

EGYETEMI DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A Magyar Referencia DNS Biobank jellemzése. Az ACE I/D
polimorfizmus szerepe a metabolikus szindrómára való fogékonyság
kialakításában a magyar lakosság körében**

Dr. Fialat Szilvia

Témavezető: Prof. Dr. Ádány Róza, D.Sc.



DEBRECENI EGYETEM
Egészségtudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2011

A Magyar Referencia DNS Biobank jellemzése. Az ACE I/D polimorfizmus szerepe a metabolikus szindrómára való fogékonyság kialakításában a magyar lakosság körében

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
az egészségtudományok tudományágban

Írta: Dr. Fialat Szilvia, általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Egészségtudományok Doktori Iskolája
(Megelőző orvostan és népegészségtan programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Ádány Róza, D.Sc.

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Muszbek László, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Puskás László, D.Sc.
Dr. Szabó Zoltán, Ph.D.

A doktori szigorlat időpontja: 2012. március 19. 11 óra

Az értekezés bírálói:

Dr. Endreffy Emőke, kandidátus
Dr. Bereczky Zsuzsanna, Ph.D.

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Muszbek László, akadémikus
tagok: Dr. Endreffy Emőke, kandidátus
Dr. Bereczky Zsuzsanna, Ph.D.
Prof. Dr. Puskás László, D.Sc.
Dr. Szabó Zoltán, Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja: 2012. március 19. 13 óra

Bevezetés

1. A populációs alapú genetikai adatok jelentősége a megelőzésben

A XXI. században a humán genomot célzó genetikai vizsgálatok központi szerepet játszanak a népegészségügyben azáltal, hogy rendelkezésre bocsátják azon információkat, melyek szükségesek a betegségek megelőzéséhez és a kialakulásuk kockázatának becsléséhez. A genetikai vizsgálatok eredményeinek felhasználása, a lakosság egészségének javítása és a betegségek prevenciója céljából nagymértékben függ az orvostudomány és népegészségügy területén kivitelezett vizsgálatok eredményeitől. A betegségekre hajlamosító ún. kandidáns géneket többségében magas rizikójú családokban vagy válogatott populációkban „fedezték fel”. Miután egy kandidáns gén azonosításra került további epidemiológiai vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy az adott génvariáns populációs hatása kvantifikálható legyen valamint, hogy lehetővé váljon a vele interakcióba lépő környezeti tényező(k) azonosítása illetve hatásának becslése.

Család-, vagy populációs alapú genetikai asszociációs vizsgálatok végrehajtásával sor kerülhet egy adott génvariáns és betegség közötti összefüggés meghatározására, azaz annak megválaszolására, hogy egy egyénben, aki egy vagy két magas kockázatú génvariánst hordoz emelkedett-e a betegség kialakulásának kockázata. Az eset-kontroll vizsgálati elrendezés az asszociációs vizsgálatok gyakori típusa, amely összehasonlítja a génvariáns gyakoriságát az egyének két jól meghatározott csoportjában: a) esetek, akiknél diagnosztizálták a betegséget (reprezentálniuk kell a forráspopulációban levő összes esetet) és b) kontrollok, akik vagy a nem-betegek közül vagy a teljes populációból random módon kerültek kiválasztásra. Ha a kontrollok nem reprezentálják megfelelően a forráspopulációt ahonnan az esetek kiválasztásra kerültek kiválasztási hiba jelentkezik így a genetikai és/vagy környezeti tényezők megoszlása az eset és kontroll csoportban nem lesz összehasonlítható.

A genetikai epidemiológiai vizsgálatokban többnyire adott betegségben szenvedő esetcsoportok genotípus-megoszlását hasonlítják össze betegségtől mentes kontrollcsoportok genotípus-megoszlásával. Ez a fajta kontrollválasztás azonban nem teszi lehetővé a populációs szintű kockázatbecslést, ami népegészségügyi szempontból kiemelten fontos, mert alapot szolgáltat a populációs járulékos kockázat becsléséhez.

Felismerve a populációs alapú megközelítésben rejlő lehetőségeket a krónikus betegségekre hajlamosító gének kereséséhez számos országban alakítottak ki populáció alapú biobankot, mely alkalmas az allélfrekvenciák populációs szintű becslésére.

2. A Magyar Referencia DNS Biobank szükségessége

Egy rizikóallélhez rendelhető járulékos kockázat minden allél esetén más, továbbá eltekintve egyéb allélok és környezeti tényezők hatásától, ez a kockázat az allél populációs prevalenciájának függvényében változik. Mivel egyik populációban jelen lévő allélspektrum direkt módon nem alkalmazható kockázatbecslésre egy másik populációban, így ahhoz, hogy becsülni tudjuk egy adott gén fogékonyságban betöltött szerepét, először fel kell mérni a rizikóallélek prevalenciáját a magyar populációban.

A közelmúltban strukturált irodalmi áttekintést végeztünk azzal a céllal, hogy a magyar populációban bizonyos kiemelt népegészségügyi jelentőségű krónikus betegségek kialakulásáért felelőssé tehető rizikóallélek populációs prevalenciáját jellemezzük. A magyar populáción elvégzett genetikai epidemiológiai vizsgálatok az eset-kontroll elrendezést alkalmazva jellemzően ún. asszociációs vizsgálatok voltak, néhány százas nagyságrendű esetszámmal. Az esetek mellé pedig az adott betegségtől mentes, és nem a magyar lakosságra reprezentatív kontrollcsoport került kiválasztásra. Az ilyen módszerrel kialakított vizsgálati populációkban becsült allélfrekvenciák nem az általános magyar lakosságra jellemző eloszlást becsülik, és nem alkalmazhatók általában annak eldöntésében, hogy populációs szinten az adott mutáció és a betegség között van-e kapcsolat. A jövőben végzett fogékonysági vizsgálatokhoz elengedhetetlen tehát egy olyan DNS mintapopuláció kialakítása, mely a magyar lakosságot megfelelően reprezentálja, így populációs referenciakontrollként használható fel. Fontos kiemelni, hogy populáció alapú reprezentatív DNS biobank hazánkban eddig még nem került kialakításra.

2.1. A referencia DNS biobank kialakítása

A Háziiorvosi Morbiditási Adatgyűjtési Program (HMAP) jó lehetőséget szolgáltatott a referencia DNS biobank költséghatékony kialakítására. A HMAP 1998-

ban a Debreceni Egyetem Népegészségügyi Iskola és az ÁNTSZ közreműködésével jött létre kiemelt népegészségügyi jelentőségű krónikus betegségek prevalenciájának és incidenciájának monitorozására. A közelmúltban a HMAP infrastruktúrájára építve számos epidemiológiai vizsgálat zajlott, melynek keretein belül került sor a magyar lakosságra nem, kor és földrajzi eloszlás szempontjából reprezentatív referencia DNS biobank kialakítására.

A DNS mintagyűjtés alapvető célja volt, hogy népegészségügyi szempontból jelentős betegségekre hajlamosító genetikai eltérések általános gyakoriságának jellemzésére alkalmas gyűjtemény jöjjön létre. A referenciapopulációba bekerülő egyes személyek kiválasztása minden vizsgálatban véletlenszerűen, előzetesen meghatározott algoritmus alapján történt a HMAP-ban résztvevő háziorvosok közreműködésével. A többlépcsős mintavétel első lépésében a vizsgálatba bevont megyék lakosságának kor- és nem szerinti eloszlása alapján képzett megyei mintanagyságok meghatározására került sor. A második lépésben egy adott megyében a részvételt vállaló háziorvosok praxisainak kor és nem szerinti eloszlása alapján a praxis-specifikus mintanagyságokat meghatározása történt meg. Harmadik lépésben került sor a cirkuláris szisztematikus véletlen mintavétellel a „referencia-személyek” kiválasztására, melynél nem és kor szerint arányos mintavételre törekedtünk.

A résztvevő háziorvosok feladata volt a demográfiai, antropometriai adatok gyűjtése, fizikális vizsgálat és vérminták gyűjtése laboratóriumi vizsgálatra. A DNS vizsgálatához EDTA-val alvadásgátolt vér gyűjtésére került sor.

2.2. A biobank kialakításának követelményei

2.2.1. Reprezentativitás

A referencia DNS biobank kialakításához felhasznált epidemiológiai vizsgálatok kohorsz populációi az adott megye lakosság száma, nem-, és kor szerinti megoszlása alapján kerültek kialakításra (ld. alább - A biobank bemutatása). A részt vevő megyék oly módon kerültek kiválasztásra, hogy mind a keleti és nyugati országrész képviseltetve legyen. A HMAP-ban résztvevő háziorvosok kiválasztása során fontos szempont volt,

hogy a praxisaik reprezentatívak legyenek az adott megye összes praxisára mind a település lakosság száma mind földrajzi elhelyezkedés tekintetében.

2.2.2. Elegendő mintaszám és megfelelő statisztikai erő

A krónikus betegségek genetikai háttere olyan génvariánsok eredőjeként alakul ki melyek a populációban gyakorta előfordulnak, egyenként pedig csak kis hatást fejtenek ki a betegség kialakításának kockázatára (EH=1,2-1,5). Így a biobankok kialakításakor fontos annak tisztázása, hogy alkalmasak lesznek-e ezen „kis hatás” detektálására. Ezért alapvető fontosságú volt a minimálisan szükséges mintaszám becslése.

2.3. Az összegyűjtött vérminták feldolgozása

Az EDTA-val alvadásgátolt vérminták a laborparaméterek vizsgálatához szükséges natív vérmintával együtt 3 órán belül a megyei ÁNTSZ intézetekbe kerültek, ahol a minták előzetes feldolgozása és átmeneti tárolása történt. Innen kerültek a minták a genetikai analízis és a laboratóriumi vizsgálat helyszínére.

A DNS extrakció a Magna Pure LC DNA Isolation Kit-Large Volume felhasználásával történt a gyártó utasításait követve. Az extrakciót követően a minták aliquotokban kerültek tárolásra. A hosszú távú tárolás -80°C -on a rövid távú tárolása $+4^{\circ}\text{C}$ -on történik.

2.4. Standard körülmények biztosítása

A vizsgálat(ok) validitásának meghatározó eleme a vérnyomásmérés, a vérvétel és a fizikális vizsgálat standard kivitelezése. Az ebből adódó torzítás kiküszöbölésére a vizsgálat(ok) kezdetét megelőzően a résztvevő háziorvosoknak oktatáson kellett részt venniük, ahol elsajátították a vizsgálatokkal szemben támasztott alapvető módszertani elvárásokat. A szérumból a klinikai paraméterek meghatározása minden esetben egyetlen (referencia) laboratóriumban történt.

3. A biobank bemutatása

3.1. Populációs alapú biobank

A biobankok egyik típusát az ún. populációs alapú biobankok képviselik, melyekben az egyedek egy meghatározott célpopulációból kerülnek kiválasztásra, oly módon hogy a kiválasztásuk független legyen a betegségstátusztól. A létrehozott populációs minta reprezentatív a lakosság egészére ezért, alkalmazható referencia vizsgálatok elvégzésére.

3.1.1. A kardiovaszkuláris megbetegedésekre hajlamosító genetikai eltérések feltérképezést célzó genetikai epidemiológiai vizsgálatok referenciapopulációja

A vizsgálat forráspopulációja a HMAP-ban 2001-ben részt vevő Győr-Moson-Sopron, Hajdú-Bihar, Szabolcs-Szatmár-Bereg és Zala megyék háziiorvosi praxisaihoz tartozó 20 éves és annál idősebb férfi és női lakosság. A megyék lakosság száma és 1999. évi kor és nem szerinti eloszlása alapján került kialakításra a vizsgálati populációt alkotó 1196 fő. Ez a mintanagyság lehetővé teszi, hogy a szív- és érrendszeri megbetegedések rizikógénjeinek előfordulási gyakoriságát nagy pontossággal meghatározhassuk a magyar populációban. A vizsgálatban gyűjtött vérmintákból a DNS-preparálás technikailag 1184 esetben volt kivitelezhető. Az egyedek kor- és nem szerinti eloszlása az alábbiak szerint alakul: Győr-Moson-Sopron megye: 127 férfi, 157 nő; Hajdú-Bihar megye: 171 férfi, 187 nő; Szabolcs-Szatmár-Bereg megye: 168 férfi, 187 nő; Zala megye: 86 férfi, 101 nő. Rendelkezésre álló adatok köre: demográfiai adatok, testsúly, testmagasság, lipidprofil.

3.1.2. A metabolikus szindróma előfordulásának, klinikai jellegzetességeinek vizsgálata a felnőtt magyar lakosság körében című keresztmetszeti vizsgálat során gyűjtött kontrollcsoport

A forráspopulációt a HMAP-ban 2005-ben részt vevő nyolc megye (Baranya, Bács-Kiskun, Győr-Moson-Sopron, Hajdú-Bihar, Heves, Komárom-Esztergom, Szabolcs-Szatmár-Bereg és Zala) háziiorvosi praxisaiba tartozó 20-69 éves férfi és női

lakosság alkotta. A vizsgálati minta tervezett elemszáma 2006 fő volt. Ez a mintanagyság lehetővé tette, hogy a metabolikus szindróma International Diabetes Federation kritériumrendszerének megfelelően legkisebb gyakorisággal bíró indikátor-paraméterének (kóros HDL-koleszterinszint) korábbi vizsgálatok alapján becsült gyakoriságát (4,8%) 20-25%-os eltéréssel detektálhassuk, illetve a vizsgált gének polimorfizmusainak előfordulását meghatározhassuk. 1819 fő vett részt önkéntesen a vizsgálatban. A DNS-preparálás technikailag 1783 esetben volt kivitelezhető. Az egyedek kor- és nem szerinti eloszlása az alábbiak szerint alakult: Baranya megye: 102 férfi, 120 nő; Bács-Kiskun megye: 149 férfi, 164 nő; Győr-Moson-Sopron megye: 109 férfi, 134 nő; Hajdú-Bihar megye: 117 férfi, 140 nő; Heves megye: 86 férfi, 95 nő; Komárom-Esztergom megye: 69 férfi, 80 nő; Szabolcs-Szatmár-Bereg megye: 137 férfi, 138 nő; Zala megye: 72 férfi, 71 nő. A gyűjtött adatok köre: demográfiai adatok, lipidprofil, testmagasság, testsúly, haskőrfogat, vérnyomás, gyógyszeres kezelés, kreatinin, húgysav, májenzimek, glükóz, hipertónia, elhízottság.

3.2. Betegség specifikus biobank

A biobankok másik típusa az ún. betegség specifikus biobank, amely adott betegségben szenvedő egyének DNS mintáit és ahhoz tartozó adatokat foglal magába. A betegség specifikus biobankok egyedeinek mintái kombinálhatóak kontroll csoportokkal, így megfelelő alapot kínálnak eset-kontroll vizsgálatokhoz.

3.2.1. „A II-es típusú diabetes mellitus ellátásának feltérképezése a háziiorvosi gyakorlatban” című vizsgálat keretében gyűjtött kontrollcsoport

A forráspopulációt a HMAP-ban részt vevő tizenegy megye (Baranya, Borsod-Abaúj-Zemplén, Bács-Kiskun, Győr-Moson-Sopron, Hajdú-Bihar, Heves, Komárom-Esztergom, Nógrád, Szabolcs-Szatmár-Bereg, Szolnok, Zala) háziiorvosi praxisaiba tartozó 35 éves és idősebb II-es típusú diabetes mellitusban szenvedő élő lakosság alkotta. A DNS-preparálás technikailag 1300 esetben volt kivitelezhető. Az egyedek kor- és nem szerinti eloszlása az alábbiak szerint alakul: Baranya megye: 88 férfi, 77 nő;

Borsod- Abaúj-Zemplén: 35 férfi, 38 nő Bács-Kiskun megye: 59 férfi, 53 nő; Győr-Moson-Sopron megye: 35 férfi, 42 nő; Hajdú-Bihar megye: 28 férfi, 30 nő; Heves megye: 50 férfi, 49 nő; Komárom-Esztergom megye: 27 férfi, 38 nő; Nógrád megye: 41 férfi, 47 nő; Szabolcs-Szatmár-Bereg megye: 116 férfi, 158 nő; Szolnok megye: 41 férfi, 38 nő Zala megye: 110 férfi, 100 nő. A gyűjtött adatok köre: demográfiai adatok, lipidprofil, testmagasság, testsúly, haskörfogat, vérnyomás, HbA1c, kreatinin, húgysav, CRP, ALP, májenzimek, glükóz, hipertónia, elhízottság.

4. A Magyar Referencia DNS Biobank haszna és kihívásai

- a. A génvariánsok magyar lakosságra jellemző prevalenciájáról leginkább szigorú kritériumok szerint létrehozott biobank szolgáltatott elfogadható becslést. A populációs járulékos kockázat becsléséhez, továbbá annak méréséhez, hogy a genetikai variánsok a betegségekre való fogékonyság kialakításában milyen mértékben vesznek részt populációs allélfrekvenciák és genotípus prevalenciák szükségesek.
- b. Elősegíti a jövőben tervezett kutatásokat azáltal, hogy megkönnyíti a multifaktoriális eredetű betegségek kialakulásához vezető genetikai fogékonyság becslését, betegségekhez tartozó ismert legfőbb genetikai faktorok és környezeti tényezők számszerűsítését.
- c. A DNS biobankot elérhetővé kell tenni a tudományos közösség ezen belül az orvosi biológiai kutatások számára. Ennek érdekében, tervezzük, hogy csatlakozunk a *Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure* páneurópai hálózatához.
- d. Az egészségügyben és kutatásban hasznosítható előnyök mellett számos etikai, jogi és társadalmi vonatkozással számolnunk kell. Néhány ezek közül a nagyon fontos kérdések közül pl. a megfelelő tájékoztatáson alapuló beleegyezés, a donor személyének adatainak bizalmas kezelése és a rendszeres nyilvános konzultáció.

5. A Magyar Referencia DNS Biobankra épülő genetikai epidemiológiai vizsgálatok

A Magyar Referencia Biobank DNS mintáit kontroll csoportként eddig az alábbi genetikai epidemiológiai vizsgálatokban kerültek felhasználásra:

1. Study on the association of insertion/deletion polymorphism of angiotensin-1 converting enzyme and metabolic syndrome in Hungarian adults.
2. Identification of multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression.

A közelmúltban egy nemzetközi kollaborációs munka keretében egy második generációs, genom szintű asszociációs vizsgálatra (4533 eset és 10750 kontroll részvételével) került sor, mely a coeliákiára való fogékonyság genetikai komponensének meghatározására irányult. Ezt követően 7 egymástól független eset-kontroll vizsgálati csoportban (4918 coelákiás eset és 5684 kontroll, melyek mindegyike európai populációkból származott) mintegy 131 „single nucleotid polymorphism” (a GWAS alapján ($P_{\text{GWAS}} < 10^{-4}$) választott 113 SNP és már korábbról ismert 14 gén 18 variánsa) sikeres genotipizálására került sor. A Magyar Referencia DNS Biobankból került kiválasztásra egy 1067 főt tartalmazó, a magyar lakosságra reprezentatív kontroll csoport. A vizsgálatban 13 genomrégió estén kaptak szignifikáns eredményt ($P_{\text{kombinált}} < 5 \times 10^{-8}$), melyek többnyire az immunrendszerben funkcionális szerepet játszó géneket kódolnak pl. a *BACH2*, *CCR4*, *CD80*, *CIITA/SOCS1/CLEC16A*, *ICOSLG*, *ZMIZ1* vagy az *ETS1*, *RUNX3*, *THEMIS* és *TNFRSF14* gének melyek kulcsszerepet játszanak a T sejtek thymusban történő szelekciója során.

3. Fine mapping of the CELIAC2 locus on chromosome 5q31-q33 in the Finnish and Hungarian populations.
4. Cost-effective HLA typing with tagging SNPs predicts celiac disease risk haplotypes in the Finnish, Hungarian, and Italian populations.
5. IL23R in the Swedish, Finnish, Hungarian and Italian populations: association with IBD and psoriasis, and linkage to celiac disease.
6. Linkage and association study of FcγR polymorphisms in celiac disease.

7. Association study of the IL18RAP locus in three European populations with coeliac disease.
8. The shared CTLA4-ICOS risk locus in celiac disease, IgA deficiency and common variable immunodeficiency.
9. Myosin IXB gene region and gluten intolerance: linkage to coeliac disease and a putative dermatitis herpetiformis association.
10. Association of the 8.1 ancestral MHC haplotype with colorectal cancer risk.
11. Modulation of the risk of coronary sclerosis/myocardial infarction by the interaction between factor XIII subunit A Val34Leu polymorphism and fibrinogen concentration in the high risk Hungarian population.

6. A vizsgálat célja

Vizsgálatunkban célunk volt a magyar lakosságot kor-, nem-, és földrajzi megoszlás szerint reprezentáló Magyar Referencia DNS Biobank sajátosságai mellett az ACE I/D és AGT M235T polimorfizmusok metabolikus szindrómára való fogékonyságban betöltött szerepének a bemutatása is. Az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. Milyen gyakorisággal fordulnak elő a magyar lakosságban az ACE I/D és AGT M235T polimorfizmusok?
2. Van-e kapcsolat a fenn említett génvariánsok és a metabolikus szindróma között?
3. Leírható-e korreláció a génvariánsok és bármely metabolikus változó között?

Anyagok és módszerek

1. A vizsgálat alanyai

A közelmúltban a HMAP infrastruktúrájára építve egy keresztmetszeti vizsgálat keretében került sor a metabolikus szindróma prevalenciájának a becslésére. A forráspopulációt a HMAP-ban résztvevő nyolc megye (Baranya, Bács-Kiskun, Győr-Moson-Sopron, Hajdú-Bihar, Heves, Komárom-Esztergom, Szabolcs-Szatmár-Bereg és Zala) 59 háziiorvosi praxisaiba tartozó 20-69 éves férfi és női lakosság alkotta. A megyék oly módon lettek kiválasztva, hogy a keleti és nyugati országrészt egyaránt reprezentálják. A tervezett mintaelemszám 2006 fő volt. Ez a mintanagyság lehetővé tette, hogy a metabolikus szindróma legkisebb gyakorisággal bíró indikátor-paramétere, a kóros HDL-koleszterinszint korábbi vizsgálatok alapján becsült gyakoriságát (4,8%) 20-25%-os eltéréssel detektálhassuk, illetve a fenti gének polimorfizmusainak előfordulását meghatározhassuk a magyar felnőtt (20-69 éves) populációban. A praxishoz tartozó, intézményben (szociális otthon stb.) élő betegek kizárása a mintavételt megelőzően a háziorvos által történt.

A vizsgálati populáció a forráspopulációból került kiválasztásra. A többlépcsős mintavétel első lépésében meghatározásra kerültek a megyei mintanagyságok, majd a praxis-specifikus mintanagyságok végül pedig a vizsgálatban részvevő személyek kiválasztására került sor cirkuláris szisztematikus véletlen mintavétellel.

2. Adatgyűjtés

A háziorvosok végezték el az adatgyűjtést (demográfiai adatok, antropometriai adatok), a teljes fizikális vizsgálatot és a vérgyűjtést a metabolikus szindróma kritériumainak laboratóriumi meghatározásához. Továbbá sor került a genetikai vizsgálatokhoz szükséges vér levételére is. A vérnyomásmérés hitelesített, higanyos vérnyomásmérővel, standard körülményeket biztosítva került kivitelezésre.

A metabolikus szindróma és komponenseinek diagnosztizálása az IDF kritériumrendszere alapján történt. A vizsgálatban résztvevőket két csoportba

metabolikus szindrómás (MS+) és nem metabolikus szindrómás csoportra (MS-) osztottuk. Az MS+ csoportot további alcsoportokra osztottuk a metabolikus komponens-kombinációiknak megfelelően.

A vizsgálati protokollt a Debreceni Egyetem Etikai bizottsága hagyta jóvá, a vizsgálatban résztvevő alanyok pedig teljes körű tájékoztatást kaptak.

3. DNS extrakció és genotipizálás

A DNS extrakció a Magna Pure LC DNA Isolation Kit-Large Volume (Roche Diagnostics) felhasználásával történt. A PCR-t és a genotipizálást LightCycler™ real time PCR (Roche Diagnostics) készülék segítségével végeztük. Reakciópufferként LightCycler DNA Master Hybridization Probes 10x-t (Roche Molecular Biochemicals) használtunk 3.2 mmol/l-es (ACE) és 2.4 mmol/l-es (AGT) végleges Mg²⁺ koncentrációval. A PCR 20 µl-es reakciótérfogatban zajlott, melyben a primerek koncentrációja 0,5- 0,5 µmol/L (ACE: 5'CTG GAG ACCACTCCC ATC CTT TCT3' és 5'GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA3' , AGT: 5'CTC TAT CTG GGA GCC TT 3' és 5'GTT TGC CTT ACC TTG GAA3'), az anchor és detector próbáké pedig 0,2- 0,2 µmol/l (ill. az AGT esetében 0,1-0,1µmol/l) volt. A detektor próba (ACE: 5'CGT GAT ACA GTC ACT TTT ATG—FL3' AGT: 5'CCC TGA TGG GAG CCA GTG—FL3') 3' vége fluoreszcenciával; az anchor próba (ACE: 5'LC Red640-GGT TTC GCC AAT TTT AT CCA GCT CTG--PH3', AGT: 5'LC Red640-GAC AGC ACC CTG GCT TTC AAC AC—PH3') 5' vége LightCycler Red 640 -nel jelölt, 3' vége pedig az extenzió blokkolása érdekében foszforilált.

Az AGT gén genotipizálása során alkalmazott PCR hőmérsékleti feltételek és időtartamok a következők voltak: az iniciális denaturáció (94°C, 45 s, 20°C/sec) után 55 ciklus amplifikáció következett, amely denaturációs (94°C, 0 s, 20°C/sec), annealációs (57°C, 15 s, 20°C/sec) és extenziós (72°C, 25s, 20°C/sec) lépéseket foglalt magába. Az ACE gén esetén a mutációt tartalmazó szakasz felszaporítása az alábbi feltételek mellett történt: az iniciális denaturáció (95°C, 60s, 20°C/sec), majd 50 ciklus amplifikáció következett amely szintén denaturációs (95°C, 3 s, 20°C/sec), annealációs (61°C, 20 s,

20°C/sec) és extenziós (72°C, 30s, 20°C/sec) lépésekből állt. Az amplifikációt követően a kapillárisokban az elegy hőmérsékletét lecsökkentettük 40°C-ra és 1 percen keresztül inkubáltuk annak érdekében, hogy a próbák a felszaporított amplitonokra hibridizáljanak. Ez követően a reakcióelegyet lassan a 85°C –ig hevítettük (0.4 °C/s), közben a fluoreszcencia intenzitás változása monitorozásra került. A mért fluoreszcencia intenzitásváltozás negatív deriváltjának hőmérséklet függvényében való ábrázolásával kaptuk meg a genotípusok elkülönítéséhez felhasznált olvadáspont görbéket.

4. Statisztikai analízis

A különböző csoportokban és alcsoportokban a normál eloszlású változók átlaga Student féle t próbával került összehasonlításra. A BMI változó logaritmikus transzformációval, az átlagos szisztolés vérnyomás változó reciprok négyzetgyök transzformáció által vált normál eloszlásúvá. Az allélfrekvenciák meghatározása a vizsgálati populációban tapasztalt genotípusmegoszlásból az ún. gene counting method segítségével történt. Annak megítélésére, hogy a referencia populációban megfigyelt genotípusmegoszlás különbözik e szignifikánsan a Hardy-Weinberg equilibrium által becsült (várt) genotípusok relatív gyakoriságától a χ^2 Goodness of fit-próbát használtuk. A vizsgálati csoportokban/alcsoportokban a genotípusmegoszlás és az allélfrekvenciák közötti különbségeket χ^2 próbával teszteltük. Többszörös logisztikus regressziós modellel vizsgáltuk a genotípusok hatását a MS kialakulásának valószínűségére. A kor és nem nincs hatással az egyén genetikai meghatározottságára, így az esetek és kontrollok illesztése e változókra nem szükséges. $P < 0,05$ -t tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. A statisztikai elemzéshez a STATA 9.2-es szoftvert (College Station, Texas) használtuk.

Eredmények

1819 fő (91%) vett részt önkéntesen a vizsgálatban, a DNS-preparálás technikailag 1783 esetben volt kivitelezhető. 641 egyén esetén vált lehetővé a MS diagnosztizálása, míg 1121 fő nem felelt meg a fenn említett IDF kritériumrendszernek. A MS prevalenciája a két nem között kis mértékben különbözött ($p = 0.02$). A hasi elhízás mellett, amely a MS diagnózisának alapvető eleme a metabolikus komponensek közül az emelkedett vérnyomás volt a leggyakoribb (87%); a betegek 50%-nak ($n=320$) volt két és 35%-nak volt ($n=224$) három metabolikus komponense a hasi elhízás mellett. Az összes metabolikus komponens a betegek 15%-ban volt jelen ($n=97$). A leggyakoribb komponens-kombináció a hasi elhízás, diszlipidémia és emelkedett vérnyomás volt (21%).

Az ACE II, ID és DD genotípusok frekvenciája 19,5% ($n= 125$), 49,1% ($n=315$) és 31,4% ($n=201$) volt az MS+ csoportban, továbbá 23,1% ($n=259$), 51,5% ($n=577$) és 25,4% ($n=285$) az MS- csoportban. A DD genotípus frekvenciája (31,36% vs. 25,42%, $p=0,006$), és a D allél frekvenciája (0,56 vs. 0,51, $p=0,006$) szignifikánsan magasabb volt az MS+ csoportban, mint az MS- csoportban. Az AGT M235M, M235T és T235T genotípusok megoszlása az MS+ csoportban 27,5 % ($n=176$), 48,8 % ($n=313$) és 23,7 % ($n=152$) –nak adódott, míg az MS- csoportban rendre 25,4% ($n=285$), 51,4 % ($n=576$), és 23,2% ($n=260$) volt. A két vizsgálati csoportban az AGT genotípus megoszlások között nem volt különbség.

A magyar felnőtt lakosságra reprezentatív teljes mintában az allélfrekvenciák a következők voltak: 0,51 és 0,49 az AGT M235 és 235T allélok nál, 0,47 és 0,53 az ACE I és D allélok nál, melyek a szakirodalomban megtalálható kaukázusi allélfrekvenciákhoz hasonlóak. A megfigyelt genotípusmegoszlások nem különböztek szignifikáns mértékben a Hardy-Weinberg equilibrium által becsült genotípus gyakoriságától (AGT: $\chi^2=0,39$, $p=0,53$; AGT: $\chi^2=0,6$, $p=0,43$). A genotípus és allélfrekvenciák nem különböztek szignifikánsan a nemek között.

A DD genotípus és a MS között logisztikus regressziós modell segítségével szignifikáns asszociációt tártunk fel (nyers $EH=1,46$, 95% $MT=1,10-1,93$, $p=0,008$). Ennek értelmében a DD genotípusú egyéneknél összehasonlítva azokkal, akik II genotípusúak a MS kialakulásának kockázata 46%-kal magasabb volt. Számításba véve a

túlsúlyosság lehetséges szerepét, mint zavarótényező, rétegzett elemzést is végeztünk, de a túlsúlyosság ezen szerepe nem igazolódott.

Az egyes metabolikus komponensek és az ACE genotípusok között szignifikáns kapcsolat nem igazolódott. Azonban azon DD genotípusú egyének esetében, akik a hasi elhízás mellett emelkedett triglicerid szinttel és alacsony HDL koleszterol szinttel rendelkeztek a MS kialakulásának kockázata összevetve az II genotípusúakkal 2,7 –szer magasabb volt (EH: II vs. DD; 95% MT: 1,14-6,31, $p=0,024$). Továbbá szignifikáns asszociációt találtunk abban az esetben is, amikor a diszlipidémia magasvérnyomással járt együtt: mind az ID (EH=1,7, 95% MT: 1,02 – 2,9, $p=0,038$) mind a DD (EH=1,9, 95% MT: 1,1-3,3, $p=0,022$) genotípus emelte a betegség kialakulásának kockázatát. Amikor a hasi elhízás mellett emelkedett triglicerid, alacsony HDL koleszterin, magasvérnyomás és glükóz intolerancia egyaránt jelen volt az EH nem utalt emelkedett kockázatra (II vs. ID: EH=1, 95% MT:0,59-1,69, II vs. DD: EH=1, 95% MT:0,57-1,83). Az AGT M235T génpolimorfizmus és a MS illetve annak komponensei között nem találtunk kapcsolatot.

Megbeszélés

A génvariánsok prevalenciájával, genotípus-fenotípus korrelációkkal, gén-gén és gén-környezeti interakciókkal kapcsolatos információk szisztematikus módon epidemiológiai vizsgálatokon keresztül gyűjthetők össze. Hazánkban a HMAP segítségével vált lehetővé - rendszerezten és reprezentatív módon - egy nagy létszámú, a magyar lakosságot kor-, nem és földrajzi eloszlás szempontjából reprezentáló populációról való adatgyűjtés. Ezen infrastruktúra segítségével létrehozott Magyar Referencia DNS Biobank az első, relatíve nagyszabású törekvés Magyarországon, mely lehetőséget teremt olyan adatok rendszerezésére, melyek a jövőben elvégzendő genetikai epidemiológiai elemzések nélkülözhetetlen kiindulópontként szolgálnak.

Munkánkban vizsgáltuk az ACE I/D és AGT M235T génpolimorfizmusok megoszlását a magyar felnőtt lakosság egy reprezentatív mintájában (n=1762), mely 641 IDF kritérium szerint azonosított metabolikus szindrómást és 1121 olyan egyedet tartalmazott, akik nem feleltek meg e kritériumnak.

Számos vizsgálat közölt összefüggést a fenti polimorfizmusok és a MS egyes komponensei illetve a MS között (*ATP III* kritériumrendszer alapján felállított diagnózis alapján). Eredményeink az ACE esetén összhangban vannak más nem kaukázusi populációkon végzett vizsgálatok eredményeivel. Alvarez-Aguilar és társai által publikált adatok alapján az ACE DD genotípusa növeli a MS-ra való fogékonyságot a mexikói populációban. Lee and Tsai kimutatták, hogy ez a genotípus a kínai lakosság körében emeli a diszlipidémiával és albuminuriával járó MS kialakulásának kockázatát. Ezzel szemben nem találtak szignifikáns összefüggést az ACE I/D polimorfizmus és a MS között egy európai felmenőkkel rendelkező brazil populációban.

Pollex és társai kaukázusi népcsoportban vizsgálták a metabolikus szindróma lehetséges genetikai determinánsait. Bár olyan polimorfizmusokat választottak, melyekről korábban igazolást nyert, hogy kapcsolatba hozhatóak a MS egyes komponenseivel, nem találtak szignifikáns összefüggést az AGT M235T és a MS között. Thomas és társai kínai populációban szintén ezen AGT génvariáns hatását elemezték a MS egyes komponenseire. Csak korlátozott bizonyítékot találtak arra, hogy az AGT M235T

kapcsolatba hozható bizonyos lipid metabolizmusbeli eltérésekkel. Az ellentmondásos eredmények háttérében állhat az, hogy az ACE gén allélja eltérő gyakorisággal fordul elő különböző népcsoportokban.

Miután mind az ACE D mind az AGT M235T variánsokkal kapcsolatban igazolt, hogy hatással vannak a magasvérnyomás kialakulására szignifikáns kapcsolatot vártunk a MS vérnyomás-komponensével, de vizsgálatunkban erre nem találtunk igazolást.

Az MS+ csoport homogenitását növeltük oly módon, hogy a klinikai fenotípusoknak megfelelően alcsoportokat képeztünk, melynek következtében az esetszámok csökkentek, azonban néhány alcsoport továbbra is elég nagyra bizonyult, ahhoz hogy szignifikáns különbségeket azonosítsunk. Vizsgálatunkban a DD vagy ID genotípusú egyénekben a diszlipidémia szignifikánsan magasabb prevalenciával fordult elő. Ezen eredmények azt sugallják, hogy a renin-angiotenzin rendszer szerepet játszhat a lipid metabolizmusban. Ez az eredmény azzal magyarázható, hogy a renin-angiotenzin rendszer komponenseit kódoló gének a zsírszövetben expresszálódnak, és résztvesznek a prosztaglandin termelésben és a zsírszöveti lipolízisben. Kimutatták, hogy az ACE inhibitor terápia javulást eredményezhet atherosclerosisban és csökkentheti az inzulin rezisztenciát, ezáltal pedig a diabetes kialakulásának kockázatát. Feltételezhető tehát, hogy a RAS útvonal nem csak a vaszkuláris funkciókra van szignifikáns hatással, hanem a metabolikus jellegű eltérésekre is.

A populáció-genetikában akár zavarótényező(k)nek köszönhetően is leírható szignifikáns eltérés/összefüggés. Az ún. *population stratification* vagy *confounding by ethnicity* fennállása esetén a betegségre hajlamosító mutáció népcsoportonkénti eltérő gyakorisága hamisan összefüggéshez vagy annak hiányához vezethet akkor, ha a különböző etnikumok vizsgálati csoportokban való eltérő reprezentációja miatt mesterségesen módosul az allélfrekvencia az eset és a kontroll csoportban. Vizsgálatunkban az esetek és kontrollok genotípusmegoszlása a Hardy Weinberg equilibriumnak megfelelt, amely arra utal, hogy a "population stratification" jelenség esetünkben nem releváns.

Az asszociációs vizsgálatok másik kulcsfontosságú tényezője az elégséges mintaelemszám. A betegség kialakításának kockázatában egyenként relatíve kis szerepet (EH: 1,2-1,5) játszó és a népesség körében gyakorta megtalálható gének „megtalálása” és

hatásuk detektálása relatíve nagy mintaelemszámot igényel. Előzetes kalkulációk alapján vizsgálatunkhoz kb. 1800 fős populáció elegendő volt ahhoz, hogy 80%-os valószínűséggel detektálni tudjunk egy legalább 1,2-es vagy annál nagyobb esélyhányadost.

Vizsgálatunk gyengeségeihez tartozik, hogy az egy ún. „egyénes” vizsgálat. A multifaktoriális betegségek - mint amilyen a MS is - komplex genetikai hátterének vizsgálata viszont ennél jóval összetettebb feladat. A fogékonyságért felelős jó néhány allél számtalan kombinációja lehetséges, így a MS kialakulásának kockázata nem becsülhető az egyes variánsok szeparált hatásaiból. A genetikai heterogenitás miatt az egyes génpolimorfizmusoknak önmagukban igen alacsony prediktív értéke. A számos fogékonyságért felelős gén hatását becsülő predikciós modell kialakítása mellett a gén-gén és gén-környezeti interakciók hatását is figyelembe, számításba kell venni.

Összefoglalás

A genetikai vizsgálatok eredményeinek felhasználása a lakosság egészségének javítása és betegségek megelőzése céljából nagymértékben függ a medikális és népegészségügyi diszciplínák tudományos eredményeitől. Miután egy betegségre hajlamosító gén azonosításra került megfelelően kivitelezett epidemiológiai vizsgálatok szükségesek azért, hogy az adott génvariáns populációs hatása kvantifikálható legyen valamint, hogy lehetővé váljon az adott génvariáns hatását potenciálisan módosító környezeti kockázati tényező(k) azonosítása illetve azok hatásának mérése.

A genetikai epidemiológiai vizsgálatokban, a legtöbb esetben az esetcsoportok az adott betegségben nem szenvedő kontroll csoportok jellemző adataival kerülnek összehasonlításra, mely elemzés a populációs járulékos kockázat becslésére nem alkalmas. Ahhoz, hogy becsülni lehessen egy betegségre hajlamosító gén jelentőségét ismerni kell a kockázati allél prevalenciáját a magyar lakosság körében, amelyhez meghatározott kritériumok alapján kialakított, a magyar lakosságra reprezentatív DNS biobankra van szükség.

A közelmúltban, a HMAP infrastruktúrájára építve számos epidemiológiai vizsgálat kivitelezésére került sor, melyek keretében lehetővé vált a magyar lakosságra kor, nem és geográfiai eloszlás szempontjából reprezentatív Magyar Referencia DNS Biobank kialakítása. A biobank, mely jelenleg 4267 DNS mintát tartalmaz, számos hazai és nemzetközi vizsgálat számára bocsátott rendelkezésre populációs kontroll mintacsoportot.

A HMAP-ra alapozva nemrégiben egy keresztmetszeti vizsgálat végrehajtására is sor került a magyar felnőtt (20-69 év) lakosság körében, melynek célja a metabolikus szindróma prevalenciájának, az ACE I/D és AGT M235T génpolimorfizmusok gyakoriságának becslése volt, valamint annak tisztázása, hogy van-e bármilyen kapcsolat a metabolikus szindróma és a fenti polimorfizmusok között. A metabolikus szindróma az IDF által javasolt diagnosztikus kritérium rendszernek megfelelően került definiálásra. A keresztmetszeti vizsgálat kohorsza ($n = 1762$), mely a HMAP populációból került kiválasztásra jól reprezentálja a magyar lakosság kor- és nem-szerinti eloszlását. Az allélfrekvencia a teljes vizsgálati populációban 0,51 és 0,49 volt az AGT M235 és 235T, illetve 0,47 és 0,53 volt az ACE I és D allélok esetén. Ezen értékek hasonlóak a

kaukázusi népcsoport szakirodalomban is fellelhető adataihoz. A D allél és a DD genotípus szignifikánsan gyakrabban fordul elő a metabolikus szindrómában szenvedő csoportban, mint a metabolikus szindrómától mentes csoportban (0,56 vs 0,51, $p = 0,006$, illetve 31,36% vs. 25,42%, $p = 0,006$). Az AGT M235T polimorfizmus genotípus megoszlása a vizsgálati csoportokban a kontrollhoz viszonyítva nem mutatott eltérést. Azon betegek körében, akik esetében a centrális típusú elhízás emelkedett triglicerid és csökkent HDL koleszterol szinttel kombinálva fordult elő az ACE genotípussal szignifikáns összefüggés volt detektálható ($p = 0.024$ and $p = 0.022$), mely alapján feltételezhető, hogy az ACE I/D génpolimorfizmus involvált lehet a lipid metabolizmusban is.

Iktatószám: DEENKÉTK /207/2011.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Fialat Szilvia

Neptun kód: QBII75

Doktori Iskola: Egészségtudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Fialat, S.**, Szigethy, E., Széles, G., Tóth, R., Ádány, R.: Insertion/deletion polymorphism of angiotensin-1 converting enzyme is associated with metabolic syndrome in Hungarian adults.
J. Renin-Angiotensin-Aldosterone Syst. Epub ahead of print (2011)
DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/1470320310394231>
IF:1.6 (2010)
2. Dubois, P.C.A., Trynka, G., Franke, L., Hunt, K.A., Romanos, J., Curtotti, A., Zhernakova, A., Heap, G.A.R., Ádány, R., Aromaa, A., Bardella, M.T., van, d.B.L.H., Bockett, N.A., Concha, E.G.d.I., Dema, B., Fehrmann, R.S.N., Fernández-Arquero, M., **Fialat, S.**, Grandone, E., Green, P.M., Groen, H.J.M., Gwilliam, R., Houwen, R.H.J., Hunt, S.E., Kaukinen, K., Kelleher, D., Korponay-Szabó, I., Kurppa, K., MacMathuna, P., Mäki, M., Mazzilli, M.C., McCann, O.T., Mearin, M.L., Mein, C.A., Mirza, M.M., Mistry, V., Mora, B., Morley, K.I., Mulder, C.J., Murray, J.A., Núñez, C., Oosterom, E., Ophoff, R.A., Polanco, I., Peltonen, L., Platteel, M., Rybak, A., Salomaa, V., Schweizer, J.J., Sperandeo, M.P., Tack, G.J., Turner, G., Veldink, J.H., Verbeek, W.H.M., Weersma, R.K., Wolters, V.M., Urcelay, E., Cukrowska, B., Greco, L., Neuhausen, S.L., McManus, R., Barisani, D., Deloukas, P., Barrett, J.C., Saavalainen, P., Wijmenga, C., Heel van, D.A.: Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression.
Nature Genet. 42 (4), 295-302, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ng.543>
IF:36.377
3. **Fialat S.**, Ádány R.: A népegészségügyi szempontból jelentős betegségekre hajlamosító genetikai mutációk előfordulása a magyar populációban.
Népegészségügy 87 (3), 185-194, 2009.



További Közlemények

4. Tóth, R., **Fiatal, S.**, Petrovsky, B.É., McKee, M., Ádány, R.: Combined effect of ADH1B rs1229984, rs2066702 and ADH1C rs1693482/ rs698 alleles on alcoholism and chronic liver diseases.

Dis. Markers. "accepted by publisher", 2010.

IF:1.723

5. Tóth, R., Pocsai, Z., **Fiatal, S.**, Széles, G., Kardos, L., Petrovsky, B.É., McKee, M., Ádány, R.: ADH1B*2 allele is protective against alcoholism but not chronic liver disease in the Hungarian population.

Addiction. 105 (5), 891-896, 2010.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1360-0443.2009.02876.x>

IF:4.145

Összesített impakt faktor: 43,845

Összesített impakt faktor: (értekezés alapjául szolgáló közlemények esetén): 37,977

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2011.10.05



A témában elhangzott előadások és bemutatott poszter:

1. Fiatal Szilvia, Pocsai Zsuzsanna, Széles György, Ádány Róza: Magasvérnyomásra hajlamosító angiotenzinogén és angiotenzin konvertáz enzim genotípusok gyakorisága a magyar populációban. Népegészségügyi Tudományos Társaság XIV. Nagygyűlése, Szeged, 2005. április 20-22. (előadás)
2. Szilvia Fiatal, György Széles, Endre Szigethy, Róza Ádány: Insertion/deletion polymorphism of angiotensin -1 converting enzyme is associated with metabolic syndrome in Hungarian adults. A Debreceni Egyetem Orvos-és Egészségtudományi Centrum és az MTA DAB Orvostudományi és Biológiai Szakbizottságának tudományos ülése, 2008. (poszter)
3. Fiatal Szilvia, Szigethy Endre, Széles György, Tóth Réka, Ádány Róza: Az angiotenzin-konvertáz enzim ins/del polimorfizmusa fokozza a metabolikus szindrómára való fogékonyságot a magyar felnőtt lakosság körében DEOEC Egészségtudományok Doktori Iskola Ph.D. hallgatóinak 2009.évi szimpóziuma, (előadás)
5. Fiatal Szilvia, Szigethy Endre, Széles György, Tóth Réka, Ádány Róza: Az angiotenzin-konvertáz enzim ins/del polimorfizmusa fokozza a metabolikus szindrómára való fogékonyságot a magyar felnőtt lakosság körében, Népegészségügyi Képző- és Kutatóhelyek Országos Egyesületének III. Konferenciája, 2009.szeptember 24-26.(előadás)
6. Fiatal Szilvia, Ádány Róza: A népegészségügyi szempontból jelentős betegségekre hajlamosító genetikai mutációk előfordulása a magyar populációban DE OEC Egészségtudományok Doktori Iskola Ph.D. hallgatóinak 2010.évi szimpóziuma, (előadás)