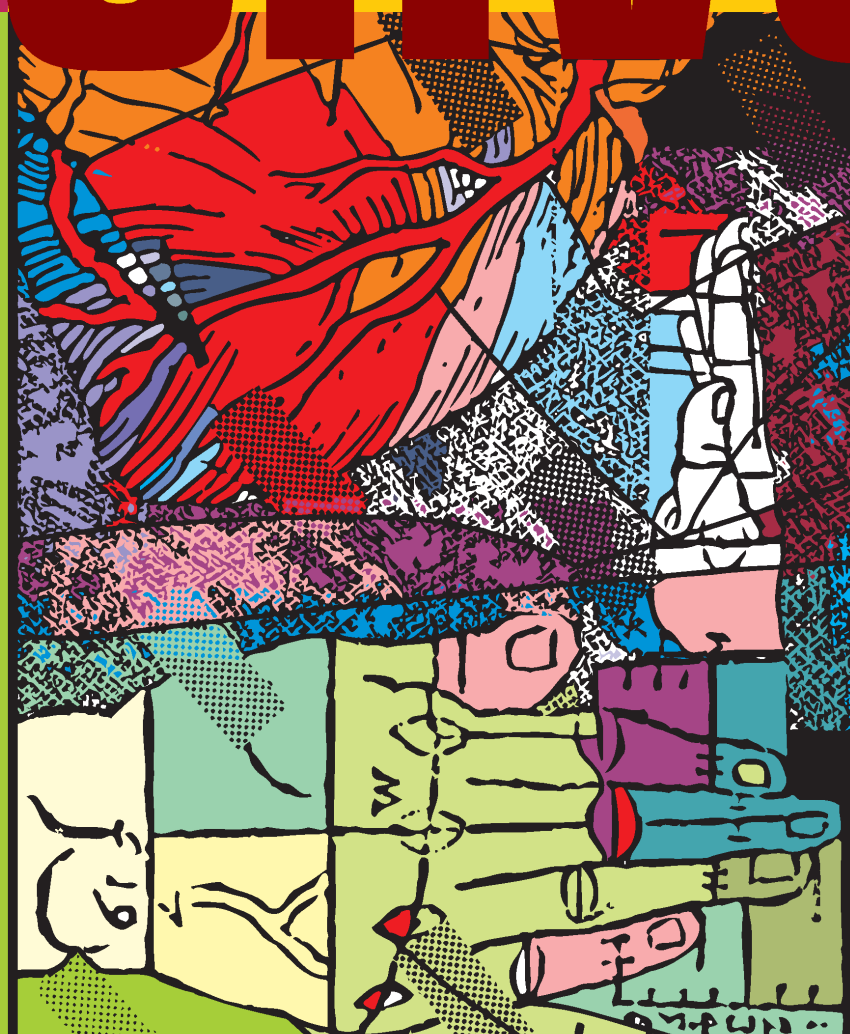


2009.
LXXXIV.
évfolyam,
5. különszám

ORVOS

KÉPZÉS



Dies Academicus 2009

- ▶ **Virtuális mikroszkópia** alkalmazási lehetőségei a **vastagbélbetegségek** diagnosztikájában
- ▶ **TRESK**: egy kalcineurin által szabályozott háttér
- ▶ A **nitrogén-monoxid-szintáz** enzimek vizsgálata **hypoxia** által kiváltott kórképekben
- ▶ Rendszerbiológiai szemlélet a **primer csontvesztés** molekuláris biológiai kutatásában és az osteoporosis **immunológiai vonatkozásai**
- ▶ A **komplementrendszer** jelentőségének vizsgálata az **atheroscleroticus eredetű érbetegségek** patogenezisében



FELELŐS SZERKESZTŐ

Merkely Béla
merkely.bela@kardio.sote.hu

FŐSZERKESZTŐK

Gál János
janos.gal67@gmail.com

Langer Róbert
roblanger@hotmail.com

SZERKESZTŐBIZOTTSÁG

Graduális képzés

Matolcsy András
matolcsy@korb1.sote.hu

PhD-képzés

Szél Ágoston
szel@ana2.sote.hu

Szakorvos-továbbképzés

Szathmári Miklós
szatmik@bel1.sote.hu

Rezidens- és szakorvosképzés

Préda István
predadr@gmail.com

Tagok

Ádám Veronika, Bereczki Dániel, Bitter István, Csermely Péter, de Châtel Rudolf, Dobozy Attila, Eckhardt Sándor, Édes István, Fazekas Árpád, Fejérdy Pál, Fekete György, Halász Béla, Karádi István, Kárpáti Sarolta, Kásler Miklós, Keller Éva, Kollai Márk, Kopper László, Ligeti Erzsébet, Losonczy György, Magyar Kálmán, [Magyar Pál], Mandl József, Muszbek László, Nagy Károly, Nardai Sándor, Nemes Attila, Németh János, Noszál Béla, Palkovits Miklós, Papp Gyula, Papp Zoltán, Petrányi Győző, Répássy Gábor, Rigó János, Réthelyi Miklós, Romics Imre, Romics László, Rosivall László, Sótanyi Péter, Szendrői Miklós, Szirmai Imre, Szollár Lajos, Telegdy Gyula, Tompa Anna, Tóth Miklós, Tulassay Zsolt, Tulassay Tivadar, Vasas Lívía, Vincze Zoltán, Zelles Tivadar

Szerkesztőségi titkár

Szelid Zsolt
orvoskepzes@kardio.sote.hu

Az ORVOSKÉPZÉS megjelenik negyedévente. Megrendelhető a Kiadótól.

Szerzői jog és másolás: minden jog fenntartva. A folyóiratban valamennyi írásos és képi anyag közlési joga a szerkesztőséget illeti. A megjelent anyag, illetve annak egy részének bármilyen formában történő másolása, ismételt megjelentetéséhez a szerkesztőség hozzájárulása szükséges.

ORVOSKÉPZÉS

A graduális és posztgraduális képzés folyóirata
Különszám a Tudomány Napjára
2009; LXXXIV. évfolyam,
S5:367-418.

Orvosképzés Szerkesztőség:
1086 Budapest, Nagyvárad tér 4.

Kiadja és terjeszti:

Semmelweis Kiadó
1086 Budapest, Nagyvárad tér 4.

Telefon: 210-4403

Fax: 210-0914, 459-1500/56471

Internet honlap:

www.semmelweiskiado.hu

E-mail: info@semmelweiskiado.hu
orvoskepzes@semmelweiskiado.hu

Szerkesztő:

VINCZE JUDIT
vincze.judit@mail.datanet.hu

Kiadásért felel:

TÁNCOS LÁSZLÓ
tancos@mail.datanet.hu

Hirdetésszervező:

KOVÁCS VERONIKA
Telefon: 215-1401, 06 20/ 221-5265
kovver@net.sote.hu

Nyomdai előállítás:

Avaloni Kft.

ISSN 0030-6037



Semmelweis Kiadó
www.semmelweiskiado.hu



ORVOSKÉPZÉS

A graduális és posztgraduális
képzés folyóirata
Különszám a Tudomány Napjára
2009; LXXXIV. évfolyam,
S5:367-418.

Az
ORVOSKÉPZÉS
folyóirat
megrendelésével kapcsolatos
információ a lap végén

Tartalom / Contents

Szél Ágoston	Előszó	369
Molnár Béla	Virtuális mikroszkópia alkalmazási lehetőségei a vastagbélbetegségek diagnosztikájában <i>Application of virtual microscopy in the diagnostics of colonic diseases</i>	371
Czirják Gábor Enyedi Péter	TRESK: egy calcineurin által szabályozott háttér K ⁺ -csatorna vizsgálata <i>Investigation of TRESK: a calcineurin-regulated background K⁺ channel.</i>	375
Rusai Krisztina Reusz György Szabó J. Attila	A nitrogén-monoxid-szintáz enzimek vizsgálata hypoxia által kiváltott kórképekben <i>Nitric oxide synthases in hypoxia-induced diseases</i>	383
Balla Bernadett Kósa János Takács István Kiss János Podani János Lazáry Áron Bácsi Krisztián Nagy Zsolt Speer Gábor Lakatos Péter	Rendszerbiológiai szemlélet a primer csontvesztés molekuláris biológiai kutatásában és az osteoporosis immunológiai vonatkozásai <i>Systems biological approach on the research of human bone loss and the immunological aspects of osteoporosis</i>	397
Széplaki Gábor	A komplementrendszer jelentőségének vizsgálata az atheroscleroticus eredetű érbetegségek patogenezisében <i>Impact of the complement system in the pathogenesis of atherosclerotic vascular disease</i>	409



DR. SZÉL ÁGOSTON
egyetemi tanár

Lectori Salutem!

Az elmúlt hónapokban ismét felélénkült egy néhány éve megkezdődött vita: legyenek-e a jó felsőoktatási intézmények között „még jobb” (vagy legjobb) egyetemek? A kutatóegyetemi státust, amely akár anyagi előnyöket is nyújthat, a Felsőoktatási Törvény kodifikálja, de konkrét tartalmi jegyek nélkül. Érthető tehát, hogy sokan sokfelé fáradoznak paraméterek, szempontok, algoritmusok kidolgozásán, amelyek alapján a megtisztelő cím odaítélhető lesz. Mi sem természetesebb, mint az, hogy ebből a munkából a Semmelweis Egyetem sem maradhat ki. A rengeteg lehetséges indikátor között, ha számszerűsítésük nem is könnyű feladat, az egyik legfontosabb a fiatalon kiemelkedő eredményeket elért kutatók megjelenítése, bemutatása. A Tudomány Napja a magyar felsőoktatás és kutatás talán legnagyobb ünnepe. Ilyenkor egymást érik a tudományos rendezvények, amelyek főszereplői általában rangos kitüntetések birtokosai, kiemelkedő eredményeket elért tudósok. Egyetemünk is kiveszi a részét ebből az ünnepi rendezvénysorozatból, és ilyenkor kerül átadásra a *Huzella-* és a *Jendrassik-díj*, és ilyenkor adják át a legmagasabb egyetemi kitüntetést, a *Semmelweis-díjat* is. A Dies Academicus keretében eskütétel után avatjuk fel a frissen végzett doktorjelölteket is, akik közül a legjobbak szintén különféle díjakban, jutalmakban részesülnek. Nem feledkezhetünk meg azokról sem, akik a Semmelweis Kutatási Támogatás díjában részesültek.

Az Orvostudományok is megpróbálta „szóra bírni” egyetemünk fiatal kiválóságait a Dies Academicus alkalmából. Különszámunk fiatal szerzői, akik felkérésünkre vállalkoztak tudományos munkájukról beszámolni a lap hasábjain, most egy újabb közleménnyel gazdagíthatják publikációs listáikat. Gratulálunk nekik, és azt kívánjuk, hogy pályafutásuk olyan sikeresen folytatódjék, mint ahogyan elkezdődött. De ennél többet várunk ifjú szerzőinktől! Még fiatalabb pályatársaik számára kell útmutatást adniuk és új ismereteket közölniük – ez nemcsak az Orvostudományok rovataiban, hanem az egyetemi pályafutásuk során is kötelességük.

Eötvös Loránd szavait idézzük: „Az egyetem ma, azt az elvet követve, hogy tudományt közölni csak az tud igazában, ki azt maga is előbbre vinni képes, vonzókörébe gyűjti a tudománynak majdnem összes munkáit, ellátja őket a szükséges segédeszközökkel, kötelességükké azt az egyetevén, hogy tanítsanak úgy, amint azt meggyőződésük sugallja, megad nekik mindent arra, hogy egyéniségüket a tudományos kutatás terén szabadon érvényesíthessék, s maguknak tanítványaikból utódokat nevelhessenek. Csodálhatjuk-e, hogy az egyetem szabad légkörében pezseg ma leghevesebben a tudományos élet?”

Ez a pezsgés az, ami az egyetemi létben a legszebb, hiszen a fiatal tanítványok előbb-utóbb maguk is mesterek lesznek. Az Orvostudományok szerzői tehát cikkeikkel máris betoppantak a mesterek körébe, és reméljük, hogy nagyon sokan olvasnak majd tudományos munkájuk eredményeiről. A rovatszerkesztő csalódással vette tudomásul, hogy a kiválasztottak és a díjazottak közül nem mindenki kívánt a közlés lehetőségével élni, megfosztva ezzel az érdeklődő egyetemi közönséget téziseik megismerésétől. Mivel a díjakat megpályázók annak idején nem tudhatták, hogy esetleges sikereiknek milyen következménye lehet, senkit nem akartunk kényszerrel kényelmetlen helyzetbe hozni, de különszámunkkal határozott jelzést szeretnénk adni a jövő nyerteseinek: a mestereknek nemcsak lehetőségük van a tudás átadására, hanem bizony kötelességük is ez a feladat...

Egyetemünk nevezetes ünnepén, a Dies Academicuson, az „akadémia napján” érdemes felidézni a gyakran használt idegen szó jelentését és eredetét. Amint az ismeretes, Akadémosz görög hérosz nevéből származik az akadémia szó. Akadémosznak Athén közelében temploma és szent ligete volt. Ebben a ligetben találkozott és vitatkozott a filozófus Platon barátjaival és tanítványaival. A híres filozófus és tudós itt alapította meg Akadémiának nevezett filozófiai iskoláját időszámításunk előtt 387-ben. Az iskola sokáig volt a tudomány fellegvára, míg alapítása után majdnem ezer év elteltével Justinianus császár megszüntette. Majdnem egy újabb évezrednek kellett eltelnie addig, amíg a XV. század Firenzéjében újjászülethetett a reneszánsz Akadémia, amely Cosimo de Medici nevéhez fűződik. Az akadémia ma is a tudósokból álló testületnek a megjelölése, amelynek minden tudományos fokozattal rendelkező személy teljes értékű tagja lehet.

Budapest, 2009 októbere

Dr. Szél Ágoston
a Doktori Tanács Elnöke



ORVOSKÉPZÉS folyóirat szerzői útmutatója

A folyóirat célja: Az 1911 óta megjelenő Orvostudomány legfontosabb célja a hazai orvostudomány folyamatos graduális és posztgraduális képzésének támogatása. A lap elsősorban olyan munkák közlését tartja feladatának, amelyek az orvostudomány egy-egy ágának újabb és leszűrt eredményeit foglalják össze magas színvonalon úgy, hogy azok a gyakorló orvoshoz, szakorvoshoz, klinikushoz és elméleti orvoshoz egyaránt szóljanak. Emellett lehetőség van eredeti közlemények és esetismertetések benyújtására, és az újság a Semmelweis Egyetem szakmai kötelező szinten tartó tanfolyamok előadási összefoglalóinak is teret ad. Az eredeti közlemények a rendszeres lapszámokban, vagy a témához kapcsolódó tematikus lapszámokban kapnak helyet. Fontos feladatunknak tartjuk, hogy rezidens kollégák tollából származó esetismertetéseket is közöljünk, melyeket mentori ajánlással kérünk benyújtani. A beadott dolgozatokat a szerkesztői bizottság előzetes bírálatra adja ki, és a kézirat közlésére a bíráló eredmények függvényében kerül sor. Tudományos dolgozat benyújtására az alábbiak szerint van lehetőség:

- Esetismertetés (case report)
- Fiatal doktorok (PhD) tudományos beszámolója, új eredményeinek összefoglalása (nem tézisek vagy doktori értekezések!)
- Klasszikus összefoglaló közlemény az elméleti és klinikai orvostudomány bármely területéről, a legújabb irodalmi eredmények felhasználásával
- „Update” jellegű közlemény, azaz nem egy téma kidolgozása, hanem adott szakterület legújabb tudományos eredményeinek összefoglalása
- Előadási összefoglaló (a tanfolyamszervezők felkérése alapján)

A kézirat: A tudományos közleményeket elektronikusan, Word dokumentum formátumban kérjük eljuttatni a szerkesztőségbe. Az illusztrációkat, ábrákat és táblázatokat külön file-ként kérjük elküldeni. Az ábrák címeit és az ábramagyarázatokat a Word dokumentumban külön oldalon kell feltüntetni, az ábra/táblázat számának egyértelmű megjelölésével. A digitális képeket minimum 300 dpi felbontásban kérjük, elfogadunk tif, eps, illetve cdr kiterjesztésű file-okat. A kézirat elfogadása esetén az ábrákat a szerkesztőség nyomtatott formában is kéri elküldeni. Az orvosi szavak helyesírásában az Akadémia állásfoglalásának megfelelően, a latinus írásmód következetes alkalmazását tekintjük elfogadottnak. Magyarosan kérjük írni a tudományágak és szakterületek, a technikai eljárások, műszerek, a kémiai vegyületek neveit. A szerkesztők fenntartják maguknak a stiláris javítás jogát. A mértékegységeket SI mértékrendszerben kérjük megadni.

A kézirat felépítése a következő: (1) címloldal, (2) magyar összefoglalás, kulcsszavakkal, (3) angol összefoglalás (angol címmel), angol kulcsszavakkal, (sorrendben): magyar cím, angol cím, (4) rövidítések jegyzéke (ha van), (5) szöveg, (6) irodalomjegyzék, (7) ábrajegyzék, (8) táblázatok, (9) ábrák. Az oldalszámozást a címlaldaltól kezdve kell megadni és az egyes felsorolt tételeket külön lapon kell kezdeni. (1) A *címlaldalon* sorrendben a következők szerepeljenek: a kézirat címe, a szerzők neve, valamint a szerzők munkahelye, a kapcsolattartó szerző pontos elektronikus és postai címének megjelölésével. (2–3) Az *összefoglalást* magyar és angol nyelven kell beküldeni, külön oldalakon, a következő szerkezet szerint: „Bevezetés” („Introduction”), „Célkitűzés” („Aim”), „Módszer” („Methods”), „Eredmények” („Results”) és „Következtetések” („Conclusions”) lényegre törő megfogalmazása történjék. A magyar és az angol összefoglalások terjedelme – külön-külön – ne haladja meg a 200 szót (kulcsszavak nélkül). A témához kapcsolódó, maximum 5 kulcsszót az összefoglalók oldalán, azokat követően kérjük feltüntetni magyar és angol nyelven. (4) A kéziratban előforduló, nem általánosan elfogadott *rövidítések*ről külön jegyzéket kell készíteni abc-sorrendben. (5) A szövegtörzs szerkezete világos és az olvasó számára átlátható legyen. Eredeti közlemények esetén a „Bevezető”-ben röviden meg kell jelölni a problémafelvetést, és az irodalmi hivatkozásokat a legújabb eredeti

közleményekre és összefoglalókra kell szűkíteni. A „Módszer” részben világosan és pontosan kell leírni azokat a módszereket, amelyek alapján a közölt eredmények születtek. Korábban közölt módszerek esetén csak a metodika alapelveit kell megjelölni, megfelelő irodalmi hivatkozással. Klinikai vizsgálatoknál a kéziratához csatolni kell az illetékes etikai bizottság állásfoglalását. Állatkísérletek esetén a Magyar Tudományos Akadémia – Egészségügyi Tudományos Tanács – állatkísérletekre vonatkozó etikai kódexe érvényes, melyre a metodikai részben utalni kell. A statisztikai módszerek és azok irodalmát is meg kell adni. Az „Eredmények” és a „Megbeszélés” részeket világosan kell megszerkeszteni. *Referáló közlemények* benyújtása esetén a szövegtörzs altémákra osztható, melyeket alcímek vezessenek be. *Összefoglaló referátumoknál* a szövegtörzs terjedelme ne haladja meg a 30 000 karaktert (szóközzel), *eredeti közleménynél* (klinikai, vagy kísérletes) ne haladja meg a 20 000 karaktert (szóközzel), *esetismertetésnél* ne haladja meg a 10 000 karaktert (szóközzel), *előadási összefoglaló* esetén pedig ne haladja meg a 8000 karaktert (szóközzel).

Irodalom: a hivatkozásokat (maximum 50, előadási összefoglalónál maximum 10) a szövegben való megjelenés sorrendjében tüntessék fel. A szövegben a hivatkozást a sorszáma jelöli.

Hivatkozás cikke: sorrendben: szerzők neve (6 szerző felett et al./és mtsai): cikk címe. folyóirat neve (Index Medicus szerint rövidítve) év; kötetszám:első-utolsó oldal. Példa: 1. Kelly PJ, Eisman JA, Sambrook PN: Interaction of genetic and environmental influences on peak bone density. Osteoporosis Int 1990; 1:56-60. *Hivatkozás könyvfejezetre,* sorrendben: a fejezet szerzői: a fejezet címe. In: szerkesztők (editors): a könyv címe. A kiadás helye, kiadó, megjelenés éve; fejezet első-utolsó oldala. Példa: 2. Delange FM, Ermans AM. Iodide deficiency. In: Braverman LE, Utiger RD, eds. Werner and Ingbar's the thyroid. 7th ed. Philadelphia, Lipincott-Raven, 1996; 296-316.

Ábrajegyzék: a megjelenés sorrendjében, arab számmal sorszámozva egymás alatt tartalmazza az ábra címét és alatta rövid és lényegre törő ábramagyarázatot

Táblázatok: külön-külön lapokon kérjük, címmel ellátva és arab számmal sorszámozva. Törekedjenek arra, hogy a táblázat könnyen áttekinthető legyen, ne tartalmazzon zavaróan sok adatot.

Ábrák: külön-külön lapokon kérjük. Csak reprodukálható minőségű ábrákat, fényképek küldését kérjük (min. 300 dpi felbontásban), a korábban megjelölt file formátumokban. A kézirat elfogadása esetén a nyomtatott ábrát kérjük beküldeni a szerkesztőségbe és az ábra hátoldalán puha ceruzával kérjük jelölni a szerző nevét, arab számmal az ábra sorszámtól és a vertikális irányt.

A formai hiányossággal beküldött kéziratokat nem tudjuk elfogadni. A gyors lektori és korrektúraforduló érdekében kérjük a legbiztosabb levelezési, illetve e-mail címet, telefon- és faxszámot megadni. Elfogadás esetén külön levélben kérjük jelezni, hogy a szerzők a közleménnyel egyetértenek (és ezt aláírásukkal igazolják), valamint lemondanak a folyóirat javára a kiadási jogról. Írásbeli engedélyt kérünk mellékelni a már közölt adat/ábra felhasználása, felismerhető személy ábrázolása, szerzőnek nem minősülő személy nevének említése/feltüntetése esetén. A szerkesztőség az általa felkért szakértők személyét titkossággal kezeli. A kézirat tulajdonjoga a megjelenésig a szerzőt illeti meg, a megjelenés napján tulajdonjoga a kiadóra száll. A megjelent kéziratok megőrzésére szerkesztőségünk nem tud vállalkozni.

A kéziratok benyújtását a következő címre várjuk:

Dr. Szelid Zsolt szerkesztőségi titkár
Semmelweis Egyetem, Kardiológiai Központ
1122 Budapest, Városmajor u. 68
Tel: (06-1) 458-6810
E-mail: orvoskepzes@kardio.sote.hu

Virtuális mikroszkópia alkalmazási lehetőségei a vastagbélbetegségek diagnosztikájában

Application of virtual microscopy in the diagnostics of colonic diseases

Molnár Béla

ÖSSZEFOGLALÁS A virtuális mikroszkópia egy a Semmelweis Egyetem II. Sz. Belgyógyászati Klinika, Sejtanalitika Laboratóriumában született eljárás, amely tárgylemez-digitalizáló rendszert, digitális tárgylemez és virtuális mikroszkóp programot foglal magában. A technika mára világszinten elfogadottá és sikeressé vált. Ez a módszer, mely kezdetben kutatási célra lett kifejlesztve, a digitális patológia alapja lett. Legfőbb felhasználási területei a rutin diagnosztika, a telekonzultáció és az oktatás. Az immunhisztokémiai kiértékelés, a fluoreszcens mikroszkópia, a 3 dimenziós szövettani rekonstrukció és a szöveti microarray elemzés alkalmazási területeken a virtuális mikroszkóp eredményesebben alkalmazható, mint a hagyományos optikai mikroszkóp. A digitálisan tárolt tárgylemez felhasználható in situ molekuláris biológiai adatok vizualizálására is. A virtuális mikroszkópia a diagnosztika mindennapos eszközévé válik.

KULCSSZAVAK virtuális mikroszkópia, digitális tárgylemez, tárgylemez-digitalizáló rendszer

SUMMARY The virtual microscopy that was born in the Cell Analysis Laboratory of the 2nd Department of Internal Medicine, Semmelweis University includes a slide digitiser scanning system, the digital slide and the virtual microscope program. This technique achieved a world-wide acceptance and break-through. The method that was developed first for research purposes now became the basis of digital pathology. The routine diagnostics, the teleconsultation and the education are the major application fields. Immunohistochemical analysis, fluorescence microscopy, 3 dimensional histological reconstruction and tissue microarray analysis could be performed more efficiently with virtual than the conventional optical microscopy. The digital slide can be also used for the visualisation of in situ molecular biological information. The virtual microscope becomes an everyday tool in the routine morphological diagnostics.

KEY WORDS Virtual microscope, digital slide, digital slide scanner

Semmelweis Egyetem,
II. Sz. Belgyógyászati
Klinika

LEVELEZÉSI CÍM:

Dr. Molnár Béla
1088 Budapest
Szentkirályi u. 46.
E-mail: mb@bel2.sote.hu

Bevezetés

A virtuális mikroszkópiát az 1990-es évek második felében a Semmelweis Egyetem II. Sz. Belgyógyászati Klinikájának Sejtanalitika Laboratóriumában fejlesztették ki a gastrointestinalis biopsziás minták háromdimenziós vizualizációjára, mely aztán az elmúlt 10 évben a patológiában digitális paradigmaváltáshoz vezetett. A virtuális mikroszkópia kifejlesztését a világban mindenhol Magyarországhoz és a Semmelweis Egyetemi fejlesztő munkaközösséghez kötik.

Közleményünk célja ennek a kutatási és diagnosztikai eszköztárnak a bemutatása, alkalmazási területeinek összefoglalása, illetve ennek a módszernek, valamint molekuláris patológiai kapcsolódási pontjainak ismertetése.

Előzmények

Az 1990-es évek közepére a komputeres tárolási, képrögzítési lehetőségeinek bővülésével lehetővé vált a mikroszkópos információ digitális tárolása. Ezzel párhuzamosan a mikroszkópra illeszthető kamerák képalkotási minősége és sebessége is elérte azt a szintet, amely már a patológusok magas igényeinek is megfelelt.

Az egyre növekvő vizsgálati mintaszám és vizsgálati területek (cervixrák szűrése) szükségessé tették az automatikus mikroszkópos rendszerek kifejlesztését. Erre a célra motorizált mikroszkópok (X/Y/Z irányú mozgás, objektívsere, motorizált megvilágításváltás), illetve speciális tárgylemez-adagoló és azonosító rendszerek kerültek kifejlesztésre.

Ezen rendszerek munka- és alkalmazási folyamatainak középpontjában azonban egyértelműen csak az adott mikroszkópos látómező állt. Ez az alapelv megakadályozta, hogy komplex szöveti és sejtstruktúrákat (kis nagyítás), il-

A szerző 2009-ben Jendrassik-díjban részesült.

letve ezzel párhuzamosan magstruktúrákat (nagy nagyítás) is vizsgálni tudjanak. Ezért ezek a fejlesztések nem értek el átütő sikereket, és az erre alapozott termékek (PAPNET, TRIPATH) nem kerültek általános bevezetésre.

A közlemény szerzője, akkor még fiatal kutatóként felismerte, hogy egy köztes munkafolyamat, a digitálás, tárgylemezen végzett virtuális mikroszkópia beiktatásával ezek a problémák kiküszöbölhetők. Digitális tárgylemez azonban akkor még nem létezett, ugyanúgy, ahogy a digitális tárgylemez előállítására és vizualizációjára alkalmas eszközök sem voltak elérhetőek.

A virtuális mikroszkópia eszközei

Tárgylemez –digitalizáló rendszer

A tárgylemez-digitalizáló rendszerek legfőbb jellemzői a nagy képfelbontás mellett ($0,2 \mu\text{m}/\text{pixel}$) történő nagy sebességű ($1 \text{ cm}^2/\text{perc}$) fókuszált digitalizálás. Ehhez mikroszkópos optikai komponensek mellett újonnan kifejlesztett mechanikai és elektronikai elemek voltak szükségesek.

A digitalizáló rendszerek egyik fő eleme a tárgylemez-adagoló rendszer, amely 1–300 tárgylemez automatikus be-, illetve kiadagolását teszik lehetővé. A tárgylemez beadagolásakor szükséges a tárgylemez azonosítása a ráhelyezett vonalkód vagy kézi írás kiértékelése alapján.

A nagyfelbontású digitalizálás előtt a tárgylemez mintát tartalmazó részeinek elővizsgálata (region of interest, ROI) történik meg egy kifelbontású képalkotó rendszer segítségével. Ez lehetővé teszi a digitalizálandó terület méretének és helyének pontos meghatározását.



1. ábra

Mirax scan tárgylemez digitalizáló

A nagyfelbontású digitalizálás folyamata során elsődleges az éles képet adó fókuszszík pontos azonosítása, amire képfeldolgozás vagy metrikus eszközök szolgálhatnak megoldásul. Ehhez a tárgylemez Z irányú mozgatása is szükséges. Ezek után megtörténhet a tárgylemez nagy sebességű, nagy felbontású digitalizálása, azaz a digitális tárgylemez előállítás.

Digitális tárgylemez

A digitális tárgylemez elsődlegesen tartalmazza a tárgylemez-azonosító adatokat (vonalkód, kézi jelölés), a biológiai minta nagyfelbontású digitális mását. Figyelembe véve a digitális média sokfajta alkalmazhatósági lehetőségét, a digitális tárgylemez több fókuszszíkot, több nagyítási változatot, megvilágítási formát (fluoreszcens csatornák) tartalmazhat. A digitális tárgylemezre elhelyezhető kézi feljegyzés és a képfeldolgozási algoritmusok eredményei, számszerűen, illetve képszerűen.

A digitális tárgylemez másolható, sokszorosítható és komputeres hálózatokon is elérhető. Az elérhetőség, illetve a hozzáférés dokumentálható. A digitális tárgylemez mérete néhány megabyte-tól gigabyte-os méretig terjedhet.

Virtuális mikroszkóp

A virtuális mikroszkóp fedi az optikai mikroszkóp funkcióit, de annál lényegesen többet is tud. A virtuális mikroszkópban tárgylemezválasztás, az X/Y irányú mozgás, nagyítás, kicsinyítés, több fókuszszík felvétele esetén Z irányú mozgás lehetséges. A különböző megvilágítások alkalmazása is lehetséges, amennyiben a tárgylemez ennek megfelelően volt digitalizálva.

A virtuális mikroszkóp azonban ennél is többet tud: a digitális tárgylemezre lehetséges leírások, megjelölések felhelyezése. A virtuális mikroszkóp alkalmazható hálózatból, amikor egy szerveren elhelyezett digitális tárgylemezhez akár interneten keresztül is hozzáférhetünk. A virtuális mikroszkópban alkalmazhatóak mérési eszközök is, amelyekkel morfológiai és denzitometriai elváltozások is kvantifikálhatóak.

A virtuális mikroszkóp képes lehet több, ugyanabból az esetből vagy más referenciaesetből származó tárgylemez párhuzamos vizualizálására.

A virtuális mikroszkóp támogatja az orientációt, mivel a vizsgáló aktuális nézeti koordinátái a tárgylemezre, mintára vonatkoztatva a képernyőn bemutatathatók.

Szoftver-alkalmazások a patológia egyes munkafolyamatainak támogatására

A virtuális mikroszkópia validált nemzetközi tanulmányok alapján alkalmazhatónak tűnik rutin diagnosztikai, sebészeti friss fagyasztott minták diagnosztikája mellett egyéb területeken is mint az oktatás, az immunhisztokémiái minták vizsgálata, FISH analízis, szkennelő fluoreszcens mikroszkópia, háromdimenziós szövettani rekonstrukció, szöveti microarray elemzés (TMA).

A virtuális mikroszkópia gyakorlati alkalmazásai

Diagnosztika

A rutin hisztológiai intézetek napi tárgylemez digitalizálási igénye nagyon különböző: a kis laboratóriumok esetén 100–200, míg a közepes európai, akadémiai laboratóriumok esetén 500–1000 tárgylemez/nap. A nagy vezető intézetek mintaszáma Európában és az Egyesült Államokban 3000–4000 tárgylemez/nap. Ennek a digitalizálási mennyiségnek a kiszolgálására több fajta tárgylemezszkennert fejlesztettünk ki (www.3dhistech.com). Teljesen digitalizált laboratóriumok jelenleg a középső szegmensben vannak. A teljes munkafolyamat digitalizálásához speciális adatbázis-kezelő szoftvereket, szervertalkalmazásokat (www.pathonet.com) és riportoló szoftverrendszereket kellett kifejleszteni.

Sebészeti friss fagyasztott minták diagnosztikája

A sebészeti beavatkozásokat kísérő friss fagyasztott metszetek diagnosztikája eddig is különleges felszerelést (cryostat) igényelt. A minták feldolgozása sok esetben a műtőben elhelyezett metszetelőkészítő készülékkel történt. Virtuális mikroszkópia segítségével, a patológus telekonzultációs formában tudja a mintát kiértékelni. Ehhez 1 tárgylemez scanner készülék, scanner/server PC és telekonzultációs virtuális mikroszkóp szükséges.

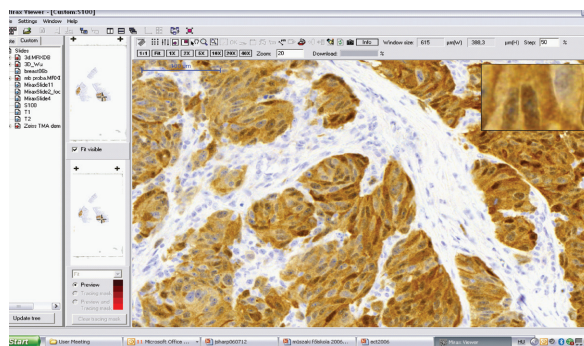
Oktatás

A virtuális mikroszkópia első átütő sikerét az oktatásban érte el. Az anatómiai, patológiai metszeteket így nem kell minden egyes hallgató részére elkészíteni. Az év során megfigyelhető törés, fogyás elmarad. Az oktatótermi anyag interneten is elérhetővé vált. A digitális tárgylemezen elhelyezett jelölések, dokumentációs megjegyzések minden hallgató számára elérhetővé váltak. Az oktatótermekben mikroszkóp helyett személyi számítógépen futó virtuális mikroszkóp-programok segítségével a hallgatók a konzultáció folyamatába aktívan bekapcsolódhatnak.

A hisztológiai oktatás végső állomása a vizsgáztatás is támogatható speciális, a virtuális mikroszkópiát és digitális tárgylemezt tartalmazó vizsgáztató programokkal.

Immunhisztokémiai minták vizsgálata

Az immunhisztokémiai minták vizsgálatát a virtuális mikroszkóp három aspektusból különösen hatékonyan tudja támogatni: 1. a minták festése nem halványul, ha azok digitálisan vannak rögzítve; 2. az egy esetből származó, különböző módon festett minták egyszerre vizualizálhatók a virtuális mikroszkópban; 3. a különböző festési módszerek (sejtmag, citoplazma, membrán) szemikvantifikálása is megoldható speciális algoritmusok segítségével. A közeljövőben olyan komplex diagnosztikai eljárások kifejlesztése várható, ahol a mintákon levő immunfestés referencia minták, standardizált protokollok, integrált festő, fedő, szkennelő automaták segítségével kvantifikálható lesz.



2. ábra

Virtuális mikroszkóp felhasználói felülete: immunhisztokémiai minta bemutatása

FISH (fluoreszcens in situ hybridisatio) analízis

A digitális tárgylemezeken történő FISH kiértékelés a genetikai vizsgálatok új lehetősége. A digitális FISH segítségével a szöveti minták párhuzamos IH analízise vizualizálható. A hagyományos mikroszkópokon eddig alkalmazott módszer technikai hibáinak kiküszöbölése lehetővé válik több fókuszírók felvételével és egy fókuszíróban történő vizualizálásával.

Szkennelő fluoreszcens mikroszkópia

A virtuális mikroszkópia kvantitatív mérőeszközként történő alkalmazását az úgynevezett scanning fluoreszcens mikroszkópia (SFM) bizonyította be. Ha az optikai utat, a digitalizáló rendszert sikerül referencia tárgylemezek segítségével kalibrálnunk, a látómező megvilágítást homogenizálnunk az átáramoltatásos és a laser scanning cytometriához hasonló eszköz állhat rendelkezésünkre. Amennyiben a sejtenként mért fluoreszcens jeleket referencia populációhoz hasonlítjuk, akkor a módszer alkalmas lehet kvantitatív DNS elemzésre is. A scanning fluoreszcens mikroszkópia szöveti metszeteken is alkalmazható, így létrejött a szöveti cytometria módszere.

Háromdimenziós szövettani rekonstrukció

A virtuális mikroszkópia speciális felhasználási lehetősége a sorozatmetszetek 3 dimenziós rekonstrukciója. Ennek a módszernek az alapja, hogy az 5 µm-es átlagos átmérőjű metszeteket automata tárgylemez-digitalizálóval egymás után digitalizáljuk, majd az így előállított mintákat speciális szoftverrel előbb 2 dimenzióban egymáshoz rendezzük, majd 3D-ben rekonstruáljuk. A 3 dimenziós modellben mérés is lehetséges.

Szöveti microarray analízis (TMA)

A szöveti microarray-k kiértékelése virtuális mikroszkópia nélkül ma már szinte elképzelhetetlen. A TMA lemezek optikai mikroszkópos kiértékelését a lokalizáción kívül a klinikai adatok hiánya is nehezítette. A virtuális

mikroszkópban mind a két fontos funkció elérhető: az egyes szöveti minták a virtuális mikroszkópon dokumentálhatók a minta feliratozásával és a hozzátartozó klinikai adatokkal. Ezenkívül az egyes mintához tartozó különböző festések egymás mellett vizualizálhatók. A szöveti minták kiértékelési eredményei („score”-olás) pedig visszairhatók a kiindulási TMA adatbázisba, akár hálózaton keresztül is.

Virtuális mikroszkópia és molekuláris patológiák alkalmazásai

A virtuális mikroszkópia segítségével lehetséges a már digitalizált minta további felhasználása olyan célokra is, amelyek a továbbiakban a minta fizikai megsemmisülésével járnak. A minta képe megmarad és összekapcsolható az újabb eredményekkel.

A lézer microdissectio során a szövettani metszet egy sejtjének, sejtcsoportjainak a szöveti környezetből történő

szelektív kiemelése lehetséges, majd RNS vagy DNS izolálást követően PCR, illetve DNS szekvenálás elvégzése válik lehetővé. Az adott sejtcsoportok esetén kapott eredmények digitális tárgylemezbe való visszafűzése lehetővé teszi a mikroszkópos és a szubmikroszkópos információ együttes tárolását és kiértékelését.

Diszkusszió

A digitális mikroszkópia a patológiai munkafolyamat sok területén bizonyított előnyösebb tulajdonságai révén már helyettesítette az optikai mikroszkópiát. A következő években ennek a folyamatnak a forradalmi megjelenését, elterjedését láthatjuk majd. A virtuális mikroszkópia megjelenik újabb, eddig nem alkalmazott területeken is, mint a konfokális mikroszkópia és a spektrális kiértékelő rendszerek. Az új generációs nagy sebességű digitalizátorokkal a teljes rutin patológiai folyamat átállítása is meg fog történni.

Irodalom

1. Varga VS, Ficsor L, Kamarás V, Jónás V, Virág T, Tulassay Z et al. Automated Multichannel Fluorescent Whole Slide Imaging and its Application for Cytometry. *Cytometry A*, 2009, Megjelenés alatt
2. Molnar B, Bercei L, Diczházy C, Varga VS, Tagscherer A, Szende B et al. Digital slide and virtual microscopy based routine and telepathology evaluation of routine gastrointestinal biopsy specimen. *J Clin Pathol* 2003; 56:433-438.
3. Krenacs T, Zsakovics I, Diczhazi C, Ficsor L, Varga VS, Molnar B. The potential of digital microscopy in breast pathology. *Pathol Oncol Res* 2009; 15:55-58.
4. Stelkovic E, Korom I, Marczinovits I, Molnar J, Rasky K, Raso et al. Collagen XVII/BP180 protein expression in squamous cell carcinoma of the skin detected with novel monoclonal antibodies in archived tissues using tissue microarrays and digital microscopy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2008; 16:433-441.
5. Ficsor L, Varga VS, Tagscherer A, Tulassay Z, Molnar B. Automated classification of inflammation in colon histological sections. *Cytometry A* 2008; 73:230-237.
6. Papay J, Krenacs T, Moldvay J, Stelkovic E, Furak J, Molnar B et al. Immunophenotypic profiling of nonsmall cell lung cancer progression using the tissue microarray approach. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2007; 15:19-30.
7. Ficsor L, Varga V, Bercei L, Miheller P, Tagscherer A, Wu ML et al. Automated virtual microscopy of gastric biopsies. *Cytometry B* 2006; 70:423-431.
8. Ladanyi A, Sipos F, Szoke D, Galamb O, Molnar B, Tulassay Z. Laser microdissection in translational and clinical research. *Cytometry A* 2006; 69:947-960.
9. Bocsi J, Lenz D, Mittag A, Varga VS, Molnar B, Tulassay Z et al. Automated four-color analysis of leukocytes by scanning fluorescence microscopy using quantum dots. *Cytometry A* 2006; 69:131-134.
10. Wu ML, Varga VS, Kamaras V, Ficsor L, Tagscherer A, Tulassay Z, et al. Three-Dimensional Virtual Microscopy of Colorectal Biopsies. *Arch Pathol Lab Med* 2005; 129: 507-510.
11. Bocsi J, Varga VS, Molnar B, Sipos F, Tulassay Z, Tarnok A. Scanning fluorescent microscopy analysis is applicable for absolute and relative cell frequency determinations. *Cytometry A* 2004; 61:1-8.
12. Varga VS, Bocsi J, Sipos F, Csendes G, Tulassay Z, Molnar B. Scanning fluorescent microscopy is an alternative for quantitative fluorescent cell analysis. *Cytometry A* 2004; 60:53-62.
13. Bocsi J, Luther E, Mittag A, Jensen I, Sack U, Lenz D et al. Clinical and laboratory applications of slide-based cytometry with the LSC, SFM, and the iCYTE imaging cytometer instruments. *Optical Biopsy V, SPIE* 2004; 5328:30-40.
14. Gombas P, Skepper JN, Krenacs T, Molnar B, Hegyi L. A digitális patológia múltja, jelene és jövője. *Orv Hetil* 2004; 145:433-443.
15. Molnar B, Bercei L, Ficsor L, Varga V, Tagscherer A, Tulassay Z. Digital slide and virtual microscopy-based routine and telepathology evaluation of gastrointestinal biopsy specimen. In: Kumar S, Dunn BE (editors). *Telepathology*. Heidelberg, Springer Verlag, Chapter 2, Megjelenés alatt
16. Ficsor L, Molnar B. Automated disease classification of colon and gastric histological samples based on digital microscopy and advanced image analysis. In: Hayat MA (editor). *Methods of cancer diagnosis, therapy and prognosis*. Springer Verlag, Heidelberg, Megjelenés alatt
17. Bocsi J, Molnar B, Mittag A, Lenz D. Isolierung disseminierter Tumorzellen. In: U. Sack, A. Tarnok, G. Rothe (editors). *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. Basel, Karger, 2007; 1047-1059.
18. Molnar B, Papik K, Tagscherer A, Csendes G, Varga VS, Tulassay Z et al. Three-dimensional reconstruction and analysis of gastric malignancies by electric slides of consecutive sections and virtual microscopy. In: *Three-Dimensional and Multidimensional Microscopy, SPIE* 1999; 3605:190-199.

TRESK: egy kalcineurin által szabályozott háttér K^+ -csatorna vizsgálata

Investigation of TRESK: a calcineurin-regulated background K^+ channel

Czirják Gábor
Enyedi Péter

ÖSSZEFOGLALÁS *Bevezetés:* A háttér K^+ -csatornák számos sejttypusban döntően meghatározzák a nyugalmi membránpotenciál értékét. A közelmúltban molekuláris szinten azonosították a háttér K^+ -csatornák kialakításáért felelős fehérjéket, a két pórusdoménnal rendelkező (K2P) csatorna alegységeket.

Célkitűzés: Észrevettük, hogy az egyéb háttér K^+ -csatornáktól eltérően, a TRESK (TWIK-related spinal cord K^+ channel) árama a citoplazma kalciumjel hatására mintegy hétszeresére aktiválódik. Mivel a kalciumjel általában a celluláris élettani/kórélettani folyamatok lényegét érinti, szeretnénk volna megérteni, hogy a TRESK kalciumfüggő szabályozása hogyan történik.

Módszer: A *Xenopus laevis* (afrikai karmosbéka) petesejtben kifejezett TRESK áramát kételektrodos feszültség clamp eljárással mértük. Gátlószerek hatását vizsgáltuk, a csatorna szerkezetét módosítottuk vagy különböző fehérjék cDNS-ét klónoztuk, és koexpresszáltuk a csatornával. A csatorna egyes részleteit rekombináns technológiával előállítottuk, és biokémiai kölcsönhatásait elemeztük. *Eredmények:* Azonosítottunk két fehérjét, melyek közvetlenül kapcsolódnak a TRESK csatornához. A kalcineurin nevű kalciumaktivált protein-foszfataz a csatorna egy speciális motívumához köt, és a csatorna defoszforilációja felelős a TRESK áram nagymértékű aktivációjáért. A másik azonosított partner, a 14-3-3 adapter fehérje kihorgonyozódása módosítja a kalciumfüggő szabályozás kinetikáját.

Következtetések: Összefüggést találtunk az orvosi szempontból nagy jelentőséggel bíró kalcineurin és a nagyon kevésbé ismert funkciójú TRESK csatorna szabályozása között. Felmerül a TRESK csatorna szerepe a kiterjedten alkalmazott kalcineurin inhibitorok okozta fájdalom patomechanizmusában.

KULCSSZAVAK TRESK, KCNK18, NFAT, 14-3-3, ciklosporin

SUMMARY *Introduction:* The resting membrane potential of several cell types is primarily determined by background K^+ channels. Recently, two-pore domain K^+ channel subunits were found to constitute background K^+ channels.

Aim: We observed that, unlike any other background K^+ channel, TRESK (TWIK-related spinal cord K^+ channel) was activated about 7-fold by the cytoplasmic calcium signal. Since the calcium signal generally influences important physiological and pathophysiological processes, we decided to elucidate the mechanism of calcium-dependent regulation of TRESK.

Methods: TRESK current, expressed in *Xenopus laevis* oocytes, was measured by two-electrode voltage clamp. Inhibitors were tested, the channel structure was modified, or the cDNA of different proteins was coexpressed with the channel. The biochemical interactions of recombinant channel fragments were analyzed. *Results:* We identified two proteins directly binding to TRESK. The calcium-dependent protein phosphatase, calcineurin, is anchored to a dedicated region of the channel and dephosphorylation is responsible for the substantial activation. The docking of the other identified partner, 14-3-3 adaptor protein, modifies the kinetics of calcium-dependent activation.

Conclusions: We found interaction between calcineurin, a protein with prominent medical importance, and the less well-known K2P channel, TRESK. TRESK may be involved in the pathomechanism of pain induced by the widely used calcineurin inhibitors.

KEY WORDS TRESK, KCNK18, NFAT, 14-3-3, cyclosporin

Semmelweis Egyetem,
Élettani Intézet

LEVELEZÉSI CÍM:

Dr. Czirják Gábor
1444 Budapest, Pf. 259.
e-mail: czirjak@eok.sote.hu

TÁMOGATÁSOK

A munkát támogatta a Semmelweis Egyetem Semmelweis Kutatási Támogatással és az Országos Tudományos Kutatási Alap (OTKA K75239 és F-67743). Czirják Gábor emellett a Magyar Tudományos Akadémia Bolyai János ösztöndíjasa volt a kutatási időszakban.

Rövidítések

K2P csatorna: két pórusdoménnal rendelkező K^+ csatorna
NFAT: Nuclear Factor of Activated T cells
TRESK: Twik-RElated Spinal cord K^+ channel
TWIK: Tandem of pore domains in a Weakly Inwardly rectifying K^+ channel

Bevezetés

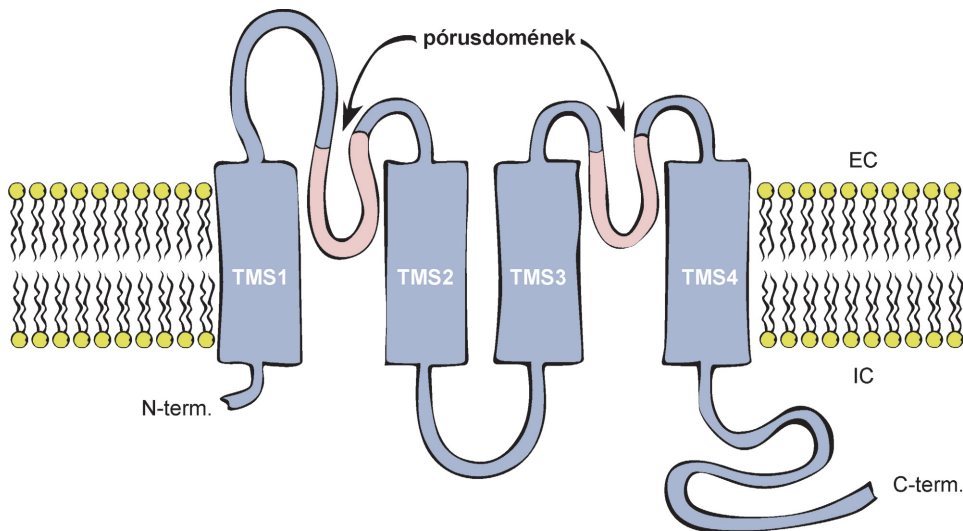
K^+ csatornák majdnem minden sejttypusban kifejeződnek, és kiemelt jelentőségűek a sejt elektromos aktivitásában. Emberben több mint 70 gén terméke határoz meg K^+ -csatorna-alegységet. Ha tekintetbe vesszük az alternatív RNS-szabdalást (splicing) és azt, hogy K^+ -csatornák több különböző alegységből is összeállhatnak, akkor fehérjeszinten ennél lényegesen többféle, számottevően különböző csatorna adódik. Az ioncsatornák között a K^+ -csatornák szupercsaládjára a legnépesebb. Fiziológiai körülmények között e csatornák mindegyikén K^+ jut ki a sejtől, ezáltal a membránpotenciál negatívabbá válik, a sejt hiperpolarizálódik. A csatornák változatosságának jelentősége elsősorban abból adódik, hogy ez milyen körülmények között, minek a hatására következik be. Szokás a csatornákat nagyobb funkcionális csoportokba osztani aszerint, hogy a membránpotenciál hogyan befolyásolja a működésüket.

A feszültségfüggő K^+ -csatornák a nyugalmi membránpotenciálnál pozitívabb értékek esetén nyitnak, ezért szerepük legtöbbször a már ingerelt, depolarizált sejtekre korlátozódik, elősegítik a nyugalmi állapotba való visszatérést. [Ilyen pl. a KvLQT (KCNQ) csatorna a szívben, mely a kamrai akciós potenciál repolarizációs fázisában szerepel, és melynek mutációja „long QT szindrómát” okozhat, végzetes ritmuszavarhoz vezethet.] A kalciumaktivált K^+ -csatornák is elsősorban ingerelt sejtekben (magas citoplazma-kalcium esetén) aktiválódnak, és fehérjeszerkezetüket tekintve és funkcionálisan is (több típusuk egyben feszültségfüggést is mutat) a feszültségfüggő K^+ -csatornákra hasonlítanak. A befelé egyenirányító (rektifikáló)

K^+ -csatornáknak nevezett csoport tagjai főként a nyugalmi membránpotenciál környékén eresztenek át (fiziológiai körülmények között kifelé), ennél pozitívabb membránpotenciál-értékek esetén viszont nem. Emiatt a befelé rektifikáló K^+ -csatornák a nyugalmi membránpotenciált stabilizálják, ha viszont a membránpotenciál a nyugalmi értékről pozitív irányba elmozdult az ingerelt sejtben, akkor ilyenkor már nem szólnak bele annak alakulásába. [Pl. ilyen befelé rektifikáló csatorna (KIR6.2) alkotja a szulfonilurea-receptorral együtt a pancreas β -sejtben az ATP-szenzitív K^+ -csatornát, mely számos orális antidiabetikum célpontja.]

Goldman, Hodgkin és Katz már az 1940-es években, a K^+ -csatorna-forgalom bölcsőjénél megsejtette, hogy léteznek olyan K^+ -csatornák is, melyek a membránpotenciál változásaitól függetlenül nyitva tartanak. Sőt, e csatornák működésének alapelveit is megjósolták a konstans tér elmélet formájában (1, 2). E háttér (csurgó, leak) K^+ -csatornák létezését különböző sejtekben később sokan elektrofiziológiai módszerekkel kísérletesen igazolták vagy igazolni vélték, de az áramok nehéz elkülöníthetősége miatt az eredmények nem nyertek általános elfogadást. A háttér K^+ -csatornák létezését megingathatatlanul bizonyító csatornafehérje-azonosítására egy fél évszázadot kellett várni.

A feszültségfüggő, kalciumaktivált és befelé rektifikáló K^+ -csatornák molekuláris élettanáról már elmélyült ismeretekkel rendelkezünk, mikor végül 1996 és 2003 között gyors egymásutánban megismertük a 15-féle humán két pórusdoménal rendelkező (K2P) K^+ -csatorna alegységet (1. ábra), a háttér káliumáram molekuláris alapját.



1. ábra

A K2P csatorna alegység sematikus transzmembrán topológiája. A K2P csatorna alegységek négy transzmembrán szegmenst (TMS1-4) tartalmaznak, és az első és második, illetve harmadik és negyedik TMS között található egy-egy K^+ csatorna pórusdomén (P). Ezt a 4TMS/2P elrendezést tükrözi a család elnevezése, hiszen az egyéb K^+ csatorna családokban alegységenként csak egy pórusdomén található. (A feszültségfüggő K^+ csatornákra a 6TMS/1P, míg a befelé rektifikálókra a 2TMS/1P szerkezet jellemző.) A 4TMS/2P alegység struktúra egyben arra is utal, hogy az egyéb K^+ csatornáktól eltérően a K2P család tagjai dimer formájában képeznek funkcionális csatornát. (A baktériumoktól kezdve, a teljes növény- és állatvilágot is beleértve az emberig az ismert K^+ csatornák transzmembrán pórusát mindig négy erősen konzervált pórusdomén alkotja. Ennek megfelelően az egy pórusdoménnal rendelkező alegységek tetramer formájában működnek.) (EC: extracelluláris tér, IC: intracelluláris tér, N-term.: N-terminális, C-term.: C-terminális)

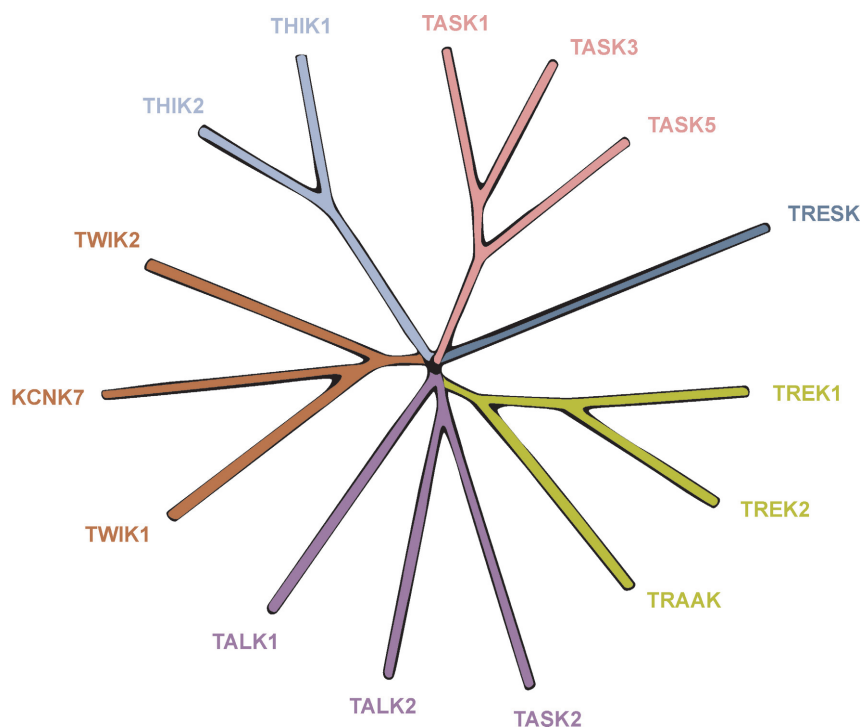
Azok a K2P-alegységek, amelyeket sikerült működőképesen kifejezni, olyan csatornákat hoztak létre, melyek aktivitása nem vagy csak kevésbé függött a membránpotenciál értékétől. A háttér K⁺-csatornák emiatt képesek a nyugalmi membránpotenciált stabilizálni, egyúttal az ingerelt sejt pozitívabb membránpotenciáljának a nyugalmi állapotba való visszatérését is serkenteni. A különböző K2P csatornák funkcionális vizsgálata megmutatta, hogy az új K⁺-csatorna család tagjai hasonló szerkezeti alapelemek ellenére nagyon változatosak. A membránpotenciál ugyan nem befolyásolja számottevően aktivitásukat, azonban meglepően sokféle egyéb módon szabályozódnak. Különböző fizikokémiai paraméterek (pl. intra- vagy extracelluláris pH, plazmamembrán feszülés vagy hőmérséklet), az élettani körülmények között fontos tartományokban, drámai módon befolyásolják egyes háttér K⁺-csatornák aktivitását, míg másokét lényegében nem. Hasonlóan változatos a háttér K⁺-csatornák szabályozása intracelluláris jelátviteli utak által.

A 15 K2P csatorna alegységet aminosav-szekvencia (és az ezt elég jól követő funkcionális) hasonlóság alapján hat alcsoaldba sorolták (2. ábra): TWIK (*Tandem of pore domains in a Weakly Inwardly rectifying K⁺ channel*), TREK (*Twik-RElated K⁺ channel*), TASK (*Twik-related Acid Sensitive K⁺ channel*), TALK (*Twik-related ALkaline pH-activated K⁺ channel*), THIK (*Twik-related Halothane-Inhibited K⁺ channel*) és TRESK (*Twik-RElated Spinal cord K⁺ channel*). Bár a felfedezésük óta csak néhány év telt el, az intenzív kutatásnak köszönhetően egyre jobban megértjük a csatornák élettani jelentőségét, és néhány orvosi vonatkozásra is fény derült.

A háttér K⁺-csatornák a párolgó folyadék anesztetikumok meghatározó farmakológiai célpontjai (3). Például az anesztéziában kiterjedten használt halothan, iso-

fluran és sevofluran vagy a ma már csak történeti jelentőséggel bíró éter és kloroform egyaránt hatékonyan (megfelelő körülmények között többszörösére) aktiválja a TREK1 és TREK2 csatornák áramát a gyógyításban használatos koncentrációban. (Emellett a halothan és isofluran szintén aktiválja a TASK1 és TASK3 csatornákat, és a rendkívül érzékeny TRESK pedig már a használt koncentráció tartomány alatt is kifejezetten aktiválódik.) Mivel a TREK és TASK csatornák kiterjedten kifejeződnek a központi idegrendszerben, az idegsejtekben, aktivációjuk az idegsejtek ingerlékenységét csökkenti, és ezzel járulnak hozzá az anesztéziára jellemző hatások kifejlődéséhez. Mivel régebben a GABA_A kloridcsatorna serkentésével magyarázták elsősorban az altatószerek hatását, felmerült a kérdés, hogy a K2P csatornák kifejtett hatás arányában mennyire fontos. A TREK1 génirtott egér (melyből nem is az összes halothane-aktivált K2P csatorna hiányzott, hanem csak egyféle) csökkent érzékenységet mutatott a halothan-anesztéziával szemben, az altatásához jóval nagyobb koncentrációra volt szükség, mint a vad típusú egereknél (4). Ez (és számos további eredmény) arra utal, hogy a K2P csatornák kifejtett hatás az anesztézia lényeges komponense.

Az SSRI (szerotonin-újrafelvételt szelektíven gátló) antidepresszánsok (pl. fluoxetin, norfluoxetin, paroxetin) a szerotonintranszporterek mellett gátolják a TREK1 és TREK2 csatornákat is (5, 6). Érdekes módon ezzel egybehangzóan a TREK1 génirtott egerek rezisztenciája (6 különböző erre elfogadott teszttel mérve) fokozódott depressziót kiváltó hatásokkal szemben. Ezek a mutáns állatok hasonló teszteredményeket produkáltak, mint az SSRI-kezelt vad típusú társaik. Azt is kimutatták, hogy a mutáns állatokban a szerotoning rendszer fokozottan működik azokon a területeken, melyek emberben az érzel-



2. ábra

Az emberi K2P csatorna alegységek filogenetikai fája. A dendrogramon a nagyobb aminosav-szekvencia hasonlóságot mutató alegységek egymáshoz közelebbi ágakon találhatóak, ami egyben utal ezek későbbi evolúciós szétválására. A hat K2P csatorna alcsoaldot különböző színekkel jelöltük.

(A KCNK7 alegység a TWIK, a TASK-2 alegység a TALK és a TRAAK alegység a TREK alcsoaldba tartozik.)

mi élet szervezéséért és kóros állapotban a depresszió kialakulásáért felelősek. Mindezek az eredmények az sugallják, hogy a TREK csatornák farmakológias gátlása jó hatású lehet egyes pszichiátriai kórképekben. A TREK1 és TREK2 csatornákról emellett kimutatták azt is, hogy fontos szerepet játszanak az arachidonsav és egyéb többszörösen telítetlen zsírsavak által létrehozott neuroprotekción. Ezek a zsírsavak ugyanis erőteljesen aktiválják a csatornákat, ami csökkenti az őket kifejező idegsejtek ingerlékenységét, és ezáltal fokozza ellenálló képességüket az ischaemiával szemben. Emellett egyes agyat ellátó artériákban, pl. az arteria basilaris területén, az érfal simaizomban is megtalálhatók ezek a csatornák, ahol az aktivációjuk vazodilatációt és javuló vérátáramlást eredményez (7).

Míg a kiterjedten, nagy mennyiségben expresszáló TREK és TASK csatornák jelentőségét mára több száz közlemény igazolja, a többi K²P csatornáról az ismereteink még mindig kezdetlegesnek mondhatók. Ezeknek a csatornáknak a kifejeződése általában csak néhány szövetre korlátozódik, gyakran kisebb mennyiségben és egyéb háttér K⁺-csatornákkal együtt. Ezért nehezebben vizsgálhatók izolált sejtekben. Ez jellemző az általunk vizsgált TRESK csatornára is, melyet elsőként humán gerincvelőből klónoztak 2003-ban (8). A gerincvelőben azonban aránylag alacsony az expressziója [csakúgy, mint az egér cerebellumban, ahonnan mi klónoztuk (9)]. Jelenleg úgy tűnik, hogy a TRESK csatorna fő előfordulási helye a hátsó gyöki és agytörzsi érző ganglionok, illetve az ezekben található pseudounipoláris érző neuronok (10-12). Ez a lokalizáció arra utal, hogy a csatorna funkciója az érző működésekkel lehet kapcsolatos.

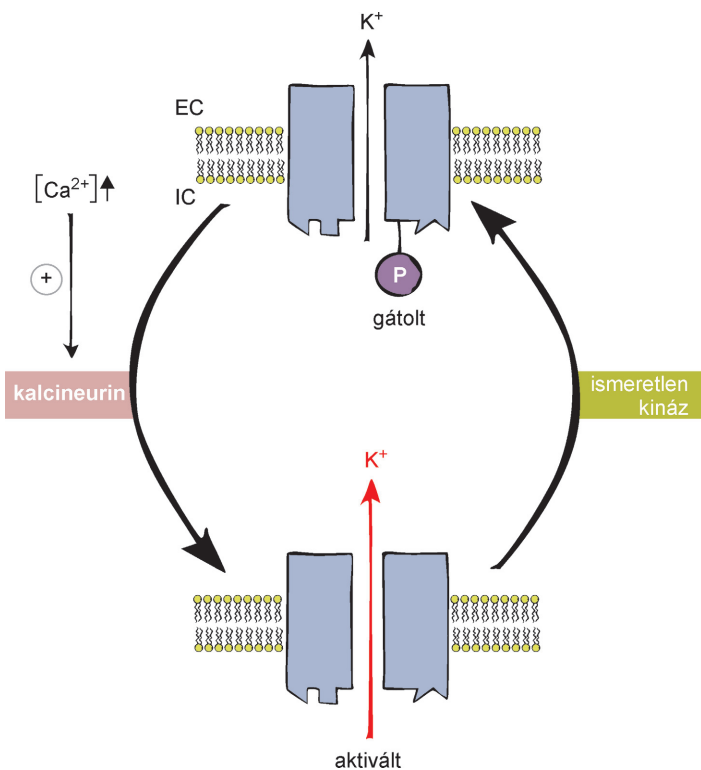
Elsőként írtuk le, hogy a TRESK a citoplazma kalciumkoncentrációjának emelkedésére nagymértékben aktiválódik (9). Ez kivételes a K²P csatorna családban, tekintettel arra, hogy a többi csatornát nem befolyásolja a kalciumjel, esetleg a kalciummobilizáló, G_q fehérjéhez kapcsolódó receptorok ingerlése kalciumtól függetlenül módon gátolja őket (13). Kíváncsiak voltunk, hogyan történik ez a különleges szabályozás a molekuláris szinten, hátha a szabályozás mechanizmusának megértése támpontot ad a rejtélyes csatorna szerepével kapcsolatban is.

Módszerek

Az alkalmazott eljárások, kísérletek, a használt reagensek és statisztikai módszerek részletes leírása az irodalomjegyzékben jelzett angol nyelvű közleményekben található meg (9, 14, 15). Az állatkísérleteket az MTA-ETT etikai kódex szabályainak megfelelően végeztük.

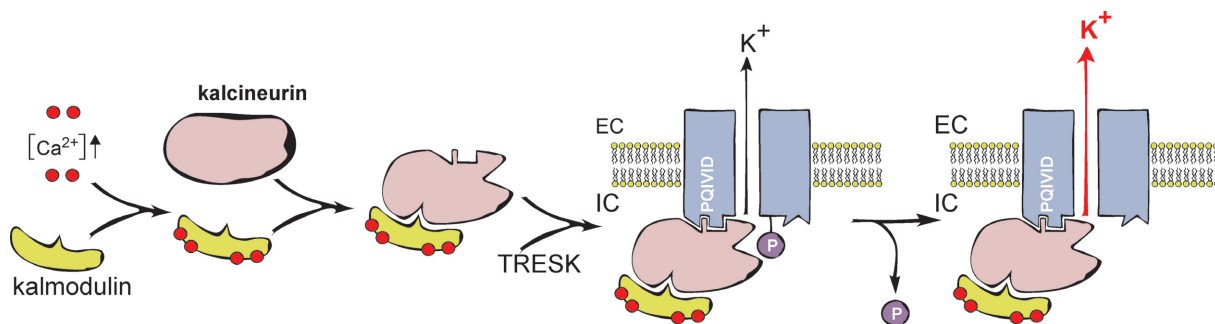
Eredmények

Mivel a megelőző években a TASK1 és TASK3 csatornák kalciummobilizáló hormonreceptorok ingerlésére létrejövő gátlásának mechanizmusát tanulmányoztuk (13, 16-18), a beállított kísérleti rendszer birtokában, azonnal megvizsgáltuk, hogyan hat ezen receptorok ingerlése az újonnan megklónozott TRESK csatornákra. Meglepetésünkre a TRESK-kel *Xenopus* oocytában koexpresszált AT_{1a} angiotenzin-receptor, vagy M₁ muszkarinos acetilkolin-receptor ingerlése egyaránt több mint ötszörösére fokozta a sejtekben a K⁺-áramot (9). Feltettük a kérdést,



3. ábra

A TRESK csatorna aktivitását a calcineurin szabályozza. A TRESK (kék) alaphelyzetben foszforilált, gátolt állapotban van. A kalciumjel következtében aktiválódik a calcineurin-foszfátáz, defoszforilálja a csatornát, melynek árama ettől többszörösére fokozódik. (A sematikus ábrán csak egy foszfátcsoportot tüntettünk fel.)



4. ábra

A NFAT-szerű (PQVID) motívum szerepe a TRESK aktivációban. A kalcium/kalmodulin/kalcineurin komplex az enzimatisusan aktív régiójától eltérő felületével kihorgonyozódik a TRESK PQVID motívumához. Ezt követően a csatornát a kalcineurin defoszforilálja, és a K⁺ áram fokozódik.

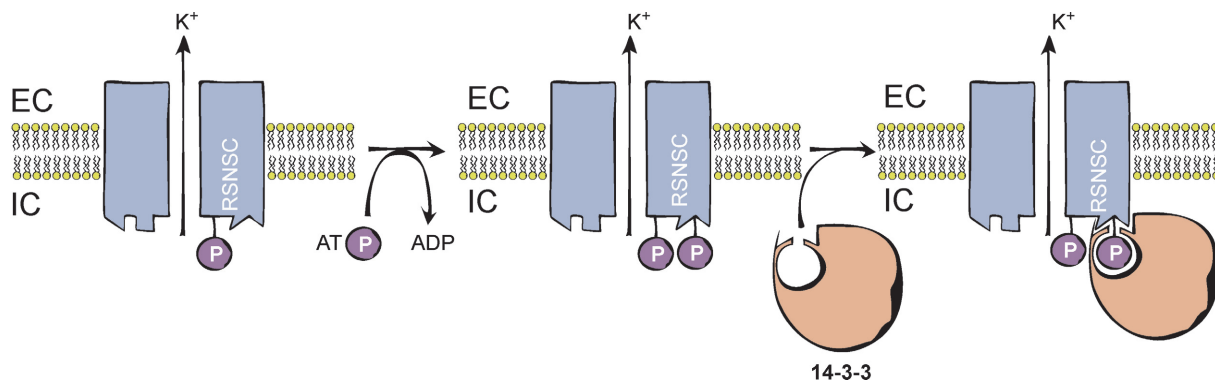
hogy a G_q fehérjéhez kapcsolt receptorok jelátvitelének melyik lépése felelős a TRESK szabályozásáért [hiszen tudtuk, hogy a TASK csatornáknál ugyanez a kérdés egyáltalán nem triviális, és a receptorok által aktivált közismert diacilglicerín- (DAG-), illetve inozitol-1,4,5-trisz-foszfát- (IP₃-)függő jelátviteli utak nem (tehát így a kalcium szignál sem) szerepelnek a folyamatban]. A TASK csatornák szabályozásától eltérően, a TRESK-et azonban minden olyan kísérleti beavatkozás aktiválta, mely a citoplazma kalciumkoncentrációját emelte. Így aztán felfedeztünk egy kalciumaktivált K₂P csatornát (9).

A régóta ismert, klasszikus kalciumaktivált K⁺-csatornát az ion közvetlenül a csatornafehérje-komplexhez kötődve aktiválja (19, 20). A TRESK fehérjeszerkezetét tekintve azonban nagyon távol esik ezektől, és ennek megfelelően a kalcium egészen más mechanizmussal szabályozza. Ha egyetlen TRESK csatornát izoláltunk egy sejt-ből kivágott plazmamembrán foltban (excised patch), és ennek a kb. 1 pikoamperes áramát regisztráltuk (ún. single channel mérést végeztünk), akkor a membrán eredeti citoplazmatikus oldalán a kalciumkoncentráció változása egyáltalán nem befolyásolta a TRESK aktivitást. Ebből

következett, hogy a kalcium nem közvetlenül hat a csatornára, hanem hatásához szükség van a citoplazmából valamilyen közvetítő tényezőre, mely a „single channel” rendszerben már nem volt jelen.

A közvetítő tényező azonosítása céljából, különböző kalcium által szabályozott enzimek gátlószereinek hatását vizsgáltuk meg a TRESK aktivációra. Azt találtuk, hogy a ciklosporin-A és az FK506 (tacrolimus), a kalcium/kalmodulin függő protein-foszfataz kalcineurin gátlószerei kivédik a kalciumfüggő TRESK-aktivációt. Ezt követően a kalcineurint az irodalomból ismert molekuláris biológiai eljárással konstitutívan aktívvá alakítottuk. Ha ezt a folyamatosan aktív foszfatazt koexpresszáltuk a TRESK csatornával, akkor az kalciumjel nélkül is aktív állapotba jutott. (Hasonló eredményt kaptunk, ha az *E. coli* baktériumban termeltetett aktív kalcineurin fehérjét a TRESK-et kifejező petesejtbe mikroinjektáltuk.) Ez azt mutatta, hogy a kalciumkoncentráció emelkedése serkenti a kalcineurint, ami defoszforilálja és így aktiválja a TRESK csatornát (3. ábra).

A kalcineurin gondolatkörében élve észrevettük, hogy a TRESK csatorna tartalmazza a PQVID aminosav-szek-



5. ábra

A 14-3-3 adapter fehérje foszforiláció függő módon kötődik a TRESK csatornához. A TRESK csatornát egy ismeretlen kináz foszforilálja (az egér csatornát a 264-es pozícióban) az RSNCP motívum második szerinjén. Ehhez a foszforilált motívumhoz kapcsolódik a 14-3-3 adapter fehérje. A 14-3-3 kötődése befolyásolhatja a csatorna működését, illetve annak kalcineurinmediált foszforilációs szabályozását (amely a TRESK 264-es szerintől eltérő aminosav maradékán is érvényesül).

enciát (az egér csatornában PQIVID, a humánban PQIIS), mely meglehetősen hasonlít az NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) fehérje kalcineurinkötő motívumára. (Az NFAT a kalcineurin legismertebb szubsztája. Ha a kalcineurin defoszforilálja ezt a transzkripciós faktort, akkor az a sejtmagba vándorol, és elősegíti az interleukin-2 mRNS átíródást, ezzel pedig a T-sejt alapú immunválasz kialakulását. A klinikumban széleskörűen használt kalcineuringátló immunszuppresszív szerek ezt védik ki.) Egy biokémiai kísérlet sorozattal igazoltuk (21), hogy a TRESK PQIVID motívuma tényleg erősen köti a kalcineurint. Jelenlegi tudásunk szerint a TRESK az egyetlen ioncsatorna, amely ilyen NFAT-szerű kalcineurinkötő motívummal rendelkezik. Kimutattuk, hogy a kalcineurin előzetes kihorgonyzódása a PQIVID motívumhoz nélkülözhetetlen a csatorna szabályozásához (4. ábra). A fehérjék interakciójának különlegessége, hogy a kalcium/kalmodulin komplex kötődése a kalcineurinhoz nemcsak a foszfatázaktivitást serkenti, hanem a TRESK-hez kötődést is (21). Egy összehasonlító vizsgálat szerint a ma ismert NFAT-szerű kötő motívumot tartalmazó fehérjék közül (beleértve magát az NFAT-t is) a TRESK köti legerősebben a kalcineurint (22).

A közelmúltban egy további TRESK-hez közvetlenül kapcsolódó partnerfehérjét azonosítottunk (15). Kimutattuk, hogy a 14-3-3 adapter fehérje foszforilációfüggő módon kötődik a csatornához. A kötődés csak akkor jön létre, ha a TRESK 14-3-3-kötő régiójában, az RSNSCP motívumban a megfelelő (a dőlt szedéssel jelölt, egér csatornában 264-es sorszámú) szerin foszforilált állapotban van (5. ábra). Az adapter fehérje kötődése érdekes funkcionális következménnyel járt. A 14-3-3 lassította a kalcineurinnal aktivált TRESK áramának visszatérését a nyugalmi (kiindulási, gátolt) állapotba, a kalciumjel megszűnését követően. Mivel a 14-3-3 minden sejtben megtalálható, várható, hogy általánosan szabályozza a TRESK aktivitását azon sejtekben, ahol ez a K2P csatorna kifejeződik (15).

Megbeszélés

A TRESK csatorna heterológ expressziós rendszerben, béka petesejtben, történő vizsgálatával általános érvényű eredményeket értünk el.

A kimutatott fehérje-fehérje kölcsönhatások (TRESK-kalcineurin és TRESK-14-3-3), a fehérjék saját biokémiai tulajdonságain alapulnak, ezért az expresszió helyétől függetlenül kialakulnak, ha a fehérjepárok megfelelő körülmények között találkoznak. Eredményeink arra utalnak, hogy a TRESK csatorna foszforilált alaphelyzetében gátolt állapotban van. (Egyelőre nem ismerjük, hogy a csatornát milyen kináz enzim foszforilálja, és viszi ezáltal gátolt állapotba.) A kalciumjel hatására aktiválódó kalcineurin defoszforilálja a csatornát, amivel előidézi a K^+ -áram többszörös fokozódását. A 14-3-3 kötődése egyrészt közvetlenül befolyásolhatja a csatorna konformációját, és ezáltal működését, másrészt pedig akadályozhatja a TRESK-et foszforiláló (még ismeretlen) kinázt (lásd 3. ábra), és így gátolhatja a K^+ -áram visszatérését a nyugalmi állapotba.

Eredményeink kapcsolatot teremtenek a nagy orvosi jelentőséggel bíró kalcineurin enzim és a még kevésbé ismert TRESK csatorna szabályozása között. A kalcineurint gátló immunszuppresszív szereket általánosan alkalmaznak például szervtranszplantációt követően, és egyes autoimmun megbetegedésekben. Ezek a szerek azonban a kívánt terápiás hatásuk mellett többféle mellékhatással is rendelkeznek. A mellékhatások között lehet olyan, melyet a TRESK csatorna szabályozásának gátlása okoz. A közelmúltban elérhetővé vált egy szabadalmi leírás (WO/2008/058399), mely szerint a TRESK nagy mennyiségben fejeződik ki a trigeminus ideg ganglionjában, és a csatorna inaktiváló mutációi emberben migrén típusú fejfájással kapcsolatos fordulnak elő. Mivel a kalcineurin inhibitorok is okozhatnak migrénszerű fejfájást mellékhatásként (23), felmerül a lehetőség, hogy a TRESK szabályozása szerepet játszik a migrén egyes formáinak, illetve egyéb fájdalom szindrómák patomechanizmusában (24).

A TRESK csatorna jóval érzékenyebb a párolgó folyadék anesztetikumokra, mint a TREK és TASK csatornák (25). Míg ez utóbbiak a sebészetben általában használatos koncentrációkra aktiválódnak, addig a TRESK serkentése már ez alatt, az anesztézia kezdeti fázisában vagy enyhe anesztézia esetén is létrejöhethet. Általános orvosi ismeret, hogy az anesztézia egyes fázisai az „altatás mélységének” megfelelően, sorrendben alakulnak ki. Ezért részben az felelős, hogy a különböző központi idegrendszeri struktúrák eltérő K2P csatorna repertoárral rendelkeznek. Amennyiben a jövőben sikerül a különböző K2P csatornákra szelektív aktiváló anyagokat kifejleszteni, akkor az anesztéziában együtt tapasztalt (pl. hipnotikus, immobilizáló, analgetikus, neuroprotektív stb.) hatásokat bizonyos mértékig szét lehet majd választani. Ilyen tekintetben különös érdeklődésre tarthat számot a TRESK csatorna, mely az érzőneuronokban fejeződik ki nagy mennyiségben.

A K2P csatornák aminosav szekvenciájának összehasonlításából (lásd a dendrogramot, 2. ábra) látható, hogy a TRESK csatorna erősen eltér a többi K2P csatornától, önmagában alkot egy alcsaládot, és nincs közelebbi rokona. Ez azt sejteti, hogy az evolúció korai szakában vált külön a többi csatornától. Valóban, a TRESK egyértelműen azonosítható a *Danio rerio* (zebrahal) genomiális szekvenciájában is. Az általunk felfedezett két kötő motívum közül a 14-3-3-é konzervált ebben az ősi hal TRESK-ben, míg a kalcineuriné nem. A kalcineurinkötő motívum viszont megtalálható az emlős (egér, patkány, kutya, szarvasmarha) TRESK-ekben (bár a kacsacsőrű emlősben egy valószínűleg nem működő változata szerepel). Ez azt sugallja, hogy a kalciumos szabályozás valahol az emlősök kialakulása előtt jelenhetett meg. Mindezekből látható, hogy a TRESK hosszú időn keresztül funkcióképesen fennmaradt, azonban korántsem változatlanul. Éppen ellenkezőleg, úgy tűnik, hogy a különböző emlősök TRESK csatornáit jobban eltérnek egymástól, mint az egyéb K2P csatornák. (Pl. ember és egér viszonylatában az aminosav szekvencia azonosság a TWIK1, TREK1 és TASK1 csatornák esetében rendre 95, 96 és 87%, míg a TRESK csatornánál 65%.) Bár ez lehet véletlen is, azért felveti annak a lehetőségét, hogy a TRESK evolúciója a „közelmúltban” gyorsabb volt, mint a többi K2P csatornáé. Ez az alacsony

szekvencia hasonlóság óvatosságra int a tekintetben, hogy az egérben nyert funkcionális eredmények, következtetések mennyire vihetők majd át az emberre. Mindenesetre, a

kalcineurinos és 14-3-3 általi szabályozás, mint azt kísérletesen igazoltuk, működik a humán és egér csatornánál egyaránt.

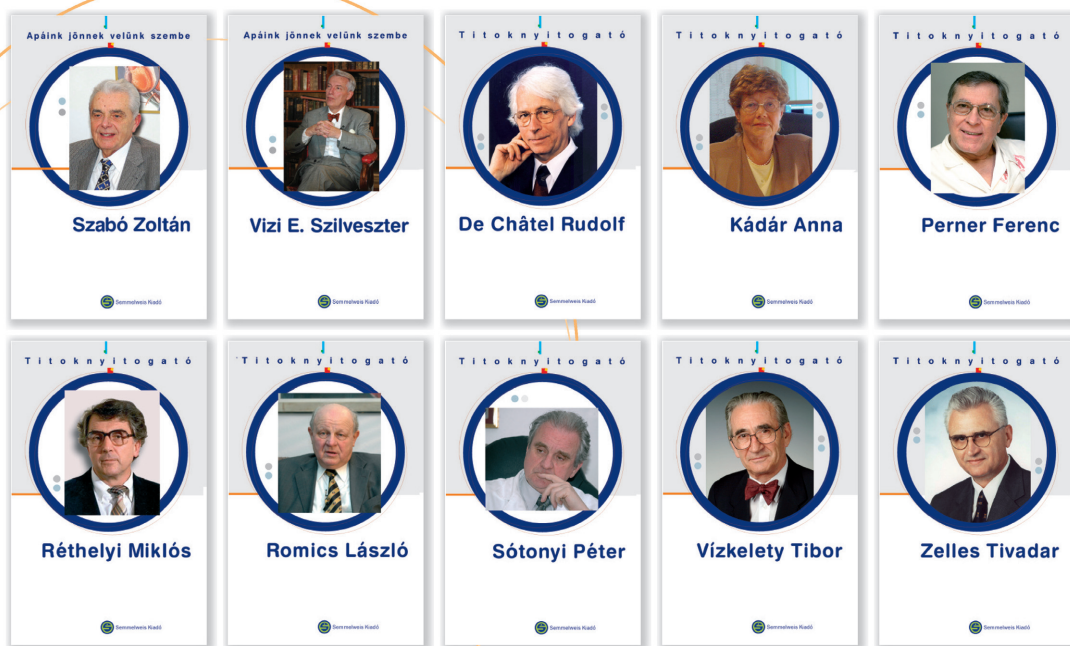
Irodalom

- Goldman DE. Potential, impedance and rectification in membranes. *J Gen Physiol* 1943; 27:37-60.
- Hodgkin AL, Katz B. The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J Physiol* 1949; 108:37-77.
- Patel AJ, Honore E, Lesage F, Fink M, Romey G, Lazdunski M. Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K⁺ channels. *Nat Neurosci* 1999; 2:422-426.
- Heurteaux C, Guy N, Laigle C, Blondeau N, Duprat F, Mazzuca M et al. TREK-1, a K⁺ channel involved in neuroprotection and general anesthesia. *EMBO J* 2004; 23:2684-2695.
- Kennard LE, Chumbley JR, Ranatunga KM, Armstrong SJ, Veale EL, Mathie A. Inhibition of the human two-pore domain potassium channel, TREK-1, by fluoxetine and its metabolite norfluoxetine. *British Journal of Pharmacology* 2005; 144:821-829.
- Heurteaux C, Lucas G, Guy N, El Yacoubi M, Thummler S, Peng XD et al. Deletion of the background potassium channel TREK-1 results in a depression-resistant phenotype. *Nat Neurosci* 2006; 9:1134-1141.
- Blondeau N, Petraut O, Manta S, Giordanengo V, Gounon P, Bordet R et al. Polyunsaturated fatty acids are cerebral vasodilators via the TREK-1 potassium channel. *Circ Res* 2007; 101:176-184.
- Sano Y, Inamura K, Miyake A, Mochizuki S, Kitada C, Yokoi H et al. A novel two-pore domain K⁺ channel, TRESK, is localized in the spinal cord. *J Biol Chem* 2003; 278:27406-27412.
- Czirják G, Tóth ZE, Enyedi P. The two-pore domain K⁺ channel, TRESK, is activated by the cytoplasmic calcium signal through calcineurin. *J Biol Chem* 2004; 279:18550-18558.
- Keshavaprasad B, Liu C, Au JD, Kindler CH, Cotten JF, Yost CS. Species-specific differences in response to anesthetics and other modulators by the K2P channel TRESK. *Anesth Analg* 2005; 101:1042-9.
- Kang D, Kim D. TREK-2 (K2P10.1) and TRESK (K2P18.1) are major background K⁺ channels in dorsal root ganglion neurons. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 291:C138-C146.
- Dobler T, Springauf A, Tovornik S, Weber M, Schmitt A, Sedlmeier R et al. TRESK two-pore-domain K⁺ channels constitute a significant component of background potassium currents in murine dorsal root ganglion neurons. *J Physiol* 2007; 585:867-879.
- Czirják G, Petheő GL, Spät A, Enyedi P. Inhibition of TASK-1 potassium channel by phospholipase C. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 281:C700-C708.
- Czirják G, Enyedi P. Zinc and mercuric ions distinguish TRESK from the other two-pore-domain K⁺ channels. *Mol Pharmacol* 2006; 69:1024-1032.
- Czirják G, Vuity D, Enyedi P. Phosphorylation-dependent binding of 14-3-3 proteins controls TRESK regulation. *J Biol Chem* 2008; 283:15672-15680.
- Czirják G, Fischer T, Spät A, Lesage F, Enyedi P. TASK (TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel) is expressed in glomerulosa cells of rat adrenal cortex and inhibited by angiotensin II. *Mol Endocrinol* 2000; 14:863-874.
- Czirják G, Enyedi P. TASK-3 dominates the background potassium conductance in rat adrenal glomerulosa cells. *Mol Endocrinol* 2002; 16:621-629.
- Czirják G, Enyedi P. Formation of functional heterodimers between the TASK-1 and TASK-3 two-pore domain potassium channel subunits. *J Biol Chem* 2002; 277:5426-5432.
- Maylie J, Bond CT, Herson PS, Lee WS, Adelman JP. Small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels and calmodulin. *J Physiol* 2004; 554:255-261.
- Salkoff L, Butler A, Ferreira G, Santi C, Wei A. High-conductance potassium channels of the SLO family. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7:921-931.
- Czirják G, Enyedi P. Targeting of calcineurin to an NFAT-like docking site is required for the calcium-dependent activation of the background K⁺ channel, TRESK. *J Biol Chem* 2006; 281:14677-14682.
- Li H, Zhang L, Rao A, Harrison SC, Hogan PG. Structure of calcineurin in complex with PVIVIT peptide: portrait of a low-affinity signaling interaction. *J Mol Biol* 2007; 369:1296-1306.
- Ferrari U, Empl M, Kim KS, Sostak P, Forderreuther S, Straube A. Calcineurin inhibitor-induced headache: clinical characteristics and possible mechanisms. *Headache* 2005; 45:211-214.
- Smith HS. Calcineurin as a nociceptor modulator. *Pain Physician* 2009; 12:E309-E318.
- Liu C, Au JD, Zou HL, Cotten JF, Yost CS. Potent activation of the human tandem pore domain K channel TRESK with clinical concentrations of volatile anesthetics. *Anesth Analg* 2004; 99:1715-22.



Az **Apáink jönnek velünk szembe** és a **Titoknyitogató** riportfilmsorozatokat alapján készült könyvek

A Semmelweis Egyetem és a Semmelweis Kiadó közös kezdeményezésére olyan sorozat indult, amely feldolgozza az orvosi-tudósi életműveket tanulságtanúság céljából. Az orvosegyetemek kapuin átlépve minden egyetemista potenciális professzor, s hogy mégis kiből lesz, miért és hogyan akadémikus, a világ elismert tudósa és professzora, ezt mutatja be a sorozat.



A nitrogén-monoxid szintáz enzimek vizsgálata hypoxia által kiváltott kórképekben

Nitric oxide synthases in hypoxia-induced diseases

Rusai Krisztina
Reusz György
Szabó J. Attila

ÖSSZEFOGLALÁS *Bevezetés:* Az ischaemia indukálta patofiziológiai folyamatok számos klinikai kórkép kialakulásában játszanak jelentős szerepet, így az ischaemiás szervkárosodások kiemelkedő mértékben járulnak hozzá a betegek morbiditásához és mortalitásához. A nitrogén-monoxid (NO) multifunkcionális jelátvivő molekula, mely központi szerephez jut a hypoxiára/ischaemiára válaszként megjelenő adaptációs, valamint patológias folyamatokban. A NO szintézist a NO-szintáz (NOS) enzim végzi, melynek három különböző; neuronális, indukálható, endoteliális izoformája létezik. Az endoteliális NOS (eNOS) izoforma által termelt NO az ér-újdonképződés egyik legfontosabb effektor molekulája.

Célkitűzés. Jelen munkánk célkitűzése az volt, hogy vizsgáljuk a NOS enzim izoformáinak viselkedését és hatását különböző hypoxia/ischaemia indukálta kórképekben. Vizsgálataink első részében a NO-szintézis szubsztrátjának, az L-argininnek, illetve a neuronális NOS (nNOS) szelektív gátlásának hatását vizsgáltuk patkányok ischaemia/reperfúzió (I/R) indukálta vesekárosodásában. Munkánk második felében a csökkent NO-termeléssel járó eNOS 27-bp repeat és T⁷⁸⁶C genetikai polimorfizmusok előfordulását vizsgáltuk koraszülött retinopathia (ROP) miatt kezelt, illetve ROP miatt nem kezelt kislányú koraszülöttekben.

Módszerek. Uninefektomizált hím Sprague-Dawley patkányokban a bal oldali vese 50 perces ischaemiáját hoztuk létre, majd az ischaemiát követően 24 órával a károsodott vesét eltávolítottuk és szövettani vizsgálatot végeztünk, valamint RT-PCR és Western blot technikákkal meghatároztuk a három NOS izoforma mRNS és fehérje expresszióját. Az állatok egy csoportját L-argininrel (2 g/kg/nap), egy másik csoportját nNOS gátlószer 7-nitroindazollal (7-NI, 50 mg/kg/nap) kezeltük az ischaemia előtt 7 napon át per os. Kontrollként vivőanyag kezelt (dimetilszulfoxid-szezám olaj, 1 : 9) állatok szolgáltak.

Munkánk második felében 105 ROP miatt kezelt kislányú koraszülöttekben allélspecifikus PCR technikával vizsgáltuk az eNOS 27-bp repeat és T⁷⁸⁶C polimorfizmusokat. Kontrollcsoportként 127 kislányú, ROP miatt kezelést nem igénylő koraszülött szolgált.

Eredmények. Az L-arginin kezelés nem változtatta meg a szöveti károsodás mértékét, illetve a vesefunkciós paraméterek szintjét, de megemelte mindhárom NOS izoforma expresszióját a vesében. A 7-NI adása sem változtatta meg a postischaemiás vesekárosodás mértékét, ugyanakkor megemelte az indukálható NOS (iNOS) expresszióját a veseszövetben. Vizsgálataink során kimutattuk, hogy a 27-bp repeat polimorfizmus hordozása egyéb kockázati tényezőktől függetlenül hozzájárulhat a ROP kialakulásához, megerősítve ezzel az eNOS angiogenezisben betöltött szerepét. Ugyanakkor nem találtunk összefüggést az eNOS T⁷⁸⁶C genetikai polimorfizmus és a ROP megjelenése között.

Következtetések. A vese I/R során végzett vizsgálataink alapján az L-arginin kezelés postischaemiás károsodásra kifejtett hatása részben a NO rendszeren keresztül valósul meg, de nem játszik központi szerepet a károsodás kivédésében. Eredményeink továbbá utalnak arra, hogy a nNOS izoforma nem játszik központi szerepet a vese I/R károsodás patomechanizmusában. Továbbá az eNOS 27-bp repeat genetikai polimorfizmus befolyásolhatja a koraszülöttek retinopathiájának megjelenését.

KULCSSZAVAK nitrogén-monoxid szintáz, hypoxia, vese, retinopathia

SUMMARY *Introduction.* The ischemia induced pathological conditions significantly contribute to the mortality and morbidity statistics. Nitric oxide (NO) is a gaseous multifunctional molecule synthesized from L-arginine by three different isoforms of NO synthases (NOS): namely the neuronal, inducible and endothelial isoforms. NO is a key mediator in the pathophysiology of different hypoxia/ischemia derived diseases, furthermore, endothelial NOS (eNOS) is believed to play a central role in both retinal angiogenesis and vasculogenesis. *Aims.* The aim of our present work was to investigate the effect of the NOS isoforms in different hypoxia/ischemia induced diseases. In the first part of our study we examined the effect of L-arginine and the selective neuronal NOS (nNOS) inhibitor 7-nitroindazole (7-NI) on

Semmelweis Egyetem,
I. Sz. Gyermekklinika

LEVELEZÉSI CÍM:

Dr. Rusai Krisztina
1083 Budapest
Bókay u. 53-54.

E-mail:

rusai@gyer1.sote.hu

renal ischemia/reperfusion (I/R) injury. In the second part we examined if there is any association between the development of ROP and the *eNOS*, 27-bp repeat and T⁷⁸⁶C genetic polymorphisms, both resulting in decreased NO production.

Methods: Following 7 days pretreatment with 7-NI (50 mg/kg per day), L-arginine (2 g/kg per day) or vehicle (dimethylsulphoxide : sesame oil, 1 : 9), the left renal vascular pedicles were clamped for 50 min in male Sprague-Dawley rats and kidneys were removed 24 h after reperfusion. Renal morphology and serum renal function parameters were assessed, and mRNA and protein expression of all NOS isoforms were determined using RT-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot analysis. *eNOS* T⁷⁸⁶C and 27-bp repeat genotypes were determined using allele-specific PCR in 105 low birth weight preterm infants treated for ROP. A control group was set up and composed of 127 LBW infants with stage 1 or 2 ROP that did not require treatment.

Results: L-arginine treatment did not have any effect on tissue injury and renal function parameters, whereas it increased the expression of all NOS isoforms in the renal tissue. Treatment with 7-NI did not change either the rate of kidney injury or the renal function parameters. On the other hand, 7-NI increased the expression of the inducible NOS (iNOS) in the posts ischemic kidney.

The genotype distribution of *eNOS* 27-bp repeat polymorphism was found to significantly differ between the two groups, whereas the genotype distribution of *eNOS* T⁷⁸⁶C did not differ between the groups.

Conclusions: The results of the present study demonstrate that selective inhibition of nNOS has no effect on renal injury, indicating that nNOS does not play a central role in the pathophysiology of renal I/R. In addition, although L-arginine has no effect on renal I/R injury in the model used in the present study, its administration increases the mRNA expression of NOS isoforms. Our study has shown that functional *eNOS* 27-bp repeat polymorphism might be associated with the risk of severe ROP, however we found no association between the *eNOS* T⁷⁸⁶C and the pathogenesis of ROP.

KEY WORDS nitric oxide synthases, hypoxia, kidney, retinopathy

Bevezetés

Az ischaemia indukálta összetett funkcionális és biokémiai folyamatok következtében létrejövő sejt- és szervkárosodás számos klinikai kórkép kialakulásában játszik jelentős szerepet.

A vese ischaemia/reperfúziós (I/R) károsodása 70–80%-ban felelős az akut veseelégtelenség kialakulásáért. Sokk és az aortát érintő műtétek kapcsán alakul ki leggyakrabban, illetve elkerülhetetlen velejárója a vesetranszplantációnak (1). Az I/R alatt végbemenő folyamatok leginkább egy komplex gyulladási immunválasznak felelnek meg. A vesén belül a medulla és a nagy transzport aktivitású proximális tubulusok a legérzékenyebbek ischaemiás károsodással szemben (2), melyek a hypoxia mértékétől függően vagy apoptózis vagy nekrosis következtében pusztulnak el (3).

A koraszülöttek retinopathiája (retinopathy of prematurity – ROP) a retina kis ereinek rendellenes növekedésével és kóros proliferációjával járó kórkép, mely a gyermekkori vaklás vezető oka (4). A ROP az 1250 g alatti születési súlyú koraszülöttek mintegy 50%-át érinti. Az éretlen, kissúlyú koraszülöttek esetében a megszületést követően a magzati élethez képest a retinában hirtelen megemelkedik az oxigén szöveti nyomása. Az így kialakult relatív szöveti hyperoxia a már meglévő retinaerek elzáródását (vazoobliteráció) okozza (ROP első fázisa) (5).

A vazoobliteráció következtében kialakult retinális ischaemia kóros vaszkulo- és angiogenezist indukál (ROP második fázisa) (6,7).

A nitrogén-monoxid (NO) L-argininből keletkező jelátvivő molekula, melynek szintézisét a nitrogén-monoxid szintáz (NOS) enzim végzi. A NO szintézisének egyik legfontosabb befolyásoló tényezője a szubsztrát L-arginin mennyisége (8). A NOS enzimnek jelenleg három izoformája ismert, melyek különböző sejtekben vannak jelen és eltérően szabályozott a működésük. A neuronális NOS (nNOS) és az endoteliális NOS (eNOS) konstitutív enzimek (9, 10, 11, 12). Az indukálható NOS (iNOS) termelődése lipopoliszacharid (LPS), valamint gyulladási citokinek hatására indul meg (13). Mindhárom izoforma jelen van a vesében, ugyanakkor a retina endotél sejtjeiben elsősorban az eNOS található meg. A NO hatása rendkívül sokrétű: a simaizomsejtek relaxációját okozza (érfal, bélfal, bronchusok simaizomzata), gátolja a trombocyták aggregációját, illetve az idegrendszerben befolyásolja a neurotranszmisszió folyamatát (14). A nagy koncentrációban termelődő NO képes gátolni bizonyos vírusok, illetve paraziták replikációját (15), valamint oxigén szabadgyökökkel reagálva citotoxikus nitrogén szabadgyökökké alakulhat. Így elsősorban a nem specifikus immunválasz részeként a mikrobák elleni küzdelemben játszik fontos szerepet. A NO képes több szinten károsítani a fehérjék, vala-

Köszönetnyilvánítás

Megköszönöm Tulassay Tivadar, Szabó Anndrás, Vásárhelyi Barna, Fekete Andrea, Vannay Ádám, Müller Veronika, Szebeni Beáta, Bokodi Géza, Borgulya Gábor, Uwe Heemann, Bernáth Mária, Ondrej Viklicky, Silvia Bloudickova, valamint Jan Rajnoch munkám során nyújtott segítségét.

mint a DNS, így a sejtek élettani funkcióját is (16), és részt vesz a programozott sejtihal szabályozásában úgy, hogy mind a pro-, mind az antiapoptotikus mechanizmusokba beavatkozik (17, 18, 19, 20, 21).

Az eNOS által termelt NO a vaszkuláris-endoteliális növekedési faktor (VEGF) angiogenezist indukáló hatásának egyik legfontosabb effektor molekulája (22, 23, 24). A megnövekedett eNOS aktiváció következtében az endotél sejtekben nagyobb mennyiségben felszabaduló NO az ér vazodilatációjához vezet, illetve gátolja az az endotél sejtek apoptózisát (25), ami szintén az érfejlődés serkentéséhez vezet.

Az eNOS gén szakaszán számos polimorfizmust azonosítottak, melyek közül a promoter régióban elhelyezkedő T⁻⁷⁸⁶C és a 7. exonon található Glu298Asp cserével járó pontmutáció, valamint a 4. intronon található 27 bázispáros szakasz kiesésével járó 27-bp repeat polimorfizmus (a/b) azok, melyeket a leginkább vizsgáltak. A T⁻⁷⁸⁶C és a 27-bp repeat polimorfizmus bizonyítottan funkcionális polimorfizmusok. A T⁻⁷⁸⁶C csere a gén csökkent promoter aktivitásával jár, így az eNOS alacsonyabb mRNS szintéziséhez vezet (26), illetve a ⁻⁷⁸⁶C allél hordozóiban a plazma NO metabolitok szintje szignifikánsan alacsonyabb a ⁻⁷⁸⁶C allélt nem hordozókhoz képest (27). A 27-bp repeat polimorfizmus „a”, azaz mutáns alléljének hordozóiban szintén szignifikánsan alacsonyabb a NO metabolitok szintje a plazmában (28).

A NO hatása vese I/R károsodás során a számos kísérletes adat ellenére is ellentmondásos, az eNOS genetikai polimorfizmusainak szerepe koraszülöttek ROP-jában pedig egyáltalán nem ismert. Munkáink során ezért arra kerestük a választ, hogy milyen hatást fejt ki a NO szubsztrát L-arginin és a szelektív nNOS gátlószer 7-nitroindazol (7-NI) a vese I/R károsodására. Ezenkívül vizsgáltuk az eNOS gén két funkcionális polimorfizmusának a kissúlyú koraszülöttek ROP kockázatával való kapcsolatát.

Módszerek

In vivo vese I/R állatmodell

Kísérleteinket ivarérett hím (370 ± 30 g) Sprague-Dawley patkányokon végeztük a Magyar Köztársaság (1998/XXVIII) állatvédelmi törvényei alapján, és a Semmelweis Egyetem állatkísérletekkel kapcsolatos irányelveinek megfelelően.

A műtéti beavatkozást intraperitoneális nátrium-pentobarbitál (50 mg/ttkg, Nembutal, Abbott Laboratories, Budapest, Magyarország) anesztéziában végeztük. A műtét elvégzése alatt az állatok rektális hőmérsékletét hőmérséklet szabályozott operációs pad használatának segítségével állandó 37 ± 0,5°C-on tartottuk. Az altatást követően medián laparotomiát végeztünk, a bal vesét ellátó artériát és vénát kivevőre vettük, majd 50 percre atraumatikus, mikrovaszkuláris klippel leztorítottuk. Az ischaemiás idő végezte előtt az ellenoldali jobb vesét eltávolítottuk. A klip felengedése után a műtéti nyílást véglegesen zártuk. A fenti műtéti beavatkozást követően 24 óra reperfüziós idő elteltével az állatokat újra elaltattuk, majd kivégeztettük.

1. táblázat

A vese I/R vizsgálatba bevont állatcsoportok adatai

CSOPORT NEVE (N=7)	KEZELÉS	DÓZIS
sham	–	–
I/R+veh	vivőanyag	–
I/R+L-arg	L-arginin	2 g/ttkg/nap
I/R+7-NI	7-nitroindazol	50 mg/ttkg/nap

A levett vérből szérumot izoláltunk, az eltávolított bal vesét 3 egyenlő darabra osztottuk és 4%-os pufferolt formalinban (pH=7,4) vagy folyékony nitrogénben történő gyorsfagyasztást követően –80 °C-on tároltuk.

Kísérleteinket az alábbi csoportokon végeztük (1. táblázat): az állatok első csoportja vivőanyag kezelést (DMSO és szeszám olaj) kapott. A második csoportot L-argininnel kezeltük az ischaemia indukciója előtt hét napon át napi egyszeri, 2 g/ttkg adagban intraperitoneálisan. A harmadik csoport szelektív nNOS gátlószer, 7-nitroindazol (7-NI) kapott 7 napon át 50 mg/ttkg dózisban intraperitoneálisan az ischaemiát megelőzően. Az állatok egy csoportja áloperáción esett át kezelés nélkül.

Szérumkreatinin és -karbamid (BUN) mérése

A vizsgált postischaemiás időpontban az aorta abdominálisból vett vérből, Hitachi-712 automatizált spektrofotométeren fotometriás módszerrel határoztuk meg a kreatinin és urea nitrogén (BUN) értékeket kereskedelmi forgalomban lévő kiték segítségével (*Diagnosticum Kft.*, Budapest, Magyarország).

A veseszövetek szövettani vizsgálata

Az eltávolított vesék egy részét formalinos (4%, pH=7,4) fixálást követően paraffinba ágyasztuk. A szövettintákat perjódsvas Schiff reakcióval (PAS) és hematoxillin-eozinnal (HE) festettük. A szöveti károsodás fénymikroszkópos kiértékelése a minták kódolása után történt. A glomeruláris és a tubuláris károsodások, illetve a vaszkuláris károsodás mértékét 0-3-ig terjedő skálán minősítettük a következők szerint: 0 – nincs, 1 – enyhe (a sejtek <30%-ában), 2 – közepesen súlyos (a sejtek 30–60%-ában), 3 – súlyos (a sejtek több mint 60%-ában).

TUNEL festés

Az apoptózist kísérő DNS fragmentáció kimutatására TUNEL festést használtunk. A módszer lényege, hogy a DNS lánc törései miatt kialakuló szabad 3' hidroxil végeket dezoxi-nukleotidil-transzferáz (TdT) enzim segítségével és jelölt dUTP-val detektáltuk. A TUNEL assay-hez kereskedelmi forgalomban levő kitéket használtunk és a gyártó által megadott protokollt követtük (Boehringer Mannheim, Németország).

A pozitív, apoptotikus sejtek számát 40' nagytárolásos fénymikroszkóp alatt látóterenként számoltuk meg.

RT-PCR vizsgálatok

A veseminta egy részét guanidin-izotiocianát lízis-pufferbe helyeztük és -80°C-on tároltuk a további molekuláris biológiai vizsgálatok elvégzéséig. A szövetminták teljes RNS-tartalmát a Qiagen kettős protokollja alapján, az RNeasy™ Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Németország) segítségével izoláltuk. A reverz transzkripció (RT) során minden minta 1 µg teljes RNS-éből konvertáltunk cDNS-t. 20 µl reakció végtérfogatban, 200 U SuperScript II RNase H⁻ reverz transzkriptáz, 20 U RNaseOUT™ inhibitor és 3,75 µg/µl oligo dT₁₂₋₁₈ primer alkalmazásával (Gibco/BRL, Eggenstein, Németország). A reakcióelegyet 20 °C-on 10 percig, majd 42 °C-on 45 percig és végül 99 °C-on 5 percig inkubáltuk, majd 4 °C-ra lehűtöttük.

A szemikvantitatív PCR reakciókat 50 µl végtérfogatú [10% 10× PCR puffer, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,4 M primer (sense és antisense egyaránt), 1,5 U rekombináns Taq polimeráz (Gibco/BRL, Eggenstein, Németország)] reakcióelegyben végeztük Perkin Elmer Thermo Cycler® automatában (PE, Model 2400, Norwalk, CT, USA). Minden reakcióhoz 1 l cDNS templátot használtunk.

A patkány specifikus nNOS, iNOS és eNOS mRNS szekvenciákat az NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) nukleotid genetikai adatbázisa és Blast szolgáltatása segítségével választottuk ki. A primerek tervezéséhez a DNASTar™ szoftvert használtuk. A patkány GAPDH (gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz) specifikus primereket *Strehlau és mtsai*-tól vettük át (29). A PCR-ek során alkalmazott primerek adatait táblázatban foglaltuk össze (2. táblázat). A PCR reakciókat a primerekre jellemző anneálási hőmérsékletek kivételével azonos módon vittük véghez. A kezdeti 5 perces 94 °C-on végzett denaturációt követően, a templátot 35 cikluson [94 °C, 15 s (denaturáció), 55 °C (iNOS, eNOS), 56 °C (nNOS, GAPDH), 30 s (anneálás), 72 °C 30 s (extenzió)] keresztül amplifikáltuk. Végül 7 percig tartó 72 °C-on történő inkubációval fejeztük be a PCR reakciót.

A keletkezett terméket etídium-bromiddal festett 2,5%-os agaróz gélen szeparálva tettük láthatóvá

(Invitrogen, Frankfurt, Németország). A PCR reakciók eredményeit Gel-Pro™ denzitometriai szoftverrel értékeltük ki.

Western blot

A Western blot vizsgálatokhoz 100 mg veseszövetet hűtött (4 °C) lizáló pufferben [10 mM TRIS-HCl pH=8,0, 60 mM Hepes, 100 mM NaCl, 0,75 mg/l leupeptin, 1 mM/l EDTA, 1 mM/l EGTA, 0,5 mM PMSF, 0,1 mM dithio-treitol] (Sigma Chemical Co, MO, USA) homogenizáltuk. Primer patkány ellenes anti-iNOS és anti-eNOS ellenanyagként egér monoklonális ellenanyagot alkalmaztunk (Transduction Laboratories). Másodlagos antitestként torma-peroxidázzal konjugált anti-egér IgG antitestet (Sigma Chemical Co, MO, USA) használtunk. A fehérje mintákat 4× SDS pufferben (12,5 mM TRIS-HCl, (pH=6,7), 4,0% SDS, 1 mM EDTA, 15% glicerol, 0,01% brómfenolkék) oldottuk fel, majd 5 percig forralással denaturáltuk. A mintákból 50-50 µg összfehérjének megfelelő mennyiséget vittünk fel 12,5% SDS-poliakrilamid gélekre. Koncentráló gélként 4%-os SDS-poliakrilamidot használtunk. A gélelektroforézist követően a blot-membránt 4 °C-on, egy éjszakán keresztül blokkoló oldatban (5% zsírmentes tejpor, 10× PBS puffer) inkubáltuk. Blokkolás után a membránt mosó oldatban (1% zsírmentes tejpor, 0,1% Tween™20 detergens, 10× PBS puffer) másfél órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk az első specifikus ellenanyaggal (iNOS 1:250, eNOS 1:200 hígításban). Mosást követően a másodlagos, torma-peroxidázzal jelölt ellenanyaggal (1:2000 anti-egér IgG hígításban) a membránokat inkubáltuk. Az immunreaktív helyek kemolumineszcens szignálját Amersham Pharmacia előírása szerint ECLplus reagenssel, Hyperfilm ECL™-en filmen (AP Biotech, Buckinghamshire, UK) detektáltuk, majd Gel-Pro™ szoftver alkalmazásával denzitometráltuk.

Allélspecifikus PCR vizsgálatok

Az eNOS T^{-786C} és 27-bp repeat genetikai polimorfizmusok vizsgálatát a Semmelweis Egyetem II. Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikájának perinatális intenzív osztályán, illetve az I. Sz. Gyermekklinikán gondozott,

2. táblázat

A NOS izoformák veseszövetben mérhető mRNS expressziójának meghatározására használt primerek adatai

GÉN	PRIMER PÁROK	ANNEÁLÓ HŐMÉRSÉKLET (°C)	TERMÉK HOSSZA (BP)
nNOS	Forward: 5'-GAACCCCAAGACCATCC-3' Reverse: 5'-GGCTTTGCTCCACAGTT-3'	56	308
iNOS	Forward: 5'-GGTTTCCCCAGTTCCTCA-3' Reverse: 5'-TCTCCATTGCCCGAGTTTTT-3'	55	119
eNOS	Forward: 5'-AAG TGG GCA GCA TCA CCT AC -3' Reverse: 5'-GGT GAA CAT TTC CTG TGC TG -3'	55	396
GAPDH	Forward: 5'-GGTGAAGGTCGGAGTCAACG-3' Reverse: 5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3'	56	498

3. táblázat

Az eNOS T⁻⁷⁸⁶C és 27-bp repeat genetikai polimorfizmusainak vizsgálatába bevont 232 kis születési súlyú koraszülött klinikai adatai

	ROP MIATT NEM KEZELT KISSÚLYÚ KORASZÜLÖTTÉK	ROP MIATT KEZELT KISSÚLYÚ KORASZÜLÖTTÉK	P ÉRTÉK
Betegek száma	127	105	
Fiú/lány (N)	60/67	67/38	0,017
Születési kor (hét)	30,5±3,5	28,4±2,5	0,0001
Születési súly (g)	1300±400	1150±360	0,003
Oxigénterápia időtartama (nap)	7 [0-47]	15 [0-92]	0,0001

2000 g alatti születési súlyú (LBW) koraszülöttek fenilketonuria vizsgálat céljára gyűjtött szűrőpapíros vércsepp mintáiból végeztük.

A vérmintákat kódoltuk és a genetikai vizsgálatokat végző személyekhez csak a kódolt, névvel el nem látott minták jutottak. A klinikai adatokat kérdőívek segítségével nyertük (szintén kódolt). A vizsgálatokat a Helsinki-deklaráció értelmében, a résztvevők írásos tájékoztatása és beleegyezése után, a Semmelweis Egyetem etikai engedélyével (TUKÉB 16/2003) végeztük. 105 ROP miatt krioterápiával, illetve fotokoagulációval kezelt, illetve 127 krioterápiás, illetve fotokoagulációs kezelést nem igénylő ROP-ban szenvedő kis születési súlyú koraszülött (LBW) esetében határoztuk meg a eNOS T⁻⁷⁸⁶C és 27-bp repeat genetikai polimorfizmusok előfordulását (3. táblázat).

A polimorfizmus vizsgálatokhoz szükséges genomiális DNS-t a szűrőpapírra vett vérből izoláltuk. A szűrőpapírból kivágott, mintegy 10 mm² felületű mintára 200 µl 5%-os Chelex 100-at mértünk. Ezután a mintákat előbb 90 percig 56 °C-on, majd 10 percig 100 °C-on inkubáltuk. Az így előkészített mintákat szobahőmérsékletre hűtöttük, majd gondosan megkevertük. Végül 10000 rpm-en 2 percig centrifugáltuk a mintákat. A további vizsgálatokig a felülúszót -20 °C-on tároltuk.

Az eNOS 27-bp repeat polimorfizmus aléllspecifikus genotipizálásához használt primerek tervezése céljából a humán specifikus eNOS genomiális szekvenciát az NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) nukleotid genetikai adatbázisa és Blast szolgáltatása segítségével választottuk ki. A

primerek tervezése a szekvenciák alapján ismét a DNASStar szoftver felhasználásával történt (4. táblázat).

Az eNOS T⁻⁷⁸⁶C polimorfizmust *Nasreen és munkatársainak* (30) módszere szerint allélspecifikus PCR reakcióval detektáltuk.

Az allélspecifikus PCR reakciókat 50 µl végtérfogatú [10% 10× PCR puffer, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,4 µM primer (forward és reverse egyaránt), 1 U rekombináns Taq polimeráz (Gibco/BRL, Eggenstein, Németország)] reakcióelegyben végeztük Perkin Elmer Thermo Cycler[®] automatában (PE, Model 2400, Norwalk, CT, USA). Minden reakcióhoz 2 µl DNS templót használtunk. Az eNOS 27-bp repeat polimorfizmus detektálásához a mintákat 60 °C annealó hőmérsékleten 38 cikluson keresztül amplifikáltuk, az eNOS T⁻⁷⁸⁶C polimorfizmus detektálásához 56 °C-on annealva szintén 38 cikluson át amplifikáltuk. A keletkezett termékeket etidium-bromiddal festett 3%-os agaróz gélen detektáltuk.

Statisztikai analízis

Az állatkísérletes adatokat átlagérték ± SD (standard szórás) értéként adtuk meg.

A hisztológiai eredményeket Kruskal-Wallis és Dunns féle post-hoc teszttel hasonlítottuk össze. Két csoport összehasonlítására kétmintás t-próbát alkalmaztunk.

A különböző csoportok RT-PCR, Western blot eredményeinek összehasonlításához ANOVA tesztet használtunk Newman-Keul post-hoc teszttel kiegészítve.

A klinikai adatok összehasonlítását a ROP miatt krioterápiával, illetve fotokoagulációval nem kezelt és a ROP

4. táblázat

Az eNOS T⁻⁷⁸⁶C és 27-bp repeat polimorfizmusok meghatározására használt primerek adatai

GÉN	PRIMER SEKVENCIÁK
eNOS T ⁻⁷⁸⁶ C	Forward primer T: 5'-CAT CAA GCT CTT CCC TG _T CT-3' Reverse primer T ₀ : 5'-AGG CCC AGC AAG GAT GTA GT-3' Forward primer C: 5'-GGC AGA GGC AGG GTC AG _A CG-3' Reverse primer C ₀ : 5'-TTT CTC CAG CCC CTC AGA TG-3'
eNOS 27-bp repeat (b/a)	Forward: 5'-TGG GGG AGA TCC TTG CCT TTT C-3' Reverse: 5'- TGA GGG GCT GCA CTG GAC TGG -3'

miatt krioterápiával, illetve fotokoagulációval kezelt, kis születési súlyú koraszülöttek között Student's t-tesztel végeztük.

A koraszülött populáció vizsgálata során az eNOS 27-bp repeat és T⁻⁷⁸⁶C genetikai polimorfizmusainak allél és genotípus frekvenciáit, illetve haplotípus megoszlását χ^2 tesztel és Fisher egzakt tesztel vizsgáltuk.

Logisztikus regressziós analízist végeztünk annak érdekében, hogy az eNOS genotípusok és a ROP kezelés összefüggését megállapítsuk. Az asszociációt a ROP szakirodalom alapján ismert rizikófaktorokra (nem, születési kor, oxigén kezelés időtartama és a kettő interakciója) korrigáltuk.

A Hardy-Weinberg egyensúly vizsgálatát és ROP miatt kezelt, illetve a nem kezelt populáció allél prevalencia vizsgálatát az ArlequinTM szoftverrel (Swiss National Science Foundation; <http://lgb.unige.ch/arlequin/>) végeztük.

A statisztikai elemzések végrehajtásához a STATISTICA.6 szoftvert (StatSoft[®] Inc., USA) használtuk. Statisztikailag szignifikánsnak a $P < 0,05$ értéket tekintettük.

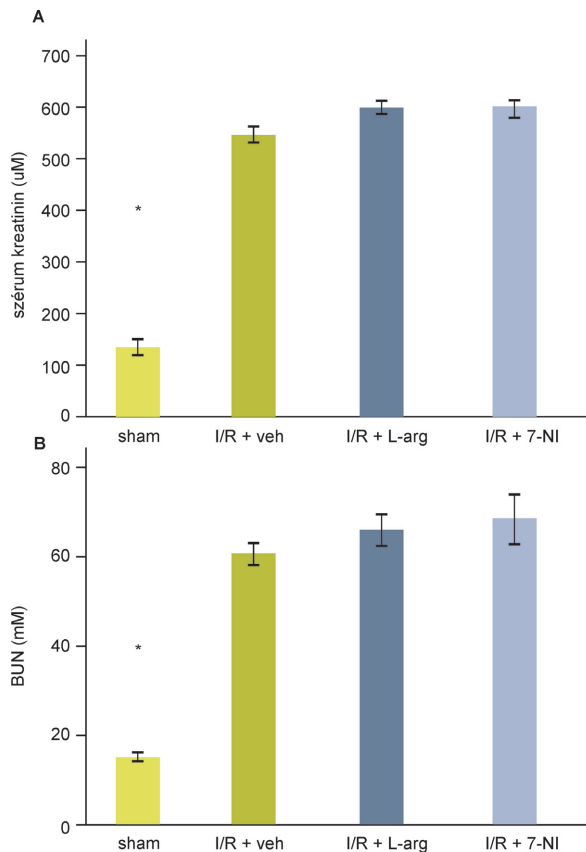
Eredmények

Az L-arginin és 7-NI kezelés hatása a vese I/R károsodására

Az ischaemiás inzultust követően mindhárom csoportban szignifikánsan emelkedett szérumszintű kreatinin és BUN értéket találtunk az áloperált állatokhoz képest, mely az ischaemia hatására kialakult súlyos akut veseelégtelenséget jelzi.

Nem találtunk azonban különbséget az I/R kezelési csoportok és a vivőanyag kezelt (I/R+veh) állatok között ($P > 0,05$) (1A-B ábra).

Mindhárom I/R csoportban súlyos ischaemiás károsodás szöveti képe alakult ki az áloperált állatokhoz képest. Súlyos tubuláris nekrozis, a vesetubulusokban hialin felgyűlése, a glomerulusok összeesése, illetve vaszkuláris károsodás alakult ki (5. táblázat). Nem találtunk ugyanakkor különbséget a kezelési csoportok és a vivőanyag kezelt I/R csoport között a szöveti károsodás mértékét illetően ($P > 0,05$) (2. ábra).



1. ábra

Áloperált (sham) és vivőanyaggal (I/R+veh), L-argininnel (I/R+L-arg), ill. 7-nitroindazollal kezelt (I/R+7-NI) vese ischaemiát szenvedett patkányok szérumszintű kreatinin- (1A) és BUN (1B) értéke. * $P < 0,01$ vs. I/R+veh, I/R+L-arg, I/R+7-NI

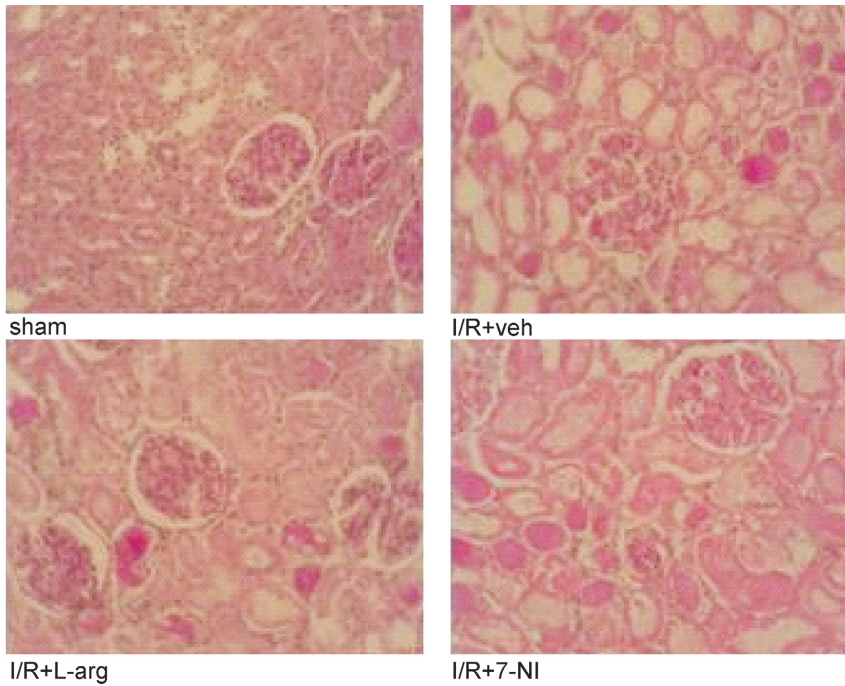
A TUNEL festés segítségével meghatározott apoptotikus sejtek száma szignifikánsan magasabb volt az ischaemiás károsodást szenvedett patkányok veséjében áloperált állatokhoz képest ($P < 0,01$). Nem találtunk ugyanakkor különbséget a kezelt csoportok és a vivőanyag kezelt I/R állatok között az apoptotikus sejtek számában ($P > 0,05$) (3. ábra).

5. táblázat

A vese károsodás histológiai mértékének kiértékelése

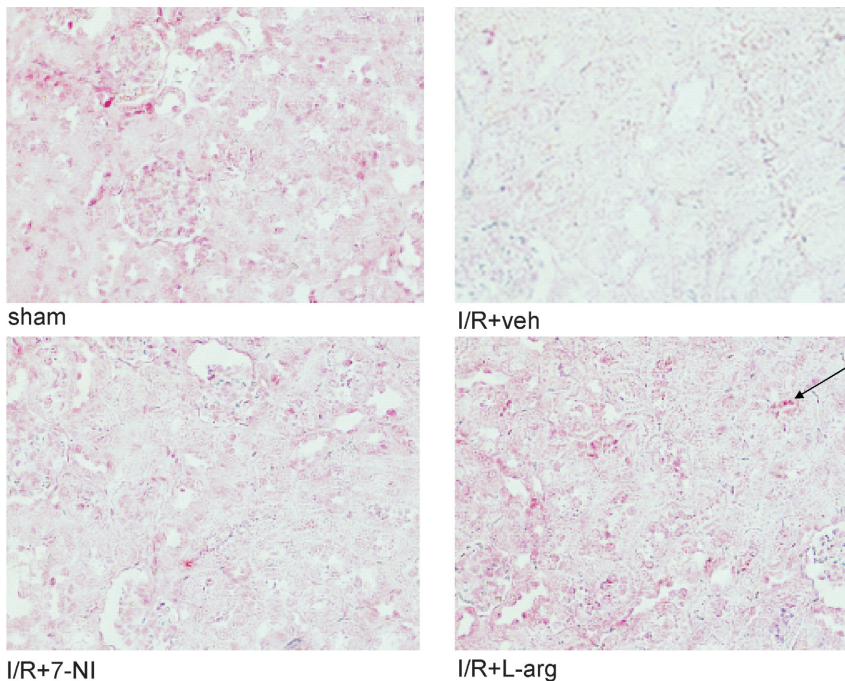
Csoport	Glomeruláris károsodás (score 0-3)	Vaszkuláris károsodás (score 0-3)	Tubuláris károsodás (score 0-3)
Áloperált (sham)	0,43±0,49*	0±0*	0,86±0,6*
I/R+veh	1,86±0,64	0,71±0,45	3±0
I/R+L-arg	1,75±0,66	0,87±0,93	3±0
I/R+7-NI	1,57±1,17	1±0,53	3±0

* $P < 0,01$ vs. I/R+veh, I/R+L-arg, I/R+7-NI



2. ábra

Áloperált (sham), valamint vivőanyaggal (I/R+veh), L-argininnel (I/R+L-arg) és 7-nitroindazollal kezelt (I/R+7-NI) patkányok postischaemiás veséjének HE-nal festett szövettani képe



3. ábra

Áloperált állatok (sham), illetve vivőanyag kezelt (I/R+veh), valamint L-argininnel (I/R+L-arg) és 7-nitroindazollal (I/R+7-NI) kezelt patkányok postischaemiás veséjének TUNEL módszerrel festett képe (a nyíl egy TUNEL-pozitív tubulus-sejtre mutat)

Az L-arginin és 7-NI I/R hatása a nNOS, iNOS és eNOS mRNS és fehérje expressziójára

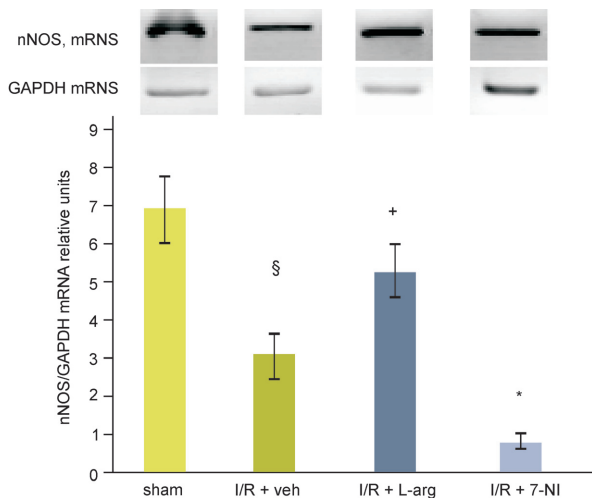
A nNOS mRNS expressziója szignifikánsan csökkent ($P < 0,05$), az iNOS mRNS expressziója szignifikánsan emelkedett ($P < 0,05$), ugyanakkor az eNOS mRNS expressziója nem változott az I/R+veh csoportban sham operált állatokhoz képest (4., 5., 6. ábra).

Az iNOS fehérje expressziója a mRNS expresszióhoz megfelelő mértékben emelkedett ($P < 0,05$), az eNOS fe-

hérje expressziója szignifikánsan csökkent ($P < 0,05$) az I/R+veh csoportban áloperált állatokhoz viszonyítva (7., 8. ábra).

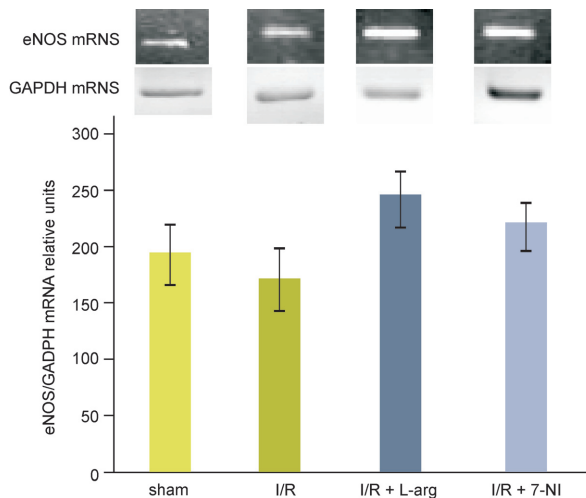
L-arginin alkalmazása mindhárom NOS enzim izoforma mRNS expresszióját növelte a vivőanyag kezelt I/R csoporthoz képest ($P < 0,05$) (4., 5., 6. ábra).

Ezzel szemben a vizsgált NOS izoformák közül csak az iNOS fehérje expressziója emelkedett szignifikánsan az L-arginin kezelt csoportban ($P < 0,05$) (7. ábra), az eNOS fehérje expressziójában nem találtunk szignifikáns kü-



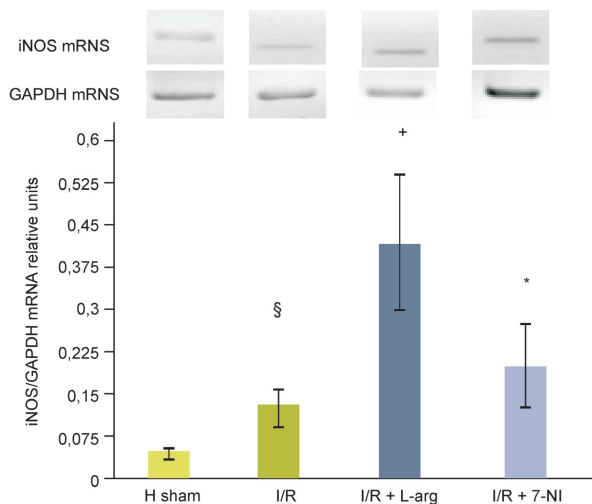
4. ábra

A nNOS mRNA expressziójának meghatározása RT-PCR technikával áloperált állatokban (sham), valamint vivőanyaggal (I/R+veh) és L-argininnel (I/R+L-arg), ill. 7-nitroindazollal kezelt (I/R+7-NI) patkányok postischaemiás veséjében. § $P < 0,05$ vs. sham, * $P < 0,05$ vs. sham, I/R+veh, + $P < 0,05$ vs. I/R+veh



6. ábra

Az eNOS mRNA expressziójának meghatározása RT-PCR technikával áloperált állatokban (sham), valamint vivőanyaggal (I/R+veh) és L-argininnel (I/R+L-arg), ill. 7-nitroindazollal kezelt (I/R+7-NI) patkányok postischaemiás veséjében



5. ábra

Az iNOS mRNA expressziójának meghatározása RT-PCR technikával áloperált állatokban (sham), valamint vivőanyaggal (I/R+veh) és L-argininnel (I/R+L-arg), illetve 7-nitroindazollal kezelt (I/R+7-NI) patkányok postischaemiás veséjében. § $P < 0,05$ vs. sham, * $P < 0,05$ vs. I/R+veh, + $P < 0,05$ vs. I/R+veh.

lönbséget a vivőanyaggal kezelt csoporthoz képest ($P > 0,05$) (8. ábra).

A 7-NI kezelés csökkentette a nNOS mRNA expresszióját ($P < 0,01$ vs. I/R+veh) (4. ábra), de nem gyakorolt hatást az iNOS és eNOS mRNA expressziójára vivőanyaggal kezelt állatokhoz képest ($P > 0,05$) (5., 6. ábra).

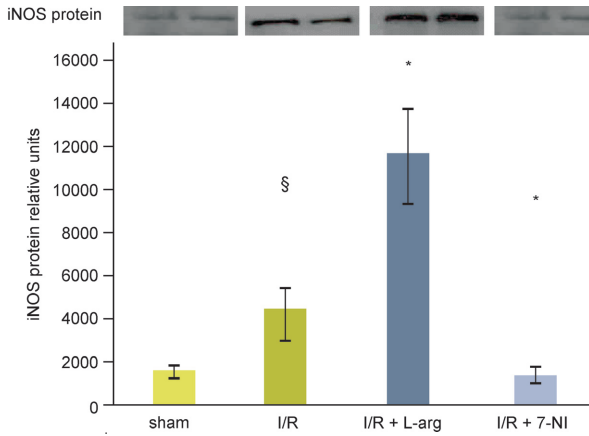
A 7-NI kezelt állatokban az iNOS fehérje expressziója csökkent ($P < 0,05$ vs. I/R+veh) (7. ábra), míg az eNOS fehérje szintézise nem változott a vivőanyag kezelt patkányokhoz képest ($P > 0,05$) (8. ábra).

Az eNOS 27-bp repeat és T⁻⁷⁸⁶C polimorfizmusok gyakorisága és a koraszülöttek retinopathiája közötti kapcsolat

Az allélspecifikus PCR reakció segítségével végzett genotipizálás során az eNOS 27-bp repeat polimorfizmus genotípus eloszlása szignifikánsan különbözött a ROP miatt kezelt és nem kezelt kissúlyú koraszülöttek között ($P = 0,015$). Ugyanakkor nem találtunk különbséget az eNOS T⁻⁷⁸⁶C polimorfizmus megoszlásában a két vizsgálati csoport között ($P = 0,984$) (6. táblázat).

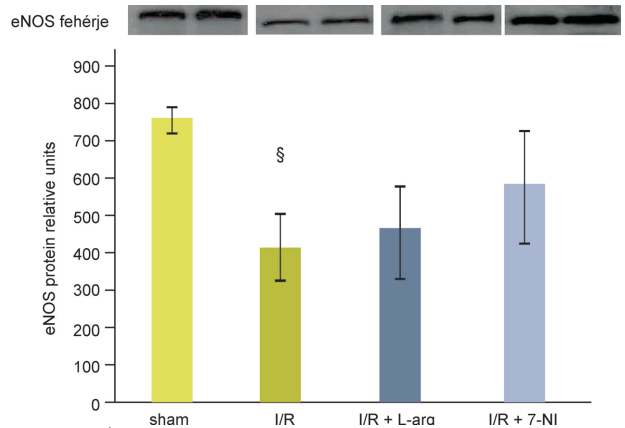
Az eNOS 27-bp repeat és T polimorfizmusok allél frekvenciák meghatározása során azt találtuk, hogy sem az eNOS 27-bp repeat „a”, sem az eNOS ⁻⁷⁸⁶C mutáns allél frekvenciája nem különbözött a két vizsgálati csoportot összehasonlítva ($P = 0,153$ és $P = 0,867$) (7. táblázat).

Logisztikus regressziós vizsgálat segítségével ki tudtuk mutatni, hogy a homozigóta mutáns „aa” genotípus és



7. ábra

Az iNOS fehérje szintjének meghatározása Western blot technikával áloperált állatokban (sham), valamint vivőanyaggal (I/R+veh) és L-argininnel (I/R+L-arg), ill. 7-nitroindazollal kezelt (I/R+7-NI) patkányok postischaemiás veséjében. § $P < 0,05$ vs. sham, * $P < 0,05$ vs. I/R+veh



8. ábra

Az eNOS fehérje szintjének meghatározása Western blot technikával áloperált állatokban (sham), valamint vivőanyaggal (I/R+veh) és L-argininnel (I/R+L-arg), illetve 7-nitroindazollal kezelt (I/R+7-NI) patkányok postischaemiás veséjében. § $P < 0,05$ vs. sham.

6. táblázat

Az eNOS 27-bp repeat és eNOS $T^{786}C$ polimorfizmusok genotípus-megoszlása retinopathia miatt kezelt és nem kezelt kissúlyú koraszülöttekben

POLIMORFIZMUS	GENOTÍPUS	ROP MIATT NEM KEZELT KISSÚLYÚ KORASZÜLÖTTEK (N=127)	ROP MIATT KEZELT KISSÚLYÚ KORASZÜLÖTTEK (N=105)	ODDS RATIO (95% CI)	P ÉRTÉK
eNOS 27-bp repeat (b/a)	bb	90	60	1,82 (1,14-2,91)	0,015
	ab	36	39		
	aa	1	6		
eNOS $T^{786}C$	TT	55	47	0,95 (0,64-1,40)	0,984
	TC	60	49		
	CC	12	9		

7. táblázat

Az eNOS 27-bp repeat és eNOS $T^{786}C$ polimorfizmusok allél frekvenciája retinopathia miatt kezelt és nem kezelt kissúlyú koraszülöttekben

POLIMORFIZMUS	ALLÉL	ROP MIATT NEM KEZELT KISSÚLYÚ KORASZÜLÖTTEK (%)	ROP MIATT KEZELT KISSÚLYÚ KORASZÜLÖTTEK (%)	ODDS RATIO (95% CI)	P ÉRTÉK
eNOS 27-bp repeat (b/a)	b / a	85% / 15%	76% / 24%	1,79 (0,87-3,66)	0,153
eNOS $T^{786}C$	T / C	67% / 33%	68% / 32%	0,95 (0,64-1,40)	0,867

a kezelést igénylő ROP kialakulása között szignifikáns összefüggés van ($P=0,047$ vs. „ab” genotípus és $P=0,022$ vs. „bb” genotípus).

Továbbá eredményeink azt mutatták, hogy a fiú nem és a ROP kialakulása között is kapcsolat van ($P=0,046$ vs. lányok) (8. táblázat).

A haplotípus eloszlásokat megvizsgálva azt találtuk, hogy az eNOS aT és bT haplotípusok gyakorisága szignifikánsan magasabb a ROP kezelést igénylő koraszülöttekben a nem kezeltékhez képest ($P=0,0001$ és $P=0,0036$) (9. táblázat).

8. táblázat

A többszörös logisztikus regresszió eredménye

VÁLTOZÓ	ODDS RATIO (95% CI)	P ÉRTÉK
Fiú nem	1,87 (1,26-4,15)	0,046
Gesztációs kor	0,87 (0,71-1,02)	0,071
Oxigénkezelés időtartama	1,20 (0,99-1,40)	0,082
Gesztációs kor: oxigénkezelés időtartama	0,99 (0,98-1,00)	0,117
eNOS 27-bp repeat aa vs. ab	0,10 (-2,13- 2,34)	0,047
eNOS 27-bp repeat aa vs. bb	0,08 (-2,12-2,28)	0,022

Megbeszélés

Munkánk során vizsgáltuk a nNOS, iNOS és eNOS izoformák expressziójának változását postischaeмиás patkányok veséjében az ischaemiás inzultust követően 24 órával.

A két konstitutív izoforma közül a nNOS mRNS expressziója csökkent, az eNOS mRNS expressziója ugyanakkor nem változott a vesében. Az iNOS mRNS expressziója ezzel szemben szignifikánsan emelkedett álloperált patkányokhoz viszonyítva. Fehérjeexpressziós szinten ugyanakkor csökkenést tudunk kimutatni az eNOS esetében is, az iNOS fehérje szintje pedig az mRNS expressziójának megfelelően emelkedett.

Eredményeink összhangban vannak a szakirodalomban eddig megjelent, az iNOS expresszióját vese I/R károsodás során vizsgáló munkával. *Okusa és mtsai* szerint az iNOS aktivitás megemelkedik az I/R vesekárosodás első 24 órájában a vese kortextben és a medullában a mért nitrit és nitrát felszabadulás alapján (31). A reperfüziót követő 7. napra a kortextben visszatér a normális szintre, de a medullában továbbra is emelkedett marad a szintje. *Kosaka és mtsai*-nak (32), valamint *Vinas és mtsai*-nak megfigyelései szerint az iNOS enzim mRNS és fehérje expressziója már 7 órával az ischaemiát követően megnövekszik a veseszövetben (33).

Az ischaemiát követően a veseszövetben kialakuló acidózis, valamint a TNF- felszabadulás képes csökkenteni az eNOS expresszióját. Kísérleteink során mi is az

eNOS fehérje expresszió csökkenését detektáltuk a postischaeмиás veseszövetben álloperált állatokhoz képest.

A nNOS mRNS expressziójában csökkenést tudunk kimutatni az ischaemiás inzultust követően 24 órás reperfüzió után. *Vinas és mtsai* ugyanakkor nem találtak változást a nNOS mRNS expressziójában (33). Bár hasonló tendenciájú változást (csökkenés) figyeltek meg, ez nem érte el a szignifikancia szintjét. Ennek oka az lehet, hogy az idézett munkában 50 perc helyett 45 perces ischaemiás időt alkalmaztak. A nNOS a veseszövetben a legnagyobb mennyiségben a macula densa sejtekben, illetve az idegvégződéseken van jelen, de megtalálható az endotél és tubulus sejtekben is. Feltételezzük, hogy a kísérleteink során detektált nNOS expresszió csökkenésének oka az I/R károsodás következtében kialakult tubulus sejt pusztulás és az endoteliális funkció zavar.

Munkánk második célkitűzése az volt, hogy megvizsgáljuk az L-arginin kezelés hatását vese I/R károsodásban. A károsodott vese szövettani vizsgálata, illetve a vese-funkciós paraméterek változása azt mutatták, hogy az L-arginin alkalmazása nem befolyásolta a vese I/R károsodásának mértékét. Nem találtunk továbbá különbséget a TUNEL-pozitív apoptotikus sejtek számában sem a vivőanyag kezelt csoporthoz képest.

Eredményeink összhangban vannak *Raff és mtsai*-nak vizsgálataival, akik kísérleteik során megfigyelték, hogy sem az ischaemia alatt, sem a reperfüzió első 14 napja alatt alkalmazott L-arginin kezelés nem változtatta meg a szöveti károsodás, illetve apoptózis mértékét vese I/R károsodást követően (34).

9. táblázat

Az eNOS 27-bp repeat és eNOS T⁷⁸⁶C polimorfizmusok genotípus megoszlása alapján becsült haplotípusok megoszlása retinopathia miatt kezelt és nem kezelt kissúlyú koraszülöttekben

POZÍCIÓ		ROP MIATT NEM KEZELT KISSÚLYÚ KORASZÜLÖTTEK (%)	ROP MIATT KEZELT KISSÚLYÚ KORASZÜLÖTTEK (%)	ODDS RATIO (95% CI)	P ÉRTÉK
27-bp repeat	-786				
a	T	7	28	0,19 (0,09-0,45)	0,0001
a	C	17	17	1,01 (0,51-2,00)	0,971
b	T	85	97	0,17 (0,05-0,58)	0,004
b	C	48	47	1,06 (0,63-1,77)	0,940

Ezzel szemben több kísérleti munka az L-arginin adás protektív vagy ezzel éppen ellenkező, azaz káros hatását igazolta vese I/R károsodásban (35, 36). A különböző eredményeket diszkrétulva azonban nagyon fontos megjegyezni, hogy a legtöbb vizsgálatban különböző dózisban, eltérő időn keresztül és más beviteli úton alkalmazták az L-arginint. A legtöbb munka esetében eltérő volt az ischaemiás és reperfüziós idő is.

Jerkic és mtsai az ischaemia előtt négy hétig szájon át kezelték a patkányokat L-argininnel (35). Kutatócsoportunk a jelen vizsgálatban az ischaemia előtt 7 napig szájon át alkalmazta az L-arginint. Az L-arginin dózisa 2 g/ttkg/nap volt, amely megfelel Jerkic és mtsai által alkalmazott dózishoz. Feltételezzük, hogy kísérleteinkben *Jerkic és munkatársainak* eredményeivel szemben azért nem fejtett ki hatást az L-arginin a veseszövet károsodásának kialakulására, mert hosszabb ischaemiás időt alkalmaztunk.

Schramm és mtsai a reperfüzió alatt intravénásan kezelték a patkányokat L-argininnel és Jerkic és mtsainak vizsgálatához hasonlóan ki tudták mutatni, hogy az L-arginin adása csökkentette a vese postischaemiás károsodását (36). Ezzel szemben Raff és mtsai-nak már korábban idézett vizsgálat sorozatában a reperfüzió alatt alkalmazott L-arginin nem befolyásolta a vesekárosodást (34).

Tome és mtsai ugyanazon kísérlet sorozaton belül tudták megfigyelni, hogy a közvetlenül ischaemia előtt alkalmazott L-arginin javította, de a reperfüzió után 7 napon át ugyanabban a dózisban alkalmazott L-arginin rontotta a vese funkcióját vese ischaemiát követően (37).

Szívizom-ischaemiában a különböző időpontokban adott L-arginin szintén egymással ellentétes hatást fejt ki (38). Tíz perccel az ischaemia kiváltása előtt, illetve 50 perccel az ischaemia után adott L-arginin (korai kezelés) javította a szív pumpafunkcióját, ugyanakkor az ischaemiát követően 3 és 4 órával (késői kezelés) alkalmazott L-arginin rontotta azt. Összefoglalva, az L-arginin postischaemiás szöveti károsodásra kifejtett hatását kritikusán befolyásolja az alkalmazásának ideje (ischaemia előtt vagy után), illetve időtartama.

Jelen munkánkban sikerült kimutatnunk azt is, hogy az L-arginin megemeli mindhárom NOS izoforma mRNS expresszióját. A legnagyobb, közel két és félszeres emelkedést az iNOS mRNS expressziójában tudtuk megfigyelni, mely összhangban van azzal, hogy a vizsgált fehérje expressziók közül az iNOS esetében detektáltunk emelkedést, míg az eNOS fehérje szintjében nem tudtunk változást kimutatni.

Az iNOS által termelt NO fokozza a szöveti károsodást vese I/R-ban (39), ezzel szemben az eNOS által termelt NO-nak számos tubulus és endotél sejt védő hatást tulajdonítanak (33). Feltételezzük, hogy az L-arginin hatása nagy mértékben függ attól, hogy az adott vizsgálati modellben – mint az NO-szintézis szubsztrátja – melyik izoforma működését milyen mértékben befolyásolja.

A kísérleti protokoll, az L-arginin alkalmazásának időpontja és időtartama, illetve dózisa alapvetően befolyásolhatja azt, hogy az adott vizsgálati időpontban melyik izoformára milyen hatást fejt ki, hiszen a NOS izoformák expressziója is dinamikusan, az ischaemiás inzultust köve-

tően eltelt időtől függően változik vese I/R károsodásban. Feltételezzük, hogy az iNOS expressziójának emelkedése lehet részben annak oka, hogy az L-arginin adás munkánkban nem bizonyult protektívnek.

A NOS a vese ischaemia indukálta akut károsodásában betöltött szerepével kapcsolatban nagyon kevés szakirodalmi háttérrel rendelkezünk. A nNOS izoformát először az idegrendszer sejtjeiben tudták kimutatni, ahol a NO elsősorban neurotranszmitterként funkcionál. Éppen ezért nem meglepő, hogy a legtöbb, a nNOS és a hypoxia/ischaemia indukált károsodás összefüggéseit vizsgáló munka is idegrendszeri modellt használ. A nNOS szelektív gátlása, valamint a nNOS gén deléciója csökkenti az agyi infarktusz kiterjedését (40, 41).

Hogy megvizsgáljuk a nNOS a vese postischaemiás károsodásában betöltött szerepét, a patkányok egy csoportját szelektív nNOS gátlószerezellel, 7-NI-vel kezeltük az ischaemia indukciója előtt. Eredményeink azt mutatták, hogy a 7-NI kezelés nem változtatta meg a vese hisztológiai károsodásának mértékét, illetve a vesefunkció romlását, valamint nem találtunk különbséget a TUNEL-pozitív apoptotikus sejtek számában sem.

Hasonló megfigyelést tettek *Vinas és mtsai*, akiknek a már korábban többször idézett munkájában a 7-NI kezelés nem fejtett ki hatást a vese postischaemiás károsodására (33). A nNOS és az általa szintetizált NO a vesén belül többek között az afferens arteriolák dilatációjáért felelős, így elsősorban a tubulo-glomeruláris feedback szabályozásában tölt be központi szerepet. A nNOS szelektív gátlása 7-NI adásával csökkenti a tubulo-glomeruláris feedback felé megnyilvánuló érzékenységet (42). Diabétesz, ill. magas vérnyomás betegség okozta végstádiumú vesebetegségben csökken a nNOS szintje a veseszövetben. A krónikus vesekárosodás mértéke csökkenthető a nNOS aktivitás emelésével, mely utal a nNOS védő szerepére. Alacsony nNOS expressziót mutató vese krónikus vesekárosodás modelljében gyorsabb progressziót mutat a különböző károsító tényezőkkel szemben (43).

Ezzel szemben jelen vizsgálatunk eredménye *Vinas és mtsai*-nak eredményeivel összhangban azt támasztja alá, hogy a nNOS akut ischaemiás vesekárosodásban nem játszik központi szerepet, mivel az enzim gátlása nem okozott változást a károsodás kimenetelében. Mindezek alapján feltételezzük, hogy a nNOS elsősorban a finom hemodinamikai szabályozó folyamatokban vesz részt a vesében, olyan akut károsodás modellekben, mint az vese I/R, nem jut jelentős szerephez.

Kísérleteink során megvizsgáltuk a 7-NI a különböző NOS enzim izoformák expressziójára kifejtett hatását is. A 7-NI szignifikánsan csökkentette a nNOS mRNS expresszióját. Ez utalhat arra, hogy az enzim működésének gátlása elnyomja az enzim termelődését. Továbbá a 7-NI csökkentette az iNOS fehérje szintézisét is. Eredményeinkkel összhangban *Qu XW és mtsai* szintén leírták, hogy 7-NI szisztémás alkalmazása csökkentette az iNOS szintjét az ileumban és hasonló tendenciát tudtak megfigyelni a vesében is (44).

In vitro végzett vizsgálatok korábban igazolták, hogy a 7-NI gátolhatja az iNOS működését is, ugyanakkor nem specifikus iNOS gátló hatást nem találtak még *in vivo*.

Bár *Wolff és mtsai* in vitro vizsgálataikban azt is megtudták figyelni, hogy a 7-NI adása gátolta az eNOS aktivitását, vizsgálatainkban nem találtunk különbséget az eNOS mRNS, illetve fehérje expressziójában 7-NI kezelést követően (45).

Összefoglalva mind az L-arginin, mind a 7-NI megváltoztatta a NOS enzimek expresszióját I/R károsodást követően a vesében, súlyos postschaemiás vesekárosodás kimenetelét azonban nem befolyásolja.

Munkánk második felében elsőként vizsgáltuk az eNOS T^{-786C}, valamint 27-bp repeat polimorfizmusok és a koraszülöttek retinopathiájának kapcsolatát. Kimutattuk, hogy a csökkent eNOS termeléssel járó eNOS 27-bp repeat polimorfizmus genotípusának megoszlása különbözik a ROP miatt kezelt és nem kezelt kissúlyú koraszülöttek között. Többszörös logisztikus regresszió segítségével igazoltuk, hogy az eNOS „aa” homozigóta mutáns genotípus és a ROP kialakulása között összefüggés van.

Az eNOS T^{-786C} polimorfizmus genotípusainak gyakoriságát vizsgálva nem mutatkozott különbség a ROP miatt kezelt és nem kezelt koraszülöttek között. Nem volt különbség a mutáns T^{-786C} allél megoszlásában sem a két vizsgálati csoport között.

A 27-bp repeat polimorfizmus funkcionális polimorfizmus, melynek szerepe van az eNOS enzim termelésének szabályozásában: szoros összefüggést lehet kimutatni az eNOS 27-bp repeat polimorfizmus jelenléte és a plazma NO metabolitok szintje között (46): az „a” allélt hordozókban szignifikánsan alacsonyabb a NO metabolitok szintje (47).

A ROP első fázisára a születés utáni relatív hyperoxiának kitett retinában meginduló vazooobliteráció jellemző. NOS gátlószer alkalmazása patkányokban, illetve az eNOS gén kiütése egerekben csökkenti a megjelenő a hiperoxia következtében kialakult vazooobliteráció mértékét a retinában (48, 49).

A ROP második fázisára a vazooobliteráció következtében kialakult retinális hypoxiára adott patológias érújdonképződés, a neovaszkularizáció a jellemző. Az eNOS közvetíti részben az endotél sejtek egyik legfontosabb mitogén faktorának, a VEGF proangiogenetikus hatását, így központi szerephez jut az angiogenezisben.

Ando és mtsai kimutatták, hogy eNOS knock-out egerekben az ischaemia talaján létrejött retinopathiában szignifikánsan kisebb mértékben zajlik a neovaszkularizáció

(50), mely azt sugallja, hogy az eNOS fokozza a koraszülöttek retinopathiájának patogenezisében megjelenő folyamatok súlyosságát.

Ezzel szemben eredményeink ellenkező összefüggést mutattak, hiszen a csökkent eNOS termeléssel járó genetikai polimorfizmus azokban a koraszülöttekben volt gyakoribb, akikben kialakult a kezelésre szoruló retinopathia. Ennek a meglepő eredménynek egyik lehetséges magyarázatául szolgálhat az, hogy *Campochiaro* vizsgálataiban megfigyelte, hogy alacsony koncentrációban termelődő NO képes megnövelni a VEGF termelődését, majd ezen keresztül fokozza a neoangiogenezis mértékét (51).

Léteznek a szakirodalomban olyan megfigyelések is, melyek szerint a NO meghatározott körülmények között képes gátolni az angiogenezis folyamatát. Egér implantációs, illetve csirke chorioallantois membrán modellekben sikerült az angiogenezist NO donor molekulával gátolni (52). Hangai és mtsai figyelték meg azt, hogy a konstitutív NOS enzimek együttes gátlása patkányokban csökkenti a retina ischaemiával szembeni toleranciáját (53). Utóbbi megfigyelések arra utalnak, hogy az eNOS protektív szerepet játszhat a retina ischaemiás károsodásának kialakulásával szemben – feltételezhetően – a vazodilatáció fokozásán keresztül.

Mindezek alapján feltételezzük, hogy a ROP első fázisában a hyperoxia által indukált vazooobliteráció csökkent mértékben zajlik azokban a koraszülöttekben, akikben az eNOS a normál szintnek megfelelően működik a mutáns 27-bp repeat „a” allélt hordozókkal szemben. Ez magyarázatául szolgálhat annak, hogy vizsgálatainkban miért figyeltük meg a csökkent NO-szinttel járó polimorfizmus gyakoribb előfordulását ROP miatt kezelt kissúlyú koraszülöttekben. *Campochiaro és mtsai*-nak eredményei alapján szintén feltételezzük, hogy a mutáns allél miatt a fiziológiásnál alacsonyabb koncentrációban termelődő NO a VEGF szintézisének emelésén keresztül fokozott neovaszkulogenezist indukálhat a ROP második fázisában a polimorfizmust hordozó koraszülöttek retinájában. Ahhoz azonban, hogy ezt a hipotézist bizonyítani tudjuk, a VEGF helyi szintjének detektálására lenne szükség.

Összefoglalva, munkánk során elsőként tudtuk kimutatni, hogy az eNOS 27-bp repeat polimorfizmus a kezelést igénylő ROP kialakulásának független rizikófaktora. Ugyanakkor nem találtunk összefüggést a ROP kialakulása és az eNOS T^{-786C} genetikai polimorfizmus között.

A munkából készült angol nyelvű közlemények

- Rusai K, Fekete A, Szebeni B, Vannay A, Bokodi G, Müller V, Viklicky O, Bloudickova S, Rajnoch J, Heemann U, Reusz G, Szabó A, Tulassay T, Szabó AJ. Effect of inhibition of neuronal nitric oxide synthase and L-arginine supplementation on renal ischaemia-reperfusion injury and the renal nitric oxide system. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2008; 35:1183-9.
- Rusai K, Vannay A, Szebeni B, Borgulya G, Fekete A, Vásárhelyi B, Tulassay T, Szabó AJ. Endothelial nitric oxide synthase gene T-786C and 27-bp repeat gene polymorphisms in retinopathy of prematurity. *Mol Vis* 2008; 14:286-90.

Irodalom

1. Szabó A, Müller V. A transzplantált vese hosszú távú működését befolyásoló faktorok. *Orv Hetil* 2002; 143(51):2811-19.
2. Brezis M, Rosen SN, Epstein FH. The pathophysiological implications of medullary hypoxia. *AM J Kid Dis* 1989; 13:253-58.

3. Lieberthal W, Menza SA, Levine JS. Graded ATP depletion can cause necrosis or apoptosis of cultured mouse proximal tubular cells. *Am J Physiol* 1998; 274:315-27.
4. Sylvester CL. Retinopathy of prematurity. *Semin Ophthalmol* 2008; 23(5):318-23.
5. Chen J, Smith LE. Retinopathy of prematurity. *Angiogenesis* 2007; 10:133-40.
6. Gibbons GH, Dzau VJ. The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med* 1994; 330:1431-38.
7. Murohara T, Witzensbichler B, Spyridopoulos I, Asahara T, Ding B, Sullivan A, Losordo DW, Isner JM. Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:1156-61.
8. Hibbs JB Jr. Synthesis of nitric oxide from L-arginine: a recently discovered pathway induced by cytokines with antitumour and antimicrobial activity. *Res Immunol* 1991; 142(7):565-69.
9. Dawson TM, Sasaki M, Gonzalez-Zulueta M, Dawson VL. Regulation of neuronal nitric oxide synthase and identification of novel nitric oxide signaling pathways. *Prog Brain Res* 1998; 118:3-11.
10. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 1999; 399(6736):597-601.
11. Boo YC, Jo H. Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 285(3):499-508.
12. Li Y, Zheng J, Bird IM, Magness RR. Mechanisms of shear stress-induced endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation and expression in ovine fetoplacental artery endothelial cells. *Biol Reprod* 2004; 70(3):785-96.
13. Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin Exp Immunol* 1998; 113(2):147-56.
14. Bredt DS. Sorting out genes that regulate epithelial and neuronal polarity. *Cell* 1998; 94(6):691-94.
15. Lowenstein CJ, Hill SL, Lafond-Walker A, Wu J, Allen G, Landavere M, Rose NR, Herskowitz A. Nitric oxide inhibits viral replication in murine myocarditis. *J Clin Invest* 1996; 97(8):1837-43.
16. Krumenacker JS, Hanafy KA, Murad F. Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. *Brain Res Bull.* 2004; 62(6):505-15.
17. Chlichlia K, Peter ME, Rocha M, Scaffidi C, Bucur M, Krammer PH, Schirmacher V, Umansky V. Caspase activation is required for nitric oxide-mediated, CD95 (APO-1/Fas)-dependent and independent apoptosis in human neoplastic lymphoid cells. *Blood* 1998; 91(11):4311-20.
18. Ing DJ, Zang J, Dzau VJ, Webster KA, Bishopric NH. Modulation of cytokine-induced cardiac myocyte apoptosis by nitric oxide, Bak, and Bcl-x. *Circ Res* 1999; 84(1):21-33.
19. Manderscheid M, Messmer UK, Franzen R, Pfeilschifter J. Regulation of inhibitor of apoptosis expression by nitric oxide and cytokines: relation to apoptosis induction in rat mesangial cells and raw 264.7 macrophages. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12(6):1151-63.
20. Balakirev MYu, Khramtsov VV, Zimmer G. Modulation of the mitochondrial permeability transition by nitric oxide. *Eur J Biochem* 1997; 246(3):710-18.
21. Zech B, Köhl R, von Knethen A, Brüne B. Nitric oxide donors inhibit formation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome and activation of caspases. *Biochem J* 2003; 371:1055-64.
22. Ziche M, Morbidelli L, Choudhuri R, Zhang HT, Donnini S, Granger HJ, Bicknell R. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *J Clin Invest* 1997; 99:2625-34.
23. Hood JD, Meininger CJ, Ziche M, Granger HJ. VEGF upregulates eNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *Am J Physiol* 1998; 274:1054-8.
24. Feng Y, Venema VJ, Venema RC, Tsai N, Caldwell RB. VEGF induces nuclear translocation of Flk-1/KDR, endothelial nitric oxide synthase, and caveolin-1 in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 256:192-97.
25. Dimmeler S, Rippmann V, Weiland U, Haendeler J, Zeiher AM. Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide. *Circ Res* 1997; 81:970-76.
26. Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H, Motoyama T, Saito Y, Ogawa Y, Miyamoto Y, Nakao K. T-786—>C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation* 1999; 99:2864-70.
27. Ohtoshi K, Yamasaki Y, Gorogawa S, Hayaishi-Okano R, Node K, Matsuhsu M, Kajimoto Y, Hori M. Association of (-)786T-C mutation of endothelial nitric oxide synthase gene with insulin resistance. *Diabetologia* 2002; 45:1594-601.
28. Tsukada T, Yokoyama K, Arai T, Takemoto F, Hara S, Yamada A, Kawaguchi Y, Hosoya T, Igari J. Evidence of association of the eNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 245:190-93.
29. Strehlau J, Pavlakis M, Lipman M, Maslinski W, Shapiro M, Strom TB. The intragraft gene activation of markers reflecting T-cell-activation and -cytotoxicity analyzed by quantitative RT-PCR in renal transplantation. *Clin Nephrol* 1996; 46:30-33.
30. Nasreen S, Nabika T, Shibata H, Moriyama H, Yamashita K, Masuda J, Kobayashi S. T-786C polymorphism in endothelial NO synthase gene affects cerebral circulation in smokers: possible gene-environmental interaction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22:605-10.
31. Okusa MD. The inflammatory cascade in acute renal failure. *Nephron* 2002; 90:133-38.
32. Kosaka H, Yoneyama H, Zhang L, Fujii S, Yamamoto A, Igarashi J. Induction of LOX-1 and iNOS expressions by ischemia-reperfusion of rat kidney and the opposing effect of L-arginine. *FASEB J* 2003; 17:636-43.
33. Vinas JL, Sola A, Genesca M, Alfaro V, Pi F, Hotter G. NO and NOS isoforms in the development of apoptosis in renal ischemia/reperfusion. *Free Radic Biol Med* 2006; 40:992-603.
34. Raff U, Schneider R, Gambaryan S, Seibold S, Reber M, Vornberger N, Freund R, Schramm L, Wanner C, Galle J. L-Arginine does not affect renal morphology and cell survival in ischemic acute renal failure in rats. *Nephron Physiol.* 2005; 101:39-50.
35. Jerkić M, Varagić J, Jovović D, Radujković-Kuburović G, Nastić-Mirić D, Adanja-Grujić G, Marković-Lipkovići J, Dimitrijević J, Miloradović Z, Vojvodić SB. L-arginine reduces tubular cell injury in acute post-ischaemic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14:1398-07.
36. Schramm L, Heibredere E, Schmitt A, Kartenbender K, Zimmermann J, Ling H, Heidland A. Role of L-arginine-derived NO in ischemic acute renal failure in the rat. *Ren Fail* 1994; 16:555-69.
37. Tomé LA, Yu L, de Castro I, Campos SB, Seguro AC. Beneficial and harmful effects of L-arginine on renal ischaemia. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14:1139-45.
38. Wang X, Liang F, Jiao X, Liu L, Bai X, Li M, Zhi J, Liu H. Diverse effects of L-arginine on cardiac function of rats subjected to myocardial ischemia and reperfusion in vivo. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2007; 39:201-07.
39. Ling H, Edelstein C, Gengaro P. Attenuation of renal ischemia-reperfusion injury in inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Am J Physiol* 1999; 277:383-90.
40. Huang Z, Huang PL, Panahian N, Dalkara T, Fishman MC, Moskowitz MA. Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science* 1994; 265:1883-5.

41. Panahian N, Yoshida T, Huang PL et al. Attenuated hippocampal damage after global cerebral ischemia in mice mutant in neuronal nitric oxide synthase. *Neuroscience* 1996; 72:343–54.
42. Brown R, Ollerstam A, Persson AE. Neuronal nitric oxide synthase inhibition sensitizes the tubuloglomerular feedback mechanism after volume expansion. *Kidney Int* 2004; 65:1349–56.
43. Szabo AJ, L Wagner. A Erdelyi, K Lau, C Baylis. Renal neuronal nitric oxide synthase protein expression as a marker of renal injury. *Kidney Int* 2003; 64(5):1765–71.
44. Qu XW, Thaete LG, Rozenfeld RA, Zhu Y, De Plaen IG, Caplan MS, Hsueh W. Tetrahydrobiopterin prevents platelet-activating factor-induced intestinal hypoperfusion and necrosis: Role of neuronal nitric oxide synthase. *Crit Care Med* 2005; 33:1050–6.
45. Wolff DJ, Gribin BJ. The inhibition of the constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms by indazole agents. *Arch Biochem Biophys* 1994; 311:300–6.
46. Hoffmann IS, Tavares-Mordwinkin R, Castejon AM, Alfieri AB, Cubeddu LX. Endothelial nitric oxide synthase polymorphism, nitric oxide production, salt sensitivity and cardiovascular risk factors in Hispanics. *J Hum Hypertens* 2005; 19:233–40.
47. Tsukada T, Yokoyama K, Arai T, Takemoto F, Hara S, Yamada A, Kawaguchi Y, Hosoya T, Igari J. Evidence of association of the eNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 245:190–93.
48. Brooks SE, Gu X, Samuel S, Marcus DM, Bartoli M, Huang PL, Caldwell RB. Reduced severity of oxygen-induced retinopathy in eNOS-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42:222–28.
49. Beauchamp MH, Sennlaub F, Speranza G, Gobeil F Jr, Checchin D, Kermorvant-Duchemin E, Abran D, Hardy P, Lachapelle P, Varma DR, Chemtob S. Redox-dependent effects of nitric oxide on microvascular integrity in oxygen-induced retinopathy. *Free Radic Biol Med* 2004; 37:1885–94.
50. Ando A, Yang A, Mori K, Yamada H, Yamada E, Takahashi K, Saikia J, Kim M, Melia M, Fishman M, Huang P, Campochiaro PA. Nitric oxide is proangiogenic in the retina and choroid. *J Cell Physiol* 2002; 191:116–24.
51. Campochiaro PA. Retinal and choroidal neovascularization. *J Cell Physiol* 2000; 184:301–10.
52. Powell JA, Mohamed SN, Kerr JS, Mousa SA. Antiangiogenesis efficacy of nitric oxide donors. *J Cell Biochem* 2000; 80:104–14.
53. Hangai M, Miyamoto K, Hiroi K, Tujikawa A, Ogura Y, Honda Y, Yoshimura N. Roles of constitutive nitric oxide synthase in posts ischemic rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40(2):450–8.

Rendszerbiológiai szemlélet a primer csontvesztés molekuláris biológiai kutatásában és az osteoporosis immunológiai vonatkozásai

Systems biological approach on the research of human bone loss and the immunological aspects of osteoporosis

Balla Bernadett¹
 Kósa János¹
 Takács István¹
 Kiss János²
 Podani János³
 Lazáry Áron¹
 Bácsi Krisztián¹
 Nagy Zsolt¹
 Speer Gábor¹
 Lakatos Péter¹

ÖSSZEFOGLALÁS A primer, életkorral járó csontvesztés hátterében álló komplex genomikai és transzkriptomikai hatások még teljes egészében nem tisztázottak. Ezért célunk volt az osteoporosisban szignifikánsan változó csontszöveti transzkripciósi profilt mutató gének meghatározása, illetve néhány jelölt génben található új egyponos nukleotid polimorfizmus (SNP) azonosítása posztmenopauzális korban nőkben. Továbbá, az immunrendszer szabályozásában központi szerepet betöltő gének expressziós mintázatának analízise osteoporoticus (OP) és nem osteoporoticus (NOP) humán csontszövetben. Kísérleteinkben hét posztmenopauzális OP (tartomány: 56–76 év) és tíz korban egyeztetett NOP nő (tartomány: 55–77 év) csontszövetmintáit használtuk fel. A kiválasztott 150 gén transzkripciósi aktivitásának eltéréseit TaqMan próba alapú kvantitatív valós-idejű RT-PCR rendszerben vizsgáltuk. A polimorfizmus vizsgálatok során a RANKL és OPG gének új SNP-ait térképeztük fel 353 magyar posztmenopauzális nő genetikai mintájában. Mann-Whitney U teszt segítségével több gén – köztük a zsírmétabolizmusban érintett gének, az osteoblast/adipocita differenciálódást szabályozó faktorok, az extracelluláris mátrix fehérjéket kódoló gének – esetén találtunk szignifikánsan változó expressziós mintázatot az OP csontszövetben. Többváltozós statisztikai analízis (DFA) segítségével nagy számban azonosítottunk géncsoportokat, amelyeknek szerepe lehet a csontszövet patológiás és egészséges fenotípusainak megkülönböztetésében. Immunológiai szempontú génkifejeződés-vizsgálat alapján adataink azt valószínűsítik, hogy az osteoporosis során átalakult csontanyagcsere változásokat indít a lokális, nem fajlagos védekező mechanizmus regulációjában. Szoros korrelációt találtunk az OPG/RANKL gének polimorfizmusai és a gerinc, illetve a csípő csontsűrűségek között. Emellett a RANKL gén kis BMD értékkel társuló 'CCT' haplotípusának *in vivo* mRNS expresszióra gyakorolt hatását is igazolni tudtuk. A több molekuláris biológiai szinten elvégzett vizsgálat lehetővé tette számos olyan új gén, illetve géncsoport azonosítását, amelyeket a primer csontvesztéssel és a csonttritkulás kialakulásával korábban még nem hoztak összefüggésbe. A genetikai információink hozzájárulhatnak az immun- és csonthomeosztázis összefüggéseinek további értelmezéséhez az osteoporoticus csontszöveti mikrokörnyezetben. A transzkripciósi hálózatban megfigyelt változások tovább segíthetik a posztmenopauzális korban módosuló csontanyagcsere folyamatok megértését.

KULCSSZAVAK osteoporosis, egyponos nukleotid polimorfizmus, transzkriptomikai profil, humán csontszövet, rendszer biológia

SUMMARY Osteoporosis is a complex systemic skeletal disease characterized by low bone mass and microarchitectural deterioration of bone tissue. The major determinants of the risk for osteoporosis in later life are peak bone mass, which are mostly determined genetically. The aim of our investigation was to determine significantly changed genes based on their mRNA expression profile in postmenopausal osteoporotic (OP) and non-osteoporotic (NOP) bone tissue and to describe the interrelationships among these genes using multivariate data analysis (DFA). Furthermore, investigate the influence of OPG/RANKL gene allelic variations on the *in vivo* human gene expression of these genes and on BMD in 353 Hungarian postmenopausal women. Seven bone tissue samples from postmenopausal OP female patients and ten bone tissue samples from NOP women were examined. The expression differences of selected 150 genes were analyzed in TaqMan probe based quantitative real-time RT-PCR system. The Mann-Whitney U test indicated significant alterations in the expression pattern of genes coding for e.g. extracellular matrix molecules, and genes affected in lipid metabolism. According to the DFA results, the groups of OP and NOP women are separable by genes coding for cytokines and various receptors affected in innate immunity as well as genes included in different signaling pathways (canonical TGF β , MAPK). We have found significant correlation between RANKL and OPG genotypes and BMD as well as RANKL haplotypes and *in vivo* RANKL expression in Hungarian postmenopausal population. We examined the primer bone loss on systems biological approach, both in genomic and

¹Semmelweis Egyetem, I. Sz. Belgyógyászati Klinika

²Semmelweis Egyetem, Ortopédiai Klinika

³Eötvös Loránd Tudományegyetem, Növényrendszertani és Ökológiai Tanszék

LEVELEZÉSI CÍM:

Dr. Balla Bernadett
 1083 Budapest,
 Korányi S. u. 2/a
 E-mail: betti@bel1.sote.hu

transcriptomical levels. The pathologic states of bone tissue have been unambiguously defined by its complex gene transcription pattern. Significant differences observed in gene expression profiles of osteoporotic human bone tissue provide further insight into the process of changed bone metabolism and the intersystem crosstalk between the immune and skeletal systems in the altered bone marrow microenvironment.

KEY WORDS osteoporosis, single nucleotide polymorphism, transcriptional profiling, human bone tissue, systems biology

Rövidítések

ALPL	alkalikus foszfatáz
AR	androgén receptor
BGLAP	osteocalcin (bone gamma-carboxyglutamate protein)
BMP4	csont morfogenetikus fehérje 4
c-Ets1,2	avian erythroblastosis vírus E26 (v-ets) oncogene homolog-1, 2
CASR	kalciumszenzor
COL1A1	I-es típusú kollagén alfa 1 lánc
EBF	korai B sejt faktor
Elk-1	ETS onkogén család tagja
ER	ösztrogén receptor
GR	glükokortikoid receptor
IGF1	inzulin szerű növekedési faktor 1
IL	interleukin

MAPK	mitogénaktivált protein kináz
MGP	matrix gamma-carboxyglutamate protein
OPG	osteoprotegerin
PICP	I. típusú kollagén C-terminális propeptid
PINP	I. típusú kollagén N-terminális propeptid
PPAR- α :RXR- α	peroxisoma proliferátor aktivált receptor alfa, retinoid X receptor alfa
PR-A, PR-B	progeszteron receptor A és B izoformái
PTHR	parathormon receptor
RANKL	nukleáris faktor-kappa B receptor/aktivátor liganduma
STAT4	signal transducer and activator of transcription 4
TGF β	transzformáló növekedési faktor béta
TNFR	tumor necrosis faktor receptor
TRAP	tartarát rezisztens savi foszfatáz
VDR	D ₃ -vitamin receptor

Bevezetés

Az osteoporosis multifaktoriális komplex megbetegedés. Az osteogenezisben és az osteoporoticus állapot kialakulásában számos környezeti tényező (pl. fizikai aktivitás, dohányzás, alkoholfogyasztás, étrend) mellett erős genetikai hatás is érvényesül. Kimutatható továbbá, hogy a csontásványanyag-tartalom (BMD), a combnyak geometriája, a trabecularis és corticalis vastagság, a csontanyagcsere különböző biokémiai markerei nagy százalékban genetikai kontroll alatt állnak (1-3). Az osteoporosis és a csontvesztés patomechanizmusának genetikai háttere poligénes eredetű, amelynek hátterében álló genetikai variációk kimutatása bonyolult feladat. A rendszerbiológia segítségével azonban több szinten is gyűjthetünk információt a csontfogyás patogenetikai folyamataival kapcsolatban.

A csonttrikulással összefüggésben leginkább széles körben kutatott rendszerbiológiai terület a genomika szintje, ahol a legtöbb adat az egyedi génpolimorfizmusok és a BMD, illetve csonttörési kockázat kapcsolatából származik. A genomikai vizsgálatok segítségével számos jelölt gén elsődleges szerepére derült fény, amelyek befolyásolják a csúc-, valamint a csökkent csonttömeg kialakulását. Ezek a kalciotrop hormonok és receptorok génjei (AR, CASR, ER, GR, PTHR, VDR, kalcitoninreceptor), a csontszerves mátrixának komponensei (BGLAP, COL1A1, MGP, oszteonectin, oszteopontin) és lokálisan ható citokineket kódoló gének (BMP4, IGF1, IL1, IL6, TNFR, TGF β , RANKL, OPG) voltak (4-7). Proteomikai elemzések során a szérumfehérjészintek és a BMD közötti asszociációkat térképezték fel. Elsősorban az osteoblastok és osteoclastok sejtanyagcsere-termékeinek eltérő szérum-

szintjét vizsgálták a csontdenzitás-csökkenés függvényében. Összefüggést találtak a csontszöveti reszorpció (pl. IL6) és formáció (pl. ALPL, BGLAP, IGF1, TGF β) markereinek szérumszintjei és az osteoporosis között (8-13). A metabolomika eredményei az osteoporosis vonatkozásában a kollagén képződési és bomlási metabolitjai (PINP, PICP, kollagén keresztkötők), amelyeket a mai klinikai diagnosztika rutinszerűen használ a csontanyagcsere laboratóriumi vizsgálatakor (14, 15).

A rendszerbiológia transzkriptomikai szintjén napjainkig nem vagy csak nagyon kevés vizsgálat történt. A humán csontszöveti génexpresszióról, illetve annak az osteoporosis során bekövetkező változásáról limitált adat áll rendelkezésre, főleg a gyulladáshoz kapcsolódó citokinek átíródására vonatkozóan (16-18). Csontszöveti fehérje kifejeződési analízis (csont-proteom meghatározás), továbbá SNP kombinációk azonosítása és gén, illetve géntermék interakciók felderítése a humán csontrendszerben ez idáig nem történt.

Mára már közismert, hogy az immunrendszer és a csont molekuláris és sejt szinten is számos ponton funkcionális kapcsolatban áll egymással. A közös csontvelői mikrokörnyezetben sejtalkotók azonos progenitorokból fejlődnek, átfedő jelátviteli hálózatokat használnak és mindkét rendszer szabályozásában ugyanaz a citokin panel vesz részt (19, 20). Az aktivált T-sejtek képesek RANKL molekulát kifejezni, amely az osteoclastok RANK receptorán keresztül fokozza az osteoclastogenezist és stimulálja a csontbontást. Az osteoblastok sejtfelszíni MHCII és kostimulátor molekuláik expressziója révén az antigénprezentáció és a T-lymphocyta-mediált immunválasz folyamatában játszanak fontos szerepet (21-23). Egyre több szempontból bebizonyosodik, hogy

Köszönetnyilvánítás

A munka a Nemzeti Kutatási és Fejlesztési Hivatal NKFP-1A/007/2004, NKFP-1A/002/2004 számú pályázata illetve az Egészségügyi Tudományos Tanács ETT 022/2006 támogatásával valósult meg.

az immunrendszer nagymértékben befolyásolja a csontszövet metabolikus folyamatait. Több tanulmány is bizonyította, hogy számos immunológiai betegség (pl. gyulladásos bélbetegségek, autoimmun cukorbetegség, allergia, néhány áttétet adó tumor) társul csökkent csonttömeggel (19, 24). A csonttrikulás a vázrendszer szisztémás megbetegedése, amely nem elhanyagolható mértékben hatással bír a csontszövetben zajló lokális immunológiai reakciókra. Kevés számú irodalmi adat áll rendelkezésre az osteoporosis és a csontvesztés immunológiai vonatkozásaival kapcsolatban. Osteoporosisban megváltozik a CD4⁺/CD8⁺ T-sejtek aránya, valamint az NK T-sejt szubpopuláció emelkedett rátát mutat a csökkent BMD-vel összefüggően.

Célunk a csontanyagcserében, az osteogenesisben és különböző alapvető immunológiai mechanizmusok szabályozásában nélkülözhetetlen szerepet játszó 150 gén csontszöveti teljes mRNS expressziós mintázati rendszerének összehasonlítása humán primer posztmenopauzális osteoporoticus és nem osteoporoticus nőkben. Továbbá a transzkriptomikai kutatások során vizsgált néhány, a jelölt génekben lokalizált új SNP-k feltérképezése 353 magyar posztmenopauzális nő genetikai mintájában.

Anyagok és módszerek

A posztmenopauzális osteoporoticus és nem osteoporoticus nők vizsgálati csoportja

A génexpressziós vizsgálatokat posztmenopauzális osteoporoticus (OP), illetve posztmenopauzában lévő,

nem osteoporoticus (NOP), független mintaválasztásból származó magyar nők csontmintáin végeztük. A kísérlethez beválogatott nők nem részesültek semmilyenfajta hormonpótló, szteroid- vagy antiporotikus terápiában. A posztmenopauzális állapot definiálása: legalább 1 éve elmaradt menstruáció, illetve a szérumsztradiolkoncentrációja kisebb, mint 30 pg/ml. A posztmenopauzális OP csoportban 7 csontszövet mintát értékeltünk, míg a kontroll, NOP csoport 10 nő csontmintájából állt. Csontsűrűségmérés a teljes femuron és a lumbalis csigolyákon (L1-L4) kettős energiájú röntgensugár-abszorpciometria (DEXA) (DPX-L, Lunar Corp. Madison, USA) segítségével történt. Az osteoporosis definíciója a WHO ajánlása szerint: T-score < -2,5 SD, bármely mért ponton. Az OP és NOP csontminták a diagnosztizált III. stádiumú primer osteoarthritis gyógyító műtétet szolgáló csípőízületi totál endoprotézis beépítésekor leforgácsolt csontszövetdarabok összegyűjtéséből származtak. A primer osteoarthritis minősítése az Amerikai Ortopédsebészeti Társaság ajánlásával a Kellgren–Lawrence-féle rendszer alapján történt (25). A betegség a combfejen a mintavételi helyként is szolgáló spongiózus csontállományt nem érintette. A gyűjtést követően a friss mintákat azonnal alaposan megtisztítottuk a csontvelőtől, illetve egyéb vérszennyeződésektől PBS felhasználásával, majd folyékony nitrogénben tároltuk. A vizsgálatot a Semmelweis Egyetem Tudományos és Kutatásügyi Bizottsága hagyta jóvá (SOTE-TUKEB 6392-1/2004-1018EUK, SOTE-TUKEB 33/2008). Minden betegről – részletes felvilágosítás után – írásos beleegyező nyilatkozatot kértünk.

A vizsgálatba bevont személyek klinikai és labor paramétereit a 1. táblázatban mutatjuk be. Nem volt szignifi-

1. táblázat

A vizsgálatban szereplő posztmenopauzális OP és NOP nők klinikai és biokémiai adatai

	MEDIÁN (TARTOMÁNY)		P ÉRTÉKEK
	POSZTMENOPAUAZÁLIS OP (N=7)	POSZTMENOPAUAZÁLIS NOP (N = 10)	
Kor (év)	69,00 (56 – 75)	60,50 (55 – 77)	0,31
T-score L1-L4 (SD)	-2,5 (-3,2 – -0,8)	-0,8 (-1,5 – 3,9)	0,002
Z-score L1-L4 (SD)	-0,7 (-0,9 – 0,8)	-0,2 (-1,3 – 3,5)	0,81
BMD L1-L4 (g/cm ²)	0,882 (0,612 – 1,099)	1,089 (1,016 – 1,652)	0,002
T-score teljes femur (SD)	-2,5 (-4,0 – -1,3)	0,1 (-1,8 – 1,8)	0,0004
Z-score teljes femur (SD)	-0,8 (-3,3 – 0,5)	0,7 (-1,0 – 3,3)	0,02
BMD teljes femur (g/cm ²)	0,695 (0,524 – 0,838)	1,008 (0,760 – 1,221)	0,0004
BMI (kg/m ²)	26,37 (21,30 – 28,95)	26,42 (23,53 – 33,69)	0,47
Beta-CrossLaps (pg/ml)	424,80 (183,00 – 707,00)	335,00 (126,00 – 626,00)	0,19
Osteocalcin (ng/ml)	22,29 (12,89 – 36,77)	16,70 (6,12 – 29,96)	0,31
PTH (pg/ml)	33,80 (23,00 – 47,00)	26,50 (15,00 – 74,00)	0,07
TSH (mIU/l)	1,04 (0,43 – 1,92)	1,35 (0,37 – 9,64)	0,47
Vércukor (mmol/l)	5,52 (4,8 – 6,8)	5,2 (4,4 – 6,5)	0,11

A valószínűségi adatok (p értékek) a jobb oldali oszlopban a két mintacsoport Mann-Whitney U teszt alapú összehasonlításának eredményei.

káns különbség a vizsgálatban szereplő OP és NOP csoportok átlag életkorában, dohányzását illetően, bevitt kalcium mennyiségében, alkohol- és kávéfogyasztásában, fizikai aktivitásában. Kifejezett különbségek figyelhetők meg elsősorban a teljes femuron és a lumbalis csigolyákon mért T-score és BMD értékekben az OP és NOP egyének között.

Az SNP analízisek vizsgálati csoportja

A polimorfizmus vizsgálatokhoz 353 magyar, független mintaválasztásból származó posztmenopauzális állapotú nő vérmintáját gyűjtöttük össze (2. táblázat). A kiválasztott nőkön a Semmelweis Egyetem I. Sz. Belgyógyászati Klinikáján csontsűrűség mérés történt kettős energiájú röntgensugár-abszorpciometria (DEXA) segítségével. A vizsgálatból kizártuk azokat a résztvevőket, akiknél endokrinológiai vagy egyéb krónikus betegség gyanúja merült fel, illetve akik hormonpótló terápiában részesültek. Továbbá, nem kerültek bevonásra azok a személyek, akik szérum ALPL, TSH, PTH, 25-OH-D-vitamin szintjében a normálértékektől eltérés volt tapasztalható.

2. táblázat

A vizsgálatba bevont 353 nő klinikai, denzitometriás és életmódbeli jellemzői

VÁLTOZÓK	ÁTLAG ± SZÓRÁS (TARTOMÁNY)
Életkor (év)	61,6 ± 7,9
Menopauzális kor (év)	13,5 (1-42)
Testmagasság (cm)	158,1 (139-176)
Testsúly (kg)	68,9 ± 12,1
Testtömeg-index (kg/m ²)	27,6 ± 4,5
Dohányzás (%)	45 (12,5%)
Alkoholfogyasztás (%)	16 (4,44%)
Kalciumbevétel (mg/nap)	642 (350-2000)
BMD lumbalis csigolya (g/cm ²)	0,887 ± 0,176
BMD teljes csípő (g/cm ²)	0,785 ± 0,168
BMD csukló (g/cm ²)	0,689 ± 0,161
A vizsgálati populációban diagnosztizált osteoporosisos betegek (%)	198 (55%)

Direkt mRNS izolálás

A humán csontmintákat folyékony nitrogén alatt elporítottuk Freezer-mill 6750 készülék segítségével (SPEX Certiprep Inc., NJ, USA). Az RNS izolálást Dynabeads Oligo (dt)₂₅ kit (DynaL Biotech ASA, Oslo, Norvégia) felhasználásával végeztük a gyártók előírása szerint. Ezután az mRNS-t 2 µl DN-áz I. enzimmel (Promega, Madison,

USA) kezeltük 20 percig, 37 °C-on. A tiszta mRNS minőségét és mennyiségét NanoDrop spektrofotométerrel (Nanodrop Technologies, Montchanin, DE, USA) ellenőriztük 260/280 nm hullámhossztartományon. 15 µl humán mRNS-t cDNS-re fordítunk át reverz transzkripció során.

A vizsgált gének kiválasztása, kvantitatív valós idejű RT-PCR és a vizsgálati csoportok statisztikai összehasonlítása

Kvantitatív valós idejű RT-PCR módszer alkalmazásával olyan jelölt géneket kerestünk, melyek eltérő génexpressziós aktivitása szerepet játszhat az osteoporoticus csontszövet megváltozott anyagcsere folyamatainak kialakulásában. Előzetes genetikai útvonal analízisek, irodalmi adatok és online adatbázisok segítségével (www.pubmed.com, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM>) kiválasztottunk 150 gént a transzkripció vizsgálatokhoz.

Előre megtervezett és validált gén-specifikus TaqMan Gene Expression Assay-eket használtunk az Applied Biosystems-től (Applied Biosystems, Foster City, USA). A PCR reakció 20 µl végtérfogatban zajlott, amelynek tartalma volt: 1 µl cDNS, 10 µl TaqMan 2× Universal PCR Master Mix NoAmpErase UNG (Applied Biosystems), 1 µl validált gén specifikus TaqMan próba 20× (Applied Biosystems) és 8 µl víz. A kiválasztott 150 gén amplifikálásához ABI Prism 7500 valós idejű PCR rendszert használtunk. Minden gént 3-3 párhuzamos mérésel vizsgáltunk a 96 lyukú lemezekben a gyártó által javasolt protokoll szerint. Általános „house-keeping” géneket (GAPDH, ACTB) alkalmaztunk belső kontrollként. A további statisztikai analízisek során a GAPDH-szinteket használtuk a normalizált értékek megadásához, mert irodalmi adatok utalnak arra, hogy az ACTB gén kifejeződését osteoblast sejtekben az ösztrogén jelentősen befolyásolja (26). A relatív kvantifikációs kiértékelés az összegyűjtött adatokból (küszöb ciklus számok, Ct) 7500 System SDS software 1.3 felhasználásával készült. A gén-specifikus mRNS relatív mennyiségét (RQ) az átlag ΔCt értékekből számítottuk mind a 150 gén esetén. A génexpressziós arányokat az osteoporoticus és nem osteoporoticus személyek RQ értékeiből kalkuláltuk. Az adatok analíziséhez Windows SPSS 13.0.1 (SPSS Inc., Chicago, USA) programot használtunk. A statisztikai analízist egyparaméteres Mann-Whitney U teszt segítségével végeztük el és statisztikailag szignifikánsnak tekintettük ahol a valószínűségi adatok p értéke kisebb vagy egyenlő volt, mint 0,05.

DNS-szeparálás perifériás vérből

A polimorfizmus meghatározásokhoz összegyűjtött 353 résztvevő EDTA-s vérmintájából genomális DNS-t izoláltunk High Pure PCR Template Purification kit (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany) felhasználásával. A tisztított DNS minőségét és mennyiségét NanoDrop spektrofotométerrel (Nanodrop Technologies) határoztuk meg. Minden mintát 10 ng/µl DNS végkoncentrációra hígítottunk.

Gének és SNP-k kiválasztása a genomikai analízisekhez, genotipizálás

Az SNP analízisekhez két olyan, humán csontszövetben expresszálandó gént (RANKL, OPG) választottunk, amelyek esetén az *in vivo* transzkriptomikai vizsgálatokat is elvégeztük, és amelyek meghatározó szerepet töltenek be a csontanyagcserében, illetve a csontritkulás kialakulásában (3. táblázat). Az NCBI dbSNP adatbázis (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) segítségével optimális GC aránnyal (40–65%) rendelkező 5 SNP-t szelektáltunk. A még nem vizsgált SNP-k kiválasztásának alapja az volt, hogy a már leírt és a csontanyagcserével összefüggésbe hozott más SNP közelében helyezkednek el. Ez alapján feltételeztük, hogy meghatározhatunk olyan új haplotípusokat, amelyek kapcsolatban állnak a BMD-vel.

A robosztus genotipizálás a Semmelweis Egyetem SNP Core Facility keretein belül a nagy átérésztőképességű GenomeLab SNPstream Genotyping System (Beckman Coulter, Fullerton, USA) rendszerben történt. Az automatizált genotipizáló rendszer multiplex polimeráz láncreakcióval kapcsolt fluoreszcens jelölésen alapuló, array-rendszerű egybázisos primer extenzió elvén működik (27).

Diszkriminancia analízis (DFA)

A diszkriminancia elemzés feladata, hogy egyes előre megadott csoportok közötti elválást maximalizálja. Az elemzés eredményei a kanonikus értékek, amelyek koordinátaként használhatók a térbeli ábrázolás során (28). Két mintacsoport esetén nem rajzolható fel koordináta-rendszer, de a csoportok elválása a kanonikus változók alapján így is felmérhető. Ha a megfigyelések random mintavételezésből származnak, és teljesül a többváltozós normalitás feltétele is, akkor a csoportok elválásának szignifikanciája is értékelhető. Ha ezek a feltételek nem teljesülnek, a csoportok elválásának mértéke akkor is informatív az adatok szerkezetére vonatkozóan. Mivel a kanonikus változók és az eredeti változók (esetünkben a gének) korrelációja is kiszámítható, a DFA igen értékes információt szolgáltat arról, hogy a csoportok elválását mik (mely gének) magya-

rázzák elsősorban. A módszer problémája azonban, hogy a változók száma nem haladhatja meg az objektumok (paciensek) számát, emiatt a géneket részhalmozokra kell osztani, és külön-külön vizsgálni. A kritériumok alapján 9 és további 5 géncsoportot definiáltunk különböző osztályozási feltételek alapján; (ezek a következők voltak: az RT-PCR és a Mann-Whitney U teszt eredményei, a gének különböző regulációs útvonalakban betöltött szerepe, illetve olyan génhalmozok, amelyek lefedik mind az adaptív, mind a természetes immunrendszer funkcióit, lásd bővebben az Eredmények c. fejezetben). A számításokat a SYN-TAX 2000 programcsomag felhasználásával készítettük (29).

A genomikai vizsgálatokhoz felhasznált leíró és elemző statisztikai módszerek

Az adatbázisban a hiányzó genotípusokat a „10 legközelebbi szomszéd módszer” (10-nearest neighbor method) segítségével determináltuk a genotipizálási hibákból eredő fals eredmények elkerülése érdekében (30). A „Haploview 3.0” (Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, USA) szoftver segítségével határoztuk meg az SNP-k közti kapcsoltsági viszonyt (LD) és a genotipizálás leíró elemzését (31) (3. táblázat). A csontdenzitás (BMD) értékre szignifikáns kovariánsokat regressziós analízis segítségével szűrtük ki.

A humán genetikai asszociációs vizsgálatokat a „PedGenie” szoftver felhasználásával végeztük (32). A statisztikai szoftver ANOVA-val ekvivalens elemzést végez három genetikai modellben (additív, domináns, recesszív). Az alkalmazás „Quantitativ” és „OddsRatio” opcióját alkalmaztuk vizsgálatunkban és empirikus *p* értéket generáltunk 10000 Monte-Carlo permutációs próba futtatásával. Statisztikailag szignifikánsnak a permutált *p* érték 0,05-nél kisebb értékét tekintettük. Az individuális SNP-analízis statisztikai erejét (power of the study) a Quanto szoftver 1.1 verziójával számoltuk ki (University of Southern California, LA, USA). A genetikai eredményekből haplotípu-analízis is végeztünk az R-statisztikai környezetbe épülő „haplo.stats” szoftver felhasználásával. Csúszo-ablak analízis segítségével konstruáltuk a 2, 3 és 4

3. táblázat

A genotipizált egy pontos nukleotid polimorfizmusok leíró statisztikai elemzései

GÉN	SNP AZONOSÍTÁSI SZÁM	ALLÉL	SNP POZÍCIÓ	SNP LOKALIZÁCIÓ	SIKERESSÉGI RÁTA (%)	HW <i>P</i> ÉRTÉK	MAF
RANKL	rs9533156	C/T	chr13:42045671	promoter	99,4	0,396	0,460
	rs9525641	C/T	chr13:42046024	promoter	99,4	0,453	0,459
	rs3742257	C/T	chr13:42071198	intron	99,4	0,215	0,486
OPG	rs1564858	A/G	chr8:120014347	intron	99,7	0,069	0,140
	rs3102735	C/T	chr8:120034251	promoter	100	0,954	0,146

A sikerességi ráta a genotípusok százalékát jelöli. A HW *p* érték a Hardy-Weinberg equilibrium megállapítására alkalmazott χ^2 -teszt szignifikancia szintje. MAF a ritkább allél előfordulási gyakorisága.

RANKL – receptor activator of nuclear factor- κ B ligand

OPG – oszteoprotegerin

SNP-ből álló haplotípusokat az egyes géneken belül, majd score-statisztika alkalmazásával határoztuk meg az egyes haplotípusok és a fenotípusok kapcsolatát. A score-statisztika permutált p értéket számít a globális összefüggés és az egyes haplotípusok szerepének jellemzésére. A haplotípusok egyedi hatását regressziós modellben a szoftverbe épített „haplo.glm” funkcióval határoztuk meg. A regressziós analíziseket a Windows SPSS 15.0 (SPSS Inc.) statisztikai szoftverkörnyezetben végeztük.

Eredmények

Az osteoporoticus és nem osteoporoticus csontszöveti transzkriptom Mann-Whitney U teszt alapú összehasonlítása

A 4. táblázatban a Mann-Whitney U teszt tekintetében szignifikánsan ($p \leq 0,05$) megváltozott expressziós különbséget mutató 12 gén kvantitatív, valós idejű RT-PCR adatait foglaltuk össze. Tíz gén kifejeződése represszáldott osteoporoticus nőkben, melyek a következők voltak: alkalikus foszfatáz (ALPL), I. típusú kollagén alfa 1 lánc (COL1A1), IgG-kötő Fc γ -receptor IIa (FCGR2A), immunglobulin szupercsalád 4. tagja (IGSF4), mátrix metalloproteináz-2 (MMP2), mátrix metalloproteináz-13 (MMP13), mátrix metalloproteináz-9 (MMP9), nukleáris faktor kappa könnyű lánc (NF κ B1), thrombocytákból származó növekedési faktor alfa polipeptid (PDGFA), A típusú scavenger receptor-3 (SCARA3). Két gén esetében pedig, trombospondin receptor (CD36) és twist homolog 2 (TWIST2) nagyobb transzkripció aktivitást észleltük.

Az osteoporoticus és nem osteoporoticus nők csontszöveti génextpressziós mintázatának Úvizsgálatára többváltozós diszkriminancia analízis (DFA) segítségével

Diszkriminancia adatelemzést alkalmaztunk, hogy az OP és NOP csoportokat multidimenzionális térben elkülönítsük a csontszöveti génextpressziós adataik alapján, illetve, hogy a vizsgált 150 génből meghatározzuk azokat a géncsoportokat, amelyek a legnagyobb diszkriminációs képességgel rendelkeznek. Kilenc és további 5 génhalmazt jellemeztünk különböző csoportosítási szempontok alapján (1-2. ábra). Vizsgáltunk egy diagnosztikus markereket tartalmazó gén szettet (8 gén). A géncsoportba olyan komponenseket soroltunk, amelyek szérumszintje, expressziós változásai, vagy genetikai polimorfizmusai kapcsolatot mutatnak a csontsűrűséggel és a fokozott csontturnoverrel (4, 5, 14, 33). Egy 9 génből álló halmazt a Mann-Whitney-teszt eredményei alapján válogattuk. Számos csoportot a különböző jelátviteli útvonalak kategorizálásával alakítottunk ki, mint a kanonikus TGFB/activin/nodal útvonal (12 gén) (34), BMP kaskád (9 gén) (35), WNT jelátvitel (6 gén), növekedési faktorok/MAPK regulációs jelpálya (9 gén), illetve olyan gének, melyek az ösztrogén jelátvitel szabályozása alatt állnak (8 gén) (36). Az elvégzett kvantitatív, valós idejű PCR analízis alapján definiáltunk egy szettet, amely 3-szor vagy annál nagyobb

mértékben alulexpresszáldó géneket tartalmazott (9 gén). A megmaradt csoport hét, a zsíranycserében érintett gént foglalt magában. További öt géncsoportot az immunológiai szempontból releváns gének felosztásával alakítottunk ki. A T- és B-sejtek aktivációját eredményező immunológiai mechanizmusokhoz 14, illetve 5 gént soroltunk (37), az antigénprezentációs, valamint stimulációs folyamatokat 11 gén képviseli, a fagocitózist 9 génnel, míg a komplementrendszer működését 10 génnel jellemeztük (38, 39).

A TGFB/activin/nodal szabályozási útvonalhoz kapcsolódó gének rendelkeztek a legnagyobb megkülönböztető erővel, amely egyértelműen szétválasztotta a posztmenopauzális OP és NOP csoportokat. Az elsősorban növekedési faktorokat és receptoraikat kódoló gének és az osteoporoticus személyek csontszövetében 3-szor, illetve annál nagyobb mértékben csökkent transzkripciót mutató gének szintén erős korrelációt mutattak a kanonikus változóval, és a vizsgált OP és NOP nők két csoportjának határozott szétválasztását tették lehetővé (1. ábra).

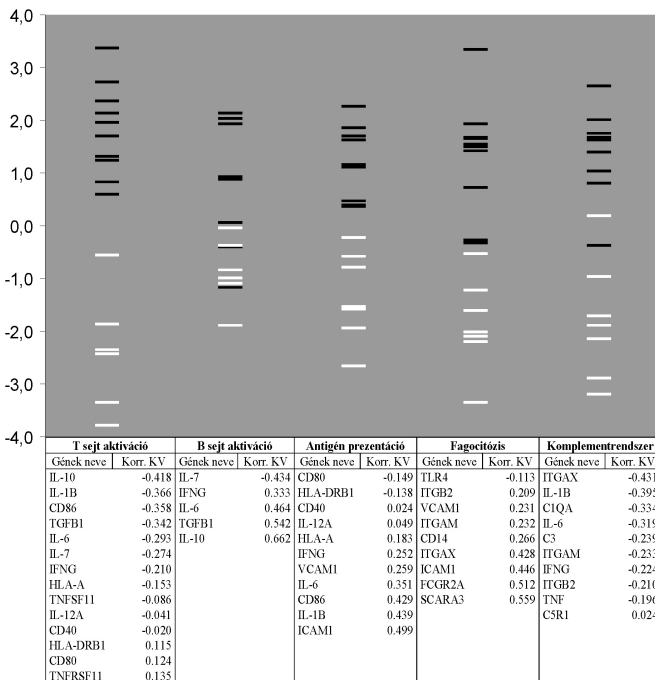
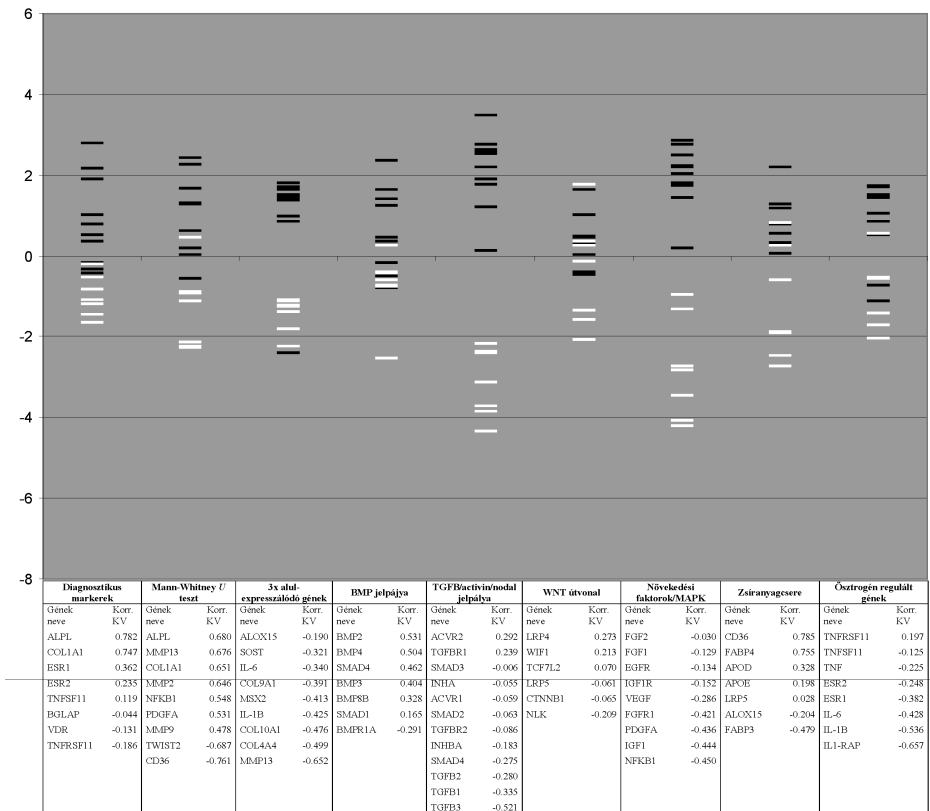
Az immunológiai szempontból meghatározó gének analízise során a legerőteljesebb diszkriminációs hatás a T-lymphocyták működésében, annak szabályozásában szerepet játszó gének esetén volt azonosítható, mely géncsoport élesen elválasztotta a humán csontszövet OP és NOP stádiumait. Emellett a veleszületett immunitásban (antigén bemutatás és fagocitózis) kulcsfontosságú szerepet betöltő gének expressziós mintázata is megváltozik az osteoporoticus csoportban, amely a két vizsgálati csoport határozott elkülönülését eredményezi (2. ábra).

Új génpolimorfizmusok összefüggése a posztmenopauzális csökkent csonttömeggel

A RANKL és OPG gének individuális SNP analíziseinek statisztikai ereje nagyobb volt, mint 75% a csípő BMD esetén (átlag \pm szórás: 0,785 \pm 0,168), $p = 0,05$, MAF = 0,140, a 353 fős mintában 0,054 g/cm²-es BMD különbséget képes kimutatni, domináns modellben. A gerinc BMD-t (átlag \pm szórás: 0,887 \pm 0,176) tekintve, 65%-os erősséggel tudtunk 0,053 g/cm²-es recesszív genetikai hatást kimutatni MAF = 0,460 esetén.

Az OPG polimorfizmusok összefüggést mutattak a lumbalis gerinc és a csípő BMD értékekkel. Az rs1564858 SNP 'A' allélját hordozóknak mind a gerincen, mind a combnyakon kisebb volt a BMD-je (a korrigált BMD különbségek 0,040 \pm 0,133 g/cm² volt az 'A/A+A/G' és 0,013 \pm 0,155 g/cm² volt a 'G/G' genotípusok esetén a csípőn, $p=0,0001$). Recesszív modellben az rs3102735 SNP és a csípő BMD között találtunk kapcsolatot (a korrigált BMD különbségek -0,129 \pm 0,083 és 0,003 \pm 0,151 voltak a 'C/C' és a 'C/T+T/T' genotípusok esetén, $p=0,004$). A RANKL gén mindkét vizsgált polimorfizmusának hatása volt a gerinc BMD-re (a korrigált gerinc BMD különbségek 0,010 \pm 0,163 és 0,040 \pm 0,154 voltak a 'C/C+C/T' és 'T/T' csoportokban a két szorosan kapcsolt rs9533156 és rs9525641 SNP esetén).

A RANKL haplotípusok szoros kapcsolatot mutattak a gerinc BMD-vel (a globális összefüggést jellemző permutált p -érték 0,022 domináns modellben). A gyakori 'CCT'



1-2. ábra

Hét posztmenopauzális osteoporoticus (OP, fehér vonal) és tíz posztmenopauzális nem osteoporoticus (NOP, fekete vonal) nő csontszöveti génextpressziós mintázatának diszkriminancia analízise.

A kilenc és öt halmazt meghatározó humán gének „Gene Cards” (www.genecards.org) által elfogadott rövidített neveit a korrelációs értékekkel együtt (korreláció a kanonikus változóval, KV) táblázatban foglaltuk össze.

haplotípus kis BMD-vel, míg a ritkább 'TTC' magasabb gerinc BMD-vel járt mind score teszt, mind GLM modell esetében (5. táblázat).

A RANKL specifikus mRNS relatív kifejeződése a 'CCT' haplotípusok számától függ (3. ábra). Azokban a személyekben, ahol a 'CCT' haplotípus 1 vagy 2 kópiában

van jelen a RANKL gén expressziója 2,25-szeresére növekedett azokhoz képest, akik nem hordoznak 'CCT' kópiát (átlag RQ±SD 0,126±0,050 és 0,056±0,026 volt a 'CCT' hordozókban és a nem hordozókban, p=0,025). In silico szekvencia analízist végeztünk, hogy meghatározzuk vajon a haplotípusok szerinti mRNS szint-különbségeket

4. táblázat

Szignifikánsan megváltozott transzkripció mintázatot mutató 12 gén kvantitatív valós idejű RT-PCR vizsgálatának eredményei 17 posztmenopauzális nő csontszövetében

GÉN SZIMBÓLUMOK ^A	GÉN-ELNEVEZÉSEK ^A	ABI ASSAY AZONOSÍTÁSI SZÁMOK ^B	GÉN ILLETVE GÉNTERMÉK RELEVANCIÁK ÉS ANNOTÁCIÓK ^C	RQ OP / RQ NOP ^D	P ÉRTÉKEK ^E
ALPL	alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	Hs00758162_m1	Mineralizáló enzim, melyet az osteoblastok termelnek. Osteoporosisban csökken a szérum szintje.	0,41	0,02
CD36	CD36 antigen (thrombospondin receptor, scavenger receptor class B, member 3)	Hs00169627_m1	Elsősorban zsírsejtekben expresszálódik, kis mértékben csontsejteken is. Ligandumai zsírsavak és lipoproteinek. Kifejeződését a PPAR gamma szabályozza.	3,22	0,03
COL1A1	collagen, type I, alpha 1	Hs00164004_m1	A legfontosabb fibrilláris típusú kollagén molekula, a csontban legnagyobb mennyiségben előforduló ECM komponens. $\alpha 2\beta 1$ integrineken keresztül kapcsolódik az osteoblast sejtekhez. Mutációja osteogenesis imperfecta eredményezhet.	0,39	0,05
FCGR2A	Fc fragment of IgG, low affinity Ila, receptor (CD32)	Hs00234969_m1	Kis affinitású receptor, mely az immunkomplexekben található IgG Fc részéhez kapcsolódik. Elsősorban B-lymphocyták termelik.	0,49	0,04
IGSF4	immunoglobulin superfamily, member 4	Hs00204937_m1	Immunglobulin-szerű intracelluláris adhéziós molekula. Aktin filamentumokhoz kapcsolódva a citoszkeletális jelátvitelben vesz részt. Az ösztrogénreceptorok egyik célgénje.	0,36	0,03
MMP2	matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A)	Hs00234422_m1	Osteoblastok által termelődik. Szükséges a normális ECM képződéshez. Mutációja Winchester szindrómát és multicentrikus osteolysist okoz. Működését MMP13 aktiválja.	0,40	0,05
MMP9	matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B)	Hs00234579_m1	Az osteoclast sejtek termelik, ezek migrációját szabályozza. Fontos szerepet tölt be a csont remodelingben és az osteoblast differenciációban.	0,34	0,03
MMP13	matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)	Hs00233992_m1	Az osteoblastok termelik. Szükséges a normális ECM képződéshez. Szerepe van az osteoarthritis kialakulásában. Működését MMP2 aktiválja.	0,21	0,04
NF κ B1	nuclear factor of kappa light polypeptide gene	Hs00231653_m1	A növekedési faktor/MAPK jelpálya és a RANKL rendszer transzkripció faktorja.	0,44	0,02
PDGFA	platelet-derived growth factor alpha polypeptide	Hs00234994_m1	Az osteoblastok szekretálják. Stimulálja a sejtprolifrációt, DNS replikációt és ECM szintézist. A mezenchímális progenitor sejtek migrációját segíti.	0,47	0,05
SCARA3	scavenger receptor class A, member 3	Hs00212206_m1	Kollagén-szerű domének ismétlődéséből felépülő receptor, védi a sejteket az oxidatív molekuláktól. Szerepet játszik a bakteriális struktúrák felismerésében. Kifejeződése fokozódik differenciálódó OB sejtekben. Érintett az OC fejlődésben és a csont növekedésében is.	0,27	0,02
TWIST2	twist homolog 2	Hs02379973_s1	Általános transzkripció inhibitor. Csökkenti az osteoblastok aktivitását.	3,86	0,02

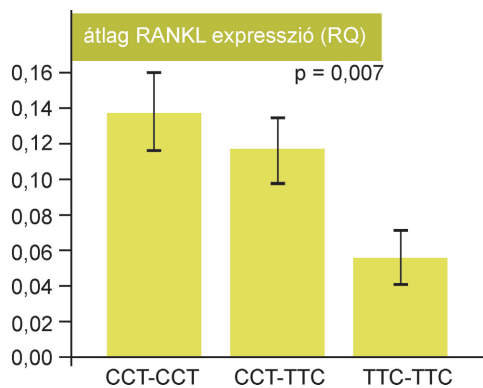
^AA gének általánosan elfogadott és használt szimbólumai, illetve nevei a standard „GeneCards” alapján (www.genecards.org)

^BA PCR reakciók során használt génspecifikus TaqMan alapú ABI expressziós kitek gyártási/azonosítási számai

^CA vizsgált gének szerepe a csont élettanában, a csontszövet fejlődésében, az osteoporosis kialakulásában

^DRelatív génextpressziós arányok osteoporoticus vs. nem osteoporoticus csontszövetben

^EMann-Witney U teszt szignifikanciaértékei



3. ábra

A RANKL haplotípusok hatása a RANKL gén in vivo csontszöveti expressziójára

okozhatja-e transzkripció faktoroktól profíl megváltozása a RANKL gén promóter régiójában. Hét transzkripció faktor köthelyét azonosítottuk a promóter régióban a 'CCT' haplotípus esetén (*GR-a*, *STAT4*, *c-Ets1*, *c-Ets2*, *Elk-1*, *PPAR- α :RXR- α* , *EBF*) és két köthelyet láttunk a 'TTC' haplotípusban (*PR-A*, *PR-B*).

Megbeszélés

Munkánk során elsőként vizsgáltuk humán posztmenopauzális OP és NOP nőkből származó csontszövetek multigén transzkripció profílját és mutattunk ki szignifikáns expressziós különbségeket a két állapot között. A vizsgálatainkkal nyert génextpressziós adatok lehetővé tették a primer osteoporotikus és nem osteoporotikus csontszöveti fenotípus elkülönítését. Meghatároztunk olyan új géneket (CD36/SCARB3, SCARA3, TWIST2, IGSF4), amelyek a humán csontmetabolizmus vonatkozásában eddig nem voltak ismertek. Vizsgáltuk az osteoporosis, mint a csontrendszer egészét érintő megbetegedés hatását a csontszövetben zajló lokális gyulladáshoz és immunreakciókra. Továbbá, az OPG/RANKL gének gerinc és a csípő csontsűrűségével szoros korrelációt mutató SNP haplotípusait sikerült kimutatnunk. Emellett a RANKL gén kis

BMD értékkel társuló 'CCT' haplotípusának *in vivo* mRNS expresszióra gyakorolt hatását is tudtuk igazolni humán csontmintákban.

Kimutattuk, hogy a CD36 (SCARB3, B típusú scavenger receptor) gén nagyobb mértékben expresszálódik, míg a vele azonos receptor családba tartozó SCARA3 (SR-AIII, A típusú scavenger receptor) szignifikánsan csökkent kifejeződést mutat OP személyek csontszövetében. A CD36 egyaránt szintetizálódik az osteoblast és az osteoclast sejtekben is (40). A lipidfelvétel és a lipoprotein körforgás meghatározó résztvevője (41). Azonban a molekula funkcionális szerepét a csont élettani folyamataiban még nem jellemezték. A SCARA3 gén elsősorban mieloid sejtekben fejeződik ki és a természetes immunrendszer részeként a mikrobiális sejt felszíni struktúrák felismerésében vesz részt (42). Emellett képes endogén ligandumok megkötésére is pl. szerves extracelluláris mátrix fehérjék (biglikán, dekorin, denaturált kollagén), valamint módosult LDL-molekulák (AcLDL, OxLDL) (43). Mindkét említett receptor részt vesz a lipid-homeosztázis szabályozásában, továbbá, szerepük meghatározó lehet a közös mezenchymális őssejtektől származó osteoblast/adipocytá sejt vonalak differenciációs egyensúlyának megtartásában. A csontszövetben megbomlott és a zsírszövet irányába eltolódott csontvelő/zsírszövet arány a csontásványanyag-tartalom (BMD) csökkenéséhez vezet (44, 45). Eredményeink megerősítik annak lehetőségét, hogy mind az A és B típusú scavenger receptorok érintettek a csontszövet 'elzsirosodásában' és ennek következtében az osteoporosis kialakulásában.

A TWIST2 gén mRNS szintje jelentősen magasabb volt az OP páciensek csontjában, mint a kontroll csontszövetben. A TWIST2 egy nem specifikus, transzkripciót gátló molekula, amely túlnyomórészt mezodermális eredetű szövetekben, sejtekben (chondroblast, osteoblast) fejeződik ki (46). Hiszton deacetylációs mechanizmuson keresztül megakadályozza számos gén transzkripcióját, emellett blokkolja az osteoblastok differenciálódását.

Az IGSF4 egy Ca^{2+} -tól független sejt-sejt kölcsönhatásokat közvetítő immunoglobulin-szerű intracelluláris adhéziós molekula, amely csökkent génaktivitást mutat az OP csontban. Az aktin filamentumokhoz történő asszociációja révén a citoskeletális jeltovábbításban és a sejtinvázió szabályozásában vesz részt (47). *Lin és mtsai* (48) az IGSF4

5. táblázat

RANKL haplotípus analízis eredményei

HAPLOTÍPUS	FREKVENCIA	SCORE TESZT		GLM MODELL	
		HAP-SCORE	P ÉRTÉK*	KOEFFICIENS \pm SE	P ÉRTÉK#
TTC	0,453	-0,398	0,711	0,037 \pm 0,019	0,048
CCC	0,063	-0,428	0,679	-0,025 \pm 0,028	0,423
CCT	0,471	-2,432	0,013	-0,049 \pm 0,021	0,018

Az 5%-nál gyakoribb haplotípusok és a korrigált lumbalis BMD-re gyakorolt egyedi hatásuk láthatók a táblázatban. *A globális összefüggést jellemző permutált *p*-érték 0,022 volt. #TTC haplotípust, mint referenciát GLM modellben vizsgáltuk. A GLM-modelben szereplő *p* értékek a regressziós változókra vonatkozó t-statisztika szignifikanciáját jelölik. A haplotípusok egyedi hatását a regressziós koefficiensek demonstrálják.

gént az ösztrogénreceptor-alfa célpontjaként írták le emlőtumorsejtekben.

Diszkriminancia analízis alkalmazásával megismerünk új géncsoportokat, amelyek élesen és egyértelműen elkülönítik az OP és NOP állapotokat. Kiemelkedő jelentősége van az egészséges és patológias csontfenotípusok határozott elválásában a különböző növekedési faktoroknak és receptoraiknak, amelyek a MAPK, illetve a kanonikus TGFB/aktivin/nodal jelátviteli rendszereken keresztül szabályoznak. Az immunológiai szempontú vizsgálatok a T sejt immunválaszt reprezentáló gének csoportjára hívták fel a figyelmet. Általánosan igazolt, hogy a T-lymphocyták és a csontsejtek működése több ponton is szorosan kapcsolódik egymáshoz pl. az osteoblastok hivatásos antigén prezentáló sejtnek működve naív T-sejteket aktiválnak (21), valamint, az effektor T-lymphocyták képesek az osteoclastok érését a RANK/RANKL/OPG rendszeren keresztül szabályozni (19). Továbbá, kimutattuk az OP és NOP betegcsoportok egyértelmű szétválását a fagocitózis markereit kódoló gének expressziós mintázata alapján is. Ez a megfigyelés alátámasztja a szignifikancia teszt eredményeit, amely segítségével meghatároztuk a fagocitózis folyamatához kapcsolható SCARA3, FCGR2A gének expressziójának kifejezett különbségét a két mintacsoportban. Adataink azt valószínűsítik, hogy az osteoporosis során átalakult csontanyagcsere változásokat indít a nem fajlagos védekező mechanizmus regulációjában. A DFA felhasználásához kapott eredmények először hangsúlyozzák ki a természetes immunrendszer szerepét az osteoporosisban.

A RANKL és az OPG aránya jelentősen befolyásolja a csontbontás folyamatát. Az egyensúly eltolódását elsősorban a RANKL gén fokozott expressziója okozhatja. Napjainkig exonikus régióban lokalizálódó mutációkat nem hoztak összefüggésbe a csontanyagcsere folyamatokkal. Azonban promotor polimorfizmusokról bebizonyosodott, hogy részt vesznek a csonttömeg genetikai szabályozásában. *Mencej és mtsai* a RANKL gén rs9533156 és rs9525641 polimorfizmusának hatását igazolták a csípő és a lumbalis csigolya BMD-re (49). Alátámasztottuk az eredményeket és azonosítottunk egy harmadik intronikus

polimorfizmust a RANKL génben, amely befolyásolja a gerinc BMD-t, továbbá erős kapcsolatot mutat a másik két SNP-vel. A RANKL gén átíródására különböző transzkripció faktorok, hormonok, citokinek hatnak (50). A promotor régióban található polimorfizmusok befolyásolhatják ezeknek a faktoroknak a kötődését, így a gén-expressziót is. In silico elemzéseink alapján haplotípus különbségeket találtunk a RANKL gén promotor régiójában. A 'CCT' haplotípus hét specifikus transzkripció faktor-kötő helyet tartalmaz, szemben a 'TTC' haplotípussal, ahol két helyet azonosítottunk. Ezek az eltérések fontos szerepet tölthetnek be a különböző haplotípusok megváltozott expressziós aktivitásában.

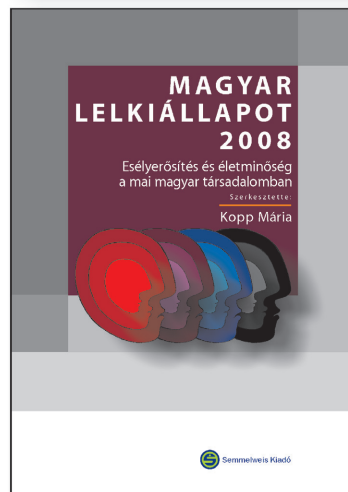
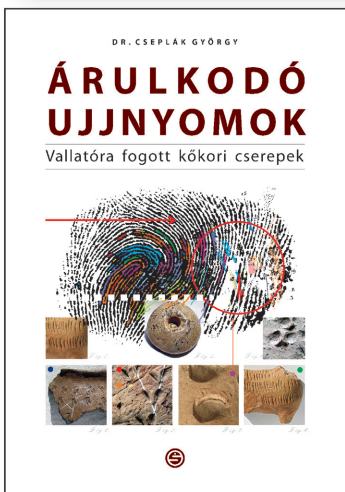
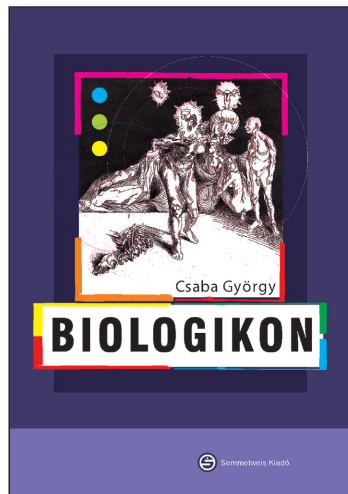
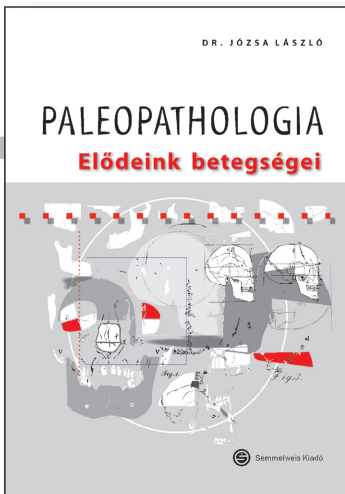
Több irodalmi adat is alátámasztja, hogy az OPG gén promotor rs3102735 polimorfizmusa összefüggést mutat a csontanyagcserevel. *Jorgensen és mtsai* (51) posztmenopauzális nőket vizsgáltak. A 'G' allél hordozóknak kisebb volt a csonttömegük, mint az 'A' allél homoizógóta formában hordozóknak. *Langdahl és mtsai* (52) igazolták, hogy a 'G' allél nagyobb arányban fordul elő osteoporoticus nőkben. Befolyásolja a csonttömeget és az osteoporoticus törések kockázatát. Vizsgálatunkban megerősítettük az rs3102735 polimorfizmus hatását a BMD-re. Az OPG gén második intronjában található rs1564858 SNP összefüggést mutat a csípő BMD-vel.

Tanulmányunk segítségével először próbáltuk a rendszerbiológia szemléletét bevezetni az osteoporosis kutatásába. Több molekuláris szinten (*transzkriptomika, genomika*) elvégzett vizsgálat segítségével számos adatot gyűjtöttünk a csontszövet megváltozott metabolikus folyamataival kapcsolatban. Ezek a genetikai információk (kvantitatív mRNS expresszió, SNP) nagyban hozzájárulhatnak a csont anyagcsere-betegségeinek megismeréséhez. Az osteoporosis kialakulását és a posztmenopauzális csontanyagcsere befolyásoló genetikai faktorok és a genetikai tényezők egymással való kapcsolata teljes egészében nem ismert. Az egyes gének, génváltozatok egyedi hatása csekélynek bizonyult a korábbi vizsgálatokban. Az osteoporosis háttérében poligénes hatás és az egyes gének, géncsoportok egymással való interakciója valószínűsíthető.

Irodalom

1. Lane NE. *Epidemiology, etiology, and diagnosis of osteoporosis. Am J Obstet Gynecol* 2006; 194:S3-11.
2. Prentice A. *The relative contribution of diet and genotype to bone development. Proc Nut Soc* 2001; 60:45-52.
3. Ralston SH. *Genetic determinants of osteoporosis. Curr Opin Rheum* 2005; 17:475-9.
4. Rizzoli R, Bonjour JP, Ferrari SL. *Osteoporosis, genetics and hormones. J Mol Endocrinol* 2001; 26:79-94.
5. Zajickova K, Zofkova I. *Osteoporosis: genetic analysis of multifactorial disease. Endocrine Reg* 2003; 37:31-44.
6. Liu YJ, Shen H, Xiao P, Xiong DH, Li LH, Recker RR et al. *Molecular genetic studies of gene identification for osteoporosis: a 2004 update. J Bone Miner Res* 2006; 21:1511-35.
7. Xiong DH, Shen H, Zhao LJ, Xiao P, Yang TL, Guo Y et al. *Robust and comprehensive analysis of 20 osteoporosis candidate genes by very high-density single-nucleotide polymorphism screen among 405 white nuclear families identified significant association and gene-gene interaction. J Bone Miner Res* 2006; 21:1678-95.
8. Lofman O, Magnusson P, Toss G, Larsson L. *Common biochemical markers of bone turnover predict future bone loss: a 5-year follow-up study. Clin Chim Acta* 2005; 356:67-75.
9. Langlois JA, Rosen CJ, Visser M, Hannan MT, Harris T, Wilson PW et al. *Association between insulin-like growth factor I and bone mineral density in older women and men: the Framingham Heart Study. J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:4257-62.
10. Grainger DJ, Percival J, Chiano M, Spector TD. *The role of serum TGF-beta isoforms as potential markers of osteoporosis. Osteoporos Int* 1999; 9:398-404.

11. Yamaguchi T, Kanatani M, Yamauchi M, Kaji H, Sugishita T, Baylink DJ et al. Serum levels of insulin-like growth factor (IGF); IGF-binding proteins-3, -4, and -5; and their relationships to bone mineral density and the risk of vertebral fractures in postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 2006; 78:18-24.
12. Inanir A, Ozoran K, Tutkak H, Mermerci B. The effects of calcitriol therapy on serum interleukin-1, interleukin-6 and tumour necrosis factor- α concentrations in post-menopausal patients with osteoporosis. *J Int Med Res* 2004; 32: 570-82.
13. Scheidt-Nave C, Bismar H, Leidig-Bruckner G, Woitge H, Seibel MJ, Ziegler R et al., Serum interleukin 6 is a major predictor of bone loss in women specific to the first decade past menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 2032-42.
14. Christenson RH. Biochemical markers of bone metabolism: an overview. *Clin Biochem* 1997; 30:573-93.
15. Srivastava AK, Vliet EL, Lewiecki EM, Maricic M, Abdelmalek A, Gluck O et al. Clinical use of serum and urine bone markers in the management of osteoporosis. *Curr Med Res Opin* 2005; 21:1015-26.
16. Abrahamsen B, Shalhoub V, Larson EK, Eriksen EF, Beck-Nielsen H, Marks SC. Cytokine RNA levels in transiliac bone biopsies from healthy early postmenopausal women. *Bone* 2000; 26:137-45.
17. Dvornyk V, Recker RR, Deng HW. Gene expression studies of osteoporosis: implications for microarray research. *Osteoporos Int* 2003; 14:451-61.
18. Ralston SH. Analysis of gene expression in human bone biopsies by polymerase chain reaction: evidence for enhanced cytokine expression in postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1994; 9:883-90.
19. Walsh MC, Kim N, Kadono Y, Rho J, Lee SY, Lorenzo J et al. Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism. *Annu Rev Immunol* 2006; 24:33-63.
20. Lorenzo J, Horowitz M, Choi Y. Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. *Endocr Rev* 2008; 29:403-40.
21. Stanley KT, VanDort C, Motyl C, Endres J, Fox DA. Immunocompetent properties of human osteoblasts: interactions with T lymphocytes. *J Bone Miner Res* 2006; 21:29-36.
22. Garcia-Martinez O, Reyes-Botella C, Aguilera-Castillo O, Vallecillo-Capilla MF, Ruiz C. Antigenic profile of osteoblasts present in human bone tissue sections. *Biosci Rep* 2006; 26:39-43.
23. Skjodt H, Hughes DE, Dobson PR, Russell RG. Constitutive and inducible expression of HLA class II determinants by human osteoblast-like cells in vitro. *J Clin Invest* 1990; 85:1421-6.
24. Rauner M, Sipos W, Pietschmann P. Osteoimmunology. *Int Arch Allergy Immunol* 2007; 143:31-48.
25. Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteo-arthrosis. *Ann Rheum Dis* 1957; 16:494-502.
26. Benayahu D. Estrogen effects on protein expressed by marrow stromal osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 233:30-5.
27. Bell PA, Chaturvedi S, Gelfand CA, Huang CY, Kochersperger M, Kopla R et al. SNPstream UHT: ultra-high throughput SNP genotyping for pharmacogenomics and drug discovery. *BioTechniques* 2002; 32S:70-7.
28. Podani J. Introduction to the Exploration of Multivariate Biological Data. Leiden, Backhuys, 2000.
29. Podani J. SYN-TAX 2000. User's Manual. Budapest, Scientia, 2001.
30. Xie Q, Ratnasinghe LD, Hong H, Perkins R, Tang ZZ, Hu N et al. Decision forest analysis of 61 single nucleotide polymorphisms in a case-control study of esophageal cancer; a novel method. *BMC Bioinformatics* 2005; 6 Suppl 2:S4.
31. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005; 21:263-5.
32. Curtin K, Wong J, Allen-Brady K, Camp NJ. PedGenie: meta genetic association testing in mixed family and case-control designs. *BMC Bioinformatics* 2007; 8:448.
33. Vega D, Maalouf NM, Sakhaee K. Review: the role of receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK)/RANK ligand/osteoprotegerin: clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:4514-21.
34. Itoh S, Itoh F, Goumans MJ, Ten Dijke P. Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *Eur J Biochem* 2000; 267:6954-67.
35. Kawabata M, Imamura T, Miyazono K. Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998; 9:49-61.
36. Manolagas SC, Kousteni S, Jilka RL. Sex steroids and bone. *Recent Prog Horm Res* 2002; 57:385-409.
37. Romagnani S. Regulation of the T cell response. *Clin Exp Allergy* 2006; 36:1357-66.
38. Schuurhuis DH, Fu N, Ossendorp F, Melief CJ. Ins and outs of dendritic cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2006; 140:53-72.
39. Steinman RM, Hemmi H. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 311:17-58.
40. Carron JA, Wagstaff SC, Gallagher JA, Bowler WB. A CD36-binding peptide from thrombospondin-1 can stimulate resorption by osteoclasts in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 270:1124-7.
41. Calvo D, Gomez-Coronado D, Suarez Y, Lasuncion MA, Vega MA. Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL. *J Lipid Res* 1998; 39:777-88.
42. Peiser L, Gordon S. The function of scavenger receptors expressed by macrophages and their role in the regulation of inflammation. *Microbes Infect* 2001; 3:149-59.
43. Pluddemann A, Neyen C, Gordon S. Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands. *Methods* 2007; 43:207-17.
44. Nuttall ME, Gimble JM. Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications. *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4:290-4.
45. Justesen J, Stenderup K, Ebbesen EN, Mosekilde L, Steiniche T, Kassem M. Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. *Biogerontology* 2001; 2:165-71.
46. Tamura M, Noda M. Identification of Dermo-1 as a member of helix-loop-helix type transcription factors expressed in osteoblastic cells. *J Cell Biochem* 1999; 72:167-76.
47. Murakami Y. Involvement of a cell adhesion molecule, TSLC1/IGSF4, in human oncogenesis. *Cancer Sci* 2005; 96:543.
48. Lin CY, Strom A, Vega VB, Kong SL, Yeo AL, Thomsen JS et al. Discovery of estrogen receptor alpha target genes and response elements in breast tumor cells. *Genome Biol* 2004; 5:R66.
49. Mencej S, Albagha OM, Prezelj J, Kocjan T, Marc J. Tumour necrosis factor superfamily member 11 gene promoter polymorphisms modulate promoter activity and influence bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *J Mol Endocrinol* 2008; 40:273-9.
50. Hojbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med* 2001; 79:243-53.
51. Jorgensen HL, Kusk P, Madsen B, Fenger M, Lauritzen JB. Serum osteoprotegerin (OPG) and the A163G polymorphism in the OPG promoter region are related to peripheral measures of bone mass and fracture odds ratios. *J Bone Miner Metab* 2004; 22:132-8.
52. Langdahl BL, Carstens M, Stenkjaer L, Eriksen EF. Polymorphisms in the osteoprotegerin gene are associated with osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res* 2002; 17:1245-55.



Tel., Fax: 210-4408

**Semmelweis Kiadó
és Multimédia Stúdió**

Budapest, Nagyvárud tér 4.
www.semmelweiskiado.hu

A komplementrendszer jelentőségének vizsgálata az atheroscleroticus eredetű érbetegségek patogenezisében

Impact of the complement system in the pathogenesis of atherosclerotic vascular disease

Széplaki Gábor

ÖSSZEFOGLALÁS *Bevezetés:* Az atherosclerosis krónikus gyulladással járó multifaktoriális megbetegedés. A komplementrendszer fontos szerepet játszik a mikrobák elleni védelemben, az immunkomplexek eltávolításában, a gyulladási reakció modulálásában, a veleszületett és szerzett immunválasz összekapcsolásában. Ismert, hogy a komplementrendszer részt vesz az atherosclerosis patogenezisében és az ischaemiás/reperfúziós (I/R) károsodás létrejöttében.

Célkitűzés: Vizsgálni kívántuk egyes komplementfehérjék (C3) és szabályozók (C1-inhibitor) szerepét az atherosclerosis prognózisának megbecslésében, továbbá a carotis endarterectomiát (CEA-t) követő komplementaktiváció és az I/R károsodás közötti összefüggést.

Módszer: Prospektív klinikai vizsgálatokban (coronaria-bypass műtéten, illetve CEA-n átesett betegekben) vizsgáltuk az új kardiovaszkuláris események, a korai restenosis megjelenése, az I/R károsodás és a komplementrendszer közötti kapcsolatot.

Eredmények: Az emelkedett C3 szint majdnem négyszeres rizikóemelkedéshez vezet az új események megjelenése tekintetében súlyos koszorúérbeteg nőkben. CEA-n átesett betegekben összefüggést mutattunk ki a magas C3 szint és a korai restenosis jelenléte között. Igazoltuk, hogy az alacsony C1-inhibitor szint előrejelzi a korai restenosis megjelenését CEA után a *mannose-binding lectin* gén (*MBL2*) homozigóta vad alléljainak hordozóiban. Kimutattuk, hogy a CEA-t követő komplementaktiváció mértéke korrelál az I/R károsodás mértékével.

Következtetések: A C3 az atherosclerosis progressziójának specifikus gyulladási markere súlyos koszorúérbetegekben és hozzájárul a korai restenosis kialakulásához CEA után. A C1-inhibitor koncentráció, illetve az *MBL2* genotípus meghatározása klinikailag hasznos lehet CEA után.

KULCSSZAVAK atherosclerosis, ischaemiás/reperfúziós károsodás, komplementrendszer, restenosis, rizikóbecslés

SUMMARY *Introduction:* Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease. The complement system plays an essential role in the defense against microbial infection, clearance of immune complexes, modulation of the inflammatory response and bridging innate and adaptive immunity. Complement also contributes to the pathogenesis of atherosclerosis and ischemia/reperfusion (IR) injury.

Aims: We aimed to investigate the prognostic value of C3 and C1-inhibitor in the progression of atherosclerosis and the association of complement activation following carotid endarterectomy (CEA) with I/R injury.

Methods: We studied the associations of complement and new vascular events, restenosis and I/R injury in prospective clinical studies (in patients who underwent coronary bypass graft [CABG] surgery or CEA).

Results: Women with high C3 levels had 4-times higher risk to develop vascular events following CABG surgery. High C3 levels were associated with early restenosis following CEA. Low C1-inhibitor levels predicted the development of an early restenosis following CEA in homozygous carriers of the wild-type alleles of the *mannose-binding lectin* gene (*MBL2*). Complement activation followed CEA and correlated with I/R injury.

Conclusions: C3 might be a specific inflammatory marker of the progression of atherosclerosis and contributes to the development of restenosis following CEA. Determining C1-inhibitor levels and *MBL2* genotypes might be useful following CEA.

KEY WORDS atherosclerosis, complement, ischemia/reperfusion injury, restenosis, risk

Semmelweis Egyetem,
Kardiológiai Központ –
Kardiológiai Tanszék

LEVELEZÉSI CÍM:

Dr. Széplaki Gábor

1122 Budapest,

Gaál József u. 9.

E-mail:

szeplaki.gabor@gmail.com

A szerző 2009-ben Junior Prima Díjban részesült.

Köszönetnyilvánítás

A doktori munka létrejöttében számos kiváló munkatárs érdemel köszönetet. Kiemelkedő közülük Prof. Füst György, aki tapasztalatával és bölcsességével irányította munkámat a Semmelweis Egyetem III. Sz. Belgyógyászati Klinika Kutató Laboratóriumában.

Rövidítések:

AMI	akut miokardiális infarktus
BMI	body mass index
C1-INH	C1-inhibitor
CABG	coronary artery bypass-graft
CAS	carotid artery stenting
CEA	carotis endarterectomia

ELISA	enzyme linked immunoabsorbent assay
I/R	ischaemiás/reperfúziós
MASP	MBL-associated serine protease
MBL	mannose-binding lectin
PTCA	percutaneous transluminary coronary angioplasty
TIA	transziens ischaemiás attack

Bevezetés

A szív- és érrendszeri megbetegedések a halál oka statisztikák vezető helyén állnak; a megbetegedések hátterében, számos esetben *atherosclerosis* mutatható ki. A kórfolyamat igen gyakori, a klinikus nap mint nap találkozik a betegséggel, illetve szövődményeivel, és napjainkban egyre nagyobb számban jelennek meg a betegség kutatásával kapcsolatos tudományos közlemények. Ez abba a téves hitbe vezethet minket, hogy a betegség vaszkuláris biológiáját jobban ismerjük, mint ahogy azt valójában (1). A kórfolyamat pontos etiopatogenezise régóta vitatott kérdés, azonban általánosan elfogadott; hogy létrejöttében multiplex tényezők együttesen játszanak fontos szerepet (2).

Az *atherosclerosis* évtizedek alatt progresszívan kialakuló betegség, melyben az egyes stádiumok jól definiáltak: *endotheldiszfunkció – fatty streak – köztes lézió – fibrózis plakk – komplikált lézió – vulnerábilis plakk – plakkruptura/erózió, thrombosis*. Az *atherosclerosis* kialakulását magyarázó, általánosan leginkább elfogadott elmélet a „sérülésre adott válasz” (*response to injury*), melyet mai formájában *Russel Ross* fogalmazott meg 1999-ben (3). Az elmélet szerint az *atherosclerosis* kiváltó eseménye az *endotheldiszfunkció*, míg a folyamat továbbfejlődésében azonban a krónikus gyulladásnak van jelentős szerepe: „az *atherosclerosis* gyulladással járó betegség” (3). A lézió korai formája a *fatty streak* tisztán gyulladással eredetű elváltozás; a gyulladással járó jelek és folyamatok végig észlelhetők a plakk fejlődésének minden szakaszában és a plakkruptura során is (4-6). Így kézenfekvő volt az a feltevés, hogy a gyulladás új rizikófaktora lehet az *atherosclerosis*nak, melynek mértékét jól jelzik a különböző gyulladással járó markerek. A legismertebb és a rizikóbecslésben mai ismereteink szerint legjobban használható ilyen marker az ultraszenzitív módszerrel meghatározott C-reaktív protein (CRP). A CRP mellett számos proinflammatorikus citokinről (interleukin-6, *tumor necrosis factor- α*), adhéziós molekulárról (*intercellular adhesion molecule-1*) és akut fázis fehérjéről (*szérum amidoid-A*, fibrinogén, komplementfehérjék) ismert, hogy emelkedett szintjük előrejelezheti az *atherosclerosis* érbetegségek megjelenését (7).

Restenosisnak nevezzük egy adott érterületen revaszkularizáció után kialakuló újraszűkülést, mely a beavatkozást követő 1-2 évben jelenik meg (az esetek döntő többségében 6 hónapon belül). A restenosis nem tekinthető a primer *atherosclerosis* ismételt megjelenésének vagy fellángolásának, hanem egy patomechanizmusban eltérő folyamatként fogható fel. A folyamat elindításában jelentős szerepe van a beavatkozás során kialakuló intimasérü-

lésnek; a sérülés nagysága és a restenosis megjelenése között szoros összefüggés mutatható ki (8).

A komplementrendszer a veleszületett, humorális immunválasz fontos része. A rendszer kiemelt szerepet játszik a mikrobák elleni védelemben, az immunkomplexek eltávolításában és a gyulladással járó reakció modulálásában, továbbá esszenciális szerepet tölt be a veleszületett és szerzett immunválasz közötti kapcsolat megteremtésében (9). A komplementrendszer képes a szervezetre káros idegen és a megváltozott saját struktúrák felismerésére (10, 11). A rendszer elemei inaktív formában, igen nagy mennyiségben vannak jelen a keringésben; az aktiválódást elindító struktúra megjelenésére a rendszer kaskádyszerű reakcióval válaszol. Az aktiváció és a komplementválasz nem antigénspecifikus, T-sejtek, illetve antitestek jelenléte nélkül is létrejön. A komplementválaszban a celséjtek lízise, az opsonizáció és a gyulladással járó reakció fokozása játszik szerepet.

A komplementrendszer nélkülözhetetlen a szervezet immunhomeosztázisának fenntartásához, kóros aktivációja számos kórfolyamat patomechanizmusában játszik szerepet (12). *Geertinger és Sorensen* már 1973-ban felvetette a komplementrendszer szerepét az *atherosclerosis* patogenezisében (13), majd *Hollander és mtsai* 1979-ben közölték az első humán vizsgálatot, mely alátámasztotta ezt a feltételezést (14). Az azóta eltelt idő óta számos vizsgálat bizonyította, hogy a komplementrendszer fontos szerepet játszik az *atherosclerosis* folyamatában (12, 15-18). Ennek legfontosabb bizonyítéka az, hogy míg az ép artériákban egyáltalán nem mutatható ki komplementaktiváció, addig az *atherosclerosis* laesióban egyértelműen jelen van a komplementaktiváció, mely a vulnerábilis és rupturált plakkokban még kifejezettebb.

Muscari és mtsai megfigyelték, hogy súlyos *atherosclerosis*ban szenvedő betegek szérumban emelkedett a C3 és a C4, továbbá az IgA-szint egészséges, életkorban egyeztetett kontrollegyenekhez képest (19). Ez a megfigyelés mutatott rá először, hogy a komplementfehérjéknek helye lehet az *atherosclerosis* rizikójának becslésében. Később egy egészséges populáció 4 éves követéses vizsgálata során azt találták, hogy a magas C3 szint a többi rizikófaktortól függetlenül több mint négyszeres rizikót jelentett az akut myocardialis infarctus (AMI) megjelenése tekintetében (20). Nagyszámú populációs vizsgálatban leírták, hogy a C3-koncentráció és a testtömegindex (*body mass index* – BMI), a systolés és diastolés vérnyomásérték, a triglicerid- és a glükózszint között szoros korreláció mutatható ki (21). A C3-szint továbbá jól korrelál az éhomi inzulin szinttel, ezért felvetették, hogy a C3 a fokozott inzulinrezisztencia, illetve a metabolikus szindróma markere lehet és ezáltal jelzi a proatherogen hatást (22). Érde-

kes azonban, hogy AMI-n átesett betegekben a C3-szint nem korrelált a tradicionális rizikófaktorokkal és emelkedettnek bizonyult, annak ellenére, hogy az utóbbiak kezelése mellett megfelelő értékeket mutatattak (23). Lényeges, hogy a C3 más akutfázis-fehérjéktől (CRP, fibrinogén) eltérő összefüggésprofil mutat a tradicionális rizikófaktorokkal, melyet az atherosclerosis folyamatában betöltött különböző szerepüknek tulajdoníthatunk (24).

A *Muscari* vezette munkacsoport eredményei alapján felvetődik, hogy a komplementrendszer központi molekulája, a C3 az atherosclerosis egyik új rizikófaktora lehet. Szérumszintje számos tradicionális rizikófaktorral és gyulladásos markerrel korrelál, azonban azoktól függetlenül, önállóan jelezte előre az AMI megjelenését egy random populációban (20). Más munkacsoport azonban C3-ra vonatkozó hasonló adatokat nem közölt, és nagyon kevés tanulmányban vizsgálták a komplement- és komplementregulátor fehérjék prognosztikai jelentőségét (25, 26).

Ha egy szövet vérellátása átmenetileg megszűnik (ischaemia), a vérellátás újraindulása (reperfúzió) intenzív gyulladásos reakcióval jellemezhető ischaemiás/reperfúziós (I/R) károsodás kialakulásához vezet (27). Az I/R károsodás aktivált polimorfonukleáris leukocyták jelenlétével, szabadgyökök termelésével, citokinek felszabadulásával, eikozanoidok termelésével jellemezhető folyamat (27). Az I/R károsodás elősegíti a neutrophil sejtek atrakcióját, aktivációját, adhézióját és a sérülés helyére jutását, számos gyulladásos mediátor termelését, mely hozzájárul a lokális és távoli szervkárosodás kialakulásához. Jól ismert tény, hogy a komplementrendszer aktivációja is jelentős mértékben segíti ezt a folyamatot anafilatoxinok (C3a, C5a) termelésével, illetve a MAC által közvetített sejtlizissel, azonban az aktiváció mechanizmusa I/R károsodás során még nem pontosan ismert (27).

Munkánk célja az volt, hogy megvizsgáljuk egyes komplementfehérjék (C3) és szabályozó molekulák (C1-inhibitor) lehetséges szerepét az atheroscleroticus érbetegségek prognózisának megbecslésében. Ezért két különböző prospektív vizsgálatban, coronariabypass műtéten, illetve carotis-endarterectomián (CEA) átesett betegekben vizsgáltuk az új kardiovaszkuláris események, az utóbbi esetben pedig a korai restenosis megjelenése és a komplementfehérjék szérumszintje közötti összefüggéseket. Munkánk további célja volt, hogy vizsgáljuk a komplementaktiváció létrejöttét CEA után és annak összefüggését az I/R károsodás mértékével.

Módszer

Klinikai vizsgálatok

Súlyos koszorúérbetegség prospektív vizsgálata

A vizsgálatba 266 (67 [25,1%] nő és 199 [74,9%] férfi, életkor: 41-85 év) súlyos coronariabetegség miatt *coronary artery bypass-graft* (CABG) műtéten átesett beteget vontunk be. A műtėti indikáció minden esetben stabil vagy instabil angina pectoris volt, melyet típusos EKG-elváltozás kísért. A szérum- és plazmaminták a műtét után 6 hónappal történt kontrollvizsgálat során kerültek levételre, a

kontrollvizsgálatok során a betegek egyikénél sem állt fenn akut infekció. A vizsgálat prospektivitását kérdőívek postai kiküldésével, illetve a háziorvosok megkeresésével biztosítottuk a 65±5,8 hónapos követési idő alatt. A kérdőívben a következő végpontok felderítését tűztük ki célul: halálozás, kardiális esemény miatti halálozás, a követési időben bekövetkezett új AMI, CABG műtét, PTCA szükségessége, stroke, CEA szükségessége, perifériás éren végzett beavatkozás. A súlyos koszorúérbetegség kontrollját 182 (100 [54,9%] nő és 82 [45,1%] férfi, életkor: 20-79 év) egészséges véradó és önkéntes képezte.

Carotis endarterectomia utáni prospektív vizsgálat

A vizsgálatba 64 (21 [32,8%] nő és 43 [67,2%] férfi, életkor: 43-79 év) súlyos carotis érszűkület miatt carotis endarterectomián (CEA-n) átesett betegek vontunk be. A vizsgált csoport a korábban munkacsoportunk által publikált 123 CEA-n átesett beteg prospektív vizsgálatának egy részét képezte (28, 29). A betegek anamnézisének felvételekor rögzítettük a korábbi koszorúérbetegség, stroke, tranzien ischaemiás attack (TIA), diabetes mellitus, perifériás érszűkület, hypertonia vagy hyperlipidaemia fennállását és a dohányzási szokásokat. A CEA indikációja megfelelt a Magyarországon is elfogadott *American Heart Association* ajánlásnak (30). Az betegkövetés medián ideje 13,8 (12,3-19,0) hónap volt. A követési idő alatt a carotisok keringési viszonyait carotis duplex scan (CDS) vizsgálattal ellenőriztük 5,7 (4,6-8,0) héttel, 6,8 (6,2-7,9) hónappal és 13,8 (12,3-19,0) hónappal a műtét után, a korábban leírt módszer szerint (29). A korai restenosis definíciójaként az operált a. carotis internán lévő 50%-ot meghaladó szűkületet tekintettük; ez 10 beteg esetében (15,6%) alakult ki a követési idő végével, mely az irodalmi adatokkal egybevethető (31). A betegektől a plazmamintákat a műtét előtt, a szérummintákat közvetlenül a műtét előtt, majd a posztoperatív 4. napon, 6. héten és 14. hónapban vettük le. A CEA-n átesett betegek kontrollját 59 (27 [45,8%] nő és 32 [54,2%] férfi, életkor: 32-61 év) egészséges véradó és önkéntes képezte.

Carotis-endarterectomiát követő prospektív obszervációs vizsgálat

A vizsgálatba 16 (7 [43,75%] nő és 9 [56,25%] férfi, életkor: 41-84 év) beteget vontunk be. A vizsgálatba csak olyan betegeket vontunk be, akiknél nem szerepelt az orvosi dokumentációban vagy aktuálisan nem állt fenn akut vagy krónikus gyulladás, autoimmun megbetegedés, szepszis vagy tumoros megbetegedés. A CEA indikációja megfelelt az *American Heart Association* ajánlásának (30), a műtétet everzios technikával végezték (32). A műtėti eljárás során az carotis artéria leszorításának idejét rögzítettük. A vizsgálatba kontrollként 10 (3 [30,0%] nő és 7 [70,0%] férfi, életkor: 50-75 év) súlyos carotis érbetegét vontunk be, akiknél percutan carotis artéria stentelés (CAS). A CAS indikációja megfelelt az *American Heart Association* és az *American Stroke Association* közös ajánlásában szereplő irányelveknek (33). A betegektől 6 időpontban történt vérvétel: CEA/CAS előtt (kiindulási minta - KI), közvetlenül a beavatkozás után (0 h), továbbá 1 (1 h), 4 (4h), 8 (8 h) és 24 (24 h) órával azt követően.

Mindhárom vizsgálatot a vizsgálatot a Semmelweis Egyetem etikai bizottsága engedélyezte, a vizsgálatban részt vevők írásos beleegyezést adtak.

Laboratóriumi vizsgálatok

A szérumban C3, C1-inhibitor (C1-INH), haptoglobin és 2HS-glikoprotein koncentrációját radiális immundiffúzió alapuló módszerrel határoztuk meg (34).

Az *MBL-associated serine protease-2* (MASP-2) szérum szintjét saját enzime linked immunoabsorbent assay (ELISA) módszerrel határoztuk meg a következők szerint (35): a CRP szérumkoncentrációját partikulumokkal erősített immunturbimetriás eljárással Roche Cobas Integra 400 laboratóriumi automata (Roche, Basel, Svájc) segítségével határoztuk meg.

A komplementaktivációs termékek közül a C4d, C3a és SC5b-9 szintjét kereskedelmi forgalomban kapható, ELISA módszerrel alapuló kitékkel határoztuk meg, pontosan betartva a gyártó alkalmazási utasításait (Quidel, San Diego, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok).

A C1rsC1INH szintjét laborunkban bevezetett ELISA módszerrel határoztuk meg (36): a genomiális dezoxiribonukleinsavat EDTA-val alvadásgátolt, felhasználásig -20 °C-on tárolt vérből kisózással nyertük (37).

Az *MBL2* gén 1. exonján található 3 pontmutációt – B allél (kodon 54), C allél (kodon 57), D allél (kodon 52) – és a promóter régió (-221) X/Y polimorfizmusát *polymerase chain reaction* (PCR) alapú szekvencia specifikus indítás (*sequence specific priming* [SSP]) módszerrel határoztuk meg, nyolc különálló reakció segítségével (38, 39).

A C3 fast és slow allotípusok (C3*F/S) meghatározását kollaborációs partnerünk laboratóriumában végezték Teisberg eredeti elektroforézisen alapuló módszere szerint (40).

A szérumban összkoleszterin- és trigliceridszintjét a CABG-n átesett betegcsoportban enzimatiszmetrikus eljárással határoztuk meg Enzachol-F, illetve ENZGlycide reagenseket alkalmazva (Diachem). A CEA-n átesett betegcsoportban a összkoleszterin- és trigliceridszint meghatározása Roche Cobas Integra 400 klinikai kémiai analizátor segítségével történt (Roche, Basel, Svájc).

Statisztikai analízis

A statisztikai analízis és az adatbrázolás a Prism for Windows (GraphPad Software, San Diego, Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok, 3.0 és 4.02 verzió) illetve az SPSS for Windows (SPSS Inc, Chicago, Illinois, Amerikai Egyesült Államok, 10.0, 11.5, 13.0.1 verziók) használatával készült. A vizsgált változók nagy része nem mutatott normál eloszlást, ezért ezekben az esetekben nonparametrikus statisztikai tesztekkel használtunk az analízisek során. Két független minta folytonos változói közötti összehasonlításhoz a Mann-Whitney U-tesztet, kategorikus változói közötti összehasonlításhoz a Fisher-féle tesztet használtuk. Csoporton belüli variancia analízishez a Friedman-féle tesztet használtuk Dunn-féle *post hoc* teszttel kiegészítve. Interakciók vizsgálatához kétirányú ANOVA teszt

használtunk Bonferroni *post hoc* teszttel kiegészítve. A változók közötti korrelációk vizsgálatára a Spearman-féle korrelációs koefficiens értékét határoztuk meg. Bináris adatok kapcsolatának vizsgálatára többszörös logisztikus regressziós analízist végeztünk. A legmegfelelőbb vágópontok meghatározását *receiver operator characteristics* görbe analízis alkalmazásával végeztük. Minden statisztikai tesztet kétoldalasan végeztünk, a próbák eredményét $p < 0,05$ értékek esetén tekintettük szignifikánsnak. A szövegben megadott értékek medián (interkvartilis tartomány) értékeknek felelnek meg, ettől eltérő esetben ezt a szövegben feltüntettem.

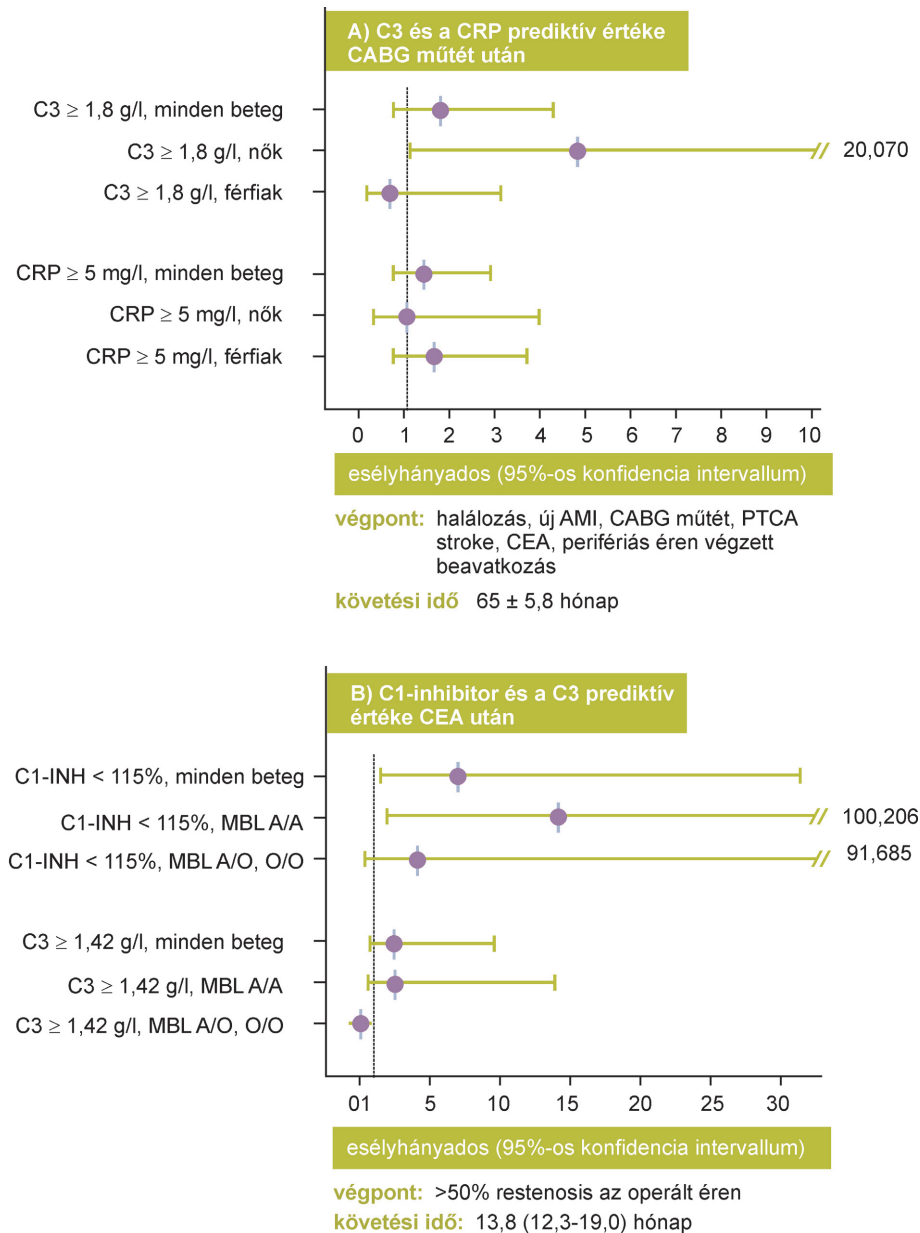
Eredmények

Súlyos koszorúér-betegek prospektív vizsgálata

Súlyos koszorúér-betegekben a szérumban C3 koncentrációja emelkedettebb egészséges kontrollokhöz viszonyítva (1,48 [1,14–1,79] vs. 1,31 [1,08–1,48] g/L; $p=0,0037$), függetlenül az életkortól, nemtől, BMI, systolés és diasztolés vérnyomásértékektől, illetve az összkoleszterin-, triglicerid- és CRP-szinttől ($p=0,021$). A magas C3-szintet nem magyarázza a C3*F allél hordozása ($p=0,5475$). Nincs összefüggés a dohányzási szokások és a C3 szintje között ($p=0,318$). Súlyos koszorúér-beteg nőkben a C3 szintje nem korrelál az életkorral, BMI-vel, összkoleszterin- és trigliceridkoncentrációval. A követési idő során 57 súlyos coronariabetegnél (18 nőbetegnél és 39 férfi beteg esetében) alakult ki az alábbi új kardiovaszkuláris események valamelyike: kardiális halálozás, új AMI, stroke, carotisműtét, illetve perifériás érbetegség. Nőkben szignifikánsan magasabb volt a C3 szintje azokban a betegben, akiknél az CABG műtét utáni követési periódus alatt új kardiovaszkuláris esemény alakult ki (1,70 [1,32–1,95] g/l vs. 1,33 [1,09–1,71] g/l, $p=0,0364$). Férfiakban hasonló összefüggést nem találtunk (1,13 [1,00–1,57] g/l vs. 1,32 [1,09–1,54] g/l, $p=0,0905$). Nőbetegben a magas C3-szint ($C3 \geq 1,8$ g/l) előrejelzi az új kardiovaszkuláris események megjelenését CABG műtét után, az esélyhányados értéke 4,1 (95%-os konfidencia intervallum: 1,23–13,61, $p=0,0249$). Az életkorra, BMI-re és dohányzásra adjusztált esélyhányados értéke 4,8 (95%-os konfidencia intervallum: 1,137–20,070, $p=0,033$; *l. ábra, A*).

Carotis-endarterectomiát követő prospektív obszervációs vizsgálat

Carotis-endarterectomia után 4 nappal a C3 szintje – a többi nemkomplement akutfázis-fehérjétől eltérően – nem növekedett, mely feltehetőleg komplementkonzumpció következménye. A műtétet követő 14. hónapban a C3-szint szignifikánsan magasabb a kiindulási értékhez képest; az emelkedés azonban csak az MBL A/A hordozókban szignifikáns ($p < 0,001$; Friedman-teszt után végzett Dunn-féle *post hoc* teszt alapján). A korai restenosis szenvedett betegekben a C3 szintje emelkedett a többi beteghez képest (1,79 [1,41–2,17] vs. 1,23 [0,98–1,65] g/l; $p=0,0175$). A műtét után 14 hónappal mért C3-szint és a restenosis mértéke között pozitív korreláció áll fenn



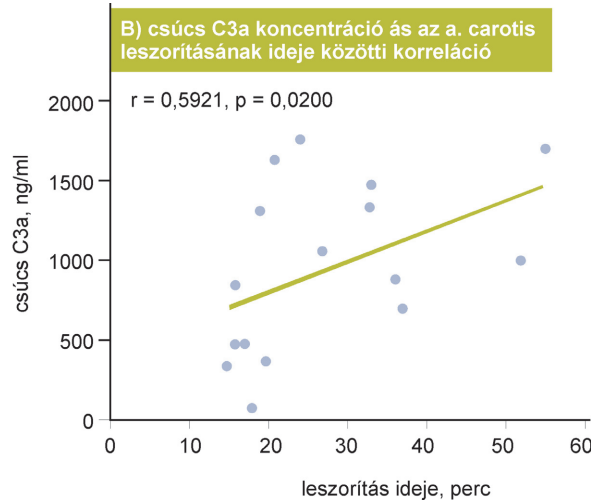
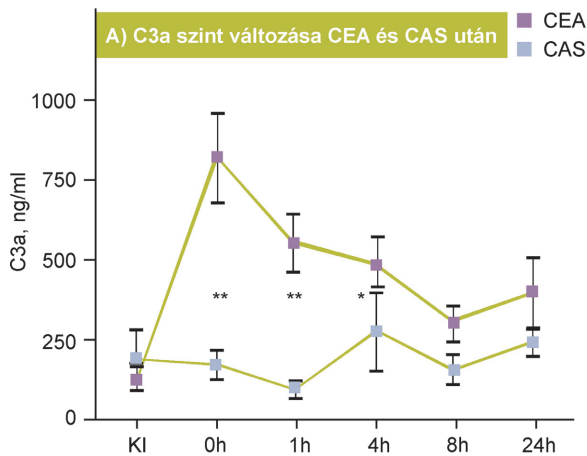
1. ábra

A C3 és C1-inhibitor prediktív értéke az atherosclerosis progressziójának előrejelzésében

A) CABG műtéten átesett súlyos koszorúérbeteg nőkben a magas C3 szint előrejelzi az új események megjelenését ($p=0,033$). Ez az összefüggés az egész betegcsoportra, illetve férfiakra vonatkoztatva nem szignifikáns. A magas CRP szint jelen vizsgálatban nem volt szignifikáns prediktor. Az egyes fehérjék koncentrációját 6 hónappal a műtét után határoztuk meg. Többszörös logisztikus regressziós modell, az életkor és a BMI folytonos változó, a dohányzás kategorikus változó (valaha dohányzott vs. soha nem dohányzott) a modellben.

B) CEA után az alacsony C1-inhibitor szint előrejelzi a restenosis kialakulását a betegcsoportban ($p=0,0113$), az összefüggés csak az MBL A/A allotípus hordozóiban szignifikáns ($p=0,0087$). A C3 szintnek nincs prediktív értéke, annak ellenére, hogy az emelkedett C3 szint és a restenosis között kapcsolat volt kimutatható (lásd szöveg). A fehérjék szérum-szintjét 6 héttel a műtét után határoztuk meg. Többszörös logisztikus regressziós modell, az életkor folytonos változó, a nem kategorikus változó a modellben.

Rövidítések: CRP – C-reaktív protein; CABG – coronary artery bypass graft; CEA – carotis endarterectomia; C1-INH – C1-inhibitor; MBL – mannose binding lectin.



1. ábra

Carotis endarterectomiát követően komplementaktiváció jön létre, melynek mértéke összefügg ischaemiás/reperfúziós károsodás idejével

A. CEA-t követően a C3a szintje szignifikánsan megemelkedett, mely komplementaktiváció jelenlétére utal. A vízszintes vonalak átlag és SEM értékeket jelölnek, a p-értéket Mann Whitney-féle U-teszt alapján számoltuk: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. BE- beavatkozás előtt.

B. A CEA-t követő csúcs C3a termelés és a carotis artéria leszorításának ideje között pozitív korreláció volt kimutatható. Az ábrán feltüntetett számok a Spearman-féle rho- és p-értéket jelölik.

Rövidítések: CEA – carotis endarterectomia; CAS – carotid artery stenting.

($r=0,3311$, $p=0,0075$), az összefüggés csak az MBL A/A hordozókban szignifikáns ($r=0,4904$, $p=0,0021$). Logisztikus regressziós analízis segítségével igazoltuk, hogy a C3-szint és a restenosis mértéke közötti összefüggés csak részben *MBL2* genotípus dependens (OR: 4,8924, 95%CI: 1,146-21,4739, $p=0,0354$). Nincs összefüggés az általunk vizsgált nemkomplement akutfázis-fehérjék (CRP, haptoglobin, α 2HS-glikoprotein) és a carotis-endarterectomia utáni korai restenosis kialakulása között.

Carotis endarterectomiát követően a C1-inhibitor szintje szignifikánsan megemelkedik a műtét utáni 4. napon, majd normalizálódik 6 héttel a műtétet követően, függetlenül az *MBL2* genotípustól ($p < 0,01$; Friedman-teszt után végzett Dunn-féle post hoc teszt alapján). Azoknál a betegeknél, akiknél korai restenosis alakult ki, a C1-inhibitor szintje szignifikánsan alacsonyabb a műtét után 4 nappal (134,0 [123,75–153,5] vs. 158,0 [135,5–177,0] %; $p=0,0277$) és 6 héttel (112,5 [105,75–120,25] vs. 131,0 [115,5–144,5] %; $p=0,0052$), a többi beteghez képest. Carotis endarterectomiát követően 6 héttel a C1-inhibitor koncentrációja negatívan korrelál a követési idő végén meghatározott restenosis mértékével ($r=-0,3415$, $p=0,0058$), ez az összefüggés csak az MBL A/A hordozókban szignifikáns ($r=-0,5044$, $p=0,0015$). Az alacsony C1-inhibitor-szinttel rendelkező betegeknél a restenosis mértéke már a követési idő 7. hónapjában magasabb a többi beteghez képest; az alacsony C1-inhibitor-szint és a restenosis mértéke közötti összefüggés szignifikáns ($p < 0,0001$; kétirányú ANOVA alapján). A 6. héten mért alacsony C1-inhibitor-szint (C1-inhibitor $< 115\%$) előrejelzi a korai restenosis megjelenését carotis-endarterec-

tomia után, az életkorra és nemre adjusztált esélyhányados értéke 6,9 (95%-os konfidencia intervallum: 1,55–31,02), $p=0,0113$). Az összefüggés csak az MBL A/A hordozókban szignifikáns, ebben az alcsoportban az adjusztált esélyhányados értéke 13,97 (95%-os konfidencia intervallum: 1,95–100,21 $p=0,0087$). Nincs összefüggés a MASP-2 szintje és a carotis endarterectomia utáni korai restenosis kialakulása között, a fehérje koncentrációja emelkedő tendenciát mutat műtét után 4 nappal és lecsökken ehhez képest a műtét utáni 6. héten (1. ábra, B).

Carotis-endarterectomiát követő prospektív obszervációs vizsgálat

Carotis-endarterectomiát követően a C3a szintje szignifikánsan megemelkedik közvetlenül a műtét után és 4 órán keresztül magasabb marad mind a kiindulási értékhez ($p < 0,001$; Friedman-teszt után végzett Dunn-féle post hoc teszt alapján, 2. ábra, A), mind a carotis-stentelésen átesett betegeknél mért értékekhez képest ($p < 0,01$). A C5b-9 szintje carotis-endarterectomián átesett betegeknél megemelkedik közvetlenül a műtét után a kiindulási értékekhez képest ($p < 0,05$; Friedman-teszt után végzett Dunn-féle post hoc teszt alapján). A C1rsC1INH és a C4d szintje nem változik a műtétet követő 24 órán belül. A C3a emelkedésének létrejötté nem függ az *MBL2* genotípusától. A műtét után mért csúcs C3a koncentráció és az ischaemiás/reperfúziós károsodás ideje között szignifikáns pozitív korreláció áll fenn ($r=0,5921$, $p=0,0200$; 2. ábra, B). A CRP szintje carotis-endarterectomiát és stentelést követően is megemelkedik 24 órával a beavatkozás után ($p < 0,05$). Carotis-stentelésen átesett betegeknél nem vál-

tozik a C1rsC1INH, C4d, C3a és C5b-9 szintje a beavatkozást követő első 24 órában.

Következtetések

CABG műtéten átesett súlyos koszorúérbeteg nőkben az ötéves követési idő alatt több mint négyszeres rizikóemelkedés volt kimutatható új kardiovaszkuláris esemény kialakulására vonatkozóan. A megfigyelt rizikóemelkedés a többi rizikófaktortól függetlenül állt fenn. Megfigyelésünk összhangban van a *Muscari és mtsai* által közölt eredményekkel, melyek szerint a C3 az ischaemiás események, a koszorúér-betegség és elsősorban az AMI fontos prediktorának bizonyult egy olyan populációs vizsgálatban, ahol a részvevőknél a vizsgálatba bekerüléskor nem állt fenn atheroscleroticus érbetegség (20). Jelen munkánkat követően több vizsgálat is megerősítette a C3 és az atherosclerosis közötti összefüggést (41-44): a C3 az atherosclerosis speciális gyulladási markere lehet.

Vizsgálatunkban igazoltuk, hogy a C3 szintjében bekövetkezett változás és a CEA-t követő korai restenosis között összefüggés van. Igazoltuk azt, hogy a C3 koncentrációja megemelkedik a műtét után 1 évvel, és értéke jól korrelál a restenosis mértékével. Bemutattuk, hogy ez az összefüggés részben függ az *MBL2* genotípusától; csak a homozigóta vad allélhordozókban volt kimutatható. Azonban többszörös regressziós analízis segítségével bemutattuk, hogy a magas C3-szint és a korai restenosis közötti összefüggés részben független az *MBL2* genotípustól. A magas C3-szint és a restenosis közötti kapcsolatot a C3 simaizomsejtekre gyakorolt profilerációt elősegítő direkt hatása (45), másrészt az interleukin-6-on keresztül megvalósuló indirekt hatások magyarázhatják (46-48).

Vizsgálatunkban elsőként igazoltuk azt, hogy az alacsony C1-INH-szint előrejelzi a korai restenosis megjelenését CEA után, az *MBL2* genotípustól függően. Bemutattuk, hogy a műtét után 6. héten mért alacsony C1-INH szinttel rendelkező betegeknek majdnem 7-szer nagyobb az esélye a restenosis kialakulására életkortól és nemtől függetlenül. Az *MBL2* A/A hordozókban a rizikó majdnem 14-szer magasabbnak bizonyult. Az alacsony C1-INH-szint és a restenosis mértéke közötti összefüggés már a műtétet követően 7 hónappal szignifikáns volt. A szérum MASP2-koncentráció nem függött össze a restenosis megjelenésével és mértékével. Mindezek arra utalnak, hogy a csökkent C1-INH szint nem képes megfelelően kontrollálni a komplementaktivációt a restenosis szenvedett betegekben. Ezen eredmények korábbi munkánkkal egyetértésben azt valószínűsítik, hogy a restenosis kialakulásához intakt lektin útra és megfelelő C1-INH általi szabályozásra van szükség (28, 49). Azonban nem zárható ki az sem, hogy a C1-INH más plazmaenzim-rendszerekre (véralvadás, fibrinolízis és kinin-kallikrein kaskád) gyakorolt elégtelen szabályozó hatása is hozzájárul a folyamat kialakulásához.

Elsőként igazoltuk azt, hogy CEA-t követően komplementaktiváció jön létre, melynek mértéke összefügg a carotis artéria leszorításának idejével. A műtétet követően közvetlenül a plazma C3a szintje jelentősen, míg a SC5b-9-koncentráció kisebb mértékben megemelkedett. A C3a szintje műtétet követően 1, illetve 4 órával is emelkedtebbnek bizonyult mind a kiindulási értékhez, mind a CAS-on átesett kontrollok mintáiban mért értékekhez képest. A CEA-t követő csúcsc3a-koncentráció jól korrelált a carotis artéria leszorításának idejével, mely az I/R károsodás idejét tükrözi. Ezen direkt összefüggés felveti a komplementrendszer gátló szerek alkalmazásának lehetőségét I/R károsodással járó klinikai körkékben (50).

Irodalom

1. Libby P. The vascular biology of atherosclerosis. In: Braunwald E, Zipes DP, Libby P, editors. *Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine*. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2001. p. 995-1010.
2. Prohászka Z. A 60 kDa-os hőszokkfehérje elleni autoantitestek jellegzetességei és szerepük az atherogenesisben. Magyar Tudományos Akadémia. Budapest, 2006.
3. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340:115-126.
4. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420:868-874.
5. Libby P. Vascular biology of atherosclerosis: overview and state of the art. *Am J Cardiol* 2003; 91:3A-6A.
6. Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:508-519.
7. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2000; 342:836-843.
8. Kornowski R, Hong MK, Tio FO, Bramwell O, Wu H, Leon MB. In-stent restenosis: contributions of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31:224-230.
9. Prohászka Z. A komplementrendszer felépítése és aktivációja. In: Falus A, Buzás E, Rajnavölgyi É, eds. *Az immunológia alapjai*. Budapest: Semmelweis Kiadó; 2007. p. 58-70.
10. Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 2001; 344:1058-1066.
11. Walport MJ. Complement. Second of two parts. *N Engl J Med* 2001; 344:1140-1144.
12. Oksjoki R, Kovanen PT, Meri S, Pentikainen MO. Function and regulation of the complement system in cardiovascular diseases. *Front Biosci* 2007; 12:4696-4708.
13. Geertinger P, Sorensen H. Complement and arteriosclerosis. *Atherosclerosis* 1973; 18:65-71.
14. Hollander W, Colombo MA, Kirkpatrick B, Paddock J. Soluble proteins in the human atherosclerotic plaque. With spectral reference to immunoglobulins, C3-complement component, alpha 1-antitrypsin and alpha 2-macroglobulin. *Atherosclerosis* 1979; 34:391-405.
15. Seifert PS, Kazatchkine MD. The complement system in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1988; 73:91-104.
16. Niculescu F, Rus H. Complement activation and atherosclerosis. *Mol Immunol* 1999; 36:949-955.
17. Oksjoki R, Kovanen PT, Pentikainen MO. Role of complement activation in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2003; 14:477-482.
18. Kostner KM. Activation of the complement system: a crucial link between inflammation and atherosclerosis? *Eur J Clin Invest* 2004; 34:800-802.

19. Muscari A, Bozzoli C, Gerratana C, Zaca F, Rovinetti C, Zauli D, et al. Association of serum IgA and C4 with severe atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1988; 74:179-186.
20. Muscari A, Bozzoli C, Puddu GM, Sangiorgi Z, Dormi A, Rovinetti C, et al. Association of serum C3 levels with the risk of myocardial infarction. *Am J Med* 1995; 98:357-364.
21. Muscari A, Massarelli G, Bastagli L, Poggiopollini G, Tomassetti V, Volta U, et al. Relationship between serum C3 levels and traditional risk factors for myocardial infarction. *Acta Cardiol* 1998; 53:345-354.
22. Muscari A, Massarelli G, Bastagli L, Poggiopollini G, Tomassetti V, Drago G, et al. Relationship of serum C3 to fasting insulin, risk factors and previous ischaemic events in middle-aged men. *Eur Heart J* 2000; 21:1081-1090.
23. Muscari A, Mele MC, Bastagli L, Poggiopollini G, Tomassetti V, Drago G, et al. Conditional risk factors in men with previous myocardial infarction: relevance of C3 and homocysteine. *Acta Cardiol* 2001; 56:303-311.
24. Muscari A, Bastagli L, Poggiopollini G, Tomassetti V, Massarelli G, Cappelletti O, et al. Different associations of C-reactive protein, fibrinogen and C3 with traditional risk factors in middle-aged men. *Int J Cardiol* 2002; 83:63-71.
25. Kostner KM, Fahti RB, Case C, Hobson P, Tate J, Marwick TH. Inflammation, complement activation and endothelial function in stable and unstable coronary artery disease. *Clin Chim Acta* 2006; 365:129-134.
26. Speidl WS, Exner M, Amighi J, Kastl SP, Zorn G, Maurer G, et al. Complement component C5a predicts future cardiovascular events in patients with advanced atherosclerosis. *Eur Heart J* 2005; 26:2294-2299.
27. Arumugam TV, Shiels IA, Woodruff TM, Granger DN, Taylor SM. The role of the complement system in ischemia-reperfusion injury. *Shock* 2004; 21:401-409.
28. Rugonfalvi-Kiss S, Dósa E, Madsen HO, Endrész V, Prohászka Z, Laki J, et al. High rate of early restenosis after carotid eversion endarterectomy in homozygous carriers of the normal mannose-binding lectin genotype. *Stroke* 2005; 36:944-948.
29. Dósa E, Rugonfalvi-Kiss S, Prohászka Z, Szabó A, Karádi I, Selmeci L, et al. Marked decrease in the levels of two inflammatory markers, hs-C-reactive protein and fibrinogen in patients with severe carotid atherosclerosis after eversion carotid endarterectomy. *Inflamm Res* 2004; 53:631-635.
30. Biller J, Feinberg WM, Castaldo JE, Whitemore AD, Harbaugh RE, Dempsey RJ, et al. Guidelines for carotid endarterectomy: a statement for healthcare professionals from a Special Writing Group of the Stroke Council, American Heart Association. *Circulation* 1998; 97:501-509.
31. Frericks H, Kievit J, van Baalen JM, van Bockel JH. Carotid recurrent stenosis and risk of ipsilateral stroke: a systematic review of the literature. *Stroke* 1998; 29:244-250.
32. Entz L, Járányi S, Nemes A. Eversion endarterectomy in surgery of the internal carotid artery. *Cardiovasc Surg* 1996; 4:190-194.
33. Sacco RL, Adams R, Albers G, Alberts MJ, Benavente O, Furie K, et al. Guidelines for prevention of stroke in patients with ischemic stroke or transient ischemic attack: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association Council on Stroke: co-sponsored by the Council on Cardiovascular Radiology and Intervention: the American Academy of Neurology affirms the value of this guideline. *Stroke* 2006; 37:577-617.
34. Kohler PF, Muller-Eberhard HJ. Immunochemical quantitation of the third, fourth and fifth components of human complement: concentrations in the serum of healthy adults. *J Immunol* 1967; 99:1211-1216.
35. Széplaki G, Varga L, Laki J, Dósa E, Rugonfalvi-Kiss S, Madsen HO, et al. Low C1-inhibitor levels predict early restenosis after eversion carotid endarterectomy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27:2756-2762.
36. Széplaki G, Hirschberg K, Gombos T, Varga L, Prohászka Z, Dósa E, et al. Early complement activation follows eversion carotid endarterectomy and correlates with the time of clamping of the carotid artery. *Mol Immunol* 2008; 45:3289-3294.
37. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16:1215.
38. Garred P, JJS, Quist L, Taaning E, Madsen HO. Association of mannose-binding lectin polymorphisms with sepsis and fatal outcome, in patients with systemic inflammatory response syndrome. *J Infect Dis* 2003; 188:1394-1403.
39. Ohlenschlaeger T, Garred P, Madsen HO, Jacobsen S. Mannose-binding lectin variant alleles and the risk of arterial thrombosis in systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2004; 351:260-267.
40. Teisberg P. High voltage agarose gel electrophoresis in the study of C 3 polymorphism. *Vox Sang* 1970; 19:47-56.
41. Engstrom G, Hedblad B, Janzon L, Lindgarde F. Complement C3 and C4 in plasma and incidence of myocardial infarction and stroke: a population-based cohort study. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2007; 14:392-397.
42. Ajjan R, Grant PJ, Futers TS, Brown JM, Cymbalista CM, Boothby M, et al. Complement C3 and C-reactive protein levels in patients with stable coronary artery disease. *Thromb Haemost* 2005; 94:1048-1053.
43. Brunetti ND, Correale M, Pellegrino PL, Cuculo A, Biase MD. Acute phase proteins in patients with acute coronary syndrome: Correlations with diagnosis, clinical features, and angiographic findings. *Eur J Intern Med* 2007; 18:109-117.
44. Palikhe A, Sinisalo J, Seppanen M, Haario H, Meri S, Valtonen V, et al. Serum complement C3/C4 ratio, a novel marker for recurrent cardiovascular events. *Am J Cardiol* 2007; 99:890-895.
45. Lin ZH, Fukuda N, Jin XQ, Yao EH, Ueno T, Endo M, et al. Complement 3 is involved in the synthetic phenotype and exaggerated growth of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2004; 44:42-47.
46. Ikeda U, Ikeda M, Oohara T, Oguchi A, Kamitani T, Tsuruya Y, et al. Interleukin 6 stimulates growth of vascular smooth muscle cells in a PDGF-dependent manner. *Am J Physiol* 1991; 260:H1713-1717.
47. Selzman CH, Shames BD, Reznikov LL, Miller SA, Meng X, Barton HA, et al. Liposomal delivery of purified inhibitory-kappaBalpha inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced human vascular smooth muscle proliferation. *Circ Res* 1999; 84:867-875.
48. Watanabe S, Mu W, Kahn A, Jing N, Li JH, Lan HY, et al. Role of JAK/STAT pathway in IL-6-induced activation of vascular smooth muscle cells. *Am J Nephrol* 2004; 24:387-392.
49. Szabó A, Laki J, Madsen HO, Dósa E, Prohászka Z, Rugonfalvi-Kiss S, et al. Early rise in serum VEGF and PDGF levels predisposes patients with a normal MBL2 genotype to restenosis after eversion endarterectomy. *Stroke* 2007; 38:2247-2253.
50. Széplaki G, Szegedi R, Hirschberg K, Gombos T, Varga L, Karádi I, et al. Strong complement activation after acute ischemic stroke is associated with unfavorable outcomes. *Atherosclerosis* 2009; 204:315-320.
51. Széplaki G, Prohászka Z, Duba J, Rugonfalvi-Kiss S, Karádi I, Kókai M, et al. Association of high serum concentration of the third component of complement (C3) with pre-existing severe coronary artery disease and new vascular events in women. *Atherosclerosis* 2004; 177:383-389.
52. Széplaki G, Varga L, Laki J, Dósa E, Madsen HO, Prohászka Z, et al. Elevated complement C3 is associated with early restenosis after eversion carotid endarterectomy. *Thromb Haemost* 2006; 96:529-534.



ORVOSKÉPZÉS a GRADUÁLIS ÉS POSZTGRADUÁLIS KÉPZÉS folyóirata

2009
eddig megjelent számai

MEGRENDELHETŐ a Semmelweis Kiadótól!

ORVOSKÉPZÉS

Klinikai pszichológia

neuropszichológia – kognitív terápia; standard és sémmképző módszerek – borderline személyiségzavar – öngyilkosság megelőzhetőség – reaktív igazságosság – figyelemhiány – anxiopszichológia – kényszerbetegség – gyermeki depresszió és szorongásos zavarok pszichoterápiája – etikai kérdések a klinikai pszichológiában – Klinikai pszichológia az addiktológiában – Klinikai pszichológia az igazságügyben – egészségpszichológia – transzperzónális pszichológia témái

www.semmelweiskiado.hu

ORVOSKÉPZÉS szerkesztőség
Tel.: 215-1401
orvoskepzes@semmelweiskiado.hu