

Hemoxigenáz-1 génexpresszió érett és koraszülött újszülöttekben

FARKAS ILDIKÓ¹, MARÓTI ZOLTÁN¹, KATONA MÁRTA DR.¹,
ORVOS HAJNALKA DR.², NÉMETH ILONA DR.¹, ENDREFFY
EMŐKE DR.¹, PÁL ATTILA DR.², TÚRI SÁNDOR DR.¹

*Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Gyermekklinika
(igazgató: Túri Sándor dr., egyetemi tanár)¹, Szegedi Tudományegyetem,
Általános Orvostudományi Kar, Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika
(igazgató: Pál Attila dr., egyetemi tanár)² közleménye*

Összefoglalás: Az újszülötteket a szülés alatt mechanikai és oxidatív stressz éri, később pedig az extrauterin körülményekhez történő adaptáció során a relatív hyperoxiához kell alkalmazkodniuk. Az adaptációs folyamat része a foetalis hemoglobin gyors lebomlása és a hem oxidációja a hemoxigenázok (HO) által. A HO indukálható izoformája a HO-1, melyet a szabad hem és általában az oxidatív stressz indukál. Ezáltal fontos szerepe van a szabad hem által indukált oxidatív stressz kivédésében. Funkciója alapján feltételeztük, hogy a HO-1 szerepet játszik az újszülöttkori fiziológiás adaptációban. A HMOX1 génexpressziót a születés utáni első héten egészséges érett és koraszülött újszülöttekben mértük. A HO-1 szint a születés utáni 2-3. napon indukálódott, majd az első hét végére a születés-kori szint alá csökkent. A HO-1 szintek és az indukálhatóság hasonló volt mind az érett újszülöttekben, mind a koraszülöttekben. Eredményeink alapján a HO-1 már a 26. gestációs héten indukálható, amely alátámasztja, hogy a HO-1-nek szerepe lehet az adaptációs folyamatok során.

Kulcsszavak: hemoxigenáz-1, újszülöttkori adaptáció, oxidatív stressz, génexpresszió, kompetitív reverz transzkriptáz PCR

Születés után az újszülött szervezete alkalmazkodik a megváltozott extrauterin körülményekhez. Ha ez a komplex adaptációs folyamat nem megfelelően zajlik, különféle szervrendszereket érintő súlyos károsodás jöhet létre, ami jelentősen befolyásolja a várható életminőséget. Az újszülötteket mechanikai és oxidatív stresszhatások érik a szülés folyamán, valamint az ezt követő időszakban. Különösen a koraszülöttek érzékenyek ezekre a hatásokra a maguk alacsony antioxidáns-kapacitásával, éretlen védekezőképességével [1, 2]. Náluk sokkal

gyakrabban jelentkeznek oxidatív károsodásra visszavezethető betegségek, mint amilyen a respirációs distressz szindróma (RDS), retinopathia prematurorum (ROP), bronchopulmonalis dysplasia (BPD), enterocolitis necroticans (NEC), vagy a subependymalis, ill. intracranialis vérzések [3, 4, 5].

Az újszülöttkori adaptáció részeként (párhuzamosan a légköri oxigénnel történő légzés beindulásával) fokozódik a foetalis hemoglobin lebomlása. A belőle felszabaduló hem oxidációját a hemoxigenázok (HO) végzik. A folya-

mat során a hemből CO, Fe²⁺, biliverdin keletkezik [6]. A biliverdint a biliverdin-reduktáz alakítja tovább bilirubinná, melynek felszaporodása az újszülöttkori fiziológiás sárgaságot hozza létre. A szabad hem toxikus molekula: direkt sejtkárosító hatása mellett oxidatív stressz és gyulladás kiváltásában is szerepel [7, 8]. A belőle képződő biliverdin és bilirubin viszont antioxidáns hatású [3, 9, 10]. A HO működése tehát citoprotektív [11].

A hemoxigenázoknak emberben két funkcionális formája ismert: egyik a HO-1, ami indukálható pl. hemmel, oxidáló anyagokkal, gyulladásos citokinekkal, UV-sugárzással, nehézfémekkel; a másik a HO-2, melynek expressziója konstitutív [12, 13]. A HO-1 indukciója az oxidatív stressz érzékeny markere [14, 15, 16].

Vizsgálatunkban arra voltunk kíváncsiak, hogy van-e születés utáni HO-1 indukció (azaz HMOX1 génexpresszió), s ha igen, ez hogyan változik a születés utáni első héten. A koraszülöttek enzimrendszerei éretlenek, adaptációjuk nehezebben megy végbe, így azt feltételeztük, hogy a HO-1 indukció nem éri el az érett újszülöttekben tapasztalható mértéket. A vizsgálat végén összehasonlítottuk a két csoportban kapott eredményeket.

Betegek és módszer

Etikai engedély birtokában és szülői beleegyezést követően a mintavétel 21 érett és 20 koraszülött 200 µl vénás vérből történt. A kutatást a hemoxigenáz-1 génről (HMOX1) átírt mRNS szint mérésével végeztük, melyet a minta 100 µl-éből izoláltunk. A maradék vérből párhuzamosan kvantitatív vérkép készült. Ez érett újszülötteknél 2-3 mintát jelent a születést követő első héten hazaadásig, melyet a születés utáni szérumbilirubin meghatározásokkal egy időben vettek le. Koraszülöttektől az első hét minden napján naponta 1, összesen 7 mintát vettünk. Kizártuk azokat, akiknél RDS, szepszis, pozitív bakteriológia vagy egyéb komplikáció (pl. intracerebrális vérzés, NEC, pneumonia, pneumothorax vagy congenitalis vitiüm) jelentkezett. Minden páciens intermittáló fényterápiában részesült. Egyiküket sem kellett 24 óránál hosszabb ideig lélegeztetni, egyikük sem kapott transzfúziót a vizsgálati idő alatt. A vizsgált újszülöttek oxigénszaturációja mindvégig normál tartományban volt (90–95%). Az érett újszülöttek egyike sem kapott extra O₂-t,

mindegyikük jó általános állapotban született (az 5 perces Apgar-értékük 8 feletti volt). A koraszülöttek közül 10 kapott extra oxigént (< 24 ó) a normál szaturáció (89–93%) eléréséhez. FiO₂ értékeik mediánja 0,4 volt (quartilisek 0,3, 0,6). 5 perces Apgar értékeik 4–9 közöttiek voltak.

A páciensek két csoportja:

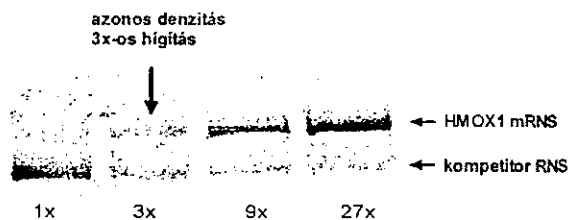
1. 21 érett újszülött (gestatiós idő: 37–40 hét; születési súly mediánja: 3305 g quartilisek 3060 g, 3770 g).

2. 20 koraszülött (gestatiós idő: 26–36 hét; születési súly mediánja: 1860 g quartilisek 1450g, 2230 g).

Mérési módszer

A minta 100 µl-ét 1 ml mRNS stabilizáló oldatba pipettáztuk. A mRNS-t mRNA Isolation Kit for Blood/Bone Marrow (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország) segítségével izoláltuk. A továbbiakban kompetitív RT-PCR-t alkalmaztunk a HMOX1 génexpresszió kimutatására. A kompetitor RNS-t *in vitro* mutagenézissel [17] (speciális PCR primerekkel és ezt követően T3 RNS polimerázzal /Fermentas AB, Vilnius, Litvánia/való transzkripcióval) állítottuk elő.

A kompetitorból hígítási sort készítettünk, majd minden hígításhoz azonos mennyiségű HMOX1 mRNS-t adtunk, és elvégeztük a cDNS átírást (RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit; Fermentas AB, Vilnius, Litvánia) specifikus primerrel. A kompetitor 20 bp delációval különbözik csupán a HMOX1 mRNS-től, tehát ha azonos primereket használunk a cDNS átírás és a PCR során, a fragmentek kompetíciója következtében a kompetitor fragmens és a minta HMOX1 fragmens aránya a folyamat végéig a kiindulásival azonos marad. A PCR-t követően polyacrylamid gélen végeztük a gélelektroforézist, amelyben a kom-



1. ábra: A kép felső sorában a HMOX1 mRNS termékek sávjai, az alsó sorban az egyre nagyobb hígítású (1x, 3x, 9x, 27x) kompetitor fragmensek sávjai láthatók. Az azonos sávdensitások azonos kiindulási fragment-koncentrációt jelentenek, amely az ábrán 3x-os hígításnál látható.

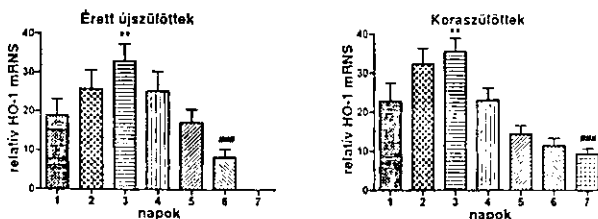
petitor termékek (rövidebbek lévén) elkülönültek a HMOX1 termékektől. Az ethidium-bromidos festést követően kapott sávok denzitásából és az ismert hígításokból tudtuk meg, milyen koncentrációban volt jelen a HMOX1 mRNS (1. ábra). Ezt az értéket az újszülött véreinek fehérvérsejt számához viszonyítottuk, így egymáshoz hasonlíthatóak lettek az eredmények.

Statistikai analízis

A klinikai adatokat átlag \pm szórás ($x \pm SD$) formában tüntettük fel. A statisztikai analízishez a Kruskal Wallis és Student's t-próbát alkalmaztuk a HO-1 expresszió változás, és a Welch korrekciós páratlan, kétmintás t-próbát az érett újszülöttek és koraszülöttek vérkép adatainak elemzéséhez. Statistikaileg szignifikánsnak a $p < 0,05$ szintet tekintettük.

Eredmények

Minden újszülött vérképeredménye az életkorának megfelelő normál tartományban volt (kiemelve: Hb-hemoglobinszint, MCV-átlagos vörösvértest térfogat, Fvs-fehérvérsejtszám, Thr-thrombocytaszám). Ezen értékek segítségével próbáltuk



2. ábra: A relatív HMOX1 mRNS szintek változása a születés utáni első héten. Páratlan, kétmintás t próba: ** $p < 0,005$ harmadik nap vs első nap; ### $p < 0,001$ utolsó nap vs harmadik nap.

kizárni anaemia, szepszis, vagy gyulladás jelenlétét (1. táblázat).

Az érett és koraszülött újszülöttek relatív HMOX1 mRNS szintjei a 2. ábráról olvashatók le. A kapott értékeket, vagyis a HO-1 indukálhatóságot mindkét csoportban hasonlóan találtuk. Már az első napon van mérhető HMOX1 génexpresszió, amely a 2-3. napon eléri a maximumot, majd a hét végére az első napinál is alacsonyabb szintre csökken (2. ábra). Az érett újszülöttek közül négyen, a koraszülöttek közül öten születtek császármetszéssel. Bár HO-1 indukálhatóságuk látszólag hasonló a nem császármetszéssel született újszülöttekéhez, az alacsony mintaszám miatt ezt statisztikailag nem értékeltük.

A szérumbilirubin szintek változása a 3. ábrán követhető nyomon. Mindkét csoportban szignifikáns emelkedés látszik a születés után, amely a 4-5. napon éri el a maximumot (3. ábra).

Megbeszélés

A HO-1 a vérben lymphocytákban, monocytákban, granulocytákban termelődik [18], ez tette lehetővé számunkra, hogy a vizsgálatot vérminták felhasználásával végezzük. Sikerült beállítanunk egy érzékeny módszert, mely segítségével már 100 ml vérminta elegendő a HMOX1 génexpresszió kimutatására.

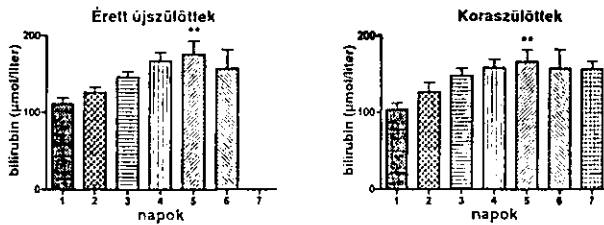
Az irodalomban eddig egyetlen esetben írták le a HO-1 enzim defektusát. A normál HMOX1 gén (22q12) 5 exont tartalmaz, az ismertett fiú-beteg esetében az apai és anyai allél is károsodott. Huszonhat hónapos korában visszatérő lázas periódusok, generalizált erythematous kiütések, növekedési elmaradás, hepatomegalia, haematuria, proteinuria jelentkezett, asplenia igazolódott. Hatévesen növekedési és fejlődési elmaradás, perzisztáló haemolyticus anaemia, abnormális vér-alvadási/fibrinolyticus rendszer, persistáló endo-

1. táblázat

Koraszülöttek és érett újszülöttek vérkép adatai ($x \pm SD$)

	Érett újszülöttek n = 21			Koraszülöttek n = 20		
	1. nap	3. nap	5. nap	1. nap	3. nap	5. nap
Hb (g/l)	159,6 \pm 19,6	155,4 \pm 23,1	156,6 \pm 29,8	184,8 \pm 16,0***	187,0 \pm 18,5***	172,7 \pm 18,8***
MCV (fl)	110,7 \pm 2,9	110,1 \pm 4,7	108,4 \pm 4,5	109,1 \pm 3,8	108,2 \pm 3,6	106,2 \pm 4,3
Thr (109/l)	187,5 \pm 84,1	198,7 \pm 79,3	243,1 \pm 112,6	233,3 \pm 67,4***	248,7 \pm 56,7***	280,2 \pm 96,6***
Fvs (109/l)	14,75 \pm 4,80	9,91 \pm 4,01	10,1 \pm 4,30	19,3 \pm 2,56**	10,83 \pm 1,77	10,10 \pm 2,23

páratlan, kétmintás t próba *** $p < 0,001$; ** $p < 0,005$ koraszülöttek vs érett újszülöttek



3. ábra: Bilirubin szintek változása a születés utáni első héten. Páratlan, kétmintás t próba:
** $p < 0,005$ ötödik nap vs első nap.

thelkárosodás, vesekárosodás, a máj és vese szövetében vaslerakódás volt megfigyelhető [19].

Az eredményeink alapján rögtön a születés után van mérhető HMOX1 génexpresszió, ami mind az érett, mind a koraszülött újszülöttekben az oxidatív stressz jele. Az ezt követő napokban bekövetkező további emelkedés mutatja, hogy mindkét csoportban indukálható a HO-1. Az enzim működőképességét igazolja az is, hogy a génexpresszó maximuma a biliverdinből képződő bilirubinszintek maximuma előtt jelentkezik.

Az érett újszülöttekből és a koraszülöttekből álló csoport összehasonlításakor nem találtunk különbséget, tehát a HO-1 mindkét csoportban a korai fiziológiás adaptáció során játszik kiemelkedő szerepet. Átmeneti adaptációs zavarban nem figyelhető meg a HO-1 indukció éretlensége. Az irodalomban közölt HO-1 defektusos páciens patológiás eltéréseket és szervi manifesztációval jelentkező kórképet mutat. A kérdés a továbbiakban az: vajon azokban a koraszülöttekben, amelyekben az oxidatív károsodásnak szervi manifesztációja is van, kimutatható-e eltérés a HO-1 indukcióban a jelenlegi eredményeinkhez képest.

Köszönnyilvánítás

Köszönjük a szegedi Szülészeti Klinika Újszülött Osztály dolgozóinak és a szegedi Gyermekklinika PIC dolgozóinak a mintavételben nyújtott sok segítséget, valamint köszönet a szegedi Gyermekklinika laboratóriumi munkatársainak a vérképanalízis elvégzéséért.

Irodalom

[1] McCarthy K, Bhogal M, Nardi M, Hart D. Pathogenic factors in bronchopulmonary dysplasia. *Pediatric Res* 1984; 18: 483–488.
[2] Rogers S, Witz G, Anwar M, Hiatt M, Hegyi T. Antioxidant capacity and oxygen radical diseases in the preterm newborn. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2000; 154: 544–548.
[3] Baranano DE, Rao M, Ferris CD, Snyder SH. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:16093–16098.

[4] Saugstad OD. Oxygen toxicity at birth: the pieces are put together. *Pediatr Res* 2003; 54: 787.
[5] Sullivan JL. Iron, plasma antioxidants, and the 'oxygen radical disease of prematurity. *Am J Dis Child* 1988; 142: 1341–1344.
[6] Maines MD. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J* 1998; 2: 2557–2568.
[7] Balla G, Vercelotti GM, Muller-Eberhard U, Eaton J, Jacob HS. Exposure of endothelial cell cells to free heme potentiates damage mediated by granulocyte and toxic oxygen species. *Lab Invest* 1991; 64: 648–655.
[8] Jeney V, Balla J, Yachie A, Varga Z, Vercelotti GM, Eaton JW, Balla G. Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood* 2002; 100: 879–887.
[9] Marilena G. New physiological importance of two classic residual products: carbon monoxide and bilirubin. *Biochem Mol Med* 1997; 61: 136–142.
[10] Tomaro ML, Batlle AM. Bilirubin: its role in cytoprotection against oxidative stress. *Int J Biochem Cell Biol* 2002; 34: 216–220.
[11] Tyrrell R, Basu-Modak S. Transient enhancement of heme oxygenase 1 mRNA accumulation: A marker of oxidative stress to eukaryotic cells. *Methods Enzymol* 1994; 234: 224–235.
[12] Keyse SM, Tyrrell RM. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 99–103.
[13] Kutty RK, Naginemi GN, Hooks JJ, Chader GJ, Wiggert B. Increased expression of heme oxygenase-1 in human retinal pigment epithelial cells by transforming growth factor-beta. *J Cell Physiol* 1994; 159: 371–378.
[14] Nath KA, Haggard JJ, Croatt AJ, Grande JP, Poss KD, Alam J. The indispensability of heme oxygenase-1 in protecting against acute heme protein-induced toxicity in vivo. *Am J Pathol* 1998; 156: 1527–1535.
[15] Stocker R. Induction of haem oxygenase as a defence against oxidative stress. *Free Radic Res Commun* 1990; 9: 101–112.
[16] Wang LJ, Lee TS, Lee FY, Pai RC, Chau LY. Expression of heme oxygenase-1 in atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1998; 152: 711–720.
[17] Waha A, Watzka M, Koch A, Pietsh T, Przkora R, Peters N, Wiestler OD, von Deimling A. A rapid and sensitive protocol for competitive reverse transcriptase (cRT) PCR analysis of cellular genes. *Brain Pathol* 1998; 8: 13–18.
[18] Niess AM, Passek F, Lorenz I, Schneider EM, Dickhuth HH, Northoff H, Fehrenbach E. Expression of the antioxidant stress protein heme oxygenase-1 (HO-1) in human leukocytes. *Free Radic Biol Med* 1999; 26: 184–192.
[19] Yachie A, Niide Y, Wada T, Igarashi N, Kaneda H, Toma T, Ohta K, Kasahara Y, Koizumi S. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *The J of Clin Invest* 1999; 1: 129–135.

Farkas I, Maróti Z, Katona M, Orvos H, Németh I, Endreffy E, Pál A, Túri S: *HO-1 expression in premature and mature neonates during the first week of life*

Newborns are exposed to mechanical and oxidative stress during labor and to relative hyperoxia thereafter during the course of adaptation to the extrauterine conditions. Part of the adaptation mechanism is the rapid degradation of fetal hemoglobin and the oxidation of its heme moiety by heme oxygenases (HOs). Heme oxygenase-1 enzyme (HO-1) is the inducible isoform, which is induced by and protective against oxidative stress. We hypothesized that HO-1 may play a role in the physiological adaptation of newborns. We therefore

measured the HO-1 mRNA expression during the first week after birth in healthy mature and premature newborns. We found that HO-1 was induced until day 2 or 3 after birth, but its level had dropped below the birth HO-1 mRNA level by the end of the first week. HO-1 levels and inducibility were similar in mature newborns and premature newborns. The fact that HO-1 was inducible even in the 26. week of gestation suggests that HO-1 plays an important role in the early adaptation processes.

Keywords: heme oxygenase-1, gene expression, neonatal adaptation, oxidative stress, cRT-PCR



**Terhes és nem terhes nőknek:
hogyan legyen gondterhelt**

PIMAFUCIN® OVULA
natamycin

A vulvovaginális candidosis hatékony kezelésére

- Széles hatásspektrum a gombás fertőzésekben
- Nagyfokú
- Rövid terápiás idő: 3 nap

Pimafucin® ovula - alkalmazási előírás
Hatóanyag: 100 mg natamycinum hüvelykúpokként
Javallatok: Candida albicans és/vagy Trichomonas vaginális okozta vaginitis.
Alkalmazás: Naponta 1 hüvelykúpot 3-6 napon át fekvő helyzetben kell mélyen a hüvelybe felhelyezni. A kezelést lehetőleg rögtön a menstruációt követően kell megkezdeni. Terhesség esetén és menopauzában a kezelés bármikor elkezdhető.
Ellenjavallat: cetylalkohol túlérzékenység
Mellékhatás: Ritkán enyhe égő érzés a külső genitáliák területén előfordulhat.
Csomagolás: 3 hüvelykúp

I. Kazy Zoltán: A terhesség alatti hüvelyi natamycin-kezelés eset-kontroll teratológiai vizsgálata (M. Nőorvosok lapja, 2004/4)

Yamanouchi
Yamanouchi Europe B.V. Képviselet
1118 Budapest, Kelenhegyi út 43.
Tel.: 361-4673 Fax: 361-4676

