGF β , BMP) tartoznak, vagy a női nemi hormon által regulálódnak, vagy a csont élettanában betöltött szerepük jól ismert (extracelluláris mátrix komponensek, extracelluláris mátrix bontó enzimek, sejtdhéziós molekulák, növekedési ill. transzkripciós faktorok).

A fibrosus dysplasias mintákban emelkedett expressziót mutat a lipid metabolizmusban szerepet játszó Low-density lipoprotein 4 (LRP4) és Apolipoprotein D (APOD), ezzel ellentétben a lipidanyagcserében szintén érintett Apolipoprotein E (APOE) és a zsírsavak transzportját végző CD36 expressziója azonban csökken a praemenopausas egészséges kontrollhoz képest. Down-regulálódást mutat a növekedési faktorok kifejeződése (insulin like growth factor 1, insulin like growth factor 1 receptor, vascular endothelial growth factor) és az adhéziós molekulák expressziója (intercellular adhesion molecule 1, vascular cell adhesion molecule 1). Az extracelluláris mátrix bontását végző matrix metalloproteinase 8 (MMP8) expressziója alacsony, míg az MMP2 expressziója erős fibrosus dysplasiában. Két mátrix alkotó kollagén molekula (COL1A1, COL12A1) transzkripciója szintén magas expressziót mutat az egészséges mintákéhoz képest. A gyulladásoos citokinek (TNF, IL1B) kifejeződése visszaszorul a betegekben. Az ösztrogén receptor mindkét típusa (ESR1, ESR2) csökkent expresszióval bír. A szénhidrát lebontásban szerepet játszó alpha enolase enzimet kódoló gén (ENO1) és a Wingless szingálútvonalonban szerepet játszó WIF csökkent, míg a TGFB

Kód	Fold change (FD/PRAE)	TWO-TAILED	
		Mann-Whitney U TESZT	(p)
ACP5	1,92		0,84
ANXA1	0,85		0,84
BGN	0,78		0,84
BMP3	0,72		0,23
BMP4	1,77		0,18
BMP8B	0,03		0,18
COL1A1	4,29		0,18
COL2A1	0,01		0,29
CTNNB1	0,86		0,95
CTSK	7,38		0,14
DCN	4,03		0,10
ENO1	0,41		0,03
ICAM1	0,01		0,00
KL	0,24		1,00
LPR4	4,75		0,01
MGP	2,48		0,45
MMP2	10,74		0,02
MSX1	0,81		1,00
OSTF1	4,06		0,84
RUNX2	7,44		0,29
SMAD3	1,95		0,29
SPARC	4,01		0,10
TGFBR1	2,40		0,63
TMSB10	0,43		0,18
TNFRSF11	0,64		0,63
TNFSF11	2,69		0,95
TWIST1	44,84		0,01
VDR	0,04		0,18
ACVR1	4,66		0,02
ACVR2	0,19		0,10
ALOX15	1,53		0,73
ANXA2	5,44		0,23
APOD	4,13		0,03
APOE	0,10		0,00
ATP2A2	181,71		0,01
BGLAP	6,97		0,84
BMP1	1,13		0,73
BMP2	1,86		0,63
BMPR1A	2,41		0,53
BMPR2	0,66		0,23
CASR	n/a		1,00
CD36	0,11		0,00
CKB	1,78		0,84
COL10A1	3,61		0,10
COL11A1	18,16		0,01
COL12A1	15,52		0,00
COL14A1	0,23		0,14
COL15A1	0,58		0,63
COL1A2	3,79		0,10
COL3A1	2,17		0,05
COL4A4	0,03		0,07
COL5A1	2,39		0,23
COL5A2	2,04		0,23
COL7A1	2,90		1,00
COL9A1	0,00		1,00
CSF2	1,27		1,00

CSF3	n/a	1,00
TWIST2	0,27	0,14
ALPL	2,28	0,29
DSPP	n/a	1,00
DUSP9	n/a	1,00
EGF	0,64	1,00
EGFR	0,63	0,73
ESR1	0,05	0,01
ESR2	0,01	0,01
FGF2	0,17	0,23
FGFR1	1,86	0,23
FN1	1,00	0,14
IGF1	0,06	0,02
IGF1R	0,20	0,02
IL-1A	n/a	1,00
IL-1B	0,03	0,01
IL-1RAP	0,85	0,14
IL-6	0,02	0,07
LRP5	0,21	0,05
MMP10	n/a	1,00
MMP13	4,15	0,14
MMP8	0,00	0,00
MMP9	0,61	0,63
NFKB1	0,32	0,14
SOX4	0,02	0,07
SOX9	0,45	0,95
TGFB1	0,59	0,37
TGFB2	2,69	0,95
TGFB3	2,24	0,18
TGFBR2	0,64	0,63
VCAM1	0,04	0,00
WIF1	0,25	0,03
BMP8A	0,15	0,73
EIF3S4	0,45	0,05
FABP3	1,53	0,29
FABP4	0,76	0,05
FGF1	0,72	0,14
FKBP2	0,40	0,18
IGSF4	5,96	0,23
INHA	1,35	0,95
INHBA	0,97	0,73
ITGA1	0,12	0,14
ITGA2	0,19	0,07
NLK	0,50	0,14
POGFA	0,14	0,05
SERF2	0,44	0,10
SFRS7	0,34	0,07
SMAD1	0,20	0,10
SMAD2	0,74	0,84
SMAD4	1,29	0,95
SOST	0,12	0,10
SP7	8,29	0,18
SPP1	1,89	0,18
TCF7L2	2,15	0,84
TIMP2	1,74	0,23
TMSB4X	0,08	0,73
TNC	1,16	0,73
TNF	0,02	0,01
TNFAIP6	0,56	0,37
TRIB2	0,25	0,53
MSX2	59,51	0,63
VEGF	0,05	0,00

A kontrollhoz képest szignifikánsan csökkent expressziót mutató gének a FD-ás szövetben

Gén kódja	Gén neve	Funkció
BMP3	Csont morfogenetikus fehérje 3	Csontképződést indukál
BMP8B	Csont morfogenetikus fehérje 8B	Csont és porcfejlődést indukál
VDR	D-vitamin receptor	D-vitamint köt
CD36	I-es típusú kollagén receptor (antigén)	Osteoclastok és osteoblastok felszínén expresszálódik
ESR1	I-es típusú ösztrogén receptor	Ösztrogén megkötése, csontmennyiség fenntartása, szerep a postmenopauzális
ESR2	II-es típusú ösztrogén receptor	osteoporózis kialakulásában (hiányukban)
IGF1	I-es típ. inzulin-szerű növekedési faktor	Osteoblast proliferációt, kollagén és ECM szintézist serkent
IGF1R	IGF1 receptor	IGF1 kötés
IL1B	Interleukin 1 béta	Gyulladásos cytokin, osteoclast aktivitást növel
MMP8	Matrix metalloproteináz 8	ECM építő

Gén kódja	Gén neve	Funkció
ICAM1	I-es típusú intercelluláris adhéziós molekula	Osteoclast érést segít elő
APOE	Apolipoprotein E	Szintje összefügg a csontsűrűséggel
VCAM1	I-es típusú vascularis cellularis adhéziós molekula	Osteoclast érést segíti
TNF	Tumor nekrosis factor	Gyulladásos cytokin, osteoclast aktivitást serkent
VEGF	Vascularis endothel növekedési faktor	Enchondrális csontosodásban van szerepe

A kontrollhoz képest szignifikánsan fokozott expressziót mutató gének a FD-ás szövetben

Gén kódja	Gén neve	Funkció
LRP4	LDL-R-related protein 4	Csontanyagcserében van szerepe
MMP2	Matrix metalloproteináz 2	ECM építő

TWIST1	Twist homológ 1	Osteoprogenitor sejtek differenciálódásában játszik szerepet
ACVR1	I-es típusú aktív A receptor	Osteoblast és osteoclast fejlődést indukál
APOD	Apolipoprotein D	Összefüggés a csontsűrűséggel
COL11A1	11-es típusú alfa kollagén	Normális csontszerkezet kialakítása
COL12A1	12-es típusú alfa kollagén	Keresztkötések létrehozása, stabilizálás

Összefoglalás: Célunk egyrészt a fibrosus dysplasias csontszövet genetikai állományának összehasonlítása a normál, nem porotikus csontminták génállományával, másrészt nyomon követni a biszfoszfonát kezelés alatti, esetlegesen a genetikában megnyilvánuló változásokat.

Eredményeink eddig a fibrosus dysplasias csontállomány és a normál, nem porotikus csontállomány genetikai állományának összehasonlításából vannak, mely szerint:

- az 1-es típusú kollagén alfa lánc (col1a1) FD-ban erősebben expresszálódott.
- a 2-es típusú mátrix metalloproteináz (MMP2) szintén FD-ban magasabb. Ez egy szolubilis zselatináz.
- a runt related gene 2 (RUNX2) egy nagyon fontos transzkripciós faktor a csontban., mely szintén magasabb FD-ban.
- bone morphogenetic protein 3, 8 nem volt detektálható FD-ban.
- a kettes típusú kollagén alfa lánc (Col2a1) sem detektálható FD-ban.
- a tumor nekrosis faktor alfa receptor (TNFR) és a D-vitamin receptor is jelentősen aluldetektálható az FD-s mintákban. Számunkra az eredmények közül különösen fontos, hogy a BMP3 és BMP8 nem, valamint a D-vitamin receptor jelentősen alul detektálható a fibrosus dysplasias mintákban, mert feltételezésünk szerint, lehetséges, hogy ezek hiánya miatt nem hatásos a biszfoszfonát kezelés a beteg részekén, míg az egészséges csontban megfelelő hatást ér el. További munkánk ennek alátámasztására vagy megcáfolására is irányul.

4. A MUNKA FOLYTATÁSA ÉS AMI MÉG HÁTRA VAN:

- Jelenleg zajlik a 8 BP-tal kezelt FD-s csontminta genetikai vizsgálata, az eredmények értékelése és statisztikai analysise a nem kezelt mintákkal való összehasonlításban. (SE I.sz. Belgyógyászati Klinika biológiai labor, dr. Takács István Adjunctus és Kósa János, ill. Balla Bernadett biológusok).
- Miután ilyen jellegű genetikai vizsgálat tudomásunk szerint jelenleg máshol nem zajlik, az eredmények mindenképpen újszerűnek tűnnek. Terveink szerint 2 közleményt jelentetünk meg, az első az eddigi eredményeket (egészséges csont – FD minták), a második a nem kezelt – kezelt FD minták összehasonlításának eredményeit közli.
- Az OTKA által támogatott munka hasonló címmel a saját PhD munkám is. Az eredmények közzétevése feltétlen érdekem a munka befejezéséhez.
- A SE II. sz. Gyermekklinikán dr. Patócs Barbara közreműködésével indítunk egy vizsgálatot, amiben 1 db folyékony nitrogénben lefagyasztott Mazabraud syndromás myxomás anyag és 2 db parafinos myxomás metszet feldolgozásával kísérjük meg mi is kimutatni a myxomában a pontmutációt.
- A munka eredményeinek közzétételét -a PhD program keretében is- 2 éven belül tervezzük megvalósítani, az OTKA támogatás feltüntetésével. Ezt elsősorban külföldi IF-os lapban, ill. hazai szakfolyóiratban is.

- *A teljes végjelentés „utóirataként” ez úton kérjük a tisztelt Szakértői Bizottságot és az OTKA zsűrit, hogy a mostani munka minősítését az OTKA kiegészítő eljárásban később módosíthassa, figyelembe véve a később megjelenő közleményeket.*

Budapest, 2007-03-29

Tisztelettel és köszönettel:

Prof. Dr. Szendrői Miklós
egyetemi tanár

dr. Kiss János
egyetemi tanársegéd