

EGYETEMI DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**A KARDIOVASZKULÁRIS BETEGSÉGEKRE
HAJLAMOSÍTÓ GENETIKAI TÉNYEZŐK
ÉS AZOK VIZSGÁLATÁNAK LEHETŐSÉGEI**

POCSAI ZSUZSA

Témavezető: Prof. Dr. Ádány Róza

**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
NÉPEGÉSZSÉGÜGYI ISKOLA
MEGELŐZŐ ORVOSTANI INTÉZET**

DEBRECEN, 2001

1. BEVEZETÉS

A kardiovaszkuláris megbetegedések molekuláris biológiai háttere

A szív-és érrendszeri betegségek a modern társadalmakban világszerte vezető halálokat képeznek. Az elmúlt két évtized nagy észak-amerikai és nyugat-európai epidemiológiai vizsgálatai egyértelműen igazolták e betegségek létrejöttében az ún. kardiovaszkuláris rizikófaktorok elsőrendű szerepét. A fejlett ipari országokban elvégzett epidemiológiai és genetikai epidemiológiai vizsgálatok eredményei alapján a fiatal felnőtt korban manifesztálódó kardiovaszkuláris betegségek esetében ma már általánosan elfogadott az a kóreredetet értelmező koncepció, miszerint e betegségek permisszív környezeti és szerzett vagy öröklött genetikai tényezők együtthatásának eredményeként alakulnak ki. Ezen genetikai tényezők között gyakoriságukat tekintve kiemelt jelentőséggel bírnak a lipidmetabolizmusban involvált fehérjék génjeinek előnytelen variánsai és defektusai, melyek a lipidháztartás zavarához, s következményesen szív-érrendszeri károsodáshoz vezetnek.

Az exogén anyagcsereút és genetikai károsodásai

Az exogén zsíryanycsere során a táplálékkal felvett zsírokat és koleszterint a bélhámsejtek felszívják, trigliceridekké ill. koleszterinészterekké alakítják, majd ezeket a kilomikronok belsejébe építik be. A kilomikron felszíni burkát AI, AIV és B48 apolipoproteinek alkotják. A nyirokcsatornákon át a vénás keringésbe jutva ez a burok a HDL molekulákból származó CII, CIII és E apolipoproteinekkal és koleszterinészterekkel egészül ki. Az apo CII aktiválja a triglicerideket hidrolizáló endothelialis lipoprotein lipáz (LPL) enzimet, melynek hatására a kilomikronokból tekintélyes mennyiségű zsírsav szabadul fel. A lipolízis során megkisebbedett, koleszterinészterben gazdag kilomikron-remnantok apoE révén a májsejteken elhelyezkedő receptorokhoz kötődnek, majd a májsejtekbe jutva az endolizoszomális enzimek hatására koleszterin szabadul fel, s válik hozzáférhetővé az építő folyamatok számára. Az exogén anyagcsereút genetikai károsodásai 1.) defektív kilomikron szekrécióban, 2.) a lebontás zavarában, valamint 3.) a remnantok eliminálásának elégtelenségében jelentkeznek.

Az endogén anyagcsereút és genetikai károsodásai

A májsejtek által szekretált VLDL molekulák trigliceridje glicerinnél ill. zsírszöveti eredetű, vagy májsejtekből származó zsírsavakból áll, koleszterinje szintén máj eredetű vagy a keringő lipoproteinekből származik. A keringésbe jutott VLDL molekulák lipolízise során felszabaduló zsírsavak – mely folyamatot a kapilláris-endothelium LPL enzimje katalizálja – a zsírszövetbe ill. az izomszövetbe kerülnek. A VLDL remnantok egy részét a májsejtek LDL receptoraikon keresztül veszik fel, míg másik része IDL-lé átalakulva a plazmában marad, ahol a májeredetű lipáz enzim LDL-lé alakítja. Az LDL a koleszterint a májsejtekhez és bizonyos extrahepatikus sejtekhez szállítja. Az LDL molekulák a felületükön levő apoB100 fehérje révén a sejtek LDL receptoraihoz kapcsolódnak és receptor által irányított endocitózissal a sejtekbe jutnak. Az LDL-ből származó szabad koleszterint az anabolikus enzimek szteroid hormonok és sejtmembránok szintézisére használják. A koleszterin sejten belüli felhalmozódásának három fontos biokémiai következménye van: (1) csökken a sejt de novo koleszterinképzését szabályozó hidroximetilglutaril-koenzim-A-reduktáz képzése, (2) aktiválódik az acil-koleszterin-aciltranszferáz enzim, mely a szabad koleszterint koleszterinészterre alakítja; (3) gátlódik az LDL receptorok képződése a sejtben; azaz összességében, a sejtekben felhalmozódó koleszterinészter által indukált feedback mechanizmus révén csökken a sejtek LDL-felvétele a keringésből. Az endogén transzport genetikai eredetű abnormalitásai, melyek az LDL molekulák eliminálási zavarához vezetnek, a következők: 1.) károsodás léphet fel az LDL receptor ligandjában, az apoB100 fehérjében vagy magában az LDL receptorban; 2.) az apoB fehérje defektív szintézise a VLDL molekulák szekréciójának zavarát okozza elsősorban, míg a a LPL és apo CII defektusok döntően a VLDL metabolizmusban észlelhető abnormalitásokért felelősek; 3.) az apoE gén szerkezeti változásai ill. az LDL receptor gén defektusai az IDL-clearance problémáiért ill. a plazma magas koleszterin koncentrációjáért tehető felelőssé.

A reverz koleszterin transzport és genetikai károsodásai

Az extrahepatikus szövetekből a HDL távolítja el a koleszterint és visszajuttatja a májba. Fő apolipoproteinje a májban és a vékonybélben képződő apo AI és apo AII. Ezek az apolipoproteinek foszfolipidekkel együtt nascens HDL-ként szekretálódnak.

A foszfolipidek és apolipoproteinek nagy része a kilomikronok és a VLDL felszínére, majd lipolízis révén a HDL-ből kialakuló HDL3-ra kerül. A keringő lecitin-koleszterin-aciltranszferáz enzim a HDL-hez kötődik és az apo AI által aktiválva észterifikálja a HDL felületére kötődött szabad koleszterint. Az így kialakult koleszterinészterben gazdag HDL2 molekula koleszterinészter transzfer protein segítségével trigliceridekkel kicserélődve lipoproteinekbe vándorol, amit a máj triglicerid-lipáza hidrolizál. A hidrolízissel a HDL2 HDL3-má alakul vissza, és ismét képes szabad koleszterint felvenni. Az apoE-t tartalmazó, koleszteringazdag HDL2 molekulákat a májreceptorok közvetlenül is képesek felvenni, ám ennek mechanizmusa ma még tisztázatlan. A reverz koleszterintranszporttal kapcsolatban nagyon kevés genetikai károsodást ismeretes, ezek 1.) a defektív HDL produkciót, valamint 2.) a HDL-koleszterin transzport defektusait foglalják magukban.

Az LDL receptor géndefektusok és a kardiovaszkuláris betegségek kapcsolata

Az LDL receptor egy 5 doménből álló, 115 kD molekulatömegű fehérje. Amennyiben a receptor bármely része károsodik, az az LDL felvétel zavarához vezet. A receptort meghatározó gén promóter régióból és az azt követő 18 exonból áll. A gén a 19. kromoszóma rövid karján, disztálisan található. Transzkripciója feed-back szabályozás alatt áll, melyet az intracelluláris koleszterin mennyisége regulál. LDL receptor károsodások között ismeretesek kis és nagy szakaszokat érintő deléciók, inszerciók, nonszensz és missence mutációk egyaránt. Eddig kb. 150, az LDL receptor génben (LDL RG) fellépő DNS alterációt írtak le, melynek több mint egyharmada a plazma koleszterinszintjének emelkedését eredményezi. A génben fellépő deléciók és mutációk helye és mértéke etnikai közösségenként igen eltérő, azonban nem ismeretesek jellegzetes, minden etnikai közösségre, népcsoportra jellemző génkárosodások ún. mutációs forró helyek. Egy adott országon belül is megfigyelhető a deléciók és mutációk variabilitása: pl. Finnországban különböző etnikai közösségekben eltérő DNS károsodásokat találtak. A Helsinki típusú mutáció esetében például a 16. introntól a 18. exonig deletált a gén (FH-Helsinki), míg az észak karéliei etnikai közösségben a 6. exonban egy 6 bp hosszúságú szakasz elvesztése (FH-North Karelia) az általános. A FH-Helsinki gén esetében, jóllehet rendelkezik ligandkötő aktivitással a mutáns receptor, nem képes a sejtmembránnal adekvát kapcsolatot létesíteni, így nem jöhet létre az LDL partikulumok

internalizációja. Becslések szerint minden ezredik ember mutáns FH-Helsinki gént hordoz Finnországban. Az elmúlt évek vizsgálatai szerint a FH-Helsinki allél igen elterjedt Észak-Finnországban, míg az észak-karéliai területen hiányzik. A FH-North Karelia gén esetében egy kis, hat bázispár hosszúságú szakasz, deléciója miatt az átírókeret megváltozik és így csak egy 345 aminosavat tartalmazó fehérje szintetizálódik, amely nem tud a membránhoz kapcsolódni. Ezen jellegzetes deléciók felismerése juttatta abba a helyzetbe a finn egészségügyet, hogy ma már rizikócsoportokban szűrővizsgálat jelleggel tesztelik a tipikus deléciók fennállását, s így a genetikusan terhelt családok gondozásba vételére ideje korán sor kerülhet.

ApoE polimorfizmus és kardiovaszkuláris betegségek kapcsolata

Az apoE apolipoproteinnek, a kilomikron remnantok eliminálása mellett, az IDL clearance-ben betöltött szerepe kulcsfontosságú. Az apoE a májsejtek kilomikron remnant illetve LDL receptorainak ligandja. A gén három gyakori allélja ismeretes ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$). Ezek kombinációja hat fenotípust eredményez (E2/2, E2/3, E3/3, E4/3, E4/4, E2/4). A három allél az apoE gén 4. exonjában két lókuszon különbözik egymástól, melyek 138 bp távolságra vannak egymástól. Egy-egy nukleotidcserét követően a 112. és 158. aminosavhelyeken Arg \rightarrow Cys aminosavcserék játszódnak le. Az E2/2 fenotípus 90%-ban a III. típusú hiperkoleszterinémia kiváltója, míg az E4/4 fenotípus a szérum magas koleszterinszintjével mutat szoros korrelációt, és ezáltal fokozott kockázati tényezőt jelent a kardiovaszkuláris betegségek kialakulása szempontjából.

Az apoE polimorfizmus és az atherogenezis közötti kapcsolatra először tapasztalati tények hívták fel a figyelmet, nevezetesen az E4/4 apoE fenotípussal rendelkező betegek fiatal korban manifesztálódó szív- és érrendszeri megbetegedései. Az utóbbi években a világ számos országában/etnikai közösségében végeztek vizsgálatot az apoE allél frekvencia meghatározására, és számos kutatás eredménye alapján igazolást nyert, hogy az atherosclerosis kialakulásának és lefolyásának egyik genetikai meghatározója lehet az apoE gén polimorfikus tulajdonsága. Az $\epsilon 4$ allél frekvenciája és a plazma koleszterin koncentrációja között a vizsgált populációkban egyértelmű összefüggést találtak, így az $\epsilon 4$ allél jelenlétét prediszpozíciónak tekintik

az atherosclerosisra nézve. Menzel és munkatársai (Arteriosclerosis, 3:310, 1983) kimutatták, hogy az $\epsilon 2$ allél protektív hatást fejt ki a coronaria atherosclerosis kialakulásával szemben: az $\epsilon 2$ allél jelenléte heterozigóta formában is (E2/3, E2/4) csökkenti a koleszterin koncentrációt, ez a koleszterinszint-csökkentő hatás az adott etnikai közösségtől függően 2-3-szorosa az $\epsilon 4$ koleszterinszintnövelő hatásának. Az $\epsilon 4$ allél földrajzi megoszlása Európán belül jellegzetes észak-déli grádiens mutat: a déli népek esetében a $\epsilon 4$ allél előfordulási gyakorisága jóval alacsonyabb, mint az északi közösségekben. Az egyes népcsoportokon belüli apoE allélfrekvencia gyakoriságokat befolyásoló tényezők lehetséges okait vizsgáló speciális tanulmányok hiánya miatt csak feltételezhető, hogy az $\epsilon 4$ allélfrekvencia eloszlás magyarázza (legalább részben) az egyes országok/etnikai közösségek közötti kardiovaszkuláris betegség prevalenciáját.

2. CÉLKITŰZÉSEK

LDL receptor gén vizsgálatok

Magyarországon a kardiovaszkuláris betegségek genetikai hátterének feltérképezése ez idáig nem történt meg. A lehetséges LDL RG károsodások feltárásához a magyar lakosság nagymérvű etnikai keveredése és a mutációk következményesen nagyfokú variabilitása miatt adekvát szűrővizsgálati módszer átvételére nincs lehetőség. A lipidmetabolizmus és a familiáris hiperkoleszterinémia genetikai hátterének jobb megértése érdekében célul tűztük ki egy új, multiplex PCR elven alapuló diagnosztikai teszt kidolgozását, mely alkalmas a teljes gén vizsgálatára és a génben lévő 20bp-nál nagyobb méretű deléciók kimutatására. Egy ilyen előszűrésre alkalmas, a rutindiagnosztika szintjén alkalmazható eljárás nemzetközi érdeklődésre tarthat számot, hisz a populációk nagyfokú genetikai variabilitása – az izolált törzsi közösségeket leszámítva – világjelenség.

2.1. APOE VIZSGÁLATOK

A magyar populációra vonatkozóan egyetlen adat áll rendelkezésre az apoE és az apoAIV allélfrekvenciák vonatkozásában, s ez is mindössze 202 véradó genetikai analízisén alapul, s adatai nehezen értelmezhetőek. Az a tény, hogy a E3/2 fenotípusú egyének koleszterin szintje szokatlanul magas, nem egyeztethető össze az ε2 allél protektív szerepéről számos etnikai közösség genetikai analízise kapcsán felállított teóriával. Önmagában ez a diszkrepancia is feltétlenül indokoltá teszi a familiáris hiperkoleszterinémiával sújtott családok apoE polimorfizmusának tisztázását hazánkban. ApoE vizsgálataink célkitűzése a kelet-magyarországi hiperkoleszterinémiás populációban az apoE izotípusok és allélfrekvenciák gyakoriságának meghatározása volt.

- PCR RFLP módszer segítségével arra a kérdésre kerestünk választ, hogy vajon különbözik-e a kelet-magyarországi hiperkoleszterinémiás populációban észlelt apoE allélfrekvencia eloszlás a magyar átlagpopulációt reprezentáló csoportban mért allélfrekvencia eloszlástól;

- továbbá célunk volt egy egylépcsős, zárt rendszerű, gyors diagnosztikai teszt beállítása apoE polimorfizmusok vizsgálatára, ami a rutindiagnosztikai laboratóriumokban helyettesítheti az idő- és munkaigényes RFLP módszert.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. VIZSGÁLATI MINTÁK ELŐKÉSZÍTÉSE A GENETIKAI VIZSGÁLATOKHOZ

Genomiális DNS preparálása

A vizsgálatokat EDTA-val alvadásgátolt perifériás vénás vér limfocitáiból nyert DNS mintákon végeztük. A DNS preparálása Lahiri és munkatársai (Nucleic Acid Research, 19:5444, 1991) által leírt sóextrakciós módszerrel történt.

Genomiális DNS agaróz elektroforézis

A preparált genomiális DNS intakt voltát standard, 1%-os agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük EcoR I HindIII λ DNS marker mellett.

DNS koncentráció meghatározása

A DNS koncentráció meghatározása GeneQuantII (Pharmacia) DNS spektrofotométerrel történt a minták százszoros desztillált vizes hígításából. A DNS mintákat további vizsgálatra csak akkor használtuk fel, ha azok $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ hányadosa nagyobb volt, mint 1.6.

3.2. LDL-RG VIZSGÁLATA

Vizsgálati populáció kiválasztása

A teszt kidolgozásához egészséges emberektől származó DNS mintákat használtunk. A teszt validitásának ellenőrzéséhez ismert státuszú FH-Helsinki génnel rendelkező betegek DNS mintáját használtuk. A kelet-magyarországi hiperkoleszterinémias populáción végzett vizsgálatokhoz a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum I.sz. Belgyógyászati Klinikáján működő Regionális Lipid Szakrendelésen gondozott, familiáris hiperkoleszterinémiával sújtott betegeket (n=20) vettünk be a vizsgálatba. A vizsgálatba vonás kritériumai a következők voltak:

1.) szérumban koleszterin szint $>7.8\text{mmol/l}$, 2.) szérumban LDL koleszterin szint $>4.9\text{mmol/l}$, 3.) normál triglicerid szint, 4.) tendon xanthomák jelenléte, 5.) tendon xanthomák és/vagy hiperkoleszterinémia jelenléte legalább egy elsőfokú rokonnál, 6.) fiatalkori miokardiális infarktusra nézve pozitív családi anamnézis. A vizsgálatba bevont egyének közül senki sem szenvedett szívbetegségben, vese, máj vagy pajzsmirigy megbetegedésben, illetve semmilyen egyéb krónikus betegségben (mint például diabetes, hipertónia). Amennyiben a gondozott betegek bármilyen véralvadást gátló gyógyszert szedtek, azt kizáró tényezőként értékeltük. Mindannyian belegyezésüket adták az LDL RG vizsgálathoz. Az LDL RG analízishez vett vérrel egyidejűleg, a terápiás beavatkozás megkezdése előtt, minden vizsgálati személytől „lipid panel” (szérumban koleszterin, HDL koleszterin, LDL koleszterin, apo AI, apoB, Lp(a), triglicerid, lipid elektroforézis) meghatározás történt standard módszerekkel.

Multiplex PCR

Az LDL RG teljes átíródozó szakaszát amplifikáltuk polimeráz láncreakció segítségével. A 2, 3, 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16. exon szintéziséhez saját tervezésű oligonukleotidokat használtunk, míg a promóter régió, 1, 7, 8, 9, 17 és 18. exon amplifikálásához a Hobbs és munkatársai (Human Mutation, 1:445, 1992) által tervezett primerpárokat alkalmaztuk. Az $50\mu\text{l}$ -es reakcióelegy összetétele a következő volt: $0.3\mu\text{g}$ genomiális DNS, 10mmol/l Tris-HCl (pH 9.0), 50mmol/l KCl, $1.5\text{--}1.5\text{mmol/l}$ dATP, dTTP, dCTP, dGTP, $1\text{--}1\mu\text{mol/l}$ primer, 2.5U Taq polimeráz, 10% DMSO. A kezdeti denaturációt követően programozható hőmosztátban 35PCR ciklust alkalmaztunk (Gene Machine Junior, UNITEK). A ciklusok paraméterei a következők voltak: 1perc inkubálás 94°C -on, 1perc inkubálás hibridizációs hőmérsékleten, 2perc inkubálás 72°C -on. A reakció optimalizálása érdekében a láncreakció minden paraméterét teszteltük minden átírt szakaszra, így a reakcióközeg komponenseinek koncentráció változását, hőmérsékleti optimumokat denaturációra, hibridizációra, polimerizációra. A módszer beállítása során a keletkezett ampliconok mérete közötti különbségeket felhasználva úgy állítottuk össze a tesztrendszer, hogy a teljes gén 7reakcióelegyben amplifikálható, és egyetlen elektroforetikus lépéssel egymástól jól elkülöníthető sávokként vizualizálható legyen. Ilyen módon $83\text{--}386\text{bp}$ hosszúságú szakaszok szintetizálhatók két hibridizációs hőmérséklet alkalmazásával.

Az 1, 2, 3 sz. reakcióelegyek esetében a hibridizációs hőmérséklet 51°C volt, míg a többi (4, 5, 6, 7 sz.) reakcióelegy esetében 47°C-os hőmérsékletet alkalmaztunk. A PCR reakció után a szintetizált DNS szakaszokat tartalmazó 50µl-es elegyet vákumcentrifuga (Automatic Environment SpeedVac, AES 1000 Savant) segítségével 8µl térfogatra koncentráltuk.

Agaróz gélelektroforézis

A szintetizált amplikonokat 3.5%-os agaróz gélben 1xTBE pufferben, pBR322 HaeIII DNS marker mellett elektroforetizáltuk.

3.2. APOE POLIMORFIZMUSOK VIZSGÁLATA

Vizsgálati populáció kiválasztása

A Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum I.sz. Belgyógyászati Klinikáján működő Regionális Lipid Szakrendelésen gondozott hiperkoleszterinémiával sújtott betegeket (n=247) vettünk be a vizsgálatba. A vizsgálatba vonás kritériumai ugyanazok voltak mint az LDL RG vizsgálat esetében. Referencia populációként a magyar populációt reprezentáló, irodalmi kontroll csoportot fogadtuk el (n=202; Hallman et al, Am J Hum Gen, 49:338, 1991).

PCR RFLP

Az ApoE genotípus meghatározást Hixon (J Lipid Res, 31:545, 1990) és munkatársai által kidolgozott módszer alapján végeztük.

Poliakrilamid gélelektroforézis

Az emésztett fragmentek vizualizálását standard poliakrilamid gélelektroforézissel végeztük. A 9%-os semleges akrilamid gél 0.2% APS-t, 0.15% TEMED-et tartalmazott, a DNS fragmentek elektroforézise 1xTBE pufferben és pBR322 HaeIII DNS marker mellett történt.

Mutáció-analízis olvadáspont analízissel

Az olvadáspont analízissel történő genotipizálást Aslanidis és munkatársai (Clin Chem, 45:1094, 1999) által kidolgozott módszerrel végeztük LightCycler real time PCR (Roche) készüléken.

Statisztikai módszerek

Az eredmények kiértékeléséhez STATA 5.0 programcsomagot használtunk. Az összefüggés jellemzésére esélyhányadosokat alkalmaztunk, melyeket a Cornfield módszere alapján számított 95%-os konfidencia intervallumaikkal együtt tüntettünk fel. Referencia kategóriának az apoE 3/3 genotípust jelöltük ki, ehhez viszonyítottuk a többi izotípus előfordulási gyakoriságát és az izotípusokkal kapcsolatos esélyhányadosokat. Az allélfrekvenciákat és esélyhányadosokat standard módszerekkel számítottuk –pl. $\epsilon 2$ allél frekvenciájának számítása a következő algoritmus alapján történt: $\{(2 \cdot \text{apoE2/2 allélek száma} + \text{apoE3/2 allélek száma} + \text{apoE4/2 allélek száma}) / \text{az összes, vizsgálatban részt vett allél}\}$. Az allélfrekvenciák közötti statisztikai különbséget χ^2 próbával vizsgáltuk. Az általunk végzett vizsgálat statisztikai ereje 80%, szignifikancia szintje 5%. Figyelembe véve azt a tényt, hogy a referenciapopulációban az $\epsilon 4$ allél előfordulási gyakorisága 12.90%, az alkalmazott mintaszámmal (247 hiperkoleszterinémiás beteg, és 202 egészséges egyén) az apoE allélfrekvencia előfordulási gyakoriság 22.85%-os változása kimutatható.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Az LDL RG vizsgálat eredményei

- Új, multiplex PCR elven alapuló diagnosztikai tesztet dolgoztunk ki, mely alkalmas a 20bp-nál nagyobb méretű deléciók kimutatására, függetlenül attól, hogy azok a gén átíródo szakaszán hol helyezkednek el. A promóter régiót és az egyes exonokat teljes mértékben közrefogó primerpárokat használva, polimeráz láncreakció segítségével a teljes gén átíródo szekvenciája exononkénti bontásban szintetizálható és tanulmányozható.
- A teszt alkalmazásával a teljes LDL receptor gén igen rövid idő alatt levizsgálható a deléciók genetikai károsodásokra. A szintetizált amplikonok alkalmasak további molekulárbioológiai (szekvenálás, SSCP analízis) vizsgálatokra is, így lehetővé válik a gén finomabb szerkezeti károsodásainak kimutatása.
- 20 familiáris hiperkoleszterinémiában szenvedő kelet-magyarországi beteg DNS mintájának analízise során nem találtunk deletált LDL receptor génnel rendelkező DNS mintát. Vizsgálatunk alapján valószínűsíthető, hogy a kelet-magyarországi hiperkoleszterinémiás állapotok háttérében nem az LDL receptor gént érintő nagy genetikai átrendeződések vagy deléciók állnak.

4.2. Az apoE vizsgálat eredményei

- PCR RFLP vizsgálattal 247 25-65 éves hiperkoleszterinémiás beteg esetében végeztünk apoE genotípus meghatározást. Az izotípusok eloszlásában χ^2 próba alkalmazásával nem találtunk szignifikáns különbséget a referencia csoport és hiperkoleszterinémiás csoport tagjai között.
- Nem találtunk arra utaló bizonyítékot, hogy a hiperkoleszterinémiás betegek apoE allélfrekvencia megoszlása eltérő lenne a referenciacsoportétól.
- A gyorsabb genotipizálás érdekében intézetünkben bevezettük az apoE pontmutációk olvadásponton alapuló mutációanalízisét. A genotipizálás időtartama a hagyományos módszerrel végzett művelet töredékére csökken, így ezzel a módszerrel 32 minta genotipizálható 100%-os biztonsággal mintegy 50 perc alatt, ami jelentős időmegtakarítás a korábbi 12 órával szemben.

5. DISZKUSSZIÓ

A jelenleg ismert LDL receptor gént érintő genetikai elváltozások nagyfokú variabilitást mutatnak: jelenthetnek kis és nagy deléciókat, inszerciókat, nonsense, és missence mutációt. Az a tény, hogy a génben ezidáig nem azonosítottak mutációs forró ponto(ka)t, igen megnehezíti a veszélyeztetettség kimutatását. A lehetséges genetikai károsodások széles skálája miatt egy populáció vagy rizikócsoporthoz történő szűrésére nem lehet már bevezetett vizsgálatokat átvenni, hanem egy olyan tesztrendszer kell kidolgozni, amely lehetőséget ad a gén teljes szakaszának analízisére. Célkitűzésünknek megfelelően kidolgoztunk egy olyan multiplex PCR elven alapuló módszert az LDL RG deléciók károsodásainak vizsgálatára, amely alkalmas a teljes gén analízisére és a génben lévő, 20bp-nál nagyobb szakaszt érintő, deléciók kimutatására. Ez a tesztrendszer egyben kiindulási vizsgálatként szolgálhat a gén további analíziséhez.

A tesztrendszer alkalmazásával nyert eredményeink arra utalnak, hogy a kelet-magyarországi hiperkoleszterinémias betegek esetében valószínűleg minor deléciók vagy mutációk jelentik az LDL receptor defektust, melynek igazolására a szintetizált PCR termékek részletesebb analízisével (szekvenálás, SSCP analízis) kell folytatni a vizsgálatokat.

Ezidáig hiperkoleszterinémias populációban apoE allélfrekvencia vizsgálat nem történt, illetve nincs erre vonatkozó közlés a szakirodalomban. Vizsgálataink alapján megállapítható, hogy a hiperkoleszterinémias populációban észlelt allélfrekvencia eloszlás nem különbözik szignifikánsan az általános populációban észlelttől. Megfigyelésünk nem támasztja alá azt a hipotézist, miszerint az ε4 allélre nézve homozigóta vagy heterozigóta egyének fokozott kardiovaszkuláris betegség kockázatnak vannak kitéve. Ugyanakkor nem zárható ki, hogy a szív és érrendszeri betegségek Kelet-Magyarországon észlelt magas prevalenciájának hátterében olyan metabolikus zavarok állnak, melyekben az apoE izotípusok is involváltak.

Adataink alapján felvethető a kérdés: az apoE polimorfizmus vizsgálat eredménye alapján véleményezhető-e az egyén veszélyeztetettsége kardiovaszkuláris

betegségekkel szemben? Napjainkban egyre több laboratórium tervezi az apoE polimorfizmusok – mint a kardiovaszkuláris betegségek egyik kockázati tényezője – meghatározásának bevezetését, azonban fontos kihangsúlyozni, hogy még nem áll rendelkezésre elegendő ismeret a szakirodalomban az apoE polimorfizmusok szérumban koleszterin szintre gyakorolt hatására vonatkozóan. További kutatások szükségesek a lipíd-háztartásban involvált egyéb gének genetikai polimorfizmusainak és a hiperkoleszterinémia különböző típusai közötti kapcsolat vizsgálatára is.

Az eredmények népegészségügyi hasznosíthatósága

Morbiditási és mortalitási statisztikai adatok egybehangzóan igazolják a kardiovaszkuláris és daganatos megbetegedések súlyozott népegészségügyi jelentőségét a magyar népesség vonatkozásában. Az országon belüli területi egyenlőtlenségek elemzésével igazolást nyert, hogy a keringési betegségek okozta korai halálozás az országos átlagnál szignifikánsan magasabb Északkelet-Magyarországon. Az idő előtti halálozáshoz vezető népbetegségek esetében a megelőzés és a gyógyító ellátás színvonalának emeléséhez nélkülözhetetlenek azok az adatok, melyek a hajlamosító genetikai defektusokat és konstellációkat, a kórfolyamatok progressziójához rendelhető genetikai elváltozásokat írják le, s ezáltal diagnosztikus, terápiás, prognosztikus és prevenciós konzekvenciák levonását teszik lehetővé. Az elmúlt évtizedben igen nagy számú közlés látott napvilágot a familiáris aggregációt mutató kardiovaszkuláris betegségek genetikai hátterére vonatkozóan. A közlések óriási száma csak részben magyarázható az intenzív kutatással; az okok között döntő súllyal szerepel az a tény, hogy a genetikai prediszpozíciót jelentő eltérések geográfiai, regionális, sőt etnikai variabilitást mutatnak. Következésképp nem lehet egy országos genetikai, molekuláris epidemiológiai szűrőprogramot nemzetközi adatokra alapozva tervezni, alapfeltétel az adott ország régióiban/etnikumaiban jellegzetes eltérések feltárása, melyre a későbbiekben a szűrőprogram építhető. Hazánkban ezek az adatok teljesen hiányoznak, így a kardiovaszkuláris betegségek primer prevencióját célzó hazai genetikai epidemiológiai szűrőprogramokra, ill. a szűrési és a következményes gondozási algoritmusok kidolgozására kell javaslatot tenni. A kardiovaszkuláris betegségek genetikai hátterének alaposabb megismerésével a betegségek prevenciója koncepcionálisan új alapokra helyezhető. Az egyének genetikai fogékonyságának

kimutatása lehetőséget ad a megbetegedések primer (preszimptomás) prevenciójának megvalósítására, mely az egyén esetében a betegségmentes életek számának növekedését, az egészségügyi ellátás költségvetésének szempontjából pedig a krónikus kardiovaszkuláris betegségek következtében kialakult ellátási költségek csökkenését vonhatja maga után.

FÜGGELÉK

A tézisekhez felhasznált közlemények jegyzéke

Pocsai Zs, Paragh Gy, Ádány R: A kardiovaszkuláris megbetegedések molekuláris biológiai háttere: a lipidmetabolizmus genetikai defektusai, mint a veszélyeztetettség biomarkerei. *Klinikai Kísérletes Laboratóriumi Medicina*, 23:169-179 (1996)

IF: -

Pocsai Zs, Paragh Gy, Ádány R: Multiplex PCR assay for screening deletions in the low density lipoprotein receptor gene. *Clinica Chimica Acta* 307:7-12, (2001)

IF: 1,035

Pocsai Zs, Paragh Gy, Ádány R: Apolipoprotein E polymorphism among patients with hypercholesterolaemia in Eastern-Hungary. *Cardiology*, 6:S7-8 (1997)

IF: 0,692

Pocsai Zs, Paragh Gy, Ádány R: Is the apoE ϵ 4 allele associated with hypercholesterolaemia? (*közlésre elküldve*)

Egyéb közlemények

Varga Cs, Pocsai Zs, Kertai P: Genotoxicity studies on urine and bone marrow samples of rats bearing transplanted nephroma. *Mutagenesis*, 10:253-255 (1995)

IF: 2,176

Varga Cs, Pocsai Zs, Kertai P: Urinary and serum mutagenicity studies with rats bearing experimental tumours. *Mutagenesis*, 10:43-45 (1995)

IF: 2,176

Varga Cs, Pocsai Zs, Horváth G, Timbrell V.: Studies on genotoxicity of orally administered crocidolite asbestos in rats: Implications for ingested asbestos carcinogenesis. *Anticancer Research.*, 16: 811-814 (1996)

IF: 1,049

Szücs S, Kávai M, Varga Cs, Kertai P, Pocsai Zs, Karányi Zs, Ádány R.: Changes in superoxide anion production and phagocytosis by circulating neutrophils during tumor progression in a rat model. *Cellular Immunology*, 170:202-211 (1996)

IF: 2,142

Az értekezés témájához kapcsolódó hazai, nemzetközi konferencián bemutatott poszterek, előadások jegyzéke

DOTÉ Tudományos Napok I. Ph.D. Konferencia, Debrecen, 1996. március 21-23.
Pocsai Zs: Multiplex PCR rendszer kidolgozása LDL receptor gén deléciók kimutatására (*előadás*)

European Thrombosis Research Organization (ETRO) 2nd Working party on Population genetics of haemostatic risk factors for arterial vascular disease, Consorzio Mario Negri Sud, Santa Maria Imbaro (Italy), May 30-June 1, 1996.
Zs Pocsai, Gy Paragh, R Ádány: Multiplex PCR assay for detecting deletions in the low density lipoprotein receptor gene (*előadás*)

Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 46. Nagygyűlése, Miskolc, 1996 szeptember 5-7. Pocsai Zs, Paragh Gy, Ádány R: Multiplex PCR rendszer kidolgozása LDL receptor gén deléciók kimutatására (*előadás*)

5th International Symposium of Slovak Atherosclerosis Association, Bratislava (Slovakia), Jan 29, 1997. Zs Pocsai, Gy Paragh, R Ádány: Apolipoprotein E polymorphism among patients with hypercholesterolaemia in Eastern-Hungary (*előadás*)

DOTE Tudományos Napok II. Ph.D. Konferencia, Debrecen, 1997. március 6-8.
Pocsai Zs.: Apolipoprotein E fenotípus eloszlás a kelet-magyarországi hiperkoleszterinémiás populációban (*előadás*)

XVI. International Society of Thrombosis Haemostasis Congress, Firenze, Italy
1997. június 6-13. Zs Pocsai, Gy, Paragh, R Ádány: Apolipoprotein E polymorphism among patients with hypercholesterolaemia in Eastern-Hungary (*poszter*)

MEDLAB, 12th IFCC European Congress of Clinical Chemistry, Basel, 1997.
augusztus 15-22, Zs Pocsai, Gy Paragh, R Ádány: Apolipoprotein E polymorphism among patients with hypercholesterolaemia in Eastern-Hungary (*poszter*)

Magyar Higiénikusok Társasága 29. Vándorgyűlés, Balatonföldvár, 1997.
szeptember 24-26. Pocsai Zs., Paragh Gy, Ádány R: Apolipoprotein E fenotípus eloszlás a kelet-magyarországi hiperkoleszterinémiás populációban (*előadás*)

Népegészségügyi Tudományos Társaság 7. Nagygyűlése, Pécs, 1998. április 23-25.
Pocsai Zs., Paragh Gy, Ádány R: Apolipoprotein B-100 Xba I allélfrekvencia gyakoriság a kelet-magyarországi hiperkoleszterinémiás populációban (*előadás*)

Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 47. Nagygyűlése, Kecskemét, 1998.
szeptember 2-5. Pocsai Zs., Paragh Gy, Ádány R: Apolipoprotein B-100 Xba I allélfrekvencia gyakoriság a kelet-magyarországi hiperkoleszterinémiás populációban (*előadás*)

Egyéb előadások, poszterek jegyzéke

Magyar Onkológusok Társaságának XX. Országos Kongresszusa, Budapest, 1993.
november 3-5. Pocsai Zs., Varga Cs., Kertai P.: A tumormarker pszeudouridin mutagenitásának vizsgálata Ames tesztben (*poszter*)

Népegészségügyi Tudományos Társaság III.. Országos Kongresszusa , Gyula, 1994.
április 27-29. Varga Cs., Pocsai Zs., Kertai P.: Az azbesztrostok karcinogenitásáról új megközelítésben (*előadás*)

UICC International Cancer Congress New Delhi, Nov 1994. Varga Cs., Pocsai Zs.,
Kertai P.: Genotoxic substances produced during development of transplanted renal
tumour (*poszter*)

Népegészségügyi Tudományos Társaság 9. Nagygyűlése, Hévíz, 2000. április 13-15.
Pocsai Zs., Fletcher T: Passzív dohányzás hatása a gyermekkori légzőszervi
megbetegedések gyakoriságára (*előadás*)