

**Genetikai polimorfizmus vizsgálatok 1-es típusú
cukorbetegségben**

Dr. Hermann Csaba

Doktori (Ph.D.) Értekezés
Tézisfüzet

Témavezető: Prof. Dr. Madácsy László egyetemi tanár
Programvezető: Prof. Dr. Tulassay Tivadar egyetemi tanár

Semmelweis Egyetem 1. sz. Gyermekgyógyászati
Klinika

Budapest, 2008

Bevezetés

Az 1-es típusú cukorbetegség (T1DM) a hasnyálmirigy β -sejtjeinek folyamatos pusztulását okozó autoimmun folyamat következménye. A T1DM gyakorisága 0,4 % a kaukázusi populációban. Genetikai és környezeti tényezők is felelősek a betegség kialakulásáért. Erre utal a monozigóta ikreknél megfigyelhető 50 %-os, illetve nem monozigóta ikreknél kimutatott 5-6 %-os konkordancia. Bár a betegségnek létezik monogénes formája is, a T1DM öröklődése döntően poligénes jellegű. A genetikai fogékonyság kb. 50 %-ért a HLA-régió génjei a felelősek. Egyéb gének jelentősége sokkal kisebb, ugyanakkor a diabétesz kialakulásáért felelős lókusztok felderítése a betegség patofiziológiájának jobb megismeréséhez illetve pontosabb individuális rizikóbecsléshez vezethet.

Az elmúlt 20 évben számos citokin szerepét igazolták a T1DM kialakulásában. Jelenlétük kimutatható a diabétesz állatmodelljeiből (BB patkány, NOD egér) és elhunyt T1DM-ben szenvedő betegekből származó Langerhans szigetekben.

A cöliákia (CD) a vékonybél súlyos gyulladással járó betegsége, melynek kialakulásában a gliadinnak van szerepe. A cöliákia prevalenciája T1DM gyerekekben a normál populációnál magasabb. A diabétesz fellépéséért felelős autoimmun környezet elősegítheti a szintén autoimmun jelleggel bíró CD kialakulását.

A gyulladáshoz vezető folyamatokban szerepet játszó fehérjék génjein elhelyezkedő polimorfizmusok a kódolt fehérjék mennyiségi és minőségi változása révén fontos szabályozó szerepet játszhatnak T1DM, CD illetve mindkettő kialakulásában.

A TNF α és IL-1 β proinflammatorikus citokin, melyeket T1DM kialakulása során a hasnyálmirigy szigeteit infiltráló aktivált makrofágok termelnek. Az

IL-6 autoimmun diabéteszben egyrészt a gyulladási folyamatokat segítheti elő, másrészt a celluláris neogenezist befolyásolva protektív, regeneráló szereppel bír. A hősokk fehérjék (HSP), vagy stresszfehérjék a szervezett legkonzervatívabb polipeptidjei közé tartoznak, melyek stresszre adott válaszreakció során citoprotektív szereppel bírnak. A hasnyálmirigy szigeteiben lokálisan elválasztott HSP a TNF α β -sejtekre gyakorolt citotoxikus hatását is mérsékli.

A gyulladási folyamatban részt vevő citokinek és fehérjék közül a TNF α ⁻²³⁸A, IL-1 β ³⁹⁵⁴T, IL-6 ⁻¹⁷⁴G és HSPA1B ¹²⁶⁷A allél hordozása jár együtt magasabb citokin ill. fehérjeprodukciónal. A TNF α ⁻²³⁸A polimorfizmus TNF α produkcióra gyakorolt hatása még nem tisztázott, azonban számos autoimmun-, illetve gyulladási betegséggel mutatott összefüggést.

A TLR4 (toll like receptor 4) és a CD14 egy baktériális lipopoliszacharid (LPS) receptor komplex része. Elsősorban a veleszületett immunitásban játszanak szerepet. A CD14 illetve TLR4 génjein található polimorfizmusok a receptor szerkezetének megváltoztatásával növelhetik a fertőzésre adott válaszreakció mértékét. Az erősödő gyulladási folyamatok a jejunális mukóza diszruptiójához vezethetnek, mely a lamina propria-ban emelkedő gluténszint által a CD kialakulásának esélyét növeli.

TLR-4 ⁸⁹⁶G allél hordozása kisebb fehérjeprodukciónal jár.

A homozigóta CD14 ⁻²⁶⁰TT genotípus magasabb CD14 expressziót okoz.

Célkitűzések

1. A gyulladásoos folyamatokban szerepet játszó citokinek és fehérjék polimorfizmusai (illetve ezek kombinációja) és a T1DM kialakulása illetve diagnosztizálásakor fennálló életkor közti kapcsolat kutatása:

- TNF α promoter régió G⁻³⁰⁸A polimorfizmus
- IL-1 β exon 5 C³⁹⁵T polimorfizmus
- IL-6 promoter régió G⁻¹⁷⁴C polimorfizmus
- HSPA1B (HSP72) A¹²⁶⁷G polimorfizmus

2. A gyulladásoos folyamatokban szerepet játszó citokinek és fehérjék polimorfizmusai illetve HLA-DQ haplotípusok és a T1DM betegekben fellépő cöliákia közti kapcsolat kutatása:

- TNF α promoter régió G⁻³⁰⁸A - and G⁻²³⁸A polimorfizmus
- CD14 promoter régió C⁻²⁶⁰T polimorfizmus
- TLR-4 A⁸⁹⁶G polimorfizmus
- HLA DQ haplotípusok

Beteganyag és módszer

Vizsgált populáció

A vizsgálatba Semmelweis Egyetem I. Gyermekgyógyászati Klinikáján gondozott T1DM-ban illetve cöliákiában szenvedő gyermeket vontunk be. A diabéteszes gyermekek klinikai adatait Microsoft Access adatbázis felhasználásával dolgoztuk fel.

Kontroll csoportként egészséges magyar véradók eredményeit (saját mérések, illetve az irodalom alapján) illetve egészséges újszülöttek anyagcsere szűrővizsgálat céljából levett vérenek eredményeit (saját mérés) használtuk fel. HLA-DQ genotípus kontrollját szervdonorok OVSZ által meghatározott eredményei képezték.

Genetikai vizsgálatok

A vérminták fehérvérsejtjeiből a DNS-t Miller módszerével vontuk ki. A TNF α , IL-1 β , IL-6, HSPA1B, TLR4, CD14 polimorfizmusokat polimeráz láncreakció (PCR) - restrikciós fragment hosszúság polimorfizmus (RFLP) módszerrel vizsgáltuk. A PCR alapú HLA-DQ tipizálás kifelbontú kit felhasználásával a gyári leírásnak megfelelően történt.

Cöliákia diagnosztizálása

Szérum IgA endomizium-ellenes antitest (EMA) meghatározása indirekt immunfluoreszcens módszer segítségével történt. A fals negatív eredmények kizárására szérum IgA szintet is mértünk. Jejunalis biopsziát két független (egymástól 3 hónapnyi távolságban levett) vérmintában észlelt EMA pozitivitás esetén végeztünk. A biopsziát a duodenojejunális átmenetben a Treitz szalagnál vettük Crosby kapszula segítségével. A

cöliákia diagnózisát csak szövettani vizsgálattal kimutatott szubtotális illetve totális villózus atrófia esetén állítottuk fel.

Statisztikai módszerek

A különböző csoportoknál vizsgáltuk a Hardy-Weinberg kritériumok fennállását. Kategórikus adatok összehasonlításánál χ^2 próbát illetve Fisher tesztet alkalmaztunk.

A polimorfizmusok és folyamatos változók közti kapcsolatot normál eloszlás esetén (pl.: HbA_{1C}, inzulin igény) kétmintás t-teszttel, illetve egyszempontos variancia analízissel (ANOVA); nem normál eloszlás esetén (diabétesz kezdetekor életkor, diabétesz tartama) pedig Mann-Whitney, illetve Kruskal-Wallis teszttel valamint Dunn próbával vizsgáltuk. Az IL-6 T1DM kezdetére gyakorolt független hatásának kimutatására többszörös logisztikus regressziót alkalmaztunk

A statisztikai számításokat SPSS 11.5 illetve S.A.S. 8.2 szoftverrel végeztük el.

Eredmények

1. A TNF α G⁻³⁰⁸A polimorfizmusa nem mutatott összefüggést a T1DM diagnosztizálásakor fennálló életkorral. T1DM esetén a magasabb citokinprodukciónal járó TNF α (-308)A allél hordozása az egészséges egyéneknél mért magyar referenciaértékhez képest gyakrabban fordult elő.
2. Az IL-1 β C³⁹⁵⁴T polimorfizmusa nem mutatott összefüggést a T1DM diagnosztizálásakor fennálló életkorral. T1DM esetén a magasabb citokinprodukciónal IL-1 β (3954)T allél hordozása az egészséges egyéneknél mért magyar referenciaértékhez képest gyakrabban fordul elő.
3. Az IL-6 G⁻¹⁷⁴C polimorfizmusa összefüggött a T1DM diagnosztizálásakor fennálló életkorral. Az IL-6 (-174)CC genotípus esetén az átlagéletkor alacsonyabb volt az IL-6 (-174)G allélt hordozó gyermekekhez képest.
4. Az IL-6 (-174)CC genotípus és a T1DM diagnosztizálásakor fennálló fiatalabb életkor közötti összefüggés csak magasabb citokinprodukciónal járó IL-1 β (3954)T allél vagy TNF α (-308)A allél egyidejű hordozásakor mutatható ki.
5. HSPA1B (HSP72) A¹²⁶⁷G polimorfizmus összefüggést mutatott a T1DM kialakulásával. HSPA1B (1267)G allél hordozása a T1DM kialakulására nézve fokozott kockázatot jelent.
6. A TNF α (-308)A illetve HSPA1B (1267)G allél együttes hordozása esetén a T1DM kialakulásának kockázata a TNF α (-308)A illetve HSPA1B (1267)G allélt nem hordozó kontrollcsoportéhoz képest 2,38-szor magasabb volt.
7. A TNF α G⁻³⁰⁸A polimorfizmus nem mutatott összefüggést a cöliákia előfordulásával T1DM-ben szenvedő gyermekeknél. A TNF α (-238)A allél

hordozása a cöliákia kialakulásának kockázatát a T1DM-ben szenvedő betegeknel 4,07-szeresre emelte az allélt nem hordozó egyénekhez képest.

8. A TLR-4 A⁸⁹⁶G SNP nem mutatott összefüggést sem a T1DM, sem a cöliákia kialakulásának kockázatával. A CD14 (-260)TT genotípus a kontrollcsoporthoz képest szignifikánsan alacsonyabb arányban fordult elő csak T1DM-ben szenvedő betegeknel, a különbség egyidejűleg fennálló T1DM és cöliákia esetén azonban már nem mutatható ki.

9. A homozigóta HLA-DQ8 genotípus szignifikánsan gyakrabban fordult elő T1DM-ben szenvedő betegeknel a cöliakiás páciensekhez képest. Cöliakiás betegeknel a homozigóta és heterozigóta HLA-DQ2 (DQ8-) genotípus a T1DM-ben szenvedő betegekhez illetve kontroll csoporthoz képest szignifikánsabb gyakrabban fordul elő. A T1DM és a T1DM+cöliákia csoportban a HLA DQ2/8 heterozigóta genotípus szignifikánsabb gyakoribb a cöliakiás betegcsoporthoz illetve kontroll csoporthoz képest.

Munkánkban a magasabb citokin produkcióval járó TNF α ⁻³⁰⁸AA és AG genotípusok és alacsonyabb fehérjeprodukcióval járó HSPA1B ¹²⁶⁷AG és GG genotípusok együttes előfordulása szignifikánsabb gyakoribb volt diabeteszes betegekben a kontroll csoporthoz képest. A TNF α egy proinflammatorikus citokin, mely a destruktív inzulinitisz kialakulásában és fenntartásában is szerepet játszhat, míg az alacsonyabb HSP72 produkció miatt a β -sejtek védtelenebbé válnak a károsító autoimmun folyamatokkal szemben. A leírt mechanizmus magyarázhatja a polimorfizmusok és T1DM kialakulása közti kapcsolatot. Ugyancsak összefüggés találtunk az IL-6 ¹⁷⁴G allél hordozása és a T1DM diagnosztizálásakor fennálló idősebb életkor közt, a kapcsolat csak magasabb citokin produkcióval járó IL-1 β (³⁹⁵⁴T allél) vagy TNF α genotípus egyidejű hordozásakor mutatható ki. A

nagyobb mennyiségben termelődő IL-6 β -sejt protektív szerepe a T1DM kialakulásának késleltetésében nyilvánul meg.

A TNF α G⁻³⁰⁸A polimorfizmus nem mutatott összefüggést a cöliákia előfordulásával T1DM-ben szenvedő gyermekeknél, míg a TNF α (-238)A allél hordozása a cöliákia kialakulásának kockázatát a T1DM-ben szenvedő betegeknél négyszeresére emelte az allélt nem hordozó egyénekhez képest. Ez utóbbi összefüggés funkcionális jelentősége még nem ismert.

A TLR-4 A⁸⁹⁶G SNP nem mutatott összefüggést sem a T1DM, sem a cöliákia kialakulásának kockázatával.

A diabéteszes betegeknél a magasabb fehérjeprodukciónal járó CD14⁻²⁶⁰TT genotípus ritkábban fordult elő, míg CD és T1DM egyidejű jelenlétekor ez az eltérés már nem figyelhető meg. A CD14 fontos szerepet játszik CD kialakulásáért felelős gyulladási folyamatokban, de T1DM patogenezisében protektív szereppel bírhat.

Vizsgálatunkban az irodalmi adatoknak megfelelően a cöliákias betegeknél a homozigóta és heterozigóta HLA-DQ2 (DQ8-) genotípus a T1DM-ben szenvedő betegekhez illetve kontroll csoporthoz képest szignifikánsan gyakrabban fordul elő. A homozigóta HLA-DQ8 genotípus a T1DM-ben szenvedő betegeknél a cöliákias páciensekhez képest szignifikánsan nagyobb számban volt kimutatható. Amennyiben a két betegség egymással társult, úgy a HLA DQ2/8 heterozigóta genotípus jelentősége nő meg.

A disszertációhoz kapcsolódó publikációk

Cikkek

Dezsőfi A, Szebeni B, **Hermann C**, Kapitány A, Veres G, Sipka S, Körner A, Madácsy L, Korponay-Szabó I, Rajczy K, Arató A. Frequencies of genetic polymorphisms of TLR4 and CD14 and of HLA DQ genotypes in children affected by coeliac disease, type I diabetes or both. *JPGN - közlésre elfogadva*

Hermann C, Krikovszky D, Vásárhelyi B, Dezsőfi A, Madácsy L. (2007) Polymorphisms of the TNF- α gene and risk of celiac disease in T1DM children. *Pediatric Diabetes*, 8: 138–141 **IF: 2.162**

Cs Hermann, D Krikovszky, G Füst, M Kovács, A Körner, A Szabó, Á Vannay, L Madácsy.(2005) Association between IL-6 polymorphism and the age-at-onset of type 1 diabetes. Epistatic influences of the TNF α and interleukin-1 β polymorphisms. *Eur Cytokine Netw*,16: 277-81 **IF: 1.073**

Poszterek/Absztraktok

Krikovszky D, **Hermann C**, Fust G et al.(2006) Association between IL-6 polymorphism and the age at the onset of type 1 diabetes. Epistatic influences of the TNF alpha and IL-1 beta polymorphisms. (poszter) American Diabetes Association, Annual Meeting, Washington. (absztrakt: *Diabetes*, 55(1) A252)

Hermann Cs, Krikovszky D, Erdei G, Fekete A, Füst G, Prohaszka Z, Kovács M, Madácsy L. (2005) Association between HSPA1B A(1267)G polymorphism and type 1 diabetes mellitus. (poszter) The European Association for the Study of Diabetes 41th Annual Meeting, Athen (absztrakt: *Diabetologia* 48, Suppl 1. A-111)

Krikovszky D, **Hermann Cs**, Erdei G, Fekete A, Füst Gy, Prohászka Z, Madácsy L. (2006) HSPA1B A(1267)G polimorfizmus vizsgálata 1-es típusú cukorbeteg gyermekekben. Magyar Diabétesz Társaság XVIII. Kongresszusa, Tihany

A disszertációtól független közlemények

Cikkek

Krikovszky Dóra, **Hermann Csaba**, Török Dóra, Perjés Zsófia, Brandt Ferenc, Emri Enikő, Kis Éva, Machay Tamás. (2007) Congenitalis centrális hipoventilációs szindróma esete. *Medicina Thoracalis*, 60(2): 78-81.

Sipos, P., Szabó, Sz., Ondrejka, P., **Hermann, Cs.**, Elek, G., Sugár, I. (2004) Subtotalis colectomia epekő-ileus műtétje során. *Magyar Sebészet*, 57(5): 293-296

Hermann Cs, Diószeghy Cs, Péntes I. (2003) Nem szívműtetre kerülő ischaemiás szívbeteg perioperatív ellátása. *Aneszteziológia és Intenzív Terápia*, 33(2): 16-32

Janeckó M., Darvas K., **Hermann Cs.** (1998) Az ambuláns egynapos sebészeti anesztézia perioperatív kérdései. *Aneszteziológia és Intenzív Terápia* 29, (Suppl. III): 8-11

Janeckó M., Pásztor M., **Hermann Cs.** (1997) Kombinált anesztézia bevezetés ambuláns nőgyógyászati beavatkozásoknál és hasi műtéteknél. *Aneszteziológia és Intenzív Terápia*, 28 (Suppl. II): 12-20

Könyvfejezetek

Péntes I, Lorx A, **Hermann Cs**: Légzés és tüdő. In: Péntes I, Lencz L (szerk.): *Az aneszteziológia és intenzív terápia tankönyve*. Alliter, Budapest, 2003: 345-403

Péntes I, **Hermann Cs**: Endokrin elégtelenségek heveny jelentkezése. Endogén mérgeзések In: Péntes I, Lencz L (szerk.): *Az aneszteziológia és intenzív terápia tankönyve*. Alliter, Budapest, 2003: 442-455

Hermann Cs: Katecholaminok és vazóaktív terápia. In: Péntes I, Lencz L (szerk.): *Az aneszteziológia és intenzív terápia tankönyve*. Alliter, Budapest, 2003: 577-582

Hermann Cs: Gázcsere. In: Péntes I, Lorx A (szerk.): *A lélegeztetés elmélete és gyakorlata*. *Medicina*, Budapest, 2004:62-67

Hermann Cs: Tüdőkeringés. In: Péntes I, Lorx A (szerk.): A lélegeztetés elmélete és gyakorlata. Medicina, Budapest, 2004: 68-72

Hermann Cs: A tüdő nem respiratorikus funkciói In: Péntes I, Lorx A (szerk.): A lélegeztetés elmélete és gyakorlata. Medicina, Budapest, 2004: 136

Hermann Cs: A gépi lélegeztetés indikációi In: Péntes I, Lorx A (szerk.): A lélegeztetés elmélete és gyakorlata. Medicina, Budapest, 2004: 277-294

Hermann Cs: A testhelyzet hatása a gázcsere In: Péntes I, Lorx A (szerk.): A lélegeztetés elmélete és gyakorlata. Medicina, Budapest, 2004: 469-478

Péntes I, Madách Krisztina, **Hermann Cs:** Tüdőembolia In: Péntes I, Lorx A (szerk.): A lélegeztetés elmélete és gyakorlata. Medicina, Budapest, 2004: 553-568

Hermann Cs, Lorx A, Péntes I: Otthoni lélegeztetés. In: Péntes I, Lorx A (szerk.): A lélegeztetés elmélete és gyakorlata. Medicina, Budapest, 2004: 831-853

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni Tulassay Tivadar Professzor Úrnak, Madácsy László Professzor Úrnak és dr. Vásárhelyi Barnának, hogy egyéni fokozatszerzőként és alapvetően más klinikai szakterületen dolgozó orvosként befogadtak az 1. sz. Gyermekgyógyászati Klinikán létrehozott szellemi műhelybe, mely lehetővé tette a fokozatszerzéshez szükséges tudományos munka elvégzését.

Szeretnék köszönetet mondani Füst György Professzor Úrnak, aki az adatok statisztikai elemzésében segített, illetve Dr Körner Annának és Dr Dezsőfi Antalnak akik a diabéteszes és cöliákiás gyermekek klinikai adatainak összegyűjtésében és értékelésében nyújtottak segítséget.

Köszönetemet szeretném kifejezni a diabétesz osztály és ambulancia dolgozóinak, elsősorban Négrádi Évának, Zeher Zsuzsannának és Szilvágyi Mártának, akik a munkámhoz szükséges klinikai adatokhoz való hozzáférést biztosították.

Köszönettel tartozom a klinika laboratóriumban dolgozó munkatársaknak és Ph.D. hallgatóknak: Bernáth Máriának, Dr Fekete Andreának, Dr Szebeni Beának és Dr Vannay Ádámnak az általuk nyújtott technikai segítségért.

A PCR módszerrel kapcsolatos kérdéseimben segített Dr Szalai Csaba és Kovács Margit, akiknek ezúton szeretnék köszönetet mondani.