

Brauswetter Diána AOK III, Elek Zsuzsa ELTE biológus IV.

Semmelweis Egyetem Orvosi Vegytani, Mol. Biol. és Pathobiokémiai Int., Budapest

Polimorf mikroRNS kötőhelyek (miR SNP) diabetes mellitus kandidáns génekben

Kérdésfeltevés: A nem inzulin függő (2-es típusú) diabetes mellitus (T2DM) napjaink egyik leggyakoribb multifaktoriális betegsége. Keveset tudni azonban a genetikai hajlamosító tényezők molekuláris hatásmechanizmusáról. A génexpresszió szabályozásának egyik legújabb területe a mikroRNS-ek (miRNS) vizsgálata. A miRNS egyszerre több fehérje expresszióját koordináltan szabályozhatja a megfelelő mRNS-ek 3'UTR (3' untranslated region) régiójához kötődve. A 3'UTR-ben előforduló egy pontos nukleotid variációk (SNP) közül *in silico* azonosíthatók azok, amelyek elméletben megváltoztatják egyes miRNS kötődését (miR SNP). Ha ez nemcsak elméleti meggondolás, hanem a valóságban is megtörténik, akkor az adott miR SNP fontos szerepet játszhat a fenotípus, jelen esetben a diabetes kialakulásában. Ilyen jellegű vizsgálat diabetes mellitus vonatkozásában tudomásunk szerint ezidáig még nem történt. Ezért célul tűztük ki a T2DM kandidáns génekben elméletileg feltételezhető miR SNP-k *in silico* felkutatását, és molekuláris-genetikai vizsgálatát.

Alkalmazott módszerek:

In silico módszerek: A T2D-DataBase, a Patrocles, a PolymiRTS és az NCBI adatbázisok összehasonlító analízisével szűrtük a kandidáns gének polimorfizmusait.

A kiválasztott SNP-k vizsgálatára Taqman rendszerű „low density array” technológiát használunk fel. Az SNP variánsok eset-kontroll megoszlásának statisztikai értékelése SPSS programcsomaggal történik. A statisztikailag szignifikáns asszociációt mutató miR SNP-eket funkcionális szempontból luciferáz riportter gén rendszerben vizsgáljuk.

Eredmények:

In silico vizsgálatok: a 159 T2DM kandidáns génből 128 gén 3'UTR-jében 520 miR SNP-t találtunk. Ebből allélfrekvencia, technikai meggondolások és irodalmi adatok alapján 32 SNP-t választottunk ki. A kiválasztott SNP-eket 400 beteg és 560 kontroll személy DNS mintáján vizsgáljuk „low density array” technológiával. Az eredmények statisztikai analízisét követően választjuk ki a funkcionális vizsgálatokban résztvevő miR SNP-eket.

Publikációk:

A témavezető csoportjában hosszabb ideje vizsgálnak genetikai polimorfizmusokat, azonban a diabetes genetikai rizikófaktorainak kutatása csak újabban kezdődött meg. Ugyanígy új témának számít a laboratóriumban a mikroRNS-ek kötőhely-polimorfizmusának vizsgálata. Mivel ezek a vizsgálatok 2008-ban indultak, ezekből a munkákból még nem jelentek meg közlemények. A jelen, komplex vizsgálatban feladatom elsősorban az *in silico* vizsgálatok elvégzése volt. A „low density array” TaqMan rendszer vizsgálata a Szegedi Biológiai Központban, Dr. Puskás László chiplaboratóriumában történik, az általunk meghatározott Taqman próbák és a laboratóriumunkban összegyűjtött DNS minták felhasználásával. A polimorf mikroRNS kötőhelyek funkcionális vizsgálatában Dr. Nagy Réka irányításával veszek részt.

Témavezető: Dr. Nagy Réka és Dr. Sasvári Mária

Farkas Roland ÁOK V.; Kövesdi Katalin ÁOK V.

Semmelweis Egyetem, ÁOK, II. Belgyógyászati Klinika, Budapest

MikroRNS vizsgálatok a mellékvesekéreg daganataiban II.: patogenetikai útvonalak azonosítása integratív bioinformatikai elemzéssel

Bevezetés: A mikroRNS-ek (miRNS, miR) rövid, 20-24 nukleotidból álló, fehérjét nem kódoló RNS molekulák, amelyek az RNS-interferencia endogén mediátoraiént specifikusan képesek kötődni cél mRNS molekulákhoz, ezáltal azok degradációját vagy a transzláció gátlását idézik elő. A miRNS-ek expressziója szövetspecifikus mintázatot mutat, megváltozott expressziójukat több daganatban észlelték. A miRNS-ek funkciójának pontos megismerése napjainkban a genomikai vizsgálatok egyik legnagyobb kihívását jelenti.

Kérdésfelvetés: Jelenleg nincs adat a miRNS-ek mellékvesekéreg daganatok patogenezisében lehetséges jelentőségéről, ezért munkánk során *in silico* módszerekkel arra kerestük a választ, hogy a megváltozott miRNS mintázat mely sejtbiológiai útvonalak befolyásolásán keresztül játszhat szerepet a mellékvesekéreg daganatok kialakulásában.

Módszerek: Normális mellékvesekéreg, hormonálisan inaktív-, kortizoltermelő Cushing-adenoma valamint primer adrenocorticalis carcinoma (ACC) szöveteket vizsgáltunk (n=32, csoportonként 8 minta). RNS izolálást követően ugyanazon mintákból ABI Taqman Low Density Human MiR Panellel miRNS expressziós mintázatot vizsgáltunk, és Agilent platformon teljes génextpressziós profil meghatározást végeztünk. A szignifikáns expressziós eltérést mutató eredmények (p<0,05) validálása valós idejű RT-PCR-rel történt (Housekeeping: RNU48). A miRNS-ek összes potenciális mRNS célmolekuláinak azonosításához munkacsoportunk által kifejlesztett bioinformatikai módszer segítségével a TargetScan, Pictar, MiRBase adatbázisokat használtuk. A microarray eredmények alapján, szövetspecifikus target predikcióval tovább szűrtük a kapott célmolekulákat, és csak a mellékvesekéregben expresszálódó mRNS-ekkel folytattuk az elemzést. A legújabb irodalmi eredmények szerint a miRNS-ek cél mRNS degradációját okozó hatása csaknem olyan jelentős, mint az átírás gátlása. Ennek megfelelően, a miRNS-ekkel funkcionálisan egyirányú expressziós változásokat mutató targeteket (ellentétes miRNS-mRNS expressziós változás) Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) szoftver segítségével azonosítottuk. Az így kiválasztott, jelentős expressziós eltérést mutató potenciális miRNS targetek IPA (Ingenuity Pathway Analysis) vizsgálatát végeztük el.

Eredmények: A primer adrenocorticalis carcinomákban szignifikáns expressziós változást mutató miRNS-ek (miR-503, miR-184, miR-210, miR-214, miR-511, miR-375) saját módszerünkkel kiválasztott targetjei a sejtciklus G2/M ellenőrzőpontjának szabályozásában vesznek részt az útvonal analízis alapján (normális vs. ACC összehasonlítás). A mellékvesekéreg daganataiban szignifikáns expressziós változást mutató mRNS-ek IPA vizsgálatában a leginkább érintett útvonal szintén a „G2/M checkpoint” volt.

Következtetés: Eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy a G2/M átmenet károsodása szerepet játszhat a mellékvesekéreg daganatok patogenezisében, és megváltozott működésének hátterében mind mRNS, mind miRNS szintű hatások állhatnak.

Publikációk a témában: A témában publikációnk még nem jelent meg, eredményeink jelenleg közlés alatt állnak.

Témavezető: **Dr. Igaz Péter PhD**

Donoreredetű antitestek vércsoportszerológiai és klinikai jelentősége májtranszplantált betegeknél

Magyarországon az első passenger lymphocytá szindrómát (PLS) 1995-ben, ABO minor inkompatibilis (ABO-MI) élődonoros veseátültetés szövődményeként írták le. A PLS az átültetett szerv immunkompetens sejtjeinek a befogadó szervezettel szembeni reakciója. A transzplantátummal átkerülő limfoid szövet B-memóriasejtjei felismerik a recipiens – számukra „nem saját” – MHC antigénjeit, és ellenük antitesttermelést indítanak meg. A betegség tünetei extra- és intravazális hemolízis, sárgaság, vese elégtelenség, DIC és fokozott csontvelőműködés. PLS megjelenését leggyakrabban ABO minor inkompatibilis transzplantációk során figyelték meg (a donor O vércsoportú, a recipiens A, B, vagy AB, ill. a donor vércsoportja A vagy B, és a recipiens AB vércsoportú). Más vércsoportantigénnel szembeni reakció kialakulása ritkább. PLS jelentkezik szerv- és haemopoeticus őssejt-transzplantáció után is. Vizsgálatunk célja a májtranszplantációt követően kialakuló PLS gyakoriságának meghatározása különböző betegcsoportokban, és a betegség sajátosságainak definiálása volt.

Az 1995 óta végzett 372 májátültetést követő donoreredetű ABO és Rh vércsoport-rendszerbeli antitestek termelődésének gyakoriságát és a kialakult szövődmények lefolyását tanulmányoztuk retrospektív vizsgálat keretében. A klinikai és laboratóriumi leletek követését és dokumentálását végeztük. A betegek szelektálása az anémia felismerése, a transzfúziós igény és a kimutatott donor eredetű antitestek alapján történt meg. Ht, Hb, Se bi (indirekt), LDH, vizelet Hb + UBG, szabad Se Hb, Haptoglobin, reticulocitaszám, és a vesefunkciók változásait figyeltük. Követtük a Direkt Coombs (DAT) változását, mellyel a szérumban és a recipiens vvs-ről eluálható donoreredetű anti-A/anti-B antitestek mutathatók ki.

A májtranszplantáltak között az ABO-MI átültetések gyakorisága 14%(51), ebből a PLS aránya 24%(12). RhD különbség (RhD+ recipiens/RhD- donor) 13%(47), ebből anti-D okozta PLS 4%(2). ABO-MI OLTx donorok között O vércsoporttal rendelkezők aránya 75%(38), az A 20%(10) és B 6%(3) vércsoportúak aránya kisebb. A recipiensek közt az A, B és AB vércsoportúak aránya hasonló. AB vércsoportú recipiensek körében a csoportazonos OLTx és ABO-MI OLTx gyakorisága megegyezett, 20-20 esetet dokumentáltak. A kialakult PLS során legnagyobb jelentősége a termelődő anti-A antitestnek volt, mely az esetek 58%-ában volt a hemolízis kiváltó oka. A betegség leggyakrabban a O-A (4 eset), és O-AB (5 eset) transzplantáció során alakult ki, azaz az A antigén tulajdonságú ABO-MI betegek veszélyeztetebbek. Májtranszplantált betegek nem szerinti megoszlásában az ABO-PLS gyakorisága férfiaknál háromszor nagyobb (9 eset – 75%) mint a nőknél (3 eset – 25%), míg más betegcsoportokban (összes beteg, ABO azonos, ABO-MI, ABO-MI PLS nélkül) nincs szignifikáns eltérés a férfiak és nők között. Egyéb irreguláris antitestek előfordulása is gyakoribb a diagnosztizált ABO-PLS-ek esetében (42% - 5 eset). Az anaemia kialakulása és a diagnózis (8./15. nap) között átlagosan egy hét telt el. Az anaemia kezelése általában szűrt, irradiált, választott vvs transzfúziójával történt. Átlagosan 2 egység vvs-t transzfundáltak alkalmanként, az össz. transzfundált vvs mennyisége 2-12 egység volt betegenként.

A hazai donációs gyakoriság és transzplantációs aktivitás mellett a jövőben is kb. 14%-s ABO minor inkompatibilitással számolhatunk, ezek között minden negyedik betegnél kell a PLS megjelenésére számítani. A hemolízis okát igazolni csak immunhematológiai vizsgálatokkal lehet, ezért ennél a betegcsoportnál a gyors felismerés érdekében célzott és rendszeres laboratóriumi és immunhematológiai szűrés szükséges.

Témavezető: Dr. Fehérvári Imre

Homicskó Krisztina, ÁOK VI, Szikszay Orsolya, ÁOK VI
Semmelweis Egyetem, Kórélettan Intézet, Budapest

Az itatóvíz deutérium-oxid (D2O) mennyiségének hatása diabéteszes patkányok szénhidrát anyagcseréjére

A legújabb kutatási eredmények alapján úgy tűnik, hogy a D2O-nak számos biológiai hatása van. Bizonyított, hogy gátolja egyes tumor sejtek osztódását, növekedését, illetve csökkenti a pankréasz béta sejtjeinek inzulin szekréciónak, feltehetően a sejten belüli mikrotubuláris rendszer stabilizálásával. Nagyon kevés tudományosan megalapozott megfigyelés áll rendelkezésünkre arról, hogy a D2O mennyiségének csökkentése miképpen hat a biológiai rendszerekre. Kísérletes és klinikai megfigyelések alapján feltételezhető, hogy a D2O megvonás antiproliferatív hatású egyes tumor sejtek esetében. Klinikai megfigyelések szerint cukorbetegben a D2O megvonás csökkenti a vércukor-szintet. Kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy a D2O megvonásnak van-e hatása a szénhidrát anyagcserére streptozotocinnal (STZ) indukált diabéteszes patkányokban. Kísérleteink elvégzése során streptozotocinnal (60mg/ttkg ip.inj.) indukált diabéteszes Sprague- Dawley patkányokat használtunk. A kezelést követő második héten az állatokat random módon (8 állat/ csoport) hat csoportba osztottuk: 1. Normál víz 2. DDW, 3. Normál víz és 2 x 1 IU inzulin/nap, 4. DDW és 2 x 1 IU inzulin/ nap, 5. Normál víz és 2x2 IU inzulin/ nap, 6. DDW és 2x2 IU inzulin/ nap. Az egyes csoportok eltérő D2O tartalmú (25-150 ppm) itatóvizet kaptak. A következő paramétereket mértük: szérum glükóz, -fruktózamin, -HbA1C, -TBARS, -kreatinin és -inzulin; vizelet glükóz, -fehérje és -kreatinin. A kísérlet végén, a kezelést követő 8. héten, Western-blott analízissel meghatároztuk a m. soleusban a plazmamembránnal asszociált GLUT-4 mennyiségét.

A kísérletek eredményeként azt kaptuk, hogy az inzulin kezelésben nem részesülő állatokban a STZ kezelés hatására kialakuló hiperglikémiát a D2O megvonás nem befolyásolta. Míg az inzulinnal kezelt csoportokban a D2O megvonás szignifikánsan csökkentette a szérum glükóz, -fruktózamin és HbA1C mennyiségét. A diabétesz kapcsán jelentkező TBARS emelkedést az inzulin kezelés önmagában kivédte és a D2O megvonásnak erre lényeges hatása nem volt. A dózishatás vizsgálatok tanúsága szerint a legkifejezettebb hatás a 125-130 ppm-es D2O tartalomnál mutatkozott. A laborparaméterek változásával korrelált a m. soleusban a plazmamembránnal asszociált GLUT-4 fehérje mennyisége is.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a D2O megvonás az inzulin hatását fokozva, az inzulin hatására létrejövő GLUT-4 transzlokációt és glükóz-felvételt elősegíti.

Témavezető: Dr. Molnár Miklós

Kerti Andrea ÁOK V, Ács Tamás Bence ÁOK V.
Simmelweis Egyetem, II. sz. Belgyógyászati Klinika, Budapest

11 β -HSD1 gén polimorfizmusainak vizsgálata endogén hypercortisolismussal járó állapotokban

Kérdésselvetés: A 11 β -hidroxiszteroid-dehidrogenáz 1 (11 β HSD1) izoenzim felelős a hormonálisan inaktív kortizon hormonálisan aktív kortizollá történő átalakításáért. Az enzim működése befolyásolja a glükokortikoidok hatását, így felmerült, hogy az enzimet kódoló gén (*HSD11B1*) variánsainak, a megváltozott enzimaktivitáson keresztül szerepük lehet az endogén hypercortisolismussal járó állapotokban. A legtöbbet vizsgált három polimorfizmus az rs846910, rs846911 és az InsA. Az rs846910 (G/A) és az rs846911 (C/A) genetikai variánsok az 1-es exon előtt a transzkripció szempontjából fontos promoter régióban helyezkednek el. Az adenin inzerciót okozó genetikai elváltozás (InsA) a *HSD11B1* gén 3. intronikus régiójában található. Irodalmi adatok szerint az rs846911 polimorfizmus Alzheimer kórral hozható összefüggésbe, míg az rs846910-es szubsztitúció 2-es típusú diabetes mellitusra, hypertoniára és inzulin rezisztenciára hajlamosít. Az InsA klinikai hatását illetően az eredmények ellentmondásosak. Funkcionális vizsgálatokkal igazolták, hogy a *HSD11B1* gén intronikus régiójában található adenin inzerció illetve a promoter régióban elhelyezkedő rs846911-es polimorfizmus csökkenti a gén transzkripcionális aktivitását. Kutatásunk során összefüggést kerestünk a *HSD11B1* gén rs846910, rs846911 valamint InsA polimorfizmusa és az endogén hypercortisolismussal járó állapotok kialakulása között.

Betegek és módszer: A rs846910, rs846911 és az InsA variánsok allél gyakoriságát 73 endogén hypercortisolismusban szenvedő betegen határoztuk meg. Ebből 41 ACTH termelő hypophysis adenomás és 32 mellékvese eredetű Cushing-szindrómás volt. A kontroll csoportba 129 hazai egészséges populációból származó személy tartozott. A polimorfizmusok kimutatásához szükséges laboratóriumi eljárások során első lépésben perifériás vérmintákból DNS-t izoláltunk. Az rs846910 és rs846911 genetikai variánsokat multiplex allélspecifikus polimeráz láncreakcióval (PCR) mutattuk ki. Az InsA detektálásához PCR-t követő restrikciós enzimemésztést alkalmaztunk. Az így kapott amplifikált DNS szakaszokat 2 %-os ethidium-bromid-agaróz gélelektroforézissel választottuk szét, majd az eltérő bázispároknál detektálható eredményeket az egyes géleképekről olvastuk le. A statisztikai elemzéshez a Statisztika 8.0 szoftvert használtuk.

Eredmények: Az rs846910 szubsztitúció A allél gyakorisága kisebb volt az általunk vizsgált beteg illetve kontroll csoportokban az európai populációban észlelt gyakorisághoz képest (0,04 vs. 0,07). Az InsA polimorfizmus gyakoriságát az európai populációban eddig nem vizsgálták. Az európai populációban is ritka, 0,01 allél gyakoriságú rs846911 polimorfizmus A allél előfordulását nem észleltük.

A 11 β -HSD1 génjén található rs846910 és InsA polimorfizmusok allél gyakoriságának vizsgálata során nem találtunk szignifikáns eltérést az egyes betegcsoportok között. Továbbá az ACTH termelő hypophysis adenomás és a mellékvese eredetű Cushing szindrómás betegek allél gyakorisága nem különbözött a kontroll populációban észlelt gyakoriságtól.

Következtetés: A *HSD11B1* gén rs846910, rs846911 és InsA genetikai variánsai az endogén hypercortisolismussal járó állapotok kialakulását nem befolyásolják.

Kutatási előzmények: Kutatócsoportunk eddigi munkája során a glükokortikoid receptor gén polimorfizmusainak jelentőségét vizsgálta endogén hypercortisolismussal járó állapotokban, a *HSD11B1* gén variánsainak vizsgálatát 1 éve kezdtük el. Jelen témában a mukacsoport még nem jelentetett meg közleményt.

Témavezető: Dr. Tóth Miklós, dr. Szappanos Ágnes

Kiss Katalin ÁOK V.

Semmelweis Egyetem II. Belgyógyászati Klinika, Budapest

Az inzulinrezisztencia vizsgálata nem alkoholos zsírmájbetegekben és 2-es típusú cukorbetegben

Célok/Háttér Az elhízás és a májbetegség közti ismert kapcsolat, a cukorbetegség magasabb cirrhotikus halálozási kockázata, illetve a nem alkoholos zsírmájbetegségben (NAFLD) tapasztalt magasabb mortalitási adatok miatt munkacsoportunk tavaly a szérumban DPP-4 enzimaktivitást vizsgálta NAFLD betegekben. Jelenleg a szénhidrát anyagcserét, az inzulinrezisztenciát, és a metabolikus szindrómát vizsgáltuk NAFLD betegekben, valamint klinikailag nem májbeteg 2-es típusú cukorbetegben (2TDM). **Betegek/Módszer** A kutatásba 39 NAFLD, és 87 2TDM beteget vontunk be a klinika hepatológiai és diabetológiai ambulanciájáról. Kontrollként 26 egészséges személy szolgált. Azokat a 2TDM betegeket, akikben a kóros májenzimek, vagy máj UH eredmények voltak, a vizsgálatból kizártuk, illetve hepatológussal történt konzultáció után az NAFLD csoportba soroltuk át. Az NAFLD diagnózisát a zsírmájbetegséghez vezető egyéb okok kizárását követően állítottuk fel. Minden NAFLD-s betegnél, kivéve a 9, már vizsgálat kezdetekor ismert cukorbeteg, 75 g CH OGTT történt. Rutin laboratóriumi paraméterek mellett haskörfogat (hk), BMI, és szérumban DPP-4 enzimaktivitás vizsgálat történt. Az inzulinrezisztenciára a HOMA2-IR-ből (komputeres módszer) következtetünk. A négy vizsgálati csoport: egészséges kontrollok, klinikailag nem májbeteg diabéteszesek, normális szénhidrát toleranciájú NAFLD, és kóros szénhidrát toleranciájú NAFLD betegek. A statisztikai analízisek során egy utas ANOVA, Kolmogorov-Smirnov-tesztet, illetve Pearson-korrelációt használtunk. **Eredmények** A 2TDM (BMI: 29,27 kg/m²; hk nő/ffi: 107,6/109,9 cm), és az NAFLD (BMI: 30,36 kg/m²; hk nő/ffi: 103,7/110,6 cm) csoport egyformán volt elhízott. 75g CH OGTT 39 NAFLD betegen: 24 normális glukóztolerancia (NGT), 4 kóros glukóz tolerancia (IGT), vagy kóros éhomi vércukor szint (IFG), és 11 manifeszt 2-es típusú diabétesz. Inzulinrezisztencia (HOMA2-IR): lépcsőzetes emelkedés a következő csoportok szerint: kontroll: 1,98; 2TDM (májbetegek kizárva): 2,58; NAFLD-NGT: 3,20 (p<0,05 vs kontroll); NAFLD-IFG/IGT/2TDM: 3,82 (p<0,01 vs kontroll, p<0,05 vs 2TDM). Metabolikus szindróma: 2TDM: 74%, NAFLD: 54%. A HOMA2-IR, és a májenzimek közti korreláció 39 NAFLD betegen: HOMA2-IR vs. ALAT: r=0,43 p= 0,0147, HOMA2-IR vs. GGT: r=0,41 p=0,0210. **Megbeszélés** Tekintettel arra, hogy a 2TDM, és a NAFLD betegek egyformán elhízottak voltak, valamint, hogy az NAFLD betegekben a HOMA2-IR magasabb volt, mint a klinikailag nem májbeteg 2-es típusú cukorbetegben, arra következtetünk, hogy az inzulinrezisztencia kialakulásában a (zsír)májbetegség kialakulásának is szerepe lehet. Ezt a következtetést az NAFLD betegekben a HOMA2-IR és bizonyos májenzimek közti összefüggés is alátámasztotta. Ezért a zsírmájbetegség diagnózisának is szerepe lehet a metabolikus szindróma jövőbeli definíciójában.

Témavezető: Dr. Firneisz Gábor, Dr. Lengyel Gabriella

Kövesdi Katalin ÁOK V.; Farkas Roland ÁOK V.

Semmelweis Egyetem, ÁOK, II. Belgyógyászati Klinika, Budapest

MikroRNS vizsgálatok a mellékvesekéreg daganataiban I.: eltérő mikroRNS expressziós mintázatok ép mellékvesekéreg szövetekben, benignus és malignus daganatokban

Bevezetés: A mikroRNS-ek (miRNS, miR) 20-24 nukleotidból álló, fehérjét nem kódoló RNS molekulák, amelyek specifikusan képesek kötődni a cél mRNS molekulák 3' át nem íródó régiójához, előidézve ezáltal a transláció gátlását. A miRNS-ek expressziója szövetspecifikus mintázatot mutat, megváltozott expressziójukat több daganat patogenezisében leírták, azonban kapcsolatuk a mellékvesekéreg tumorok kialakulásával eddig még nem tisztázott.

Kérdésfelvetés: Ezen daganatok szövettani diagnózisa, a dignitás megállapítása sokszor nehéz feladat. Kutatásaink során arra kerestük a választ, hogy az eltérő miRNS mintázatok alapján differenciálhatók-e a különböző mellékvesekéreg daganatok, és ezek közül egyes biomarkerek alkalmasak lehetnek-e a klinikai diagnózis pontosítására.

Módszerek: Normális mellékvesekéreg, hormonálisan inaktív benignus, kortizoltermelő Cushing-adenoma valamint primer adrenocorticalis carcinoma (ACC) szöveteket vizsgáltunk (n=32, csoportonként 8 minta). A mikroRNS expressziós profil meghatározásához ABI TLDA Human MiR Panelt használtunk. A Taqman-kártya normalizált eredményeit egyutas ANOVA módszerrel elemeztük ($p < 0,05$). A szignifikáns eltérést mutató expressziós eredmények validálását és az esetszám növelését valós idejű RT-PCR-rel végeztük (Housekeeping: RNU48). Az ACC minták többi vizsgált szövettípustól való elkülönítésére alkalmas miRNS-ek azonosítása keresztvalidációs módszerrel (One-leave-out cross validation method) történt. A miRNS-ek mRNS célmolekuláinak azonosításához interneten elérhető adatbázisokat (TargetScan, Pictar, MiRBase) használtunk.

Eredmények: A mérési eredményeink értékelése során 25 olyan miRNS-t kaptunk, amelyek expressziója jelentős eltérést mutatott valamely csoportok között. A validálás során a miR-214, miR-375 és miR-511 expressziója szignifikáns csökkenést mutatott, a miR-184, miR-210 és miR-503 expressziója pedig szignifikánsan emelkedett a malignus daganatokban, összehasonlítva a többi szövetscsoporttal. Ezek közül a miR-503 és miR-511 expressziójának együttes vizsgálatával az ACC-k 100%-os szenzitivitással és 97%-os specificitással elkülöníthetők a többi mintától. A miRNS-ek target mRNS-ei közül funkciójuk alapján kiemelkedőek egyes daganatok patogenezisében szerepet játszó onkogén (E2F3, HIF3 α , IGF1R, FGFR2) és tumorszupresszor (PTEN, AIF3, NPTX1) gének termékei. A jövőben a prediktált célmolekulák validálását fehérje szinten (Western-blot, immunhisztokémia) is el kívánjuk végezni.

Következtetés: Az észlelt expressziós eltérések eddig ismeretlen mechanizmusok lehetőségét vetik fel a mellékvesekéreg daganatok patogenezisében. Kutatásaink során megfigyelt jellegzetes miRNS mintázatok a jövőben hozzájárulhatnak a vizsgált tumorok kialakulásának jobb megértéséhez, a miR-503 és miR-511 expressziójának együttes vizsgálata pedig alapját képezheti új eljárások kifejlesztésének az ACC-k diagnosztikájában.

Publikációk a témában: A témában publikációnk még nem jelent meg, eredményeink jelenleg közlés alatt állnak.

Témavezető: Dr. Igaz Péter PhD

Szerzők: Szakály Mária ÁOK IV, Zóka András ÁOK IV
Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinika, Budapest

Lymphocyták felszínéhez kötött CD26 expresszió vizsgálata 1-es típusú diabetes mellitusban

Háttér/Célok: A dipeptidyl-peptidase-4 (DPP-4) szolubilis és membránhoz kötött (CD26) formában található meg a szervezetben. A peptid a szénhidrát-anyagcsere szabályozásán kívül immunfolyamatokban is szerepet játszik. Korábbi tanulmányainkban magasabb szérumban DPP-4 enzimaktivitást mértünk 1-es típusú diabetes mellitusban (T1DM), mint egészségesekben. Célunk az autoimmun T1DM-ben észlelt emelkedett szérumban DPP-4 aktivitás sejtszintű hátterének feltárása a lymphocyták CD26 expressziójának meghatározásával.

Betegek/módszer: 36 (nő/ffi:18:18, életkor: $27,81 \pm 7,48$ év) 1-es típusú cukorbeteg és 16 (nő/ffi:9:7, életkor: $37,75 \pm 11,69$ év) egészséges személy kontrollként. A vizsgálat során klinikailag a csagcsere-paraméterek és lymphocyták felszíni CD26 expresszió meghatározása történt éhomi állapotban vett perifériás vérből. A lymphocyták szeparálását és a felszíni CD26 expresszió kvantitatív mérését FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) módszerrel végeztük. Az eredmények értékeléséhez kétmintás T-próbát használtunk.

Eredmények: A T1DM betegek lymphocytáinak sejtfelszíni CD26 expressziója átlagosan 128,34 fluorescens egység, míg az egészséges kontrollok esetében 141,04 fluorescens egység volt. Az adatok nem mutattak szignifikáns különbséget.

Megbeszélés: A korábban a T1DM betegek szérumban talált szolubilis DPP-4 enzimaktivitás-emelkedést nem a lymphocyták sejtfelszínén bekövetkezett CD26 expresszió-változás magyarázza.

Témavezetők: Dr. Firneisz Gábor, Dr. Varga Tímea
Konzulens: Dr. Somogyi Anikó

Szémán Barbara ÁOK V.

Semmelweis Egyetem II. Belgyógyászati Klinika, Budapest

Depressziós tünetek vizsgálata mikro-és makroangiopatiás illetve szövődménymentes cukorbetegekben

Hazánkban, az átlagpopulációban az enyhe tüneteket mutató depresszió előfordulási gyakorisága 14%. A depressziós tünetek előfordulása cukorbetegek között ennek kétszerese. A diabétesz és a depresszió komorbiditásának alapja ezidáig nem tisztázott. Irodalmi adatok felvetik, hogy a diabétesz, krónikus szövődményei lehetnek felelősek a depresszió gyakoribb előfordulásáért. A diabétesz krónikus szövődményei közül a nephropathia (40%), a retinopathia (20-69%) és a neuropathia (30%) nagy számban érinti a magyarországi diabéteszes populációt.

Célkitűzés: Összehasonlítani a depressziós tünetek előfordulási gyakoriságát és azok súlyosságát micro- és macrovascularis szövődményekben szenvedő, illetve szövődménymentes cukorbetegekben. **Betegek és módszerek:** 247 2-es típusú és 24 1-es típusú cukorbetegét vizsgáltunk. A résztvevőket nem, és késői diabéteszes komplikációik alapján osztottuk csoportokba. Vizsgáltunk egy makrovaszkuláris szövődmények nélküli férfi (SZMMAF: n=52, BMI:28,78±3,36, kor:56,4±15,45, HbA1C:8,03±1,57,) és női csoportot, (SZMMAN: n=67, BMI:31,08±8,28, kor:58,23±14,39, HbA1C:8,37±1,91), egy makrovaszkuláris szövődményekben szenvedő férfi (MAF: n=32, BMI:30,88±5,01, kor:63,06±8,88, HbA1C:8,46±2,0) és női (MAN: n=27, BMI:32,0±5,96, vércukor:8.86±3,13, kor:66,18±9,28, HbA1C:7,9±1,73) csoportot. Majd mikrovaszkuláris szövődmények tekintetében egy mikrovaszkuláris szövődményektől mentes férfi (SZMMIF: n=19, BMI:27,95±3,5, kor:55,42±18,21, HbA1C:7,61±1,34) és női (SZMMIN: n=35, BMI:31,43±8,56, kor:56,65±63,54, HbA1C:7,57±1,73) csoportot, és egy mikrovaszkuláris szövődményekben szenvedő férfi (MIF:n=34, BMI:29,59±5,62, vércukor:9,8±3,66, kor:58,91±11,93, HbA1C:8,6±1,89) és női (MIN: n=39, BMI:32,42±7,34, kor:63,54±11,0, HbA1C:8,6±1,69) csoportot. A depresszív tünetek kimutatására a Beck-tesztet alkalmaztunk. A statisztikai számításokhoz az SPSS statisztikai programot használtuk. **Eredmények:** A MAF csoport szignifikánsan magasabb Beck depresszió pontszámokat ért el a SZMMAF-hoz képest (SZMMAF: Beck:4,59±3,88, Beck:6,44±3,96,p<0,05). Makroangiopatiás nők esetében ez a különbség nem volt kimutatható (SZMMAN Beck: 7,01±6,46 MAN Beck: 9,22±5,8) A mikroangiopatiás szövődmények fennállásakor a mikroangiopáthiás férfiak szignifikánsan magasabb depressziós pontszámot értek el a mikroangiopátia mentes csoporthoz képest (SZMMIF: Beck: 3,05±2,89, MIF: Beck:5,29±3,77, p<0,05). Hasonlóan a makroangiopatiás adatokhoz, mikroangiopatiás nőkben a depressziós pontszámok nem különböztek a szövődmény mentes nőktől (SZMMIN Beck: 7,02±4,72 MIN Beck: 7,8±6,00). **Következtetés:** Mind a makrovaszkuláris, mind a mikrovaszkuláris szövődmények megjelenése a férfiak depressziós tüneteit nagymértékben befolyásolják. Ugyanez a hatás nőkben nem volt kimutatható, a nők depressziós pontszámai szövődményektől függetlenül magasabbak, mint a férfiaké. Diabéteszes betegek gondozása során a szövődmények manifesztációja esetén különösen férfiak esetében fontos hogy felmerüljön a depresszió fennállásának lehetősége, melyet kezelni kell, mert ez meggátolhatja a diabétesz megfelelő kezelését.

Témavezető: dr. Nagy Géza és dr. Somogyi Anikó

Limfocita-aktiváció 1-es típusú diabetesben: a káliumcsatornák megváltozott működése

Bevezetés: A limfociták aktivációjában a Kv1.3 és az IKCa1 jelű káliumcsatornák központi szerepet játszanak: gátlásuk immunmoduláns hatású. 1-es típusú diabetesben és egyéb autoimmun betegségekben működésükre és klinikai jelentőségükre vonatkozóan azonban nincsenek adatok. A feszültségfüggő Kv1.3 csatorna specifikus gátlószere a margatoxin (MGTX), a kalciumdependens IKCa1 csatornát egy triarilmetán-származék (TRAM-34), a charybdotoxin (CHTX) pedig mindkét említett csatornát képes gátolni.

Célkitűzés: Kutatócsoportunk korábban kimutatta, hogy 1-es típusú diabetesben sejtaktiváció hatására megváltozik a kalcium-beáramlás kinetikája a limfocitákban. Ebben a vizsgálatban arra kerestük a választ, hogy a kétféle káliumcsatorna milyen mértékben játszik szerepet a különböző limfocita-populációk aktiválására bekövetkező kalciumszint-változásban.

Módszerek: Öt egészséges és öt, 1-es típusú diabetesben szenvedő felnőttől perifériás vérmintát vettünk, melyből izoláltuk a mononukleáris sejteket. CD4 és CD8, valamint Th1 és Th2 markerekkel való jelölést követően kalciumot kötő fluoreszcens festékekkel (Fluo-3 és Fura-Red) töltöttük fel, majd fitohemagglutininnel (PHA) aktiváltuk a limfocitákat. A citoplazmatikus kalciumszintet áramlási citométerrel kinetikusan monitoroztuk. Vizsgáltuk, hogy az egyes limfocita-populációk esetében ez hogyan változik meg a fent említett gátlószerek (MGTX, TRAM-34, CHTX, 60 nM) hatására. A kalcium-flux kinetikáját a laboratóriumban fejlesztett program segítségével elemeztük; meghatároztuk az aktivációt jellemző görbe alatti területben (AUC) a gátlás hatására bekövetkező változást. Az ugyanazon csoporton belül fellépő változásokat egymintás t-próba, a két csoport közötti különbségeket pedig kétmintás t-próba segítségével értékeltük.

Eredmények: Az AUC [U] az összes vizsgált sejttípus esetén az egészségesekhez képest lényegesen kisebb volt diabeteses betegeknél, statisztikailag szignifikáns szintet a következő sejtpopulációknál ért el: Th1 (átlag: 1013,6 U vs. 452 U, $p < 0,05$), Th2 (átlag: 1183,2 U vs. 474,6 U, $p < 0,05$), CD4+ Th2 (átlag: 1205,6 U vs. 419,5 U, $p < 0,05$), összes limfocita (átlag: 1295,9 U vs. 607,4 U, $p < 0,05$). Egészséges személyekben a MGTX a következő sejtpopulációk esetében csökkentette szignifikánsan ($p < 0,05$) az AUC értékeket (a kezeletlen minta AUC-jének megadott százalékára): Th2 (46,3 %), CD4 (60,1 %), valamint CD4+ Th2 (54,1 %). Ugyanilyen módon a TRAM-34 a Th1 (42,6 %) és a CD4+ Th1 (64,7) sejtek esetében fejtett ki szignifikáns ($p < 0,05$) gátlóhatást. A CD8 sejtpopulációt mind a MGTX, mind a TRAM-34 szignifikánsan gátolta (36,8 %, illetve 40,6 %, $p < 0,05$). Diabeteses betegeknél egyik szerrel sem tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni a CD4, illetve a Th2 sejtek gátlása esetén. Th1 sejtek TRAM-34 kezelésekor azonban szignifikáns maradt a különbség (63,6 %, $p < 0,05$), e sejteken belül különösképpen a CD8+ Th1 populáció gátlódik diabetesben (44,1 %, $p < 0,05$). A CD8 sejtpopulációt ebben az esetben is mind a MGTX, mind a TRAM-34 szignifikánsan gátolta (31 %, illetve 45,8 %, $p < 0,05$).

Következtetés: 1-es típusú diabetesben a limfociták aktiválhatósága csökken. Ebben a CD4 és a Th2 sejtek esetében a Kv1.3 csatorna megváltozott működése játszhat szerepet. További vizsgálatok szükségesek annak meghatározására, hogy ez a jelenség milyen szerepet játszhat az 1-es típusú diabetes kialakulásában, illetve, hogy eredményeink mennyiben hasznosíthatóak a betegség kezelésében.

Kapcsolódó publikáció: Aarnisalo J, Treszl A, Svec P, Marttila J, Oling V, Simell O, Knip M, Korner A, Madacsy L, Vasarhelyi B, Ilonen J, Hermann R. Reduced CD4+ T cell activation in children with type 1 diabetes carrying the PTPN22/Lyp 620Trp variant. J Autoimmun. 2008 Aug;31(1):13-21.

Témavezető: Dr. Vásárhelyi Barna, Dr. Treszl András

Kapcsolódó anyagok: **Máté Attila:** Depressziós tünetek előfordulási gyakoriságának vizsgálata 2-es típusú diabetes mellitusban 2006 TDK konferencia **Szémán Barbara:** Depresszív és szorongásos tünetegyüttes vizsgálata 2-es típusú cukorbetegben 2007 TDK konferencia.

Komplex kardiovaszkuláris kockázatcsökkentő kezelés vesetranszplantált betegekben

Bevezetés: A diabétesz (DM) előfordulási gyakorisága növekszik, s nő a cukorbeteg aránya a krónikus vesebetegek (KVB) körében is. A diabétesz fennállása a krónikus vesebetegség minden stádiumában fokozza a betegek kardiovaszkuláris (KV) kockázatát. Munkacsoportunk korábbi adatainak elemzése azt mutatta, hogy vesetranszplantált betegek 5 éves halálozási és graft-vesztési kockázatát a cukorbetegség fennállása kétszeresre fokozta. A komplex KV rizikócsökkentés (a vérnyomás kontrollja, HMG-CoA-reduktáz inhibitorok (sztatinok), angiotenzin-konvertáz enzim gátlók és angiotenzin receptor bénítók (ACEI/ARB), valamint thrombocita aggregáció gátlók (PAI-k) alkalmazása) számos betegcsoportban a KV események és mortalitás csökkenését eredményezte.

Célkitűzés: Vesetranszplantált betegek körében összehasonlítottuk diabeteses és nem diabeteses betegek KV rizikóját. Felmértük, hogy van-e különbség cukorbeteg és nem cukorbeteg között azon betegek arányában, akik a vérnyomás és a szérum koleszterin céltartományát nem érik el. Végül felmértük, hogy van-e különbség a rizikócsökkentő terápia alkalmazása tekintetében a diabeteses és nem diabeteses betegek között.

Módszerek: A Semmelweis Egyetem Transzplantációs és Sebészeti Klinikáján gondozott felnőtt vesetranszplantált betegeket felkértük a vizsgálatban való részvételre. Az anamnézisre, a gyógyszerelésre, valamint a szocio-demográfiai helyzetre vonatkozó adatokat a kartonokból illetve a betegektől gyűjtöttük. A laboratóriumi paramétereket a laboratórium adatbázisából nyertük. A betegek vérnyomását a rendelőben, standard körülmények között, higanyos vérnyomásmérővel mértük. A statisztikai elemzésekhez SPSS 13.0 programot használtunk. Az adatok összehasonlításához t-próbát, Mann-Whitney tesztet és χ^2 -tesztet alkalmaztunk. A betegek beleegyező nyilatkozatot írtak alá és a vizsgálatot az egyetem etikai bizottsága engedélyezte. Elemzésünkben felhasználtuk a 2002-ben munkacsoportunk által végzett TRANSQoL-HU tanulmány során hasonló módszerekkel nyert adatokat is.

Eredmények: A végső analízist 993 beteg adataival végeztük. Átlagéletkoruk 51 ± 13 év, 57%-uk férfi, 19%-uk cukorbeteg, az átlagos BMI 27 ± 5 kg/m², a becsült glomerulus filtrációs ráta (bGFR) átlaga 51 ± 21 ml/perc volt. A cukorbeteg aránya 21% volt a mintában. A diabeteses betegek idősebbek voltak (56 ± 11 vs 49 ± 13 év; $p < 0,001$), átlagos BMI-jük magasabb volt (28 ± 5 vs 26 ± 5 ; $p < 0,001$). Nem volt különbség a betegek összkoleszterin, HDL-koleszterin és LDL-koleszterin szintjében, de a cukorbeteg triglicerid szintje szignifikánsan magasabb volt, mint nem diabeteses társaiké (median {interquartilis tartomány – IQR}: 2 {1,5} vs 1,6 {1,3}; $p < 0,001$). A cukorbeteg Framingham pontszám alapján számított 10 éves KV mortalitási rizikója kétszerese volt nem cukorbeteg társaikénak (median {IQR} 16 {15} vs 8 {9} %; $p < 0,001$). Bár a diabeteses betegek nagyobb hányada kapott 3 vagy több vérnyomáscsökkentő gyógyszert, átlagos szisztolés vérnyomásuk magasabb (145 ± 20 vs 141 ± 19 Hgmm; $p < 0,05$), diasztolés vérnyomásuk alacsonyabb (80 ± 12 vs 85 ± 12 Hgmm; $p < 0,001$) volt, mint nem diabeteses társaiké. 2007-ben a cukorbeteg valamivel nagyobb hányada részesült ACEI/ARB (32 vs 25%), PAI (45 vs 38%) és sztatin (37 vs 28%) kezelésben, mint nem cukorbeteg esetében ($p < 0,01$ minden esetben), ugyanakkor a cukorbeteg közel 40%-a nem vagy csak 1 KV kockázatcsökkentő gyógyszert szedett.

Következtetés: Eredményeink alapján azt mondhatjuk, hogy a cukorbeteg vesetranszplantáltak kissé nagyobb arányban részesülnek komplex KV kockázatcsökkentő kezelésben, mint nem diabeteses betegtársaik, ugyanakkor sok cukorbeteg vérnyomása a céltartománynál magasabb, és a betegek közel fel nem vagy csak 1 KV kockázatcsökkentő gyógyszert kapott.

