A 2009-2011-es periódusban tárcaszintű támogatásban részesített kutatási témák elfogadott szakmai beszámolói

Összeállította:
Az Egészségügyi Tudományos Tanács Titkársága

Bevezetés

Az ETT által koordinált tárcaszintű kutatási támogatás 2009-2011. évi periódusa a beszámolók értékelésével lezárult. A 2009-ben kiírt pályázatra 495 kutatási terv érkezett, melyekből a miniszteri felkérés alapján kinevezett tíz tudományos szakterületi albizottság rangsora alapján az albizottságok elnökeiből álló Kutatás-Fejlesztési Bizottság és az ETT Elnöksége javaslata alapján 166-ot támogatott.

A 2011. december 31-én lejáró hároméves kutatások zárójelentéseit az ETT 2012. február 15-i határidővel kérte be, és felkérte a tíz szakbizottságot azok szakmai bírálatára. Az elfogadás feltétele a szakmai beszámolóban leírt eredmények legalább egy, impakt faktorral rendelkező folyóiratban történő, közleményben való megjelenése, amitől a Bizottság csak a környezet egészségügyi, népegészségügyi kutatások esetében tekintett el. A megfelelő publikációval nem rendelkező témavezetők 2012. november 16-ig kaptak haladékot jelentésük kiegészítésére. Az ETT Kutatás-Fejlesztési Bizottsága végül 166 beszámoló közül 159 elfogadását javasolta. A javaslatot az Elnökség 2013. január 10-i ülésén jóváhagyta. A korábbi hagyományoknak megfelelően az elfogadott pályázati jelentéseket az ETT a honlapján nyilvánosságra hozza.

Összességében megállapítható, hogy a tárcaszintű kutatási támogatás 2011-ben zárult periódusa – a korábbi ciklusokhoz hasonlóan – egyértelműen sikeres volt. Bár a támogatás egyénenként és témánként viszonylag kisösszegű volt, mégis igen jelentős szakmai, tudományos tevékenység elvégzéséhez járult hozzá, amit a jelentésekben foglalt nagyszámú nemzetközi és hazai publikációk is jól mutatnak.

Az ETT Elnöksége elengedhetetlenül fontosnak tartja a bevált, tárcaszintű kutatástámogatási rendszer további életben tartását, és szorgalmazza egy új tárcaszintű kutatási pályázat mielőbbi meghirdetését.

A következő oldalakon olvashatók az elfogadott szakmai beszámolók eredeti, szerkesztetlen változatban.

Budget: 5,400,000.- HUF

A TERMÉSZETI ÉS TÁRSADALMI KÖRNYEZET VÁLTOZÁSÁT ELŐIDÉZŐ POLITIKAI DÖNTÉSEK, PROGRAMOK ÉS PROJEKTEK EGÉSZSÉGHATÁS VIZSGÁLATÁBAN A HATÁS TELJES LÁNCOLATÁT ÉRTÉKELŐ BECSLÉS MÓDSZEREINEK TOVÁBBFEJLESZTÉSE AZ EGÉSZSÉGET TÁMOGATÓ DÖNTÉSEK ELŐSEGÍTÉSE ÉRDEKÉBEN

Ádám Balázs, Molnár Ágnes, Ádány Róza
Debreceni Egyetem OEC, Népegészségügyi Kar, Megelőző Orvostani Intézet

A magyar lakosság kedvezőtlen egészségi állapotának javítása össztársadalmi érdek, melyhez hatékonyan járulhatnak hozzá az egészség, mint alapvető érték, politikai döntéshozatalban történő megjelenését elősegítő egészséghatás vizsgálatok (EHV). Célunk az EHV hazai gyakorlatának támogatása, módszertanának a politikai döntéshozatalban minél inkább felhasználható eredményeket nyújtó fejlesztése volt. Kezdeti vizsgálataink a minőségi bortermelés és Roma lakhatási projektek egészségi hatásainak elemzésére irányultak, melyek esősorban kvalitatív módon becsülték meg e kezdeményezések hatásait és adtak ajánlásokat a kapcsolódó egészségnyereség maximalizálására és az egészségveszteség minimalizálására. E tanulmányok a hatásokat az egészségdeterminánsok/kockázati tényezők szintjén vizsgálták az egészség kimenetelek részletes elemzése nélkül, mindazonáltal értékes tapasztalatokat szolgáltattak az EHV gyakorlati alkalmazására és eredményeinek felhasználására vonatkozóan. Erre a gyakorlatra építve történt meg az EHV módszertani fejlődésének áttekintése, az előterjesztéstől az egészségdeterminánsokon és kockázati tényezőkön keresztül az egészség kimenetelekig a teljes hatásláncot elemző folyamat meglévő példákon alapuló meghatározása és továbbfejlesztése, melynek keretében lehetővé vált kvantitatív hatásbecslést alkalmazó módszerek integrálása. A számszerű hatásbecslés betegségteher számításon alapuló gyakorlata lehetővé tette betegségteher mutatók (járulékos halálozás, rokkantsággal korrigált életévi veszteség) kalkulációját, mellyel jellemezhető egy előterjesztés egészséghatása, különböző egészségi állapotú társadalmi csoportokra eltérő kapcsolati mutatókat alkalmazva pedig az egészségi egyenlőtlenségekre gyakorolt hatás is. A teljes hatáslánc felmérése, az egyes szinteken megjelenő tényezőknek az oksági bizonyíték erőssége, a várható hatás mértéke és számszerűsíthetősége, valamint népegészségügyi jelentősége alapján történő fontossági sorrendbe állítása, a tényezők közötti horizontális interakciók figyelembe vétele és a becslési folyamat különböző pontjain jelentkező bizonytalanság jellemzése tapasztalataink szerint mind fontos feltételei a kvantitatív hatásbecslés elemzési folyamatba történő integrálásának.
Elvégeztük az eredetileg kvalitatív eredményeket szolgáltató, a nemdohányzók védelméről szóló törvény módosítási javaslatában a nyilvános közforgalmú helyeken, munkahelyeken és tömegközlekedési eszközökön a dohányzás tilalmát elrendelő tervezet várható egészségi hatásait elemző EHV-nek az egészség kimenetelek számszerű becslésével történő kiegészítését. A tanulmány kimutatta, hogy az előterjesztés hatására az aktív és passzív dohányzás prevalenciája visszaesik, melynek következtében számos megbetegedés, köztük a dohányzáshoz köthető kórállapotok közül a legnagyobb népegészségügyi jelentőséggel bíró tüdőrák, ischémiás szívbetegség, stroke és krónikus aspecifikus légzőszervi betegség terhe jelentősen csökken. Az alkalmazott konzervatív becslési modell szerint az előterjesztéshez köthető összesített egészségnyereség hosszú távon (hozzávetőleg 15 elteltével) közel 1700 haláleset és 16000 életévi veszteség elkerülése a 10 milliós magyar populációban évente. Az elemzés az első hazai példa, s egyben a kevés nemzetközi példák egyike arra, hogy miképp lehet az EHV folyamatába integrált kvantitatív hatásbecslést végezni (közlése major revision fázisában, 2012).

Ádám B, Molnár Á, Bárdos H, Ádány R: Health impact assessment of quality wine production in Hungary. HEALTH PROMOTOTION INTERNATIONAL 24: pp. 383-393 (2009) IF: 1,544

Molnár Á, Ádány R, Ádám B, Gulis G, Kósa K: Health impact assessment and evaluation of a Roma housing project in Hungary. HEALTH & PLACE 16: pp. 1240-1247 (2010) IF: 2,694

Budget: 5,400,000.- HUF

IMPROVEMENT OF METHODOLOGY FOR ASSESSING THE FULL IMPACT CHAIN IN THE HEALTH IMPACT ASSESSMENT OF POLITICAL DECISIONS, PROGRAMMES AND PROJECTS THAT RESULT IN CHANGES OF THE NATURAL AND SOCIAL ENVIRONMENT SO AS TO CONDUCE POLICIES PROMOTING HEALTH

Ádám Balázs, Ádány Róza, Molnár Ágnes
Department of Preventive Medicine, Faculty of Public Health, Medical and Health Science Centre, University of Debrecen

Improving the unfavourable health status of the Hungarian population is a common public interest, to which health impact assessment (HIA) can contribute effectively by promoting the consideration of health as a fundamental value in policy making. Our aim was to promote the practice of HIA in Hungary and to improve its methodology so as to provide results that are preferred in political decision making. Our first studies analysed the health impacts of quality wine production and Roma housing projects assessing the health effects of the initiatives in a mainly qualitative way and giving recommendations for the maximization of related health gain and minimization of health loss. These studies investigated the effects on the level of health determinants/risk factors without analysing health outcomes in details; however, they could provide good experiences for the applicability of HIA and for use of its results in practice. Built on these experiences, the methodological development of HIA was reviewed, the assessment of the full impact chain from proposal through health determinants and risk factors to health outcomes was characterised by existing examples and further developed that allowed the integration of quantitative methods in the process. Quantitative risk assessment based on disease burden modelling allowed the calculation of disease burden measures (attributable death, disability adjusted life years) by which characterization of the impact on health and, applying different association measures for population groups of various health status, also impact on health inequalities becomes possible. The mapping of the full impact scheme (causal web), the prioritization of factors on various levels by the strength of evidence for causality, size and quantifiability of expected effect, as well as by public health importance, the consideration of horizontal interactions and the characterization of uncertainty at various stages of the assessment process proved to be all important criteria for the integration of quantitative assessment in the analysis process.
The originally qualitative HIA of the proposal for the amendment of the Act on the protection of non-smokers with banning smoking in closed public places, workplaces and public transport vehicles was completed with quantitative assessment of health outcomes. The study revealed that the proposal reduces the prevalence of active and passive smoking, and consequently the burden of several smoking-related diseases of high public health importance, like lung cancer, ischemic heart disease, stroke and chronic obstructive pulmonary disease, significantly decreases. According to the conservative estimates, the overall health gain of the proposal is close to 1700 lives and 16000 disability adjusted life years in long term (after about 15 years) in the Hungarian population of 10 million inhabitants. This assessment is the first Hungarian and one of the few international examples for how to carry out quantitative impact assessment integrated in the process of HIA (under major revision, 2012).

Ádám B, Molnár Á, Bárdos H, Ádány R: Health impact assessment of quality wine production in Hungary. HEALTH PROMOTOTION INTERNATIONAL 24: pp. 383-393 (2009) IF: 1.544

Molnár Á, Ádány R, Ádám B, Gulis G, Kósa K: Health impact assessment and evaluation of a Roma housing project in Hungary. HEALTH & PLACE 16: pp. 1240-1247 (2010) IF: 2.694

Teljes támogatás: 6.000.000,- Ft

EGÉSZSÉGI ÁLLAPOT FELMÉRÉS AZ ÉSZAK- KELET MAGYARORSZÁGI ROMA LAKOSSÁG KÖRÉBEN

Ádány Róza[1], Kósa Karolina[1], Sándor János[1], Fiatal Szilvia[1], Tóth Réka[1], Rurik Imre[2], Kósa Zsigmond[3], Sasvári Mária[4]
[1] Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Népegészségügyi Kar, Megelőző Orvostani Intézet, [2] Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum Népegészségügyi Kar, Családorvosi és Foglalkozás-egészségügyi Tanszék, [3] Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum Egészségügyi Kar, Védőnői Módszertani és Népegészségtani Tanszék, [4] Semmelweis Egyetem, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézet

Jelen projekt keretében - megalapozó felméréseket követően (1) - az északkeleti országrészben a részvételt tájékozottan vállaló felnőtt (18 éves és annál idősebb) roma lakosság egészségi állapotának felmérését végeztük el a roma lakosság esetében legnagyobb súllyal jellemezhető egészségi állapot problémák azonosítása érdekében. Az egészségi állapot felmérés mintapopulációjának geográfiai kijelölése érdekében környezet-egészségügyi felmérés kapcsán kerültek azonosításra azok a döntően romák által lakott telepek, melyekhez olyan háziorvosi praxisok rendelhetők, melyek az egészségfelmérés vizsgálat kapcsán vállalják az egészségi állapotot jellemző adatok szolgáltatását. A részvételi arány 76% volt (tervezett mintaszám 1000 fő). Az egészségfelmérés tartalma: (1) nem és kor, foglalkoztatottság, iskolázottság, dohányzási szokás, rutin fizikális vizsgálat, (2) ismert betegségek (a BNO X. osztályozás alapján) (3) testtömeg, testmagasság és derék-körfogat (4) testtömeg index (BMI), (5) vérnyomásmérés, (6) vérvétel laboratóriumi vizsgálatokra (éhomi vércukorszint, a zsíranyagcserét jellemző paraméterek közül, a totál koleszterin, a triglicerid és a HDL-koleszterin szérumszintjének meghatározása, népbetegségekre hajlamosító genetikai polimorfizmusok gyakorisága), (7) a metabolikus szindróma fennállásának megállapítása vagy elvetése IDF kritériumok alapján. A felmérés 2011 december közepén fejeződött be. Jelenleg az elemzés zajlik (Stata 6.0 programmal) kor és nem szerinti rétegezést végezve. Az adatok az általános magyar populációt jellemző adatokkal (KSH, HMAP, metabolikus szindróma felmérés, polimorfizmus eloszlási adatok) kerülnek összevetésre.
A tervezett vizsgálatok költségigénye 10 M Ft volt. A lényegesen redukált ETT támogatás az eredetileg tervezett vizsgálatok elvégzését nem tette volna lehetővé, ezért annak érdekében, hogy az ETT támogatási összeghez kiegészítést találjunk, kutatási programunkat beillesztettük a Debreceni Egyetem által a TÁMOP-4.2.1.B-09/1/KONV kódszámú „A felsőoktatás minőségének javítása a kutatás-fejlesztés-innováció-oktatás fejlesztésén keresztül” c. pályázatba.

Az egészségfelmérés kiegészítéseként a HBSC vizsgálat keretében 2010-ben hazánkban alkalmazott kérdőív felhasználásával Észak-kelet Magyarország három megyéjében (Borsod-Abaúj Zemplén, Hajdú-Bihar, Szabolcs-Szatmár-Bereg) telepszerű körülmények között élő 11 és 13 éves iskolás gyermekek körében egészségmagatartás vizsgálatot végeztünk 2011. március-május hónapban, véletlenszerű mintaválasztás alapján kiválasztott településeken az iskolavédőnők közreműködésével. A kutatás során a tervezett minta elemszáma 1000 fő volt;összesen 924 értékelhető kérdőív került felvételre (463 fő 11-12 éves; 461 fő 13-14 éves). Az Országos Gyermekegészségügyi Intézettel történt egyeztetés alapján elkészült a magyar referencia populáció és a telepszerű körülmények között élő tanulók egészségmagatartás vizsgálati adatbázisa, s elkezdődött annak elemzése, mely előreláthatólag 2012 márciusában fejeződik be.
A vizsgálatokat az ETT TUKEB és a DE OEC Regionális és Intézeti Kutatás Etikai Bizottsága engedélyezte.

Teljes támogatás: 6.000.000,- Ft

Fenti vizsgálatok kiegészítő elemzései a magyarországi Roma populáció egészségi állapotát meghatározó társadalmi gazdasági tényezők elemzésére irányultak, melynek kapcsán megállapítottuk, hogy

(a) a társadalmi-gazdasági státusz jelentős mértékben meghatározza a cigány lakosság egészségi állapotát, de csak részben magyarázza az egészségmagatartás jellegzetességeit. Az egészségi állapot kedvező befolyásolása a társadalmi-gazdasági helyzet javítása mellett a kulturális determinánsok megváltoztatásával lehetséges (2, 3, 4);
(b) a Roma lakosság egészségi állapotának javítását célzó egészségpolitikai intézkedések az oktatási és foglalkoztatási politikával összhangban lehetnek csak hatékonyak, azaz a Roma integrációs politika részeként vezethetnek sikerre (5).

Tudományos folyóiratban megjelent, illetve elfogadott eredeti és összefoglaló (review) *közlemények* (szerzők, cím, folyóirat címe, kötetszám, oldalszámok, évszám), a folyóirat impakt faktorának megadásával:

1. Kósa, K., Daragó, L., Ádány, R.: Environmental survey of segregated habitats of Roma in Hungary: a way to be empowering and reliable in minority research. Eur. J. Public Health, 21, 4, 463-468, (2011). IF: 2,267

2. Vokó, Z., Csépe, P., Németh, R., Kósa, K., Kósa, Zs., Széles, Gy., Ádány, R.: Does socioeconomic status fully mediate the effect of ethnicity on the health of Roma people in Hungary? *J. Epidemiol. Comm. Health,* 63, 6, 455-460, (2009). IF: 3,043

3. Molnár, Á., Ádány, R., Ádám, B., Gulis, G., Kósa, K.: Health impact assessment and evaluation of a Roma housing project in Hungary. Health Place, 16, 6, 1240-1247, (2010). IF: 2,694

4. Petrovski, B. E., Széles, Gy., Melles, M., Pataki, V., Kardos, L., Jenei, T., Ádány, R., Vokó, Z.: Behaviour does not fully explain the high risk of chronic liver disease in less educated men in Hungary. Eur. J. Public Health, 21, 5, 662-666, (2011). IF: 2,267

5. Fésüs, G., Ostlin, P., McKee, M., Ádány, R.: Policies to improve the health and well-being of Roma people: The European experience. Health Policy, 2012 Jan 2. [Epub ahead of print] (2012). IF: 1,383

Kongresszusi előadások/poszterek (szerzők, cím, a kongresszus helye, ideje):

Molnár Á, Kósa K, Ádám B, Antova T, Bosak L, Dimitrov P, Mileva H, Pekarcikova J, Zurlyte I, Gulis, G, Ádány R.: Health impact assessment of Roma housing policies in Central and Eastern Europe. European Public Health Conference, Lodz, 2009.

Molnár Á, Ádám B, Antova T, Bosak L, Dimitrov P, Mileva H, Pekarcikova J, Zurlyte I, Gulis G, Ádány R, Kósa K.: Közép Európai Roma lakhatási politikák egészséghatás vizsgálata. Népegészségügyi Képző- és Kutatóhelyek 3. Országos Konferenciája, Győr, 2009.

Molnár Á, Ádám B, Gulis G, Ádány R, Kósa K.: Egészséghatás vizsgálat és értékelés egy helyi szintű Roma lakhatási projekthez kapcsolódóan. Népegészségügyi Képző- és Kutatóhelyek 4. Országos Konferenciája, Szombathely, 2010.

Teljes támogatás: 6.000.000,- Ft

HEALTH EXAMINATION SURVEY IN ROMA COMMUNITIES OF NORTH-EAST HUNGARY

Ádány Róza[1], Kósa Karolina[1], Sándor János[1], Fiatal Szilvia[1], Tóth Réka[1], Rurik Imre[2], Kósa Zsigmond[3], Sasvári Mária[4]
[1]Department of Preventive Medicine, Faculty of Public Health, Medical and Health Science Center, University of Debrecen, [2]Department of Family Medicine and Occupational Health, Faculty of Public Health, Medical and Health Science Center, University of Debrecen, [3]Department of Health Visitors Methodology and Public Health, Faculty of Health, Medical and Health Science Center, University of Debrecen, [4]Department of Medical Chemistry, Molecular Biology and Pathobiochemistry, Semmelweis University

In the framework of the present project – on the basis of findings obtained in an environmental health study (1) – a health examination survey was carried out among Roma people (aged 18 and above) living in colonies of North-East Hungary. The aim of the study was to define the prevalence of health problems with high public health relevance. First, the settlements were selected and in the second step persons were invited randomly. Of the planned 1000 examinations 760 were completed successfully. In the health examination survey the followings were recorded : (1) sex and age, employment and education status, smoking, results of physical examination, (2) diseases known and classified by ICD X codes, (3) body weight and height, waist circumference, (4) body mass index - BMI, (5) blood pressure. Blood samples were obtained for laboratory analyses (glucose, lipid parameters as total cholesterol, trigyceride, HDL-cholesterol, as well as SNP-analyses). On the basis of results the prevalence of metabolic syndrome in the Roma population can be defined. The survey was completed in December, 2011. Presently the epidemiological studies - in which the population is stratified by sex and age - are in progress (by using Stata 6.0 programme). Results will be compared by data for the general Hungarian population obtained in previous studies. Concerning the fact that the budget estimates were about 10 million in addition to the budget of the project we had to find additional financial support. So the project was partially inserted into the research programme of the TÁMOP-4.2.1.B-09/1/KONV project entitled „Improving the quality of higher education through the development of research-innovation-education".

As a complementary study - in connection with the European Survey on Health Behaviour of School-Aged Children (HBSC) - health behaviour survey was carried out in three counties (Borsod-Abaúj Zemplén, Hajdú-Bihar, Szabolcs-Szatmár-Bereg) of North-East Hungary among 11 and 13 year-old children living in colonies by the participation of school nurses in March-April, 2011. The response rate was 92.4%. In collaboration with the National Institute of Child Health a database was developed, the analysis is in progress and will be completed by March, 2012.

Both surveys were approved by the Ethical Committee of the Hungarian National Scientific Council on Health and the Regional and Institutional Ethical Committee of the University of Debrecen.

In addition to the above surveys studies were carried out on the possible role of socio-economical factors as health determinants in case of the Roma population. It was showed, that

(a) Socioeconomic status is a strong determinant of health of people living in Roma settlements in Hungary. It fully explains their worse health status but only partially determines their less healthy behaviours. Efforts to improve the health of Roma people should include a focus on socioeconomic status, but it is important to note that cultural differences must be taken into account in developing public health interventions. (2, 3, 4);

(b) Health policies seeking to reduce health inequalities for Roma people need to be aligned with education, labour market, housing, environmental and terrirorial policies and form a part of comprehensive policy frameworks allowing for effective integration (5).

Publications:

1. Kósa, K., Daragó, L., Ádány, R.: Environmental survey of segregated habitats of Roma in Hungary: a way to be empowering and reliable in minority research. Eur. J. Public Health, 21, 4, 463-468, (2011). IF: 2,267

2. Vokó, Z., Csépe, P., Németh, R., Kósa, K., Kósa, Zs., Széles, Gy., Ádány, R.: Does socioeconomic status fully mediate the effect of ethnicity on the health of Roma people in Hungary? *J. Epidemiol. Comm. Health,* 63, 6, 455-460, (2009). IF: 3,043

3. Molnár, Á., Ádány, R., Ádám, B., Gulis, G., Kósa, K.: Health impact assessment and evaluation of a Roma housing project in Hungary. Health Place, 16, 6, 1240-1247, (2010). IF: 2,694

4. Petrovski, B. E., Széles, Gy., Melles, M., Pataki, V., Kardos, L., Jenei, T., Ádány, R., Vokó, Z.: Behaviour does not fully explain the high risk of chronic liver disease in less educated men in Hungary. Eur. J. Public Health, 21, 5, 662-666, (2011). IF: 2,267

5. Fésüs, G., Ostlin, P., McKee, M., Ádány, R.: Policies to improve the health and well-being of Roma people: The European experience. Health Policy, 2012 Jan 2. [Epub ahead of print] (2012). IF: 1,383

Presentations:

Molnár Á, Kósa K, Ádám B, Antova T, Bosak L, Dimitrov P, Mileva H, Pekarcikova J, Zurlyte I, Gulis, G, Ádány R.: Health impact assessment of Roma housing policies in Central and Eastern Europe. European Public Health Conference, Lodz, 2009

Molnár Á, Ádám B, Antova T, Bosak L, Dimitrov P, Mileva H, Pekarcikova J, Zurlyte I, Gulis G, Ádány R, Kósa K.: Közép Európai Roma lakhatási politikák egészséghatás vizsgálata. III. Conference of Hungarian Association of Public Health Training and Research Institutions, Győr, 2009

Molnár Á, Ádám B, Gulis G, Ádány R, Kósa K.: Health impact assessment and evaluation of a Roma housing project in Hungary. IV. Conference of Hungarian Association of Public Health Training and Research Institutions, Szombathely, 2010

Teljes támogatás 2.400.000,- Ft.

Rekeszizom komplex patho-physiológiai vizsgálata hiatus herniákban és GORB-ben

Altorjay Áron
Fejér Megyei Szent György Kórház, Sebészeti Osztály
Székesfehérvár

Előzmények: Az antireflux műtétek késői funkcionális eredményeiben az objektív tény a 82 %-os panaszmentesség. 10-18 %-ban bizonyos tünetek visszamaradnak. A betegek 15-7 %-ában reinterventióra van szükség. A reoperatióra kerülő betegek 55 %-ában a rekeszszárak szétnyílásával találkozunk.

Célkitűzés: A rekeszszár izomzatának histológiai feltérképezése hiatus hernia, illetve GOR betegség miatt műtétre kerülő betegek jobb, illetve bal rekeszszárából vett reprezentatív izomminta alapján.

Anyag, módszer: A jobb, illetve bal rekeszszárakból 113 betegből vettünk standard helyről izommintát, átlagosan 2-4 mm átmérőjűt. A 2 mm-nél kisebb, illetve csak adventiciális kötőszövetet tartalmazó mintákat, illetve ha az izomrostok területe kisebb volt mint a Zeiss-Okton Standard 20 mikroszkóp 10 x objektív látótere, nem értékeltük. Így a vizsgálatból 26 beteg adatait zártunk ki, 87-et értékeltünk. Pufferolt formalinban történő fixálás és paraffin beágyazást követően 3-4 mikronos metszetvastagságok készültek. Haematoxilin-eosin (HE) és Van-Gieson kötőszöveti rostfestés történt.
A blokkokból mikroszkópos kontroll mellett kiválasztottuk a megfelelő részeket, melyeket a blokkból kivágva deparaffináltuk és elektronmikroszkópos vizsgálat céljára műgyantába ágyaztuk. Az így nyert blokkokból további fénymikroszkópos metszetek készülek, melyeket toluidinkékkel festettünk meg. Ezekből a metszetekből történt mikroszkópos kontroll mellett az elektronmikroszkópos vizsgálatra alkalmas területek kiválasztása. Az ultravékony metszeteket uranilacetáttal és ólomcitráttal kontrasztoztuk. Az vizsgálat Philips CM10 elektronmikroszkóppal történt.

Eredmények:
1. Normál harántcsíkolt izomszövetet 54/87 = 62.1 %-ban észleltünk.
2. Polymorphonuclearis leukocyták megjelenését perivastularisan 19/87 = 21.8 %-ban találtunk.
3. Polymorphonuclearis leukocyták megjelenésével nem csak a perivascularis regióban, hanem az endomysiumban is 8/87 = 9.2 %-ban szembesültünk.
4. Lymphocyták és leukocyták perivascularis megjelenése 2/87 = 2.3 %-ban jelentkezett.
5. Az endomysiumban deffinitív kötőszövet felszaporodást és egyidejű perivascularis leukocytás infiltratiót 4/87 = 4.6 %-ban találtunk.
6. A jobb, illetve bal rekeszszárak vonatkozásában eltérés nem mutatkozott.
7. A Visick III-IV. csoportba tartozó betegek a 3-5 típusú szöveti eltérések csoportjába tartoztak.

Teljes támogatás 2.400.000,- Ft.

Összefoglalás: A lymphocyták, macrophagok, histioyták megjelenése chronicus folyamat eredménye. Ennek oka lehet gyulladás, degeneratív folyamat. folyamatos mechanicus irritáció. A kötőszöveti rostok és a capillarisok felszaporodása a gyulladásos és degeneratív folyamatok végstádiuma, amikor az elpusztult szöveteket pótolja vagy a gyulladásos reakciót követi a sarjszövet. Nyilvánvalóvá vált, hogy a reflux-betegek mintegy 17 %-ában a transmuralis oesophagitis igenis eléri nemcsak a mediastinumot, hanem a rekeszszárakat is és ebben chroncius gyulladásos folyamatot generál. A klinikum számára levonható nagy jelentősségű megfigyelésnek azt tartjuk, hogy ez a stádium már kötőszövet felszaporodásával járó chronicus folyamattá válhat az izomban, így a rekeszszárak egyesítését, gyógyulását nehezítő körülményt jelent, a recidívák egyik okaként felelőssé tehető. A lehető legtökéletesebb PPI-kezelés beállítása mellett is, ha anatómiai ok észlelhető, mely sebészileg már idejekorán reconstruálható, úgy ennek elvégzése kerüljön előtérbe.

Teljes támogatás 2.400.000,- Ft.

Complex pathophysiological examinations of GERD's patients diaphragmatic muscles

Áron Altorjay
Saint George Hospital,
Székesfehérvár

Background: The late functional results of the antireflux surgery proved to be successfull in 82 %. There are certain complaints in 10-18 %. Redo operation is necessery in about 5-7 % of the cases. Among these the disruption of the diaphragmatic cruses were observed in about
55 %.

Aims: The histiopathological examination of the diaphragmatic cruses – right and left – harvested during hiatal hernia repair and antireflux surgery.

Material and methods: On the avarage 2-4 mm – in diameter – muscle peaces were removed from 113 patients during antireflux surgery from the right and left diaphragmatic crus. Those samples which were less than 2 mm or contained only adventitial fascia or the surface of the muscle sample was smaller than 10x visual field of Zeiss 20 microscope were excluded. This way altogether 26 patient's data were excluded. 87 patient's samples were considered. The electronmicroscopical examination was carried out with Philips CM 10 electronmicroscope.

Result:

1. Normal histopathological structure of the muscles were noticed in 54/87 = 62.1 %.
2. Polymorphonuclear leucocytes appeared in perivascular field in 21.8 % = 19/87..
3. Polymorphonuclear leucocytes appeared not only in perivascular regions but in endomysium as well in 8/87 = 9.2 %.
4. Appearence of not only leucocytes but also lymphocytes in perivacular region was noticed in 2/87 = 2.3 %.
5. In endomysium we found definitive abundance of connective tissue fibers withe leucocytic perivascular infiltration, in 4/87 = 4.6 %.
6. There was no significant alteration between the right and left crus of the diaphragm 5/87 = 5.7 %.
7. Patients in group Visick III-IV belong to the 3-5 type hystopathological alteration group.

Summary: The appearance of lymphocytes, macrophages, hystiocytes is the result of a chronic procedure. The cause can be an inflammation degenerative process and continous mechanical irritation. The abundance of connective tissue fibers and

capillaries means the end station of the inflammation and degenerative processes. On the basis of our new observation it became evident that in almost 17 % of the GERD patients the transmural esophagitis does reach not only the mediastinum but the diaphragmatic cruses as well, and it induces a chronic infiltratic process.

The massage of our observation for the every day practice is that the chronic inflammation in dyaphragmatic cruse could be one of the causes of the rupture after reconstructive surgery. Even with perfect results of PPI treatment we can not underline the importance of the surgical treatment carried out in time.

Teljes támogatás: 2.400.000,- Ft

A TERMÉSZETES IMMUNITÁS SZEREPE A GYULLADÁSOS BÉLBETEGSÉG ÉS A COELIAKIA PATOGENEZISÉBEN KÜLÖNÖS TEKINTETTEL A TOLL-LIKE RECEPTOROK HATÁSÁRA A PPARγ EXPRESSZIÓJÁRA ÉS A REGULÁTOR T-SEJTEK ARÁNYÁRA

Arató András, Veres Gábor, Körner Anna
Semmelweis Egyetem I.Sz.Gyermekklinika

Korábbi vizsgálatainkban bizonyítottuk, hogy a toll-like receptorok (TLR) expressziójának változása figyelhető meg a bélnyálkahártyában immunmediált bélbetegségekben, így coeliakiában és gyulladásos bélbetegségben. Annak érdekében, hogy felderítsük az egyes TLR-ek hatásait, elemeztük, hogy a TLR-ek expressziója hogyan befolyásolja egyes olyan faktorok alakulását, amelyek szerepet játszhatnak a bélnyálkahártya integritásának védelmében és az apoptosis gátlásában. A TLR receptorok ligandja a hő sokk fehérje 72 chaperon protein (HSP 72), ami képes védeni az epithelialis barrier integritását és antiapoptotikus hatása is van.
Tizenhat kezeletlen és 10 kezelt coeliakiás gyermekek vékonybélnyálkahártyájában vizsgálva a HSP 72 mRNS és protein expresszió fokozott volt mind a kezeletlen és a kezelt coeliakiásokban a kontrollokhoz képest, de a kezeltekben a HSP 72 expresszió mind mRNS, mind protein szinten csökkenést mutatott a kezeletlenekhez képet. Feltételezzük, hogy a HSP72 fokozott expressziója védelmet jelent coeliakiában a gliadin okozta citotoxicitás tüneteinek enyhítésében. Ugyancsak vizsgáltuk ezekben a betegekben a hypoxia indukált faktor 1 alfa (HIF) és a trefoil faktor 1 (TFF1) expresszióját és az eredményeket 10 kontrolléval hasonlítottuk össze. Kimutattuk, hogy a HIF-1alfa és a TFF1 mRNS és a HIF-1alfa protein expresszió emelkedett a kezeletlen coeliákiások duodenum nyálkahártyájában a kezelt betegekhez és a kontrollokéhoz képest. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a fokozott HIF-1alfa expresszió részt vesz a természetes immunválasz szignalizációs útján és hozzájárulhat a coeliakia patogeneziséhez.
A peroxisoma proliferator-aktivált gamma (PPARγ) egy transzkripciós faktor, ami úgy csökkenti az intestinalis gyulladást, hogy gátolja a gyulladásos cytokinek termelődését a mukosában és mérsékli egyéb olyan transzkrcipciós faktorok aktivitását, amelyeknek proinflammatorikus hatása van. Vizsgáltuk a a peroxisoma proliferator-aktivált gamma expresszióját és lokalizációját frissen diagnosztizált és gluten mentes diétát tartó coeliakiás gyermekekekben és az eredményeket egészséges kontrollokhoz hasonlítottuk. A PPARγ mRNS expresszió meghatározása RT-PCR-rel, a protein szinteké pedig Western blot analízissel és immunfluoreszcens festéssel történt. Kezeletlen coeliakiások duodenum nyálkahártyájában a PPARγ fehérje szint csökkenést mutatott a glutenmentes diétán talált értékekhez, de a kontrollokéhoz képest a csökkenés mértéke kisebb volt. A PPARγ mRNS expressziója kezeletlen coeliakiásokban kissé emelkedett volt a gliadinmentes diétán talált értékekhez képest, de a kontrollokéval lényegében megegyezett. Immunofluoreszcens festéssel PPARγ a betegek és kontrollok duodenum mucosájában a lamina propria lymphocytáiban és a felszíni epithelialiumban volt detektálható. A kezeletlen coeliakiásokban a csökkent PPARγ fehérje szint hozzájárulhat a vékonybélnyálkahártya gyulladásához és atrophiájához. A normális PPARγ mRNA expresszió arra utal, hogy a PPARγ fehérje lebomlása fokozott a kezeletlen coeliakiásokban, hiszen glutenmentes diétán a kissé csökkent mRNS expresszió is elégséges a normális mértékű PPARγ termeléshez.
Ugyancsak vizsgáltuk kezelt és kezeletlen coeliakiás gyermekek perifériás vérében a veleszületett és adaptív immunitásban szerepet játszó sejtek megoszlását. Kezeletlen coliakásokban a perifériás vérben csökkent a Th1, az NK (CD3-CD161+), az NKT (CD3+ CD161+) és az invariáns NKT (CD3+ 6b11+) sejtek száma, míg az aktivált CD4+ sejtek, a myeloid dendritikus sejtek és a toll-like receptor (TLR) 2 és 4 positive DC-ek növekedése volt észlelhető. Az antigén prezentáló sejtek (APC) TLR-2 és 4 expresszióját szintén emelkedetnek találtuk a frissen diagnosztizált coeliákiásokban az egészségesekhez képest. Érdekes módon, a veleszületett immunitás sejtes elemeinek eltérései a diétázó coeliákiásokban is megmaradtak, egyedül az APC-k TLR-4 expressziója normalizálódott.

Crohn betegek perifériás vérében is elemeztük a lymphocyta szubpopulációk megoszlását. CD beteg gyermekben az adaptív immunitás sejtes elemei közül az aktivált (CD4+CD25+) sejtek prevalenciája magasabb volt. Ezzel együtt a Th1 elkötelezett sejtek (CD4+CXCR3+) aránya csökkent, és így a Th1/Th2 arány Th2 irányban eltolódott a terápiában még nem részesült beteg gyermekekben. Az effektor vagy memória sejtek (CD4 +CD45RO+) prevalenciája megnőtt, és a naív/memória sejtek aránya a memória sejtek irányába toldódott. A Treg sejtek (CD4 +CD25hiFoxP3+) prevalenciája ugyanakkor nem különbözött a két csoport között. Jelentős különbségeket találtunk viszont a veleszületett immunitás fenotípusában. Az NK (CD3 -CD161+) és NKT (CD3 + 6b11+) sejtek prevalenciája alacsonyabb volt a terápiában még nem részesült CD-s gyermekekben, mint a kontrollokban. A dendritikus sejtek (DC) és monocita sejtek aránya szintén különbözött a két csoport között. A DC (Lin1-HLADR+) és ezen belül az mDC-k (CD11c +) prevalenciája magasabb volt, míg a pDC-k (CD123+) prevalenciája alacsonyabb friss beteg gyermekekben az egészségesekhez képest.
A hagyományos terápiára nem reagáló Crohn beteg gyermekekben az adaptív és veleszületett immunitás elemei normalizálódnak az IFX kezelés hatására. Az IFX kezelés ugyanakkor az adaptív immunitás elemei közül tovább fokozza az effektor limfociták, Th1 és Treg sejtek prevalenciáját.
Allergiás colitisben az aktivált CD4+CD25+ sejtek és a FoxP3+ regulátoros T-sejtek száma alacsonyabb volt mint a kontrollokban, ezek az eltérések azonban már nem voltak kimutathatóak az aminosav keverék tartalmú tápszerrel kezeltekben.

Teljes támogatás: 2.400.000,- Ft

THE ROLE OF INNATE IMMUNITY IN THE PATHOGENESIS OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASE AND COELIAC DISEASE, WITH SPECIAL CONSIDERATION TO THE EFFECT OF TOLL RECEPTORS, PPARγ EXPRESSION AND THE PROPORTION OF REGULATORY T-CELLS

Arató András, Veres Gábor, Körner Anna
Semmelweis Egyetem I.Sz.Gyermekklinika

In our previous studies it was proved that changed expression of toll-like receptors (TLR) is observed in the intestinal mucosa of patients with immunomediated intestinal disorders, as in coeliac disease and inflammatory bowel disease. Our aim was to recognize how the TLR expressions influence the levels of such factors which may have a role in the defense of integrity of intestinal mucosa and the inhibition of apoptosis The heat shock protein 72 (HSP 72) chaperon is a ligand of TLR, which is able to defend the integrity of epithelial barrier and it has also an antiapoptopic effect.

The HSP 72 mRNA and protein expression were increased in the small intestinal mucosa of both 16 untreated and 10 treated coeliac children compared to controls, but in children with gluten free diet the mRNA and protein levels were lower than in untreated patients. We assume that the increased HSP72 expression help to alleviate the symptoms caused by gluten toxicity. The expression of hypoxia induced factor 1alfa (HIF-1alfa) and trefoil faktor 1 (TFF1) were also examined in these patients and the values were compared to those of controls. HIF-1alfa and TFF1 mRNA and HIF-1alfa protein protein expression were increased in the duodenal mucosa of treated and untreated coeliac children compared to the controls. These results indicate that HIF-1alfa expression take part in the signalization pathway of innate immunity and may contribute to the pathogenesis of coeliac disease.

Peroxisome proliferators-activated receptor-gamma (PPARγ) is a nuclear factor and a key down regulating factor of intestinal inflammation by decreaseing the mucosal production of inflammatory cytokines and repression the activities of other activated transcription factors. We tested the expression and localization of PPARγ in the duodenal mucosa of children with newly diagnosed coeliac disease (CD), on gluten-free diet (GFD) and compared to those from healthy children. The mRNA expression of PPARγ was determined by RT-PCR, the protein level of PPARγ by Western blot analysis and the localization by immunofluorescent staining. The protein level of PPARγ in the duodenal mucosa of children with newly diagnosed CD was decreased compared to patient on GFD, but showed only a slight decline compared to controls. The mRNA expression of PPARγ in patients with CD tended to be elevated compared to those on GFD, but did not differed from controls. Immunofluorescent staining revealed PPARγ to the epithelial surface and the lamina propria lymphocytes in duodenal mucosa of CD patients and controls. The decreased PPARγ protein level of untreated celiac patients may be a contributing factor to the increased inflammation and damage of the intestinal mucosa. The normal PPARγ mRNA expression indicates that the destruction of PPARγ protein is increased in untreated children, because on GFD even the slightly decreased mRNA expression is sufficient for normal PPARγ protein production.

The distribution of cells participating in innate and adaptive immunity were also studied int he peripheral blood of untreated and treated coeliac patients. In the peripheral blood of untreated coeliac children the numbers of Th1, NK (CD3-CD161+), NKT (CD3+ CD161+) and invariant NKT (CD3+ 6b11+) cells were decreased, while the number of activated CD4+ cells as well as the myeloid and TLR 2 and 4 positive dendritic cells were increased. The numbers of antigen presenting cells (APC) expressing TLR-2 and TLR4 were also expressed in freshly diagnosed coeliac children compared to controls.

Interestingly, the changes of cells belonging to innate immunity remained even in patients on GFD, only the normalization of APC expressing TLR4 was observed.

Teljes támogatás: 2.400.000,- Ft

The distribution of lympocyte subpopulations in the peripheral blood of patients with Crohn disease were analysed. Among the cellular elements of adaptive immunity the prevalence of activated cells (CD4+CD25+) were increased. Despite of this the ratio of Th1 committed cells decreased and so the Th1/Th2 ratio was skewed to Th2 direction in untreated children with Corhn disease. The prevalence of effector or memory cells (CD4 +CD45RO+) was increased and the ratio of naive and memory cells moved to the direction of memory cells. The prevalence of Treg cells (CD4 +CD25hiFoxP3+) was not different beween the two groups. We found significant difference of lymphocyte phenotypes of innate immunity. The prevalence of NK (CD3 -CD161+) and NKT (CD3 + 6b11+) cells were lower in untreated children with Crohn disease than in untreated ones and controls. The proportion of dendritic cells (DC) and monocytes was also different in the two groups of patients. The prevalence of DC (Lin1-HLADR+) and among them the myeloid DC (CD11c +) cells were higher, while the ratio of plasmocytic DC were lower in the untreated children compared to controls.

The numbers of cells belonging to both innate and adaptive immunity normalized in children with Crohn disease on infliximab treatment, even in those who did not react to the convential therapy, although the prevalence of Th1 and Treg cells were increased.

In allergic colitis, the number of activatedt CD4+CD25+ cells and FoxP3+ regulatory T-cells were lower compared to the controls, but these changes was not detected on treatment with formula containing amino acid mixture.

A depressziós fenotípus kialakulásában szerepet játszó pszichés, környezeti és genetikai tényezők közös vizsgálata

Bagdy György[1], Tóthfalusi László[1], Gonda Xénia[2], Molnár Eszter[1], Benkő Anita[1], Pap Dorottya[1], Lazáry Judit[2]
[1]Semmelweis Egyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Gyógyszerhatástani Intézet, Budapest
[2]Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Klinikai és Kutatási Mentálhigiénés Osztály, Kútvölgyi Klinikai Tömb, Budapest

Kutatásaink fő célja volt, hogy felmérjük és minél több lehetséges rizikófaktor figyelembe vételével vizsgáljuk a magyar átlagpopuláció depresszióra való vulnerabilitását. Ennek érdekében vizsgáltuk a már kialakult, illetve a még nem diagnosztikus (szubklinikus) depressziót, genetikai markereket, sokrétű környezeti rizikófaktorokat és a pszichés immunrendszer szerepét, valamint ezen összetevők egymáshoz való, illetve depresszióhoz való viszonyát.

Ehhez több, mint ezer magyar önkéntestől gyűjtöttük genetikai mintát és vettünk fel pszichológiai kérdőíveket, melyek többek között a depresszióra, szorongásra, személyiségvonásokra, pszichológiai immunkompetenciára, temperamentumra, felnőtt- és gyermekkori életeseményekre és háttér információkra (nem, kor, iskolázottság stb.) kérdeztek rá. Számos kulcsfontosságú gén polimorfizmusait meghatároztuk, melynek során a polimorfizmusok kiválasztásához Haplotype tagging módszert alkalmaztunk, ami a génben található haploblokkok számától függően génenként 1-10 polimorfizmust jelent.

Ismert jelenség, hogy a korai és jelenlegi negatív életesemények hajlamosíthatnak későbbi depressziós megbetegedésre. A súlyos- és gyerekkori életesemények, szociális támogatás, valamint a pszichológiai immunkompetencia (PIK), mint lehetséges védőfaktor szerepét eddig főleg külön-külön vizsgálták a depresszió kialakulása szempontjából. Arra azonban, hogy ezek a faktorok együttesen hogyan befolyásolják egymást, illetve egymás hatását a depressziót kialakító hajlamra, kevesebb az irodalmi adat. A immunkompetencia a személyiség azon része, mely rendelkezik azzal a megküzdési forráskapacitással, ami a stressz hatások elviseléséhez szükséges. A PIK védő hatását három alrendszerén keresztül vizsgáltuk, melyek közül a mobilitás (önbecsülés, leleményesség, szociális forrásmobilizálás, szociális alkotóképesség, szociális monitorozás, empátia) csökkentette a gyerekkori és súlyos életesemények károsító hatását és az egyén depresszióra való fogékonyságát. Az önreguláló alrendszeren (impulzivitás kontroll, ingerlékenység kontroll, érzelmi kontroll, szinkronképesség, kitartás) keresztül csak a gyerekkori életesemények hatása csökken. A monitorozó megközelítő alrendszer (pozitív gondolkodás, növekedésérzés, koherencia érzés) önmagában nem segít a gyerekkor és súlyos életeseményekkel való megküzdésben. A pszichológiai immunkompetencia jelentősen különbözik egészséges és depressziós személyeknél, a gyerekkori és súlyos életesemények önmagukban is befolyásolják és az alskálákon keresztül is hatnak a depresszióra való fogékonyságra. Modellünk alapján a mobilitás alrendszer segíti elő leginkább a nehezített alkalmazkodási helyzet körülményeinek megváltoztathatóságát (Pap et al, 2010, 2011).

A hangulatzavarok egyik altípusa, a szezonális affektív zavar, melynek vizsgálatát genetikai faktorokkal összefüggésben részletesen vizsgáltuk. Leírtuk a magyarországi előfordulását (4,6%), meghatároztuk a téli és nyári depresszió arányát (3,7% és 0,9%), valamint az 5HTR2A receptor génnel való kapcsolatát, ami a téli depresszió patomechanizmusára és terápiájára vonatkozóan is új adatokat eredményezett (Molnár et al., 2010).

A szerencsejáték során megmutatkozó kockázatvállalás és az idegrendszerre jellemző, kizárólag ott előforduló, triptofán-hidroxiláz-2 gén különböző polimorfizmusai között szignifikáns összefüggést találtunk, eredményeinket haplotípus analízissel is megerősítettük (Juhasz et al, 2010).

A szerotonin-1A és 1B receptor gének befolyásoló szerepét mutattuk ki érzelmeket mutató arcfelismerés folyamatában. Bizonyos polimorfizmusok és negatív életesemények együttes jelenlétében változik az érzelmet kifejező arcokra adott válasz sebessége, melynek hátterében módosult információfeldolgozási folyamatok állnak (Mekli et al., 2011).

Érdekes gén-gén interakciós hatást írtunk le rumináció (önemésztés) hátterében. Eredményeink szerint a magas ruminációs pontszámot mutató személyeknél a CREB és KCNJ6 (a GIRK kálium csatorna alegység génje) gének bizonyos polimorfizmusai összefüggést mutatnak a rumináció, depresszióban, szkizofréniában vagy C-típusú személyiségzavarban gyakran előforduló vonásjellegű mutatójával (Lazary et al, 2011).

Tovább vizsgáltuk a szerotonin transzporter gén szerepét a depresszióban és szuicídumban. Eredményeink alapján az 5-HTTLPR s allélja bizonyos temperamentumokkal és személyiségvonásokkal (például neuroticizmus) interakcióban, rizikófaktort jelenthet a violens öngyilkosságra nézve (Gonda et al., 2010).

Összefüggést mutattunk ki az agresszió/hostilitás (ellenségeskedés) és az 5-HTTLPR genotípusai között, mely kapcsolat még robosztusabbá vált depresszió jelenlétében. Az s allél hordozása nem csak a depresszióra való hajlamot növeli, de depresszióban az agresszív/hostilis magatartás is jelentősen emelkedik, ami együttesen a violens öngyilkosság kockázatát növeli (Gonda et al., 2011).

A reménytelenség érzés jelentős indikátora mind a depressziónak, mind az öngyilkosságnak. A szerotonin szintézisében részt vevő TPH2 (triptofán hidroxiláz 2) gén polimorfizmusai nem közvetlenül a depressziót befolyásolták, hanem a reménytelenségérzésen keresztül módosították a depresszióra és az öngyilkos magatartásra való hajlamot (Lazary et al., 2012).

Összefoglaló tanulmányban vizsgáltuk az endokannabinoid szignalizációs útvonalak szorongásban és depresszióban játszott szerepét és kimutattuk, hogy a CB1 receptor antagonisták okozta mellékhatásokat leginkább a szerotonerg és endokannabinoid rendszer kölcsönhatása közvetíti. Eredményeink arra mutattak rá, hogy a CNR1 és az SLC6A4 gének segítségével azonosíthatjuk azokat a személyeket, akik számára a CB1 receptor antagonista kezelés nem okoz pszichiátriai mellékhatást, és ezzel elősegíthetjük a személyre szabott kezelésüket (Lazary et al., 2011).

Hivatkozások

1. Gonda X, Fountoulakis KN, Harro J, Pompili M, Akiskal HS, Bagdy G, Rihmer Z. Journal of Psychopharmacology 25:(7) pp:857-866. (2011) IF: 3.801
2. Gonda X. Fountoulakis KN, Csukly G, Bagdy G, Pap D, Molnár E, Laszik A, Lazary J, Sarosi A, Faludi G, Sasvari-Szekely M, Szekely A, Rihmer Z. J Affect Disord. 132(3) pp:432-7. (2011) IF: 3.740
3. Juhasz G, Downey D, Hinvest N, Thomas E, Chase D, Toth ZG, Lloyd-Williams K, Mekli K, Platt H, Payton A, Bagdy G, Elliott R, Deakin JF, Anderson IM. Neuropsychopharmacology. 35(5) pp:1109-19. (2010) IF: 6.685
4. Lazary J, Juhasz G, Anderson IM, Jacob CP, Nguyen TT, Lesch KP, Reif A, Deakin JF, Bagdy G. Eur Neuropsychopharmacol. 21(1) pp:63-70. (2011) IF: 4.201
5. Lazary J, Juhasz G, Hunyady L, Bagdy G. Trends Pharmacol Sci. 32(5) pp:270-80. (2011) IF: 11.050
6. Lazary J, Viczena V, Dome P, Chase D, Juhasz G, Bagdy G. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 36(1) pp:155-60. (2012) IF: 2.877
7. Mekli K, Payton A, Miyajima F, Platt H, Thomas E, Downey D, Lloyd-Williams K, Chase D, Toth Z G, Elliott R, Ollier W E, Anderson I M, Deakin J F W, Bagdy G, Juhasz G. Eur Neuropsychopharmacol. 21:(1) pp:129-139. (2011) IF: 4.201
8. Molnar E, Lazary J, Benko A, Gonda X, Pap D, Mekli K, Juhasz G, Kovacs G, Kurimay T, Rihmer Z, Bagdy G. Eur Neuropsychopharmacol. 20(9) pp:655-62. (2010) IF: 4.201
9. Pap D, Gonda X, Lazary J, Molnar M, Tothfalusi L, Bagdy Gy. European Neuropsychopharmacology 20: pp. S361-S362. (2010) 23rd Congress Meeting of European-College-of-Neuropsychopharmacology. AUG 28-SEP 01, 2010, Amsterdam, Netherlands, SU: Suppl. 3.
10. Pap D, Gonda X, Molnar E, Lazary J, Tothfalusi L, Bagdy Gy, Juhasz G. 2nd Int. Cong. on Neurobiology, Psychopharmacology & Treatment Guidance. NOV 24-27, 2011, Thessaloniki, Greece. Abstract: Book of abstract, pp. 175.

The role of psychological, environmental and genetic factors in the development of depressive phenotype

György Bagdy[1], László Tóthfalusi[1], Xénia Gonda[2], Eszter Molnár[1], Anita Benkő[1], Dorottya Pap[1], Judit Lazáry[2]

[1]Semmelweis Egyetem, Department of Pharmacodynamics, Faculty of Pharmacy, Budapest
[2]Semmelweis Egyetem, Department of Clinical and Theoretical Mental Health, Kutvolgyi Clinical Centre, Budapest

Our aim was to investigate the vulnerability to depression in the Hungarian population including several potential risk factors. Depression and subclinical depression, genetic markers, environmental risk factors and psychological immune system and their interactions were investigated.

More than thousand unrelated volunteers were included in the study. Volunteers supplied genetic sample and completed several psychological questionnaires including those for depression, anxiety, personality traits, provoking- and childhood life events and general background (gender, age, education ec.) as well. We assigned many important gene polymorphism using the Haplotype tagging method resulting 1-10 polymorphism per gene depending on the number of haploblocks.

It is well known that early and current adverse life events can sensitize people to susceptibility of depression. Threatening life events, childhood adverse events, social support and psychological immune competencies (PIC) have been investigated individually and reported to play an important role in the development of depression. However, less attention was paid to interactions, how these factors may influence each other, and their possible mediator role on the emergence of depressive symptoms. Immune competency is a part of personality that helps coping with stress. We investigated the protective attribute via the three subdivisions. One of them, the Mobilization-Creation-Executor System (self estimate, resilience, social monitoring, empathy, social creativity, social mobilisation, self efficiency) decreased the harmful effect of childhood and threatening life events and susceptibility to depression. Via the subdivision Self-control System (impulsivity control, inhibition of irritability, emotional control, synchronization, endurance) only the effect of early life events could be suppressed. We analyzed the possible interactions and mediating role between provoking and early life events, present social support and the psychological immune system and their role in susceptibility to depressive symptoms using structural equation modelling in a large population genetic sample. We found that childhood and provoking life events influence susceptibility to depressive symptoms both directly and also indirectly via the mediating effects of coping strategies and psychological immune competencies. Our results indicate that the Mobilization subdivision, including psychological immune competencies related to mobilizing and activating resources and execution, plays the mediating role between life events and emergence of depressive symptoms. Our results are relevant for the research of endophenotypes in genetic studies, and also in developing effective therapies in depression (Pap et al, 2010, 2011).

Seasonal affective disorder is a subtype fo mood disorders. We reported the incidence int he Hungarian population (4.6%), defined the rate of winter and summer depression (3.7% and 0.9%) and provided evidence for the role of the 5HTR2A gene in seasonality (Molnár et al., 2010).

We found significant interaction between risk-taking behaviour and the tryptophan hydroxylase-2 gene polymorphisms. We confirmed our achievements with haplotype analysis (Juhasz et al, 2010).

We detected the mediating role of serotonin-1A and 1B receptors in the process of face-emotions. Certain polymorphisms and negative life events may change the speed of response and information processing for fear faces. (Mekli et al, 2011).

A strong gene-gene interaction in rumination, a trait also associated with depression, schizophrenia, or cluster C personality, was described by us. In our sample, high rumination scores

were associated with interaction of certain polymorphisms of CREB and KCNJ6 genes. This interaction was present in an English and German sample as well (Lazary et al, 2011).

In further invesitgations we analysed the role of serotonin transporter gene in suicide. We found that s allele of 5-HTTLPR gene in interaction with certain temperaments and personality traits like neuroticism, can be a risk factors for suicide (Gonda et al., 2010).

We found an association between agression/hostility and 5-HTTLPR genoypes. This interaction became more robust in presence of depression. The s allele can increase the susceptibility for depression and in depression aggressive/hostyle attitude is frequent phenomenon enchancing the risk of violance suicide (Gonda et al., 2011).

Hopelessness is a important indicator for depression and suicide as well. We found that TPH2 gene, the gene o fan enzyme participating in serotonin synthesis, influence depressive and suicide attitude via hopelessness (Lazary et al., 2012).

We summarized the interactions of endocannabinoid and serotonergic signalling in pathways related to anxiety and depression. We identified this interaction as the most likely candidate that mediates the psychiatric side effects of CB1 receptor antagonist antiobesity drugs, and propose that polymorphisms in CNR1 and SLC6A4 could help to identify individuals who may benefit from treatment with CB1 receptor antagonist without psychiatric side effects. These findings could be used in Personalized Medicine (Lazary et al., 2011).

References

1. Gonda X, Fountoulakis KN, Harro J, Pompili M, Akiskal HS, Bagdy G, Rihmer Z. Journal of Psychopharmacology 25:(7) pp:857-866. (2011) IF: 3.801
2. Gonda X. Fountoulakis KN, Csukly G, Bagdy G, Pap D, Molnár E, Laszik A, Lazary J, Sarosi A, Faludi G, Sasvari-Szekely M, Szekely A, Rihmer Z. J Affect Disord. 132(3) pp:432-7. (2011) IF: 3.740
3. Juhasz G, Downey D, Hinvest N, Thomas E, Chase D, Toth ZG, Lloyd-Williams K, Mekli K, Platt H, Payton A, Bagdy G, Elliott R, Deakin JF, Anderson IM. Neuropsychopharmacology. 35(5) pp:1109-19. (2010) IF: 6.685
4. Lazary J, Juhasz G, Anderson IM, Jacob CP, Nguyen TT, Lesch KP, Reif A, Deakin JF, Bagdy G. Eur Neuropsychopharmacol. 21(1) pp:63-70. (2011) IF: 4.201
5. Lazary J, Juhasz G, Hunyady L, Bagdy G. Trends Pharmacol Sci. 32(5) pp:270-80. (2011) IF: 11.050
6. Lazary J, Viczena V, Dome P, Chase D, Juhasz G, Bagdy G. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 36(1) pp:155-60. (2012) IF: 2.877
7. Mekli K, Payton A, Miyajima F, Platt H, Thomas E, Downey D, Lloyd-Williams K, Chase D, Toth Z G, Elliott R, Ollier W E, Anderson I M, Deakin J F W, Bagdy G, Juhasz G. Eur Neuropsychopharmacol. 21:(1) pp:129-139. (2011) IF: 4.201
8. Molnar E, Lazary J, Benko A, Gonda X, Pap D, Mekli K, Juhasz G, Kovacs G, Kurimay T, Rihmer Z, Bagdy G. Eur Neuropsychopharmacol. 20(9) pp:655-62. (2010) IF: 4.201
9. Pap D, Gonda X, Lazary J, Molnar M, Tothfalusi L, Bagdy Gy. European Neuropsychopharmacology 20: pp. S361-S362. (2010) 23rd Congress Meeting of European-College-of-Neuropsychopharmacology. AUG 28-SEP 01, 2010, Amsterdam, Netherlands, SU: Suppl. 3.
10. Pap D, Gonda X, Molnar E, Lazary J, Tothfalusi L, Bagdy Gy, Juhasz G. 2nd Int. Cong. on Neurobiology, Psychopharmacology & Treatment Guidance. NOV 24-27, 2011, Thessaloniki, Greece. Abstract: Book of Abstract, pp. 175.

Teljes támogatás: 6.000.000,- Ft

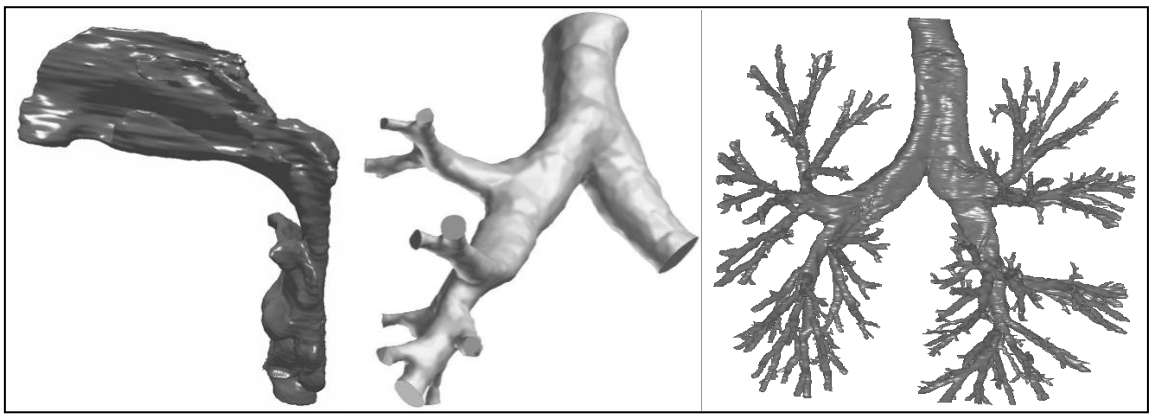
ÖSSZETETT NUMERIKUS MODELL A KÖRNYEZETI RADON ÉS SZÁRMAZÉKAI OKOZTA TÜDŐRÁK KOCKÁZATÁNAK BECSLÉSÉRE

Balásházy Imre, Farkas Árpád, Madas Balázs Gergely, Szőke István
MTA Energiatudományi Kutatóközpont Atomenergia-kutató Intézet

A nemzetközi statisztikák szerint a tüdőrákos esetek száma évről-évre magasabb. Hazánk tüdőrák-előfordulási gyakoriság értékei az egyik legmagasabbak a világon, de az Európai rákregiszterek alapján minden 10-18. európai ember is tüdőrákban hal meg. Az USA Környezetvédelmi Hivatala szerint a dohányzás után a radon a második leggyakoribb tüdőrákot előidéző tényező. Mivel a természetes háttérsugárzás meghatározó része a környezeti radontól származik, e terhelés gyakorlatilag a Föld minden emberét érinti. Mindazonáltal ezen ionizáló radioaktív sugárzások kis dózisainak biológiai hatása máig vitatott. Ennek egyik oka, hogy nem ismertek eléggé azok az elemi molekuláris-, sejt-, szövet- és szervszintű folyamatok amelyek a kóros elváltozásokhoz vezetnek. Ugyanakkor úgy tűnik, hogy a numerikus modellek hatékony eszközök lehetnek a radon okozta tüdőrák kockázatának becslésében. A növekvő számítógép-kapacitásoknak köszönhetően egyre pontosabban modellezhetők azok a fizikai és biokémiai folyamatok, amelyeknek kulcsszerepe lehet a rák kialakulásában.

Jelen pályázat célja egy olyan biofizikai mechanizmusokon alapuló, integrált modell kifejlesztése és alkalmazása volt, amely a környezeti radonszint ismeretében becsülni tudja a tüdőrák-keletkezés valószínűségét.

A pályázati munka három éven át, három munkaszakaszban folyt. Az első munkaszakasz keretében előállítottuk a légutak háromdimenziós számítógépes modelljét és e geometriában szimuláltuk a belélegzett radioaktív részecskék pályáit és légúti kiülepedését. A digitális légúti szegmenseket orvosi képalkotó eszközzel (CT) kapott rétegfelvételekből rekonstruáltuk kereskedelmi (3D-DOCTOR) és saját szoftverek segítségével. Néhány a fent említett technikával előállított légúti szegmenst az 1. ábra szemléltet.



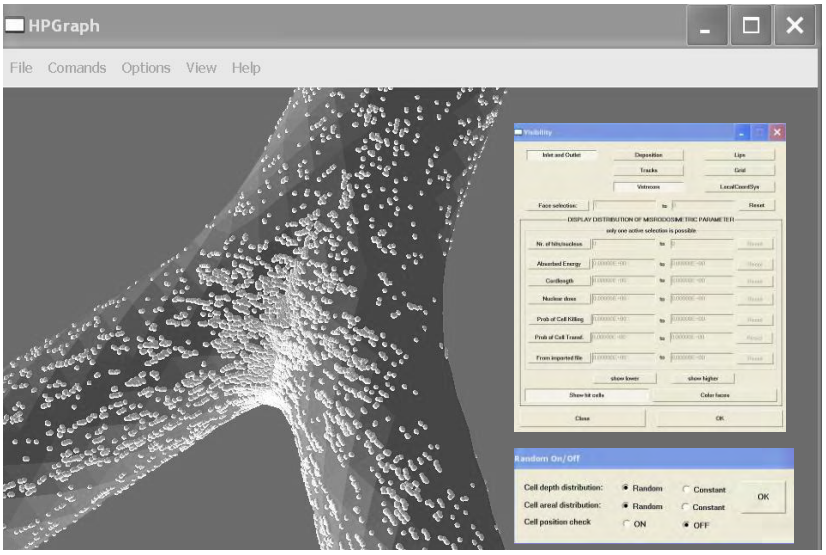
1. Ábra Légúti szegmensek háromdimenziós számítógépes modelljei.

A belélegzett radioizotópok követése numerikusan történt. Ehhez először modelleztük a légúti levegőáramlást, majd az áramlási térbe diszkrét részecskéket sorsoltunk és numerikus integrálással meghatároztuk ezek pályáit és légúti kiülepedési helyeit. Azt találtuk, hogy a légúti részecskekiülepedés erősen inhomogén, a kiülepedett részecskék jelentős része a légúti elágazások csúcsában található. Ez összecseng a szakirodalomban leírt azon megfigyeléssel, miszerint az uránbányászok esetében a tumorok kialakulási helye az elágazások központi részében volt. Érdemes megjegyezni, hogy a depozíció inhomogenitását a korábbi analitikus modellek képtelenek voltak kimutatni. Ezzel szemben, az általunk használt numerikus módszerrel nagypontossággal meghatározható a légúton belüli lokális (pl. sejtszintű) terhelés realisztikus térbeni eloszlása.

A második munkaszakaszban két részmodellt fejlesztettünk. Az első részmodell kifejlesztésére azért volt szükség, hogy az első részfeladatban meghatározott részecskekiülepedés eloszlásokból kiindulva meghatározhassuk az epitél sejteket ért sugárterhelést. E cél megvalósításának érdekében

első lépésként, szakirodalmi adatok alapján, megszerkesztettük a tüdőhám háromdimenziós sejtszerkezetének számítógépes modelljét. Ezt követően szimuláltuk a kiülepedett radon leányelemek által kibocsátott alfa részecskék pályáit és a sejteknek átadott energiát. Ezáltal olyan mikrodozimetriai paraméterek eloszlását tudtuk meghatározni, mint sejttalálati valószínűség, sejt- és sejtmagdózis. E paraméterek bemeneti adatként szerepeltek a második részmodell számára, mely különböző biológiai végpontokat (sejthalál, sejttranszformáció) és rákkeletkezési valószínűséget számol. E részmodell alapját biológiai kísérletek és epidemiológiai adatok képezték.

A harmadik munkaszakasz három részfeladatból állt. Az első részfeladat a részecske kiülepedési, mikrodozimetriai és rákkeletkezési modelleknek egy összetett tüdőrák-kockázat becslési modellbe történő integrálását jelentette. E komplex modell alkalmas a tüdőrák-kialakulási valószínűség becslésére adott környezeti radonexpozíciós szint (radonkoncentráció) esetében. A második részfeladat kapcsán a fenti modell matematikai algoritmusait beprogramoztuk. A szoftverfejlesztés Compaq Visual Fortran környezetben történt, így az alkalmazási felület felhasználóbarát. A 2. ábra egy pillanatfelvételt mutat a szóban forgó szoftver felhasználói felületéről.



2. Ábra A modellhez kapcsolódó szoftver felhasználói felülete

Az utolsó munkaszakasz harmadik részfeladata a modell validálását és a szoftver tesztelését foglalta magába. A modellt lakásnak és uránbányának megfelelő sugárexpozíciós körülményekre alkalmaztuk. A validációhoz irodalmi adatokat használtunk.

Összefoglalva, a pályázati munka eredményeként egy hatékony kockázatbecslő eszköz áll rendelkezésre. A kifejlesztett modell a környezeti radonszint ismeretében képes megadni a tüdőrák kialakulásának kockázatát. A projekt melléktermékeként létrejött egy az eddigieknél minőségileg jobb tüdődepozíciós modell is, melyet a radonproblémán túlmenően, más káros szennyezők hatásának tanulmányozására is felhasználhatunk, de sikeresen alkalmazható lesz aeroszol gyógyszerek légúti adminsztrációjának optimalizálására is.

[1] Szőke I, Farkas Á, Balásházy I, Hofmann W. RADIATION RESEARCH. 171**:** pp. 96-106 (2009) IF: 2.948
[2] Balásházy I, Farkas Á, Madas BG, Hofmann W. JOURNAL OF RADIOLOGICAL PROTECTION 29: pp. 147-162 (2009) IF: 1.054
[3] Farkas Á: NUKLEON 2**:** pp. 1-10 (2009)
[4] Madas BG, Balásházy I, Farkas Á, Szőke I. RADIATION PROTECTION DOSIMETRY 143: pp. 253-257 (2010) IF: 0.966
[5] Farkas Á, Hofmann W, Balásházy I, Szőke I, Madas BG, Moustafa M. RADIATION AND ENVIRONMENTAL BIOPHYSICS 50: pp. 281-297. (2011) IF: 2.040
[6] Madas BG, Balásházy I. RADIATION AND ENVIRONMENTAL BIOPHYSICS. 50: pp. 553-570 (2011) IF: 2.040

Budget: 6,000,000.- HUF

A COMPOSITE NUMERICAL MODEL FOR THE ASSESSMENT OF LUNG CANCER RISK ASSOCIATED WITH THE INHALATION OF RADON AND ITS PROGENIES

Imre Balásházy, Árpád Farkas, Balázs Gergely Madas, István Szőke
Institute for Atomic Energy Research, Centre for Energy Research, Hungarian Academy of Sciences

According to the statistics the number of lung cancer cases is continuously increasing. Hungary is one of the countries leading these statistics. Based on the national cancer registries every 10th – 18th European citizen dies in lung cancer. US EPA (Environmental Protection Agency) stated that radon is the second leading cause of lung cancer, after smoking. Radon is present in the environment and it is the responsible for more than the half of the natural radiation exposure. Practically every human being is involved in the radon problem. Although average radiation burden provided by radon falls in the low dose range, health consequences of these low doses of ionizing radiations are not fully understood to date. One of the causes of the controversies could be the lack of sufficient knowledge on the processes triggered by radiation. The underlying mechanisms of the taking place at the levels of molecules, cells, tissue, organs and organism can be studied in multiple ways. Due to the enhancing computer power numerical modeling seems to be a promising avenue.

The primary objective of this project was to develop and validate a biophysical mechanisms based complex model of radon induced lung cancer risk.

The three years long project consisted in three work packages. In the frame of the first work package three dimensional digital replicas of human airway segments have been reconstructed based on planar slices acquired by medical imaging techniques (CT). Figure 1 illustrates a few examples of such 3D airway geometries.

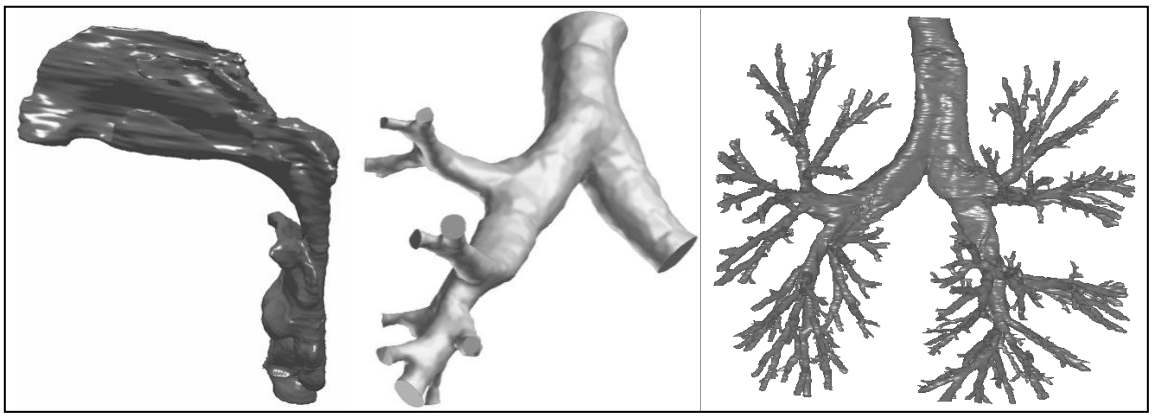


Figure 1 Digital upper- and thoracic airway geometries

Airflow fields have been modeled by numerical techniques. Tracking of the inhaled radon progenies has been performed by solving the force balance equation of the particles propelled by the airflow streams. In this way trajectories and deposition locations of individual particles could be determined. Our deposition simulations revealed that radioactive particles accumulate in the vicinity of the peak of the airway bifurcations. This finding is in line with the observation of pathologists, who reported that in the case of former uranium miners lung tumours were located predominantly at the bifurcation zones. It is worth noting that this preferential particle deposition could not be predicted by former analytical models. In contrast, our numerical models can predict the exact spatial distribution of radiation burden along the airways.

In the frame of the second work package two sub-models have been developed. The first one aims to determine the distribution of cellular burden induced by the alpha-particles emitted by the deposited radon daughters. In the frame of these efforts a three dimensional epithelium model has been built based on cell number- and depth-distribution data derived from the open literature. Alpha particle tracks have also been simulated. In this way energy deposition in individual cell nuclei and cells could be determined. Distributions of microdosimetric parameters, such as cellular doses and

alpha hits, have been computed. These parameters serve as inputs for the second sub-model, which predicts different biological endpoints (cell death, cell transformation) and lung cancer probability. This sub-model is based on the results of several cell biology experiments and epidemiological data retrieved in the literature.

The third work package contained three tasks. The first one consisted in the integration of above mentioned lung deposition, microdosimetric and cancer formation models into a composite risk assessment model. The model is able to predict the probability of lung cancer if the radiation exposure level is known. The first task referred to the development of software based on the algorithms of the complex risk model. Programming has been performed in the Compaq Visual Fortran environment. Figure 2 presents a screenshot of the graphical interface of the user friendly software.

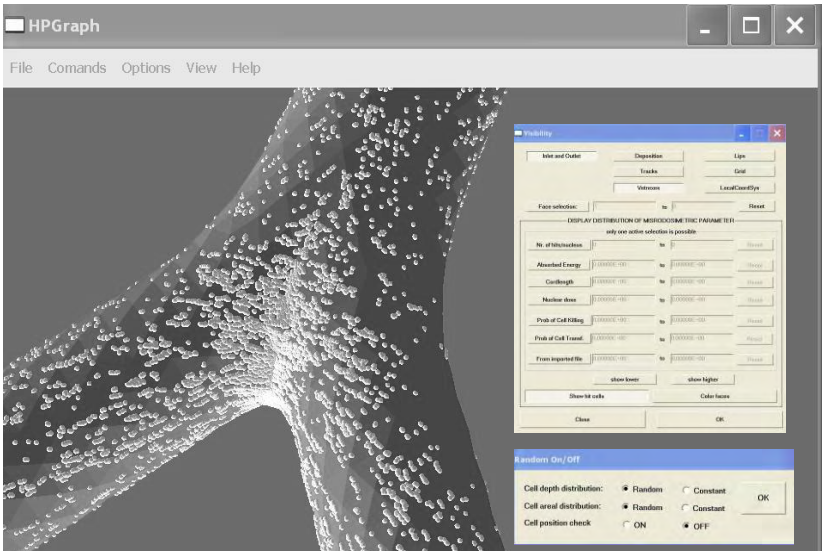


Figure 2 Graphical interface of the software related to the developed risk model

The objective of the third task of the last work package was to validate the risk model and to test the related software. The model has been applied for radiation exposure conditions characteristic of homes and uranium mines.

In conclusion, a biophysical mechanisms based lung cancer risk model has been developed. The model quantifies the risks associated with radon inhalation. As a byproduct of the project a qualitatively better lung deposition model is available for the assessment of health effects of not only radio-aerosols but also environmental pollutants, bioaerosols and even therapeutic aerosols.

[1] Szőke I, Farkas Á, Balásházy I, Hofmann W. RADIATION RESEARCH. 171**:** pp. 96-106 (2009) IF: 2.948

[2] Balásházy I, Farkas Á, Madas BG, Hofmann W. JOURNAL OF RADIOLOGICAL PROTECTION 29: pp. 147-162 (2009) IF: 1.054

[3] Farkas Á: NUKLEON 2**:** pp. 1-10 (2009)

[4] Madas BG, Balásházy I, Farkas Á, Szőke I. RADIATION PROTECTION DOSIMETRY 143: pp. 253-257 (2010) IF: 0.966

[5] Farkas Á, Hofmann W, Balásházy I, Szőke I, Madas BG, Moustafa M. RADIATION AND ENVIRONMENTAL BIOPHYSICS 50: pp. 281-297. (2011) IF: 2.040

[6] Madas BG, Balásházy I. RADIATION AND ENVIRONMENTAL BIOPHYSICS. 50: pp. 553-570 (2011) IF: 2.040

2 cm

Budget: 1,000,000.- HUF

GÉNPOLIMORFIZMUSOK SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA KIEMELT NÉPEGÉSZSÉGÜGYI JELENTŐSÉGŰ BETEGSÉGEKBEN; ANYAGCSERE- ÉS DAGANATOS BETEGSÉGEK

Margit Balázs[1], Szilvia Fiatal[1], Szilvia Ecsedi[1], Laura Vízkeleti[1], Réka Tóth[1], Ágnes Bégány[2], Róza Ádány[1]
[1]DE OEC Népegészségügyi Kar Megelőző Orvostani Intézet, [2]DE OEC Bőrgyógyászati Klinika

Célunk a legnagyobb halálozási és betegségterhet jelentő népbetegségek közül az anyagcsere és daganatos betegségekre hajlamosító génvariánsok és genetikai eltérések vizsgálata volt. Az anyagcsere betegségek közül a 2-es típusú diabetes (DM) mellitusra hajlamosító génvariánsokat, a daganatos betegségekben a normál genomban a közelmúltban felfedezett kópiaszám variánsok (CNVs) közül a daganatok kialakulásában és progressziójában szerepet játszó eltéréseket vizsgáltuk.
A 2-es típusú DM genetikai fogékonyságot vizsgáló szakirodalom alapján vizsgálataink az alábbi génpolimorfizmusok tanulmányozására irányultak: PPARγ Pro12Ala, KCNJ11 E23K és TCF7L2 rs7903146. Összefüggés elemzéseket (eset-kontroll) végeztünk, elemeztük, hogy a magyar populációban az irodalmi adatok alapján azonosított rizikóallélok a 2-es típusú DM-el milyen kapcsolatba hozhatók. A PPARγ Pro12Ala génváltozatra fókuszálva meghatároztuk a különböző genotípusok előfordulását, valamint a vad és mutáns allélok gyakoriságát a magyar populációt reprezentáló referencia és betegcsoportban. A vizsgálatban 1783 referencia és 1300 beteg genotípus analízise valósult meg real-time PCR-al. A betegség és a genotípusok közötti kapcsolat elemzéséhez kialakított eset referencia vizsgálati elrendezés során a beteg csoportba az IDF kritériumrendszere alapján 2-es típusú cukorbetegséggel rendelkezőket soroltuk, kontrollként azokat választottuk, akik szénhidrát anyagcserezavarban nem szenvedtek. A genotípus-megoszlás alapján számított magyar lakosságra jellemző allélfrekvencia: vad (Pro): 0,87, mutáns (Ala): 0,13. Eredményeink összhangban vannak a korábban kaukázusi populáción elvégzett vizsgálatok eredményeivel.
Nagyfelbontású array CGH-el vizsgáltuk különböző klinikai tulajdonságú, primer melanomák genom eltéréseit. Az array CGH platform 72 ezer DNS próbát tartalmazott lefedve a teljes (kódoló és nem kódoló) genomot. Analízisünk során a 7q11 és a 9q13 lokuszokon azonosítottunk olyan, több száz kb méretű régiót, melyeken az egészséges populációra is jellemző, rövidebb szekvenciákat átfogó gén CNV mutatható ki. Megállapítottuk, hogy a kedvezőtlen biológiai paraméterekkel jellemezhető mintákban előforduló géntöbbletek nagyobb méretű szekvenciákat érintenek, ugyanakkor a deléciók eloszlása több kódoló génre terjed ki és génexpressziós változásokkal is összefüggésbe hozhatók. Prognosztikai szempontból kiemelkedőek azok a „genomi forrópontok", melyeken nemcsak markáns kópiaszám különbség látható a különböző prognózisú minták között, de szignifikáns korreláció is fennáll a kópiaszám és a génexpresszió között. A 6-os és a 10-es kromoszómán azonosítottunk összesen 6 olyan kódoló szakaszt, melyeknél az ulcerációval társuló deléciók statisztikailag összefüggést mutatattak csökkent génexpresszióval. Az itt kódolt gének közül 10 (ELOV24, ME1, TPBG, AIM1, TPD52L1, IL20RA, HEPB2, PERP, UTRN, ADLIM1) alulműködését figyeltük meg. A gének eltérő biológiai funkciói közül fontos kiemelni, hogy 4 (TPBG, PERP, URTN, ADLIM1) az adhézióban, 2 (PERP, TPD52L1) az apoptózisban játszik szerepet. Fontos, hogy a 10q25-ön eddig egyetlen genomi forrópontot (PTEN) azonosítottak, eredményeink alapján azonban az adhézióban fontos szerepet betöltő ABLIM1 gén (10q25) deléciója is jelentős szerepet játszik a melanoma agresszív biológiai viselkedésében.

Lázár V, Ecsedi Sz, Szöllősi AG, Tóth R, Vízkeleti L, Rákosy Z, Bégány A, Adány R, Balázs M: MODERN PATHOLOLOGY 22(10): pp. 1367-1378 (2009) IF: 4,678

Balázs M, Ecsedi S, Vízkeleti L, Bégány Á: in BREAKTHROUGHS IN MELANOMA RESEARCH, ed. Yohei Tanaka Open Access Publisher pp. 237-263 (2011)

Vízkeleti L, Ecsedi Sz, Rákosy Zs, Bégány Á, Emri G, Tóth R, Orosz A., Szöllősi AG, Méhes G, Ádány R, Balázs M: FRONTIERS IN BIOSCIENCE E4, 1802-1812. 2012. IF: 4,048

2 cm

2 cm

2 cm

Budget: 1,000,000.- HUF

INVESTIGATION OF THE ROLE OF GENE POLYMORPHISMS IN DISEASES OF HIGH PUBLIC HEALTH IMPORTANCE; METABOLIC DISEASES AND CANCER

Flórián Péter[1], Frigyes Sándor[1], Barnabás István[2]
[1]Department of Internal Medicine, University of Szeged; [2]Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Semmelweis University

Our aim was to investigate the effect of the main polymorphisms and genetic alterations on metabolic and neoplastic diseases with high public health importance. Among metabolic diseases the genetic polymorphisms affecting the risk of Type II Diabetes Mellitus (DM) were in the focus of our study; concerning the neoplastic diseases we investigated the newly described copy number changes (CNVs) which play role in tumor initialization and progression.
According to the literature on Type II Diabetes we studied the following polymorphisms: PPARγ Pro12Ala, KCNJ11 E23K and TCF7L2 rs7903146. In a case-control setting we performed an association analysis to describe the effect of these polymorphisms on DM in the Hungarian population. For PPARγ Pro12Ala we genotyped 1300 patients with- and 1783 patients without DM using real-time PCR to assess the genotype and allele frequencies in control and case groups. We used a case-reference setting to analyze the association between the disease and the genotype. In this setting the case group contained patients with DM according the IDF criteria while the reference group contained patients without a disorder of carbohydrate metabolism. According to our study the allele frequencies in the Hungarian general population were 0.87 (wild type, Pro) and 0.13 (mutant type, Ala). Our results are in concordance with previous studies conducted among Caucasians.
Using high resolution array CGH platform we analyzed genomic alterations of primary melanomas with different clinical characteristics. The array CGH platform contained 72 000 DNA probes covering the entire human genome. We identified large -few hundred kilobase size- loci containing gene copy number variations that are also characteristic for the healthy population. Based on our array CGH data we observed that gene applications usually cover large DNA sequences and are more frequent in samples with unfavorable clinical parameters. On the other hand, we noticed that the distribution of deletions is frequently present in the coding regions of genes and associated with gene expression changes. From prognostic point of view, those „genomic hotspots" are the most prominent ones which contain not only marked copy number variations but also show significant correlation between copy number alterations and gene expression changes. We identified 6 coding regions on chromosomes 6 and 10 on which the ulceration was associated with deletions and was statistically correlated with down-regulation. Ten genes that were coded at these two chromosomes (ELOV24, ME1, TPBG, AIM1, TPD52L1, IL20RA, HEPB2, PERP, UTRN, ADLIM1) were downregulated. It is important to note, out the different biological function of the genes four (TPBG, PERP, URTN, ADLIM1) are involved in the adhesion and two genes (PERP, TPD52L1) are involved in apoptosis. More importantly, there was only one „genetic hotspot" published on 10q25 till now, however we found deletion of the adhesion related ABLIM1 gene, located at the same sequence, which plays an important role the aggressive behavior of malignant melanoma.

Lázár V, Ecsedi Sz, Szöllősi AG, Tóth R, Vízkeleti L, Rákosy Z, Bégány A, Adány R, Balázs M: MODERN PATHOLOLOGY 22(10): pp. 1367-1378 (2009) IF: 4,678

Balázs M, Ecsedi S, Vízkeleti L, Bégány Á: in BREAKTHROUGHS IN MELANOMA RESEARCH, ed. Yohei Tanaka Open Access Publisher pp. 237-263 (2011)

Vízkeleti L, Ecsedi Sz, Rákosy Zs, Bégány Á, Emri G, Tóth R, Orosz A., Szöllősi AG, Méhes G, Ádány R, Balázs M: FRONTIERS IN BIOSCIENCE E4, pp. 1802-1812 (2012) IF: 4,048

2 cm

2 cm

Teljes támogatás: 3.600.000,- Ft

FEHÉRJÉK KIFEJEZŐDÉSÉNEK EX VIVO VIZSGÁLATA RHEUMATOID ARTHRITISES, SPONDYLOARTHROPATHIÁS ÉS ARTHROSISOS BETEGEK SYNOVIUMÁN KISTELJESÍTMÉNYŰ SOFT LASER KEZELÉS HATÁSÁRA

Bálint Géza[1], Bakos József[2], Barabás Klára [1,3], Szekanecz Zoltán[4]
[1]Országos Reumatológiai és Fizioterápiás Intézet, [2]Országos „Frédéric Joliot-Curie" Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi Kutató Intézet, [1]Országos Reumatológiai és Fizioterápiás Intézet, [3]Budavári Önkormányzat Szakrendelő Intézet, [4]DEOEC Belgyógyászati Intézet Reumatológiai Tanszék

A kisteljesítményű soft-laser terápiát közel 30 éve alkalmazzák nem invazív kezelésként a mozgásszervi megbetegedések kezelésében. Korábbi vizsgálatainkban kimutattuk, hogy a rheumatoid arthritises (RA) synovium fehérje expressziója befolyásolható a szövet ex vivo lézerbesugárzásával. A kutatás célja annak megállapítása volt, hogy a kisteljesítményű infravörös lézer besugárzással mely fehérjék kifejeződése befolyásolható szignifikáns mértékben rheumatoid arthritises (RA), spondylarthropathiás és arthrosisos (OA) betegek térdízületi synoviumában ex vivo. A vizsgálatok a legkorszerűbb proteomikai és fehérje azonosító módszerekkel töténtek. Mivel a spondylarthropathiás betegekből származó műtéti anyaghoz nem sikerült kellő számban hozzájutnunk, ezért vizsgálataink nem terjedhettek ki erre a betegségre.
A kísérletek során 12 db műtétből származó synovialis membrán minta került feldolgozásra. Ebből 6 db rheumatoid arthritis, 6 db arthrosis diagnózissal műtött betegtől származott. A minták egyik felét 25 J/cm^2 energiájú közeli infravörös lézersugárzással kezeltük in vitro, másik felét kontrollként kezeletlenül hagytuk. A kezelt és kezeletlen mintákat 21 órás inkubálást követően -80 ºC-on lefagyasztottuk a további feldolgozásig. Ezután megtörtént a minták fehérjetartalmának kivonása és a lézerrel kezelt, ill. a kezeletlen kontroll minták fehérje tartalmának 2-dimenziós differenciál gél-elektroforézissel (2DIGE) történő szétválasztása. A gélek kiértékelésekor kapott eredményeink alapján gélenként mintegy 400 fehérjét sikerült elválasztani a 2DIGE módszerrel. A kezelt és kezeletlen kontroll mintákban szignifikánsan eltérő mennyiségben kimutatott fehérjék azonosítása tömegspektrometriás módszerrel történt.
Az OA-s betegek esetében a kezelt és kezeletlen kontroll mintákból 2DIGE módszerrel szétválasztott közel 400 fehérje közül 11 esetében találtunk szignifikánsan eltérő különbséget a kifejeződésben. Ezek a következők voltak: A közeli infravörös lézerkezelés hatására egyedül a mitochondrial heat shock 60kD protein 1 mutatott jelentős emelkedést ($p<0.05$) a kontroll mintákhoz képest három beteg esetében. Hat beteg esetében az Alpha tubulin és a TUBA1C protein (tubulin alpha-1C); öt betegnél a type VI collagen alpha 2 chain precursor; négy betegnél az annexin A5; három betegnél a calpain, small subunit 1, tubulin beta 2 és a vimentin variant 3; míg két betegnél a cofilin 1 (non-muscle) és a transgelin fehérje kifejeződése csökkent szignifikánsan ($p<0.05$). Az arthrosisos betegek synoviális membránjának dióda lézerrel történő egyszeri besugárzása hatására a porc destrukcióval korreláló calpain és annexin 5 fehérjék expressziója szignifikánsan csökkent. Vizsgálatunk során egyetlen fehérje: a mitokondriális hősokkfehérje (1 típus, 60kD) emelkedését találtuk szignifikánsnak, mely az OA-s synoviális membrán illetve a porcállomány anabolikus folyamatait kedvezően befolyásolhatja.
Az RA-s betegek esetében: Öt betegnél a mimecan; két betegnél a haptoglobin fehérjék kifejeződése emelkedett szignifikánsan a kontrollhoz képest. Négy betegnél az actin cytoplasmic 2; három-három betegnél a heat shock protein beta-1, glutathione S-transferase P, apolipoprotein A-I, peroxiredoxin-2; kettő-kettő betegnél az alpha-enolase isoform, vimentin, annexin A1, actin-related protein 1 isoformja, galectin-1 szignifikánsan csökkent mértékben expresszálódott a lézerkezelés után. A proteomikai segítségével az autoantigének (vimentin, α-enolase) identifikálhatók RA-s betegek synoviális membránjában. Mérföldkőként értékeljük, hogy a kandidáns autoantigének mennyisége szignifikánsan csökkent a klinikumban is alkalmazott, diódalézerrel történő egyszeri besugárzás hatására.

Teljes támogatás: 3.600.000,- Ft

Munkacsoportunk először vizsgálta kisteljesítményű soft lézer besugárzás ex vivo hatását RA-s és OA-s betegek synoviális membránjából származó szövetmintákon. Az eredményekből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a kisteljesítményű közeli infravörös lézersugárzás ex vivo körülmények között is képes a synovialis membránban megváltoztatni egyes fehérjék kifejeződését. A fentiek alapján úgy gondoljuk, újabb bizonyítékot nyertünk az eddigi, kevéssé tisztázott hatásmechanizmusú soft-laser kezelés molekuláris biológiai hátterét illetően.

Közlemények:

1./ Bálint G, Barabás K, Zeitler Zs, Bakos J, Pethes Á, Nagy E, Böröcz I, Lakatos T, Kékesi A K, Tanos E, Horváth J, Gáspár L: Lézerkezelés hatása a citoszolfehérjék expressziójára rheumatoid arthritises synoviumban. IMMUNOLÓGIAI SZEMLE 1: pp. 21-27 (2009).

2./ Bálint G, Barabás K, Zeitler Zs, Bakos J, Kékesi A K, Pethes Á, Nagy E, Lakatos T, Bálint P V, Szekanecz Z: Ex Vivo Soft-Laser Treatment Inhibits the Synovial Expression of Vimentin and α-Enolase, Potential Autoantigens in Rheumatoid Arthritis. PHYSICAL THERAPY, 91: pp. 665-674 (2011) IF: 2.645

3./ Barabás K, Zeitler Zs, Bakos J, Bálint G, Pethes Á, Nagy E, Lakatos T, Böröcz I, Kékesi A K, Tanos E, Horváth J, Szekanecz Z: Lézerkezelés hatása a citoszol fehérjék kifejeződésére osteoarthritises synoviumban. IMMUNOLÓGIAI SZEMLE 2012. (in press)

4./ K Barabás, Z Zeitler, J bakos, G Bálint, Á Pethes, E Nagy, T Lakatos, I Böröcz, AK Kékesi, E Tanos, J Horváth, Z Szekanecz.: Effect of laser treatment on the expression of cytosolic proteins in the synovium of petients with osteoarthritis. (Közlésre előkészítve)

Könyvek: 0

Kongresszusi előadás:

1./ Géza Bálint, Klára Barabás, Zsuzsanna Zeitler, József Bakos, Ákos Pethes, Erzsébet Nagy, Ervin Tanos, Zoltán Szekanecz: The effect of ex vivo low level laser irradiation of rheumatoid synovium on expression of synovial membrane cytosolic proteins. EULAR Congress 2009, Copenhagen, Denmark, 10-13 June 2009

2./ Barabás Klára, Zeitler Zsuzsanna, Bakos József, Pethes Ákos, Nagy Erzsébet, Lakatos Tamás, Kékesi Adrienna Katalin, Tanos Ervin, Gáspár Lajos, Horváth József, Böröcz István, Bálint Géza: Dióda lézer in vitro hatása a rheumatoid arthritises synovium citoszol fehérjéire. XII. Magyar Osteológiai Kongresszus. Balatonfüred, 2011.06.01-04.

Poszter:

Bálint G, Barabás K, Zeitler Z, Bakos J, Pethes Á, Nagy E, Tanos E, Szekanecz Z.: The effect of ex vivo low level laser irradiation of rheumatoid synovium on synovial membrane citosol protein expression patterns. ARTHRITIS RHEUM. 61, (Suppl):S310. 2009 (American College of Rheumatology 2009 Scientific Meeting, Philadelphia).

Budget: 3.600,000.- HUF

EX VIVO STUDY OF THE EFFECT OF LOW LEVEL SOFT LASER TREATMENT ON PROTEIN EXPRESSION OF THE SYNOVIUM OF PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS, SPONDYLARTHROPATHIES AND OSTEOARTHRITIS

Géza Bálint[1], József Bakos[2], Klára Barabás [1,3], Zoltán Szekanecz[4]
[1]National Institute of Rheumatology and Physiotherapy, [2]National „Frédéric Joliot-Curie" Research Institute for Radiobiology and Radiohygiene, [1,3] Natl. Institute of Rheumatology and Physiotherapy, Outpatient Clinic of Budavári Local Government, [4]Division of Rheumatology, University of Debrecen Medical and Health Sciences Center (UDMHSC)

Low level laser therapy has been used for non-invasive treatment of different joint diseases in the last 30 years. In our earlier study it was found that ex vivo laser therapy could influence the protein expression of the synovium of a patient with rheumatoid arthritis (RA).
The aim of our research project was to study the effect of low level laser treatment on the expression of proteins of synovial samples taken from the knee joint of patients with rheumatoid arthritis (RA), spondylarthropathies and osteoarthritis (OA) with the methods of modern proteomics. Unfortunately surgically removed membrane samples from patients with spondylarthropathies were not available in sufficient number, therefore our study could not cover this desease.
Altogether 12 surgically removed samples were investigated: 6 were from patients with rheumatoid arthritis and 6 from patients with osteoarthritis. Halves of the samples were irradiated in vitro by near infared laser with radiant exposure of 25 J/cm^2. The other halves were treated in the same way - except the laser irradiation - and served as control samples. Following irradiation, samples were incubated in thermostat for 21 hours and were stored at -80 ºC until they were processed further. Thereafter the proteins of irradiated and control samples were extracted and separated by 2 dimensional differential gel electrophoresis (2DIGE). By 2DIGE nearly 400 proteins were separated on a gel. The proteins of different spots showing significant difference were identified by mass spectrometry.
We could to identify 11 proteins showing altered expression due to laser irradiation from 400 proteins which were separated on a gel by 2DIGE method. In three patients tissue samples demonstrated a significant increase ($p< 0.05$) in mitochondrial heat-shock proteins (type 1, 60 kD) due to near infrared laser irradiation compared to control samples. The expression of other proteins decreased: Alpha tubulin and TUBA1C protein (tubulin alpha-1C) in of six patients; type VI collagen alpha 2 chain precursor in five; annexin A5 in four; calpain 1 small subunit; tubulin α and β2; vimentine variant 3 in three; cofilin 1 and transgelin in two patients decreased significantly ($p<0.05$).
The single diode laser irradiation of the synovium of patients with osteoarthritis significantly decreased the expression of proteins calpain and annexin 5 correlating with joint destruction. In our study we found that the only protein showing statistically significant increase was mitochondrial heat-shock protein (type 1, 60 kD), which may beneficially influence the anabolic processes of the synovial membrane and also the cartilage in OA.
Laser irradiation of RA synovial membrane, with similar physical parameters used in our clinical practice resulted in an increase of mimecan in five patients and in the increase of haptoglobin in two patients. The expression of the following proteins was decreased after laser irradiation: actin cytoplasmic 2 in four patients; heat shock protein beta-1, glutathione S-transferase P, apolipoprotein A-I, peroxiredoxin-2 in three; Isoform alpha-enolase of alpha-enolase, vimentin, annexin A1, isoform 1 of actin-related protein, galectin-1 at two patients. The protein expression of α-enolase and vimentin decreased due to laser irradiation. These proteins have been considered as important autoantigens in their citrullinated form and drive autoimmunity in RA. Other differently expressed proteins may also be implicated in the pathogenesis of RA.
Our study was the first showing, that low level near infrared laser irradiation may alter the protein expression of synovial membrane in ex vivo conditions. Based on the above-described results, we

have provided more evidence the molecular effects of soft laser treatment of joint diseases, the mechanism of action of which is, still, less understood.

1./ Bálint G, Barabás K, Zeitler Zs, Bakos J, Pethes Á, Nagy E, Böröcz I, Lakatos T, Kékesi A K, Tanos E, Horváth J, Gáspár L: Lézerkezelés hatása a citoszolfehérjék expressziójára rheumatoid arthritises synoviumban. IMMUNOLÓGIAI SZEMLE 1: pp. 21-27 (2009).

2./ Bálint G, Barabás K, Zeitler Zs, Bakos J, Kékesi A K, Pethes Á, Nagy E, Lakatos T, Bálint P V, Szekanecz Z: Ex Vivo Soft-Laser Treatment Inhibits the Synovial Expression of Vimentin and α-Enolase, Potential Autoantigens in Rheumatoid Arthritis. PGYSICAL THERAPY, 91: pp. 665-674 (2011) IF: 2.645

3./ Barabás K, Zeitler Zs, Bakos J, Bálint G, Pethes Á, Nagy E, Lakatos T, Böröcz I, Kékesi A K, Tanos E, Horváth J, Szekanecz Z: Lézerkezelés hatása a citoszol fehérjék kifejeződésére osteoarthritises synoviumban. IMMUNOLÓGIAI SZEMLE 2012. (in press)

4./ K Barabás, Z Zeitler, J bakos, G Bálint, Á Pethes, E Nagy, T Lakatos, I Böröcz, AK Kékesi, E Tanos, J Horváth, Z Szekanecz.: Effect of laser treatment on the expression of cytosolic proteins in the synovium of petients with osteoarthritis. (Közlésre előkészítve)

Könyvek: 0

Kongresszusi előadás:

1./ Géza Bálint, Klára Barabás, Zsuzsanna Zeitler, József Bakos, Ákos Pethes, Erzsébet Nagy, Ervin Tanos, Zoltán Szekanecz: The effect of ex vivo low level laser irradiation of rheumatoid synovium on expression of synovial membrane cytosolic proteins. EULAR Congress 2009, Copenhagen, Denmark, 10-13 June 2009

2./ Barabás Klára, Zeitler Zsuzsanna, Bakos József, Pethes Ákos, Nagy Erzsébet, Lakatos Tamás, Kékesi Adrienna Katalin, Tanos Ervin, Gáspár Lajos, Horváth József, Böröcz István, Bálint Géza: Dióda lézer in vitro hatása a rheumatoid arthritises synovium citoszol fehérjéire. XII. Magyar Osteológiai Kongresszus. Balatonfüred, 2011.06.01-04.

Poszter:

Bálint G, Barabás K, Zeitler Z, Bakos J, Pethes Á, Nagy E, Tanos E, Szekanecz Z.: The effect of ex vivo low level laser irradiation of rheumatoid synovium on synovial membrane citosol protein expression patterns. ARTHRITIS RHEUM. 61, (Suppl):S310. 2009 (American College of Rheumatology 2009 Scientific Meeting, Philadelphia).

2 cm

Teljes támogatás: 4.500.000,- Ft

A KORASZÜLÖTTEK KRÓNIKUS UTÓBETEGSÉGEINEK VALÓBAN AZ OXIGÉNTOXICITÁS AZ EGYIK KÖZÖS RIZIKÓFAKTORA?

Balla György[1],
[1]DEOEC Gyermekgyógyászati Intézet, [2]

2 cm 2 cm

A hem az aerob élőlények nélkülözhetetlen molekulája. A ferri-hemoglobin elengedi a hemet, ami a sejtmembránokba ékelődnek. A reaktív oxigéngyökök felnyitják a hem gyűrűjét, szabad, redox-aktív vas szabadul fel, ami katalizálja a szabadgyökök képződését. Mindezek a metabolitok oxidálják a zsírokat, fehérjéket, nukleinsavakat; aktiválják a sejtek szabályzó útvonalait, az oxidáció-érzékeny, gyulladáskeltő transzkripciós faktorokat; proteinek képződését befolyásolják, károsítják a membrán-csatornákat; befolyásolják az apoptózist és a sejthalált. A hem-eredetű oxidánsok aztán a fehérvérsejteket, a vérlemezkéket és a vörösvértesteket az erek falához vonzzák; oxidálják az LDL-t; felhasználják a nitrogénmonoxidot (1). E grant támogatásával a hem-katalizálta oxigéntoxicitás és érbetegségek terén alapvető megfigyeléseket tettünk, melyek a koraszülöttek krónikus utóbetegségeiben központi pathophysiológiai szerepet játszanak. Kimutattuk, hogy a kénhidrogén közvetlen módon véd a hidrogén peroxid és a hem-mediálta endothelium károsodás ellen (2). Sőt, a kénhidrogén a foszfát-indukálta kalcifikációt, az ér-eredetű simaizomsejtek osteoblastos differenciáját hatékonyan gátolja (3). A hemoxigenáz-ferritin rendszer indukciója a kalcifikációt és osteoblast transzormációt szintén megelőzi (4). Ezen mineralizáció-gátlás, valamint a folyamatokat jelző, specifikus génexpressziók befolyása a ferritin nehézláncának ferrooxidáz aktivitásához köthető (5). Mindezek a jelenségek az érelmeszesedés pathomechanizmusában is megtalálhatók. Az előrehaladott érelmeszesedéses plakk belsejében prooxidáns állapotot bizonyítottunk, ahol a vörösvértestek szétesnek, a hemoglobin oxidálódik, a felszabadult hem és vas további lipidperoxidációt okoz (6). Mivel a szénmonoxid a hemoxigenáz enzim működésének egyék végterméke, megvizsgáltuk a placenta-vérkeringésre gyakorolt hatását (7). A vénás keringés szabályozásában bizonyítottuk a hisztamin és receptorának szerepét (8). A neonatális vasculáris pathologia helyét elemeztük újszülöttek sérvének, hydroceléjének kialakulásában (9), a tágult bélkacsok szegmentális működésében, ahol az nitrogénmonoxid szerepét követtük (10), valamint diaphragma hernia okozta bél-infarktus esetében (11).

2 cm 2 cm

1. Belcher JD, Beckman JD, Balla G, Balla J, Vercellotti G: ANTIOXID REDOX SIGNAL, 12: pp. 233-248 (2010) IF: 7.581
2. Jeney V, Komódi E, Nagy E, Zarjou A, Vercellotti GM, Eaton JW, Balla G, Balla J: FREE RADIC BIOL MED, 46: pp. 616-623 (2009) IF: 6,081
3. Zavaczki E, Jeney V, Agarwal A, Zarjou A, Oros M, Katkó M, Varga Z, Balla G, Balla J: KIDNEY INT, 80: pp. 731-739 (2011) IF: 6,105
4. Zarjou A, Jeney V, Arosio P, Poli M, Antal-Szalmás P, Agarwal A, Balla G, Balla J: J AM SOC NEPHROL, 20: pp. 1254-1263 (2009) IF: 7,689
5. Zarjou A, Jeney V, Arosio P, Poli M, Zavaczki E, Balla G, Balla J: J BONE MINER RES, 25: pp. 164-172 (2010) IF: 7,099
6. Nagy E, Eaton JW, Jeney V, Soares MP, Varga Z, Galajda Z, Szentmiklósi J, Méhes G, Csonka T, Smith A, Vercellotti GM, Balla G, Balla J: ARTERIOSCLER THROMB VASC BIOL, 30: pp. 1347-53 (2010) IF: 7,215
7. Ovári L, Aranyosi J, Balla G: ACTA PHYSIOL HUNG, 96: pp. 243-250 (2009) IF: 0,75
8. Galajda Z, Balla J, Szentmiklosi AJ, Biro T, Czifra G, Dobrosi N, Cseppento A, Patonay L, Roszer T, Balla G, Popescu LM, Lekli I, Tosaki A: J CELL MOL MED, 15: pp. 2614-2623 (2011) IF: 4,608
9. Józsa T, Telek A, Kutasy B, Benyó M, Csanádi G, Kovács I, Balla G, Flaskó T, Csernoch L, Kiss C: ASIAN J ANDROL, 11: pp. 741-745 (2009) IF: 1,688
10. Józsa T, Magyar A, Cserni T, Szentmiklósi AJ, Erdélyi K, Kincses Z, Rákóczy G, Balla G, Roszer T: J INVEST SURG, 22: pp. 292-300 (2009) IF: 1,035
11. Cserni T, Polonkai E, Torok O, Nagy A, Pataki I, Long AM, Cserni P, Orosz L, Balla G: J PEDIATR SURG, 46: pp. 551-553 (2011) IF: 1,308

2 cm

Budget: 4.500.000.- HUF

IS THE OXYGEN TOXICITY ONE OF THE COMMON RISK FACTORS OF THE LONG TERM COMPLICATIONS OF PREMATURE NEWBORNS?

György Balla[1],
[1]University of Debrecen Medical and Health Science Center Institute of Pediatrics, [2]

Heme is an essential molecule in aerobic organisms. Ferric hemoglobin readily releases free heme, which intercalates into cell membranes. Free radicals can split the heme ring and release "free" redox-active iron, which catalytically amplifies the production of reactive oxygen species. These oxidants can oxidize lipids, proteins, and DNA; activate cell-signaling pathways and oxidant-sensitive, proinflammatory transcription factors; alter protein expression; perturb membrane channels; and induce apoptosis and cell death. Heme-derived oxidants induce recruitment of leukocytes, platelets, and red blood cells to the vessel wall; oxidize low-density lipoproteins; and consume nitric oxide (1). By the support of this grant we made basic observations on the field of heme catalyzed oxygen toxicity and vascular diseases representing the central pathophysiological part of the chronic illnesses of premature newborns. We have shown that hydrogen sulfide can directly protect endothelium against hydrogen peroxide- and heme-mediated endothelial cytotoxicity (2). Moreover hydrogen sulfide is a potent inhibitor of phosphate-induced calcification and osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells (3). The induction of the heme oxygenase-ferritin system also prevents phophate-mediated calcification and osteoblastic differentiation of human smooth muscle cells (4). We proved that inhibition of osteoblastic activity, mineralization, and specific gene expression is attributed to the ferroxidase activity of ferritin (5). This phenomenon showed close parallelism to atherosclerosis. The interior of advanced atheromatous lesions is a prooxidant environment in which erythrocytes lyse, hemoglobin is oxidized to ferri- and ferrylhemoglobin, and released heme and iron promote further oxidation of lipids (6). Since carbon monoxide is one of the endproducts of heme oxygensae we studied its effect on placental blood flow (7). Histamine and histamin receptor function was analyzed in venous circulation, and their effects on venous return were proved (8). Neonatal vascular pathologies were demonstrated in groin hernia and communicating hydrocele (9), in dilated functional bowel segment with overproduction of nNOS (10) and in tight diaphragmatic defect with bowel infarction (11).

2 cm

2 cm

1. Belcher JD, Beckman JD, Balla G, Balla J, Vercellotti G: ANTIOXID REDOX SIGNAL, 12: pp. 233-248 (2010) IF: 7.581
2. Jeney V, Komódi E, Nagy E, Zarjou A, Vercellotti GM, Eaton JW, Balla G, Balla J: FREE RADIC BIOL MED, 46: pp. 616-623 (2009) IF: 6,081
3. Zavaczki E, Jeney V, Agarwal A, Zarjou A, Oros M, Katkó M, Varga Z, Balla G, Balla J: KIDNEY INT, 80: pp. 731-739 (2011) IF: 6,105
4. Zarjou A, Jeney V, Arosio P, Poli M, Antal-Szalmás P, Agarwal A, Balla G, Balla J: J AM SOC NEPHROL, 20: pp. 1254-1263 (2009) IF: 7,689
5. Zarjou A, Jeney V, Arosio P, Poli M, Zavaczki E, Balla G, Balla J: J BONE MINER RES, 25: pp. 164-172 (2010) IF: 7,099
6. Nagy E, Eaton JW, Jeney V, Soares MP, Varga Z, Galajda Z, Szentmiklósi J, Méhes G, Csonka T, Smith A, Vercellotti GM, Balla G, Balla J: ARTERIOSCLER THROMB VASC BIOL, 30: pp. 1347-53 (2010) IF: 7,215
7. Ovári L, Aranyosi J, Balla G: ACTA PHYSIOL HUNG, 96: pp. 243-250 (2009) IF: 0,75
8. Galajda Z, Balla J, Szentmiklosi AJ, Biro T, Czifra G, Dobrosi N, Cseppento A, Patonay L, Roszer T, Balla G, Popescu LM, Lekli I, Tosaki A: J CELL MOL MED, 15: pp. 2614-2623 (2011) IF: 4,608
9. Józsa T, Telek A, Kutasy B, Benyó M, Csanádi G, Kovács I, Balla G, Flaskó T, Csernoch L, Kiss C: ASIAN J ANDROL, 11: pp. 741-745 (2009) IF: 1,688
10. Józsa T, Magyar A, Cserni T, Szentmiklósi AJ, Erdélyi K, Kincses Z, Rákóczy G, Balla G, Roszer T: J INVEST SURG, 22: pp. 292-300 (2009) IF: 1,035
11. Cserni T, Polonkai E, Torok O, Nagy A, Pataki I, Long AM, Cserni P, Orosz L, Balla G: J PEDIATR SURG, 46: pp. 551-553 (2011) IF: 1,308

Teljes támogatás: 6.000.000,- Ft

REDOX SZABÁLYOZÁS AZ ENDOPLAZMÁS RETIKULUM LUMENÉBEN

Bánhegyi Gábor[1], Jemnitz Katalin[2], Veres Zsuzsa[2], Margittai Éva[1]
[1]Semmelweis Egyetem, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémia Intézet; [2]MTA Kémiai Kutatóközpont, Farmakobiokémiai Osztály

A pályázat keretében az endoplazmás retikulum (ER) lumenének három fő redox rendszerét (glutation, aszkorbinsav, piridin nukleotid) és a közöttük levő összefüggéseket tanulmányoztuk, valamint olyan gyógyszerek hatását vizsgáltuk a bilirubin-glukuronidok (BG) eliminációjára, amelyek klinikai alkalmazásuk során kolesztázist okoztak.

Megállapítottuk, hogy az ER lumen piridin nukleotidjainak redox állapota a tápláltsági állapottól függ, éhezésben oxidálódnak, míg szénhidrátok (pl. fruktóz) hatására redukálódnak. Feltételezzük, hogy az ER lumen piridin nukleotidjai, illetve a redox állapotukat elsősorban meghatározó hexóz-6-foszfát dehidrogenáz nutriens szenzorként működnek, és hatásukat egyrészt a prereceptoriális glukokortikoid aktiválás, másrészt a makroautofágia mechanizmusainak beindítása révén fejtik ki. Kimutattuk továbbá, hogy az oxidatív fehérjefolding melléktermékeként keletkező hidrogén-peroxid felhasználható további diszulfidhidak szintéziséhez. Eredményeink alapján több összefoglaló közleményt írtunk az ER redox rendszereiről, melyekben a kompartimentáció jelentőségét, illetve a redox rendszerek közötti kapcsolatokat, valamint azok hiányát emeltük ki.

A BG eliminációjára ható gyógyszerek kolesztatikus potenciálját aszerint rangsoroltuk, hogy milyen mértékben gátolták a multidrug resistance associated protein 2 and 3 (Mrp2 and Mrp3) transzportereket, amelyek kijuttatják a BG-okat a szinuszoidális, illetve a kanalikuláris térbe. Rifampicin, probenecid, indometacin és benzbromaron hatását vizsgáltuk primer patkány hepatocita szendvics kultúrában. Szendvics konfigurációban a sejtek visszanyerik in vivo jellemző morfológiájukat és vektoriális transzportáló képességüket. A BG kanalikuláris transzportját az összes vizsgált gyógyszer gátolta. A szinuszoidális transzportot azonban, nem egyformán befolyásolták. Rifampicin és probenecid jelenlétében a BG szinuszoidális transzportja megnőtt, aminek következtében a transzport eltolódott a szinuszoidális tér irányába. Ez jellegzetes kolesztatikus hatás, amely konjugált hiperbilirubineamia-ként jelentkezik. Ezzel együtt a bilirubin eliminációja nem csökken. Ezzel szemben az indometacin és benzbromaron gátolta a BG mindkét irányú effluxát, a teljes BG eliminációt és így a sejtben nőtt a bilirubin és BG koncentráció. A konjugált bilirubin aránya is csökkent. Ahogy ezt néhány esettanulmányban leírták, citotoxikus anyagok sejten belüli akkumulációja, mint amilyen a bilirubin is, májkárosodást okozhatnak.

Publikációk

Bánhegyi G, Csala M, Benedetti A. Hexose-6-phosphate dehydrogenase: linking endocrinology and metabolism in the endoplasmic reticulum. J Mol Endocrinol. 2009 Apr;42(4):283-9.

Bánhegyi G, Margittai E, Szarka A, Mandl J, Csala M. Crosstalk and barriers between the electron carriers of the endoplasmic reticulum. Antioxid Redox Signal.

Csala M, Kereszturi E, Mandl J, Bánhegyi G. The endoplasmic reticulum as the extracellular space inside the cell: role in protein folding and glycosylation. Antioxid Redox Signal.

Csala M, Margittai E, Bánhegyi G. Redox control of endoplasmic reticulum function. Antioxid Redox Signal. 2010 Jul 1;13(1):77-108.

Kereszturi É, Kálmán FS, Kardon T, Csala M, Bánhegyi G. Decreased prereceptorial glucocorticoid activating capacity in starvation due to an oxidative shift of pyridine nucleotides in the endoplasmic reticulum. FEBS Lett. 2010 Nov 19;584(22):4703-8.

Mandl J, Mészáros T, Bánhegyi G, Hunyady L, Csala M. Endoplasmic reticulum: nutrient sensor in physiology and pathology. Trends Endocrinol Metab. 2009 May;20(4):194-201.

Mandl J, Szarka A, Bánhegyi G. Vitamin C: update on physiology and pharmacology. Br J Pharmacol. 2009 Aug;157(7):1097-110.

Marcolongo P, Senesi S, Giunti R, Csala M, Fulceri R, Bánhegyi G, Benedetti A. Expression of hexose-6-phosphate dehydrogenase in rat tissues. J Steroid Biochem Mol Biol. 2011 126:57-64.

Margittai E, Bánhegyi G. Oxidative folding in the endoplasmic reticulum: towards a multiple oxidant hypothesis? FEBS Lett. 2010 Jul 16;584(14):2995-8.

Margittai E, Csala M, Mandl J, Bánhegyi G. Participation of low molecular weight electron carriers in oxidative protein folding. Int J Mol Sci. 2009 Mar;10(3):1346-59.

Nagy G, Szarka A, Lotz G, Dóczi J, Wunderlich L, Kiss A, Jemnitz K, Veres Z, Bánhegyi G, Schaff Z, Sümegi B, Mandl J. BGP-15 inhibits caspase-independent programmed cell death in acetaminophen-induced liver injury. Toxicol Appl Pharmacol. 2010 Feb 15;243(1):96-103.

Senesi S, Csala M, Marcolongo P, Fulceri R, Mandl J, Banhegyi G, Benedetti A. Hexose-6-phosphate dehydrogenase in the endoplasmic reticulum. Biol Chem. 2010 Jan;391(1):1-8.

Senesi S, Legeza B, Balázs Z, Csala M, Marcolongo P, Kereszturi E, Szelényi P., Egger C, Fulceri R, Mandl J, Giunti R, Odermatt A, Bánhegyi G, Benedetti A. Contribution of fructose-6-phosphate to glucocorticoid activation in the endoplasmic reticulum: possible implication in the metabolic syndrome. Endocrinology. 2010 Oct;151(10):4830-9.

Száraz P, Bánhegyi G, Benedetti A. Altered redox state of luminal pyridine nucleotides facilitates the sensitivity towards oxidative injury and leads to endoplasmic reticulum stress dependent autophagy in HepG2 cells. Int J Biochem Cell Biol. 2010 Jan;42(1):157-66.

Budget: 6,000,000.- HUF

REDOX REGULATION IN THE LUMEN OF THE ENDOPLASMIC RETICULUM

Gábor Bánhegyi[1], Katalin Jemnitz[2], Zsuzsa Veres[2], Éva Margittai[1]
[1]Semmelweis University, Department of Medical Chemistry, Molecular Biology and Pathobiochemistry; [2]HAS Chemical Research Center, Department of Biochemical Pharmacology

The three main redox systems (glutathione, ascorbate, pyridine nucleotides) of the endoplasmic reticulum (ER) and their connections, as well as the capacity of cholestasis-inducing drugs to interact with the elimination of bilirubin glucuronides (BG) were studied in the frame of the project.

We demonstrated that the redox state of ER pyridine nucleotides depends on the nutritional conditions; pyridine nucleotides become oxidized in starvation, while upon carbohydrate (e.g. fructose) intake they become reduced. We suppose that the pyridine nucleotides in the ER lumen and the enzyme principally defining their redox condition (hexose-6-phosphate dehydrogenase) act as nutrient sensors, and can promote the prereceptorial glucocorticoid activation or the mechanisms of macroautophagy. We also observed that the side-product of the oxidative protein folding, hydrogen peroxide, can be effectively reutilized in the generation of further disulfide bonds. We published some review papers on the redox systems of the ER, when we underlined the significance of compartmentation, and the connections/disconnections between the redox systems.

The cholestatic potential of the drugs causing cholestasis during therapeutic use was characterized according to their ability to modulate the activity of multidrug resistance associated protein 2 and 3 (Mrp2 and Mrp3), which transport proteins mediate the sinusoidal and canalicular efflux of BG, respectively. The change of the rate of BG elimination by rifampicin, probenecid, indomethacin and benzbromarone was assayed in sandwich culture of primary rat hepatocytes. In sandwich configuration the cells regain their in vivo like morphology and their vectorial transport function. All drugs studied decreased the canalicular transport, but modified the sinusoidal efflux differently. In the presence of rifampicin and probenecid the sinusoidal efflux increased shifting the elimination of BG to the sinusoidal domain, which is a typical cholestatic marker that is observed as conjugated hyperbilirubinaemia. At the same time, the overall elimination did not change significantly. In contrast, indomethacin and benzbromarone inhibited the transport of BG towards both directions, resulting in a decreased overall BG elimination together with an increased intracellular bilirubin and BG concentration. The ratio of conjugated bilirubin also decreased. The elevated intracellular accumulation of cytotoxic compounds, such as bilirubin may lead to liver injury, as it was published in some case reports.

Publications

Bánhegyi G, Csala M, Benedetti A. Hexose-6-phosphate dehydrogenase: linking endocrinology and metabolism in the endoplasmic reticulum. J Mol Endocrinol. 2009 Apr;42(4):283-9.

Bánhegyi G, Margittai E, Szarka A, Mandl J, Csala M. Crosstalk and barriers between the electron carriers of the endoplasmic reticulum. Antioxid Redox Signal.

Csala M, Kereszturi E, Mandl J, Bánhegyi G. The endoplasmic reticulum as the extracellular space inside the cell: role in protein folding and glycosylation. Antioxid Redox Signal.

Csala M, Margittai E, Bánhegyi G. Redox control of endoplasmic reticulum function. Antioxid Redox Signal. 2010 Jul 1;13(1):77-108.

Kereszturi É, Kálmán FS, Kardon T, Csala M, Bánhegyi G. Decreased prereceptorial glucocorticoid activating capacity in starvation due to an oxidative shift of pyridine nucleotides in the endoplasmic reticulum. FEBS Lett. 2010 Nov 19;584(22):4703-8.

Mandl J, Mészáros T, Bánhegyi G, Hunyady L, Csala M. Endoplasmic reticulum: nutrient sensor in physiology and pathology. Trends Endocrinol Metab. 2009 May;20(4):194-201.

Mandl J, Szarka A, Bánhegyi G. Vitamin C: update on physiology and pharmacology. Br J Pharmacol. 2009 Aug;157(7):1097-110.

Marcolongo P, Senesi S, Giunti R, Csala M, Fulceri R, Bánhegyi G, Benedetti A. Expression of hexose-6-phosphate dehydrogenase in rat tissues. J Steroid Biochem Mol Biol. 2011 126:57-64.

Margittai E, Bánhegyi G. Oxidative folding in the endoplasmic reticulum: towards a multiple oxidant hypothesis? FEBS Lett. 2010 Jul 16;584(14):2995-8.

Margittai E, Csala M, Mandl J, Bánhegyi G. Participation of low molecular weight electron carriers in oxidative protein folding. Int J Mol Sci. 2009 Mar;10(3):1346-59.

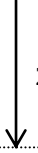
Nagy G, Szarka A, Lotz G, Dóczi J, Wunderlich L, Kiss A, Jemnitz K, Veres Z, Bánhegyi G, Schaff Z, Sümegi B, Mandl J. BGP-15 inhibits caspase-independent programmed cell death in acetaminophen-induced liver injury. Toxicol Appl Pharmacol. 2010 Feb 15;243(1):96-103.

Senesi S, Csala M, Marcolongo P, Fulceri R, Mandl J, Banhegyi G, Benedetti A. Hexose-6-phosphate dehydrogenase in the endoplasmic reticulum. Biol Chem. 2010 Jan;391(1):1-8.

Senesi S, Legeza B, Balázs Z, Csala M, Marcolongo P, Kereszturi E, Szelényi P., Egger C, Fulceri R, Mandl J, Giunti R, Odermatt A, Bánhegyi G, Benedetti A. Contribution of fructose-6-phosphate to glucocorticoid activation in the endoplasmic reticulum: possible implication in the metabolic syndrome. Endocrinology. 2010 Oct;151(10):4830-9.

Száraz P, Bánhegyi G, Benedetti A. Altered redox state of luminal pyridine nucleotides facilitates the sensitivity towards oxidative injury and leads to endoplasmic reticulum stress dependent autophagy in HepG2 cells. Int J Biochem Cell Biol. 2010 Jan;42(1):157-66.

.....



Teljes támogatás: 3 300 000,- Ft

A DAGANATBETEGSÉGBŐL GYÓGYULT GYERMEKEK KELET-ÉS NYUGAT-MAGYARORSZÁGI KÉSŐI MELLÉKHATÁSOKAT GONDOZÓ HÁLÓZAT KIÉPÍTÉSE, AZÉRT HOGY MINDEN KÉSŐI TÚLÉLŐ SZÁMÁRA ELÉRHETŐ LEGYEN A LEGOPTOMÁLISABB GONDOZÁS.

Bárdi Edit[1], Kiss Csongor[2] , Masát Péter[1], Bartyik Katalin[3]
[1] Vas Megyei Markusovszky Kórház Nonprofit Zrt, [2]DEOEC Gyermekgyógyászati Intézet Hematológiai és Onkológiai nem Önálló Tanszék, [3] SZOTE Gyermekklinika

Bevezetés: Napjainkra a gyermekkori rosszindulatú daganatos megbetegedések többségükben gyógyíthatóvá váltak. Ennek köszönhetően egyre inkább előtérbe kerülhetett a tartósan túlélő betegekben (diagnózistól számított legalább 5 évvel túlélt remisszióban levő betegekben) a kezelés okozta mellékhatások vizsgálata a betegek jobb életminősége érdekében.
Betegek: A tartós remisszióban levő betegeket 3 csoportra osztottuk, mivel a korábbi betegpopuláció kezelése során az azonos daganatbetegség esetében is több különféle kemoterápiás protokollt alkalmaztunk. A leukémiás és limfómás (LL) betegek a BFM protokolloknak megfelelő kezelésben részesültek. A BFM protokollok közös eleme volt a nagy dózisú (HD) metotrexát (MTX), az antraciklinek, a ciklofoszfamid valamint a magas rizikójú (HR) és a Burkitt-leukémia/limfóma betegek esetében az ifoszfamid (IFO). A Wilms tumoros (WT) beteg heminefrektómián estek át, pólusreszekciót csak 1 esetben végeztünk. A standard (SR) és a közepes rizikójú (IR) betegek vinkrisztin, epirubucin és D-aktinomicin, míg a HR betegek az előbbiek mellett IFO és carboplatin kezelésben részesültek. A WT betegek egy része lokális irradiációban is részesült. A szolid tumoros betegek (ST) kezelési sémáiban szerepeltek az IFO, a platinaszármazékok és a HD MTX, vagy e szerek kombinációi. **Szombathelyen** 97 korábban kemoterápiás és sugárkezelésen átesett tartós túlélő (53 fiú, 44 lány) szűrése történt meg, aki közül 77 LL, 6 WT, 14 ST gyógyult (átlagéletkor: 21 év, 5-36 év). **Debrecenben** a vizsgálatban 112 (61 fiú és 51 lány, átlagéletkor: 14±5 év) korábban kemoterápián átesett (79 LL, 12 WT, 21 ST) beteg vett részt. **Szegeden** 57 gyógyult daganatos gyermeket sikerült gondozásba venni (26 fiú és 31 lány, átlagéletkor: 16±5 év, 8-25 év) 47 LL, 2 WT, 8 ST túlélőt.
Módszerek: A kemoterápiás kezelést kapott gyermekek laboratóriumi paraméterekkel mérhető cardiovascularis és osteoporosis rizikótényezőit reggeli éhgyomri vérvételből határoztuk meg. A vérnyomás és testtömegindex adatok értékelésekor az Országos Gyermekegészségügyi Intézet által kiadott percentilis táblázatokat használtuk. *Csontritkulás szűrés:* Csontsűrűség méréssel (DEXA) és érzékeny laboratóriumi módszerekkel (osteocalcin /OC/, B-Crosslaps /β-CTX/, alkalikus foszfatáz, kalcium, foszfor, D vitamin, parathormon /PTH/, nemi és pajzsmirigy hormon /sTSH/ szintek) próbálta kiszűrni azokat a gyógyult betegeket, akik életmód-táplálkozási tanácsadásra, csontépítésre ható és a hormonális eltérések kezelésére szolgáló gyógyszerek adására szorultak. *Cardiovaszkuláris szűrés:* Az EKG és szív UH vizsgálatokon kívül, vérkép, urea, kreatinin, cystatin C, húgysav, ionok, triglicerid, koleszterin, LDL és HDL, mikroalbumin, B12-vitamin, folsav, homocystein, N-acetil-ß-D-glükózaminidáz (NAG-áz) aktivitás (csak Debrecenben volt kivitelezhető), rutin coagulogram és trombophilia panel, vizelet vizsgálat. Szegeden osteocalcin, β-CTX, cystatin C mérések nem voltak kivitelezhetők, ezért ezeket a méréseket fagyasztott mintákon Szombathelyen végezték.
Eredmények: Debrecenben patológiás csontháztartásra vonatkozó értéket a betegek 69%-ában (77/112) találtunk (53/82 a LL, 12/15 a WT és 12/15 ST-túlélőkben). A csontépítés markerei közül eltérés mutatkozott az OC értékében, mely (átlag±SD: 79,5±54,6 ng/mL) a normál tartomány (5–25 ng/mL) felső határának mintegy háromszorosa. A vizsgált 112 beteg közül 65 gyermeknél emelkedett szérumszintet találtunk. A csontlebontási markerek közül a B-CTX (átlag±SD: 956±540

pg/mL) átlagértéke mintegy másfélszerese volt a referenciatartomány felső határának (150–600 pg/ml). 94 gyermeknél találtunk magasabb értékeket. A többi laboratóriumi paraméterben nem találtunk szignifikáns eltérést. -2 alatti Z score értéket 16 betegben találtunk, a legalacsonyabb DEXA-értéket a szolid tumor-túlélőkben találtuk**. Szombathelyen** csökkent Z score értéket DEXA vizsgálattal (Z score<-2) 19 betegben észleltünk, akiket D vitamin, Ca supplementációban részesítettünk, életmód tanácsadás mellett, hangsúlyozva a csontok egyenletes terhelését okozó fizikai aktivitás (séta, futás, biciklizés) fontosságát, a kontakt sportok kerülését. Az OC átlagértéke a debrecenihez hasonló volt (72,34±48 ng/mL). A csontritkulás pathogenetikai hátterének tisztázása során magas sTSH értéket 5 betegben (2 Hodgkin kór, 1 ALL, 1 neuroblastoma, 1 agytumoros) észleltünk, akiket pajzsmirigy hormon szubsztitucióban részesítünk. A cystatin C értékkel monitorozott GFR 2 beteg kivételével minden betegnek normális volt (átlag cystatin C 0,7 mmol/L, norm:0,53-0,95 mmol/L), kardiovaszkuláris rizikófaktorként is szereplő microalbuminuriát 6 betegben észleltünk (átlag: 39 mg/dl norm:0-20 mg/dl), akik ACE gátló kezelésben részesülnek. **Szegeden** DEXA vizsgálatra ez idáig nem nyílt mód, de a betegek csonthomeosztáziára vonatkozó adatok teljesen hasonlóak voltak a debreceni és szombathelyi adatokkal, így a háromszoros OC értéket mutató betegeket életmódi tanácsadással elláttuk. Tekintettel arra, hogy minden központban alacsony D vitamin szinteket mértünk: 43-47 nmol/L, az alacsony D vitamin szinttel bíró betegeket D vitamin szupplementációban részesítettük. Az egy vesével bíró WT túlélők és a csökkent vesefunkciójú betegek alacsony száma a vese tiszta pathogenetikai hátterét tisztázni nem tudtuk. A csontháztartás zavarához hozzájárult a betegek 1/3-ában észlelhető enyhe hypokalcémia, a betegek 10-15 %-ában észlelhető PTH eltérés. EKG és szív UH vizsgálatokkal a túlélők 10 %-ában találtunk eltéréseket, amelyhez hozzájárult a korábbi kardiotoxikus kezelés mellett a betegek emelkedett BMI értéke. Emelkedett BMI-vel bíró betegek többsége sugárkezelésben is részesült. Szombathelyen az átlag BMI 22,24 volt (14,30-36,13). A 18 év alatti gyermek közül 13 betegnek normál, 2 alacsony, míg 3 magas BMI értéke volt. Mindhárom betegnek diétás nővér segít életmód tanácsokkal a testsúlycsökkentésben. A három túlsúlyos beteg közül kettőnél határérték hypertóniát mértünk, Holter monitorozásuk folyamatban van. A felnőttek esetén 7 férfinek volt 20 alatti BMI értéke, és 4 nőnek 18,6 alatti. 25,1-30,1 közötti BMI értéket 13 férfiban, 23,8-30,1 közötti BMI értéket 3 betegben mértünk. Egy 36 éves férfiban 13,6 mmol/L éhgyomri vércukor értéket, glükózuriát, 150/90 Hgmm mértünk 28,08 BMI mellett, ő endocrin és kardiológiai gondozásba került. A többi beteg vércukor szintje normális volt: átlag 4,71 mmol/L (2,71-13,6 mmol/L). Ezenkívül még 4 beteget kellett kardiológiai gondozásba venni határérték hipertónia miatt. 30,1 feletti BMI értéket 3 férfiban és 3 nőben észleltünk, mindnyájan LL miatt álltak kezelés alatt. A másik két központban is hasonló volt az anyagcsere betegségben szenvedők aránya és mértéke. A legsúlyosabb kardiovaszkuláris mellékhatással azokban az ST túlélőkben kellett számoljunk, akiknek a legrosszabb volt a vesefunkciója és a legnagyobb fokú az osteoporosisa.

Konklúzió: Három gyermek onko-hematológiai központban kezdődött el a daganatbetegségből gyógyult gyermekek gondozása. Bár a három központ nem tudta a betegek szűrését teljesen egyforma protokollal elvégezni, mégis a betegek jelentős részében hozzá tudtunk járulni ahhoz, hogy a daganatbetegséget túlélve, egészséges felnőtté válhasson. A gyermekonkológiai hálózatot megterheli a betegek kezelése, így eddig kevés figyelem jutott a túlélőkre. Ez a vizsgálat rávilágított arra, hogy a jövőben több gyógyult daganatbeteg gyermeket kell gondozásba vegyünk. Tekintettel arra, hogy az ország különböző régióiban található laboratóriumok különböző módszerekkel dolgoznak, így bizonyos laboratóriumi értékek a rutin gondozás során nehezen összehasonlíthatóak, de az összehasonlítást ezen study segítségével meg lehetett tenni. Azonban a vizsgálat legfontosabb eredményének mégis azt tartjuk, hogy a betegek profitáltak a gondozásból, életminőségük javult.

Irodalom: Bardi E, Dobos E, Kappelmayer J, Kiss C: PATHOL ONCOL RES 16: pp. 453-456 (2010) IF: 1,260

Bárdi E, Jenei Z, Horváth Á, Bodó T, et al: MAGYAR ONKOLÓGIA 55: pp. 110-116 (2011)

2 cm

Budget: 3 300,000.- HUF

BUILDING UP A SYSTEM IN EASTERN - AND WESTERN PART OF HUNGARY FOR FOLLOW UP LONG TERM SURVIVORS FOR EQUAL ACSESS OF LONG TERM FOLLOW UP.

Edit Bárdi [1], Csongor Kiss [2], Péter Masát [1], Katalin Bartyik [3]

[1] Vas Country Markusovszky Hospital; [2]Department of Pediatric Hematology and Oncology, Institute of Pediatrics, Medical and Health Science Center, University of Debrecen, Department of Pediatrics, University of Szeged

Introduction: As the outcome of childhood cancer improved substantially during the last 3 decades, the attitude of pediatric oncology has changed from "cure at any cost" to "cure at least cost" and pediatric oncologist can put more attention to the treatment related side effects of long term survivors to achieve better quality of life.

Patients: During the last 20 years different protocols were used; therefore, for further analysis, we divided the patients into 3 groups: leukemia-lymphoma (LL), Wilms tumor (WT), and (other) solid tumors (ST). Patients with LL treated according to BFM protocols consisting of high dose (HD) methotrexat (MTX), cyclophosphamide (CYC), and iphosphamide (IFO) for high risk (HR) and Burkitt leukemia/lymphoma patients. WT patients underwent heminephrectomy, polar resection was performed in 1 case. Standard and medium risk patients were treated with vincristine and d-actinomycine, HR patients received IFO and carboplatin in addition. Some of the WT patients received local (flank) irradiation. Patients with ST received either IFO or platinum derivates or HD MTX or combinations of these agents with or without additional cytostatic drugs in higher cumulative dose.

In Szombathely, 97 long-term survivors (53 boys, 44 girls) was screened (77LL, 6WT, 14 ST; median age: 21 years, 5-36 years). In Debrecen, we studied 112 (61 boys and 51 girls, mean age: 14 ± 5 years) survivors (79 LL, 12 WT, 21 ST). In Szeged, 57 long term survivors (47 LL, WT 2, ST 8) could be examined (26 boys and 31 girls, mean age: 16 ± 5 years, 8-25 years).

Methods: In long term survivors of childhood cancer cardiovascular risk factors and laboratory parameters indicating osteoporosis was measured in morning fasting blood samples. Blood pressure and body mass index (BMI) was assessed according to the published percentile tables of the Institute of Child Health.

Osteoporosis screening: By the help of bone density measurement (DEXA) and sensitive laboratory methods (Osteocalcin /OC/, B-crosslaps /B-CTX/, alkaline phosphatase, calcium, phosphorous, vitamine D, parathyroid hormone, sex and thyroid hormone levels) we tried to determined those cured patients who need life-nutrition counseling and/or treatment for bone-building or hormonal disturbances.

Cardiovascular screening: The electrocardiography (ECG), cardiac ultrasound examination and in addition blood samples for: blood count, urea, creatinine, cystatin C, ions, uric acid, triglycerides, cholesterol, LDL and HDL, microalbumin, vitamin B12, folic acid, homocysteine, N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG-ase) activity (Debrecen was the only feasible), and routine coagulogram, trombophilia panel, urinalysis were done. B-CTX, cystatin C and osteocalcin measurements were not feasible in Szeged, so these measurements were conducted from frozen samples in Szombathely.

Results: In Debrecen pathological bone values were found in 69% of patients (77/112) (53/82 in LL, 12/15 WT and 12/15 in ST-survivors). The marker of bone formation, the OC (mean ± SD: 79.5 ± 54.6 ng/mL) normal range (5-25 ng/mL) were about three times higher than the upper limit. Increased serum levels were found in 65 of the studied 112 patients. The average value of bone brakedown, the B-CTX (mean ± SD: 956 ± 540 pg mL), was about one and a half times higher, than the upper limit of reference range (150-600 pg/ml). We found in individually tested 94 children higher values. We found no significant difference in the other

laboratory parameters. Z-score values below -2 were found in 16 patients, DEXA showed the lowest value in the ST survivors.
In Szombathely decreased Z score value during DEXA analysis (Z score <-2), was observed in 19 patients, who received vitamine D, calcium supplementation and lifestyle counseling in addition, emphasizing the physical activities causing bone load (walking, running, cycling), and the importance of the contact sports aversion. The average value of OC was similar to that of the Debrecen (72.34 ± 48 ng /mL). Behind the pathogenetic background of osteoporosis was observed high sTSH in five patients (two Hodgkin's disease, 1 ALL, 1 neuroblastoma, 1 brain tumors), who had been put on thyroid hormone substitution. The values GFR, monitored by cystatin C were normal in all patients except two patients (mean cystatin C 0.7 mmol/L, norm: 0.53 to 0.95 mmol/L), while microalbuminuria, which also be used as a cardiovascular risk factor, was observed in 6 patients (mean: 39 mg/dl, norm:0-20 mg/dl) who were treated with an ACE inhibitor. In Szeged DEXA testing methods have not been opened yet, but the patients' data according to bone remodeling were similar to data observed in Szombathely and Debrecen, so the patients with three times higher OC value were provided by lifestyle advices. It is a very important fact that in all centers low vitamin D levels were measured: 43 to 47 nmol/L, so all these patients need vitamin D supplementation. The low number of WT survivors and patients with decreased kidney function could not make us possible to detect of the role of the kidney in bone homeostasis. This problem can be solved by increasing patients' numbers. Behind the disturbed bone remodeling we observed hypocalcemia in 1/3 and PTH level difference in 10-15% of patients. During ECG and cardiac ultrasound studies of the survivors were found in 10% variability, but behind these disturbances not only former cardiotoxic therapy, but elevated BMI of the patients could be observed. The patients with elevated BMI received irradiation above chemotherapy during their treatment. Szombathely, the average BMI was 22.24 (14.30 to 36.13). The 18 children under the age of 13 patients with normal BMI, two low, while 3 had a high BMI. Dietician helps all three patients by lifestyle advice to decrease body weight. In the three obese patients hypertension was measured, Holter monitoring is ongoing. Seven adult man had BMI under 20, four women had below 18.6. BMI values from 25.1 to 30.1 was observed among 13 males, between 23.8 to 30.1 in three patients. A 36 year old man with 28.08 BMI had 13.6 mmol/L fasting blood glucose value with glycosuria, 150/90 mmHg blood pressure, he was presented to endocrine and cardiac care. The other patients had normal blood sugar levels: mean 4.71 mmol / L (2.71 to 13.6 mmol / L). In addition, four other patients had been sent to cardiac care because of hypertension. BMI above 30.1 was observed in 3 males and in 3 woman, all of them were on LL treatment. The other two centers had similar metabolic rate and extent of disease. The most serious cardiovascular side effects was observed in the ST group, of whom renal function and the degree of osteoporosis was the worst.
Conclusion: The care of the long term survivors of childhood cancer began in three Hungarian pediatric onco-hematology centers. Although screening of patients in the three-centers was unable to be carried out by the fully same protocol, but in significant proportion of the previously treated patients we were able to contribute to become healthy adults. Till this time the pediatric oncology network was mostly occupied with treating new patients, so the long term survivors of childhood cancer could receive little attention. This study showed that in the future more cured cancer patients must be taken to long term survivor complex care to achieve better quality of life. Although the laboratories in different regions of Hungary working with various methods, making it hard to compare during routine care different laboratory parameters, which could be achieved by the help of this study, all the patients who could be examined, benefit somehow to achieve better quality of life.
References: Bardi E, Dobos E, Kappelmayer J, Kiss C: PATHOL ONCOL RES 16: pp. 453-456 (2010) IF: 1,260
Bárdi E, Jenei Z, Horváth Á, Bodó T, et al: MAGYAR ONKOLÓGIA 55: pp. 110-116 (2011)

Teljes támogatás: 4.500.000,-FT

AZ ALKOHOLFOGYASZTÁS HATÁSA AZ AGYI VÉRKERINGÉS SZABÁLYOZÁSÁRA PATKÁNYBAN KÜLÖNÖS TEKINTETTEL AZ ÖREGEDÉSRE ÉS A NEMEK KÖZTI KÜLÖNBSÉGEKRE

Bari Ferenc[1], Domoki Ferenc[2], Farkas Eszter[1], Institóris Ádám[2], Bere Zsófia[1,2], Mracskó Éva[1], Hertelendy Péter[1], Tóth Judit[2], Hugyecz Marietta[1,2], Darren L. Clark [1], Dunja Drakulic[3]
Szegedi Tudományegyetem, ÁOK [1] Orvosi Fizikai és Orvosi Fizikai Intézet, [2] Élettani Intézet és [3]VINCA Institute of Nuclear Sciences, University of Belgrade, Serbia

Súlyos kardiovaszkuláris történések (megbetegedések, baleset stb.) esetén az agy rövid ideig tartó vér- és oxigén-ellátási zavarai globális ischemiában manifesztálódnak. Sikeres újraélesztés esetén azonban számos károsító ágenssel –többek között a reperfúzió során nagy mennyiségben termelődő reaktív oxigén gyökökkel (ROS)- is számolni kell. A szervezetben élettani körülmények között termelődő és működő pro- és antioxidáns enzimek egyensúlya megbomlik, amelynek következtében pl. apoptotikus neuronális pusztulás történik. A hipoxiás károsodások szempontjából az agy egyik legsérülékenyebb területe a memória folyamatokban meghatározó funkciót betöltő hippocampus.

Tapasztalatok szerint a női nemi hormonok védelmet nyújtanak számos kardiovaszkuláris megbetegedéssel szemben. Ugyanakkor, a menopauzát követően a cerebrovaszkuláris megbetegedések (köztük a stroke) előfordulási gyakorisága jelentős mértékben megemelkedik. Az agyban számos mechanizmuson keresztül nőhet meg a ROS termelés, de a ROS eliminációja fiziológiás körülmények között biztosított. Bár a ROS semlegesítése szempontjából számos fontos biokémiai útvonal ismert, a nemhez kötött különbségekről viszonylag kevés ismerettel rendelkezünk. Az életkor előrehaladtával a kongnitív funkciók csökkenését tapasztaljuk.

A korai öregedésben jelentős szerepet játszanak mind az alkoholfogyasztás, mind a különböző etiológiájú agyi vérkeringési zavarok. Az is ismert, hogy a krónikus alkoholfogyasztás, különösen a középkorú és az idősebb emberek körében oxidatív stresszt okoz az agyban. Ezért fontos megismerni, hogy miként reagál a vérellátási zavarokra alkoholfogyasztás után a központi idegrendszer.

Munkánk fő célkitűzései a következők voltak:

- megvizsgáltuk, hogy miként változik néhány esszenciális pro- és antioxidáns enzim szintje hím és nőstény patkányok hippokampuszában tranziens agyi ischaemiát követően,
- tanulmányoztuk, hogy milyen hatással van az említett enzimek szintézisére a krónikus alkoholbevitel és a kombinált agyi hipoperfúzió idősödő állatokban.

Kísérleteinkben hím és nőstény patkányokat használtunk, amelyeket megfelelő kísérleti csoportokba osztottunk be. Kontrollként kezeletlen (naiv), illetve áloperált és megfelelően kezelt állatokat használtunk. Globális agyi ischaemiát a kétoldali carotis comm. elszorításával (2VO) és hipovolémiás hipotenzióval (art. vérnyomás:~ 40 Hgmm) hoztunk létre, amelyet 5, ill. 10 percen át tartottunk fenn. A nőstény patkányok ovariumát az ischaemiát megelőzően egy hónappal műtétileg eltávolítottuk. A reperfúziót 3 napos túlélés követte, majd az állatok agyát eltávolítottuk és azokból Western blottos eljárással meghatároztuk számos pro és antioxidás enzim, apoptotikus marker (Bcl-2 és Bax)és csatoló fehérje (connexin 30, -40 és -43) szintjét.

Az alkohol hatását egy éves hím patkányokon vizsgáltuk, amelyeket 5 kísérleti csoportba osztottunk. A naiv kontrolok mellett áloperált és a bevitt alkohollal azonos volumenű és energiatartalmú cukros tejet fogyasztó kontrol állatokat is vizsgáltunk. A beavatkozás a globális ischemia volt, amelyet 2VO előzött meg – a beavatkozás a kísérletek előtt 9 hónappal történt- és az alkohol bevitel volt. Az alkoholt 4 napon át, napi 3 alkalommal gyomorszondán keresztül adagoltuk az állatoknak (20tf%-os etanol, 5g/kg).

Eredményeink szerint hím állatokban az 5 perces agyi ischaemia hatására csökkent a neuronális nitrogén monoxid szintáz (nNOS) és a Cx30 fehérje, míg a mangán szuperoxid dizmutáz (MnSOD), ugyanakkor az apoptózist markerként használt Bax és Bcl-2 szintek alig változtak. A 10 perces ischaemiát azonban az idős hím patkányok egyike sem élte túl (valószínűleg a túlsúlyuk és hormonális státuszuk miatt). Nőstény patkányokban azonban az 5 perces ischaemia nem okozott változást a vizsgált fehérjék szintjében. Tíz perces inzultus után azonban a Bcl-2/Bax arány nőt, amely antipoptotikus folyamatok elindítására utal. Eredményeink tehát arra utalnak, hogy még ovariektómiát követően is másként reagál a hímek és nőstények agya, a nőstények védettebbek bizonyulnak. Modellünkben, hím patkányokban az 5 perces ischemia számos fehérje változását okozta, míg a 10 perces inzultus minden esetben letálisnak bizonyult. A hippocampusban az nNOs csökkenése minden bizonnyal a sejtelhalást tükrözi, míg a kapcsoló proteinek változása (pl. Cx 30) a réskapcsolatokon keresztül megvalósuló diffúziót befolyásolja. Ez egyaránt tükrözheti a sejtregeneráló szignálok gátolt terjedését, de a sejtelhalást indukáló faktorok korlátozott mozgását is. Nőstényekben az 5 perces inzultus nem okozott változást a vizsgált fehérjék expressziójában. Ezzel szemben az emelkedett Bcl-2/Bax arány sejtregeneráló hatások indukcióját tükrözi.

Eredményünk, miszerint egyik nemben sem változott az MnSOD expressziója megerősíti azt a korábbi megállapításunkat, hogy ennek az enzimnek az expressziójára nem hat közvetlenül az ischaemiás inzultus. A nagy energiájú folyadék (cukrozott tej) bevitele önmagában nem befolyásolta a vizsgált fehérjék egyikét sem (kivéve a Bax). Ugyanakkor a 2VO csoportban a tejbevitel önmagában is megváltoztatta az nNOS és a Cx30 és Cx43 expressziókat (31 és 40% emelkedés ill. 15% csökkenés). Továbbá, az agyi hipoperfúzió és az alkohol bevitele jelentősen csökkentette a nNOS, Cx43 és -30 expressziót, fokozta az iNOS kifejeződését, továbbá jelentősen rontotta a MnSOD szintézist (40%!) is. Emellett csökkent a Bcl-2/Bax arány, ami sejtelhalást jelez. Az eNOS expresszió ebben a kísérletsorozatban nem változott. Eredményeink aláhúzzák, hogy a krónikus alkoholbevitel jelentős mértékben megváltoztatja a hippocampusban a pro- és antioxidáns enzimek expresszióját és a változások a károsító mechanizmusok túlsúlyát tükrözik. Munkánk rámutat arra, hogy megváltozik az idősödő, sok alkoholt fogyasztó egyének antioxidáns kapacitása, amelynek jelentős terápiás konzekvenciái is vannak pl. stroke esetében.

Munkánk számos területen új irányokat nyitott, eddig nem ismert mechanizmusokra irányította a figyelmet. Eredményeink egy részét már publikáltuk, ill. konferenciákon ismertettük, ugyanakkor számos vizsgálatot még tovább kell folytatnunk.

Teljes támogatás: 4.500.000,-FT

THE EFFECT OF ETHANOL INTAKE ON THE REGULATION OF CEREBRAL BLOOD FLOW WITH SPECIAL FOCUS ON AGEING AND GENDER DIFFERENCES

Ferenc Bari[1], Ferenc Domoki[2], Eszter Farkas[1], Ádám Institóris[2], Zsófia Bere[1,2], Mracskó Éva Mracskó[1], Péter Herteleny[1], Judit Tóth[2], Marietta Hugyecz[1,2], Darren L. Clark[1], Dunja Drakulic[3] [1]Department of Medical Physics & Informatics, [2]Department of Physiology, University of Szeged & [3]VINCA Institute of Nuclear Sciences, University of Belgrade, Serbia

Transient global ischemia (TGI) may occur in serious cardiovascular disorders that deprive the brain of oxygen and glucose for a short period of time. Reperfusion injury plays a critical role in the pathophysiology of brain damage most likely mediated by reactive oxygen species (ROS). Impairment of physiological pro- and antioxidant enzyme levels by ROS leads to neuronal death through apoptotic pathways in the hippocampus, the most vulnerable part of the brain to oxidative damage. It is well established that female sex hormones play protective role in some cardiovascular diseases. Therefore after menopausa the risk of stoke is sharply elevated among female. There are several mechanisms which are responsible for both enhanced ROS production and elimination. Although, some fundamental pro and antioxidant mechanisms have already been elucidated, the obvious sex-specific differences are still unexplored. Cognitive decline that occurs in aging, vascular dementia and Alzheimer's disease could be provoked by chronic cerebral hypoperfusion. Chronic excessive alcohol intake, especially in the middle-aged people and elders, induce various problems, including neurodegenerative changes and memory disorders. Since progressive ethanol consumption leads to enhanced oxidative damage and cell death in the brain, it is essential to determine whether chronic alcohol intake could incite the progression of neurodegenerative diseases. The major goals of our studies were:

to explore the sex-specific differences in some pro and anti-oxidant enzymes found in the hippocampus in rats exposed to TGI; and *to study* the combined effect of alcohol intake and cerebral hypoperfusion on the enzymatic changes in the hippocampus

We used male and female rats in our experiments. The animals were divided into appropriate experimental groups: naïve (no treatment, no operation), sham-operated (all the surgical procedures were performed except the TGI) and a group subjected to TGI. TGI was induced by occluding the common carotid arteries and hypovolemic hypotension (~40 mmHg) for 5 or 10 min. One month before this procedures females were bilaterally ovariectomised, while males underwent sham operation (anesthesia, etc). Three days after TGI, all animals were sacrificed and by immunoblotting pro- and antioxidant enzymes, pro- and antiapoptotic molecules as well as connexin (Cx30, -40 and 43) protein expression in whole cell extracts were detected.

One year old male rats were divided into 5 main groups: 1) naïve; 2) animals subjected to milk ; 3) animals subjected to ethanol ; 4) sham operated animals exposed to milk and to permanent bilateral common artery ligation (2VO) and 5) animals 2VO and ethanol (OE). Sham operation and 2VO were done when animals

were 3 months old and treatments were applied 9 months later, for 4 consecutive days, 3 times per day. Protein expressions in hippocampal whole cell extract (WCE) were observed by Western blot technique.

TGI lasting 5 min in males caused decrease of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) and Cx30 protein levels, while the expression of manganese superoxide dismutase (MnSOD), apoptosis promoting and apoptosis regulating proteins (Bax, and Bcl-2) were less affected. All males subjected to 10 min TGI died within a day, probably due to body overweight, age and hormone status. In female rats, 5 min TGI did not significantly change the expression of the investigated proteins, but after 10 min, enhanced Bcl-2/Bax protein ratio was obtained. TGI in male and female hippocampus differently alters protein expression and results in cascade of events leading to a number of vital cellular changes. In this model system in male hippocampus, 5 min TGI evoked alterations in protein expressions whereas 10-min TGI was already a lethal insult. Decreased nNOS level in male hippocampal area may be the result of high degree of cell damage caused by TGI. Lower Cx30 protein level could lead to modulation of intercellular diffusion of necrotic or apoptotic signals and may allow diffusion of ions and substances from healthy to injured cells. In females, 5 min TGI was insufficient to induce changes in expression of investigated molecules, whereas 10 min TGI, due to increase of Bcl-2/Bax protein ratio, most likely triggers intracellular signaling pathways involved in cell survival and regenerative processes. In both gender, TGI did not influence MnSOD expression, indicating that ischemic stress is not directly involved in regulation of expression of this enzyme. Comparing to control, milk intake (for equivalent energy with alcohol) did not alter the expression of investigated proteins except pro-apoptotic Bax, while chronic ethanol treatment stimulated the expression of cx30 (by ~ 40%). In animals with 2VO and milk, expressions of nNOS and cx30 increased (~31% and ~ 40%), while cx43 decreased (~15%). Furthermore, cerebral hypoperfusion combined with chronic ethanol intake caused significant change in expression of nNOS, inducible NOS (iNOS), cx43, cx30, MnSOD (decrease by 40% !) and Bax while Bcl-2/Bax protein ratio was decreased. The expression of eNOS was not significantly altered in any investigated group. This study indicates that chronic alcohol intake after cerebral hypoperfusion caused significant change in expression of investigated proteins and Bcl-2/Bax protein ratio. Thus, identifying various mechanisms and signaling pathways activated by alcohol combined with cerebral hypoperfusion injury in elders could reveal new possible therapies for stroke patients that are alcoholics. Some of our results have already been published and presented on home and international meetings. In addition, a considerable part of our data needs further analysis and interpretation.

ETT 03-372/2009 Teljes támogatás: 4 800 EFt

SOMATOSTATIN, ADJUVÁNS ANALGETIKUMOK, ENDOCANNABINOIDOK, OPIOIDOK ÉS POTENCIÁLIS ANTIASTHMATICUMOK MODULÁCIÓS HATÁSAI SIMAIZOMSZERVEK VEGETATÍV, KAPSZAICIN-ÉRZÉKENY ÉS HÍZÓSEJT-MEDIÁLT VÁLASZAIRA

Barthó Loránd, Benkó Rita, Pethő Gábor, Pintér Erika
Pécsi Tudományegyetem ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

Vállalt kísérleteink elsősorban a belső szervek (gyomor-béltraktus, urogenitális és légúti simaizomzat) mozgásválaszai mechanizmusának jobb megértését, a rájuk ható szerek vizsgálatát célozták.
Új megállapításaink a következők:

- Az emberi ileum hosszanti izomzatának gátló beidegzésében (simaizom-elernyedés) P2 purinoceptorok (valószínűleg az ATP P2Y1 receptorai, amelyeket az MRS 2179-es jelű antagonista gátol) részt vesznek (*Undi S et al. 2009 Life Sci. 84:871-5*).
- Humán bélen és számos állati simaizom-preparátumon a BCTC jelű TRPV1 receptor antagonista megbízhatóan gátolja a kapszaicin hatását, míg a szintén antagonistaként használt jodo-reziniferatoxin egyes preparátumokon agonista hatást fejt ki, a kapszazepin esetében viszont nehéz elkerülni a nem-specifikus hatásokat (*Benkó R et al. 2011/12 Eur J Pharmac. 674:44-50*). A kérdés tágabb jelentősége a neurogén gyulladás és hyperalgesia befolyásolásában áll.
- A humán szövet beérkezésének ütemében folytatódnak a morfin, ill. az opioid μ-receptor-specifikus agonista DAMGO kolinerg válaszokra kifejtett hatásaival kapcsolatos kísérletek. Vékony-, ill. vastagbél hosszanti és körkörös izomzatában az opioid agonisták a vártnál sokkal gyengébb gátló hatást fejtenek ki (azaz csak viszonylag magas koncentrációkban gátolják a kolinerg válaszokat). Ez arra utal, hogy az opioidok okozta székrekedés nem elsősorban a bél kolinerg neuronjainak gátlása útján jön létre. E a fontos opioid-mellékhatás mechanizmusainak jobb megértése terápiás szempontból is jelentőséggel bír (*Benkó R et al. 2010 Pharmacology 86:145-8*).
- Az endocannabinoid anandamid olyan izgató hatással is rendelkezik bélpreparátumokon, amely sem cannabinoid-, sem TRPV-1-receptorok izgatásával nem magyarázható. Eddig ismeretlen mechanizmusú cannabinoid-hatások felderítése hosszabb távon addiktológiai összefüggésben is hasznos lehet (*Barthó L et al. 2010 MÉT-MFT Kongresszus, Szeged*)
- A Farmakognóziai Tanszékkel és a Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézettel kollaborációban megkezdtük egyrészt in vivo gyulladásgátló hatással rendelkező karotinoidok in vitro hatásainak vizsgálatát, másrészt olyan potenciális gyógynövények kivonatainak tesztelését, amelyekkel kapcsolatban partnereink már szövettani, fitokémiai és egyéb vizsgálatokat folytattak. Úgy tűnik, hogy ezek az anyagok befolyásolják részben az enterális idegek működését, részben pedig a gyulladásos mediátorok hatását. Ezek a kutatások fitofarmakológiai jelentőségűek lehetnek.
- Megállapítottuk, hogy az adenozin bomlásterméke, az inozin immunhatásait valószínűleg nem a ciklo-oxigenáz rendszer befolyásolásán, leukotrién-antagonista hatás révén, hízósejt-stabilizálóként, antihisztaminként, ill. a neurogén gyulladás komponenseinek befolyásolása útján fejti ki. Bár az eredmények negatívak, közelebb visznek ezen immunmodulátor hatásmechanizmusának megértéséhez (*Wolf M et al. 2009 Meth Find Exp Clin Pharmac 31:359-66*).
- Folyamatban vannak kísérleteink a H2S zsigeri hatásaival és lehetséges transzmitter-szerepével kapcsolatban (prof. Pintér Erikával kollaborációban), valamint egy új nociceptív / antinociceptív modell kidolgozására (prof. Pethő Gáborral és prof. Szolcsányi Jánossal együtt).
- A nem-szelektív somatostatin antagonista ciklo-somatostatin jellemzése kapcsán meglepetésünkre azt találtuk, hogy a szer opioid agonista-szerű hatással rendelkezik. A somatostatin-kutatás a gyulladások és fájdalom témakörében intenzíven folynak világszerte. Fontos, hogy a felhasznált "antagonistákat" alaposan megismerjük (*Benkó R et al., elbírálás alatt*).

ETT 03-372/2009 Total support, HUF 4 800 000

MODULATORY EFFECTS OF SOMATOSTATIN, ADJUVANT ANALGESICS, ENDOCANNABINOIDS, OPIOIDS, AND POTENTIAL ANTIASTHMATICS ON AUTONOMIC, CAPSAICIN-SENSITIVE AND MAST CELL-MEDIATED RESPONSES OF SMOOTH MUSCLE ORGANS

Loránd Barthó, Rita Benkó, Gábor Pethő, Erika Pintér
Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, University Medical School of Pécs

We have set out for performing experiments aiming at a better understanding of motor responses of viscera (gastrointestinal, urogenital, respiratory smooth muscles), as well as for studying drugs acting upon these organs.
Our new findings have been as follows.

- P2 purinoceptors (probably P2Y1 receptors, sensitive to the antagonist MRS 2179) participate in the functional inhibitory innervation (relaxation) of the human ileal longitudinal muscle (*Undi S et al. 2009 Life Sci. 84:871-5*).
- The TRPV1 receptor antagonist reliably inhibits the effect of capsaicin on the human intestine, as well as on several smooth muscle preparations from laboratory animals. Iodo-resiniferatoxin (a substance also used as TRPV1 receptor antagonist) exerts agonist activity in some preparations, while capsazepine may have non-specific effects (*Benkó R et al. 2011/12 Eur J Pharmac. 674:44-50*). This problem has relevance as to drugs acting on neurogenic inflammation and hyperalgesia.
- We have been continuing experiments concerning the effects of morphine and the opioid μ receptor antagonist DAMGO on cholinergic responses of longitudinal and circular muscles of the human small and large intestine. We have detected an unexpectedly low opioid agonist sensitivity in all these preparations. This may indicate that constipation, a major side effect of opioid therapy is not dependent on an inhibition of cholinergic neurons and that other mechanisms may have more important roles (*Benkó R et al. 2010 Pharmacology 86:145-8*).
- The endocannabinoid anandamide shows excitatory effect on some intestinal preparations. This action is not mediated by either cannabinoid or TRPV1 receptors. Characterization of a hitherto unknown cannabinoid effect may offer a better insight into the psychotropic cannabinoid actions as well (*Barthó L et al. 2010 MÉT-MFT Congress, Szeged*)
- We started testing the in vitro effects of carotinoids and potentially anti-inflammatory plant extracts (in collaboration with the Department of Pharmacognosy). Preliminary data show that some of these extracts influence enteric nerves, as well as the visceral effects of inflammatory mediators, consequently they may be of phytopharmacological significance.
- We have established that inosine, a breakdown product of adenosine with immunomodulatory action probably does not act through the cyclo-oxygenase system or as a histamine or leukotriene antagonist, mast cell stabilizer or through influencing components of the neurogenic inflammatory reaction. These results, though negative, may contribute to a better understanding of the immunomodulatory action of inosine (*Wolf M et al. 2009 Meth Find Exp Clin Pharmac 31:359-66*).
- Experiments are running, together with Prof. E. Pintér, for studying the visceral effects and a possible transmitter role of H2S and with Prof. G. Pethő and Prof. J. Szolcsányi for elaborating a mouse model of nociception /antinociception.
- As we planned to use somatostatin receptor antagonists for an analysis of visceral effects of capsaicin, we tried to test the anti-somatostatin effect of the non-selective antagonist cyclo-somatostatin on gastrointestinal preparations. Surprisingly, this compound behaved as an opioid receptor agonist, i.e. it inhibited, in a naloxone-reversible manner, cholinergic contractions of the preparations (*Benkó R et al., submitted for publication*). Somatostatin, as well as its synthetic analogues may be important modulators of pain and inflammation, which makes characterization of its antagonists even more important as before.

Támogatás: 3.000.000- HUF

A "CLOCK" GÉNEK ÉS FEHÉRJÉK, MINT A CIRCADIAN RITMUS SZABÁLYOZÁSÁÉRT FELELŐS FAKTOROK GENETIKAI VIZSGÁLATAI A KÖRNYEZETI ÉS ÉLETMÓDBELI KAPCSOLÓDÁSOK TISZTÁZÁSA CÉLJÁBÓL MELANOMA MALIGNUM ESETEIBEN

Lengyel Zsuzsanna[1], Kádár Zsolt[1], Battyáni Zita[1]
[1]PTE. KK, Bőr Nemikórtani és Onkodermatológiai Klinika

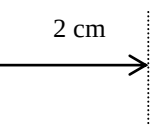
Epidemiológiai és genetikai vizsgálatok feltételezik a cirkadián ritmus károsodását a tumorok kia - lakulásának folyamatában. A cirkadián óragének bőrtumorok kialakulásában játszott szerepét eddig még nem vizsgálták.
Saját korábbi vizsgálatainkban műtétileg eltávolított melanomás szövetekben és a környező normál bőrben vizsgáltuk a *per1, per2, clock,* and *cry1* mRNS expressziót, valós idejű *RT-PCR* módszerrel. Vizsgáltuk továbbá a clock gén expresszió és a melanoma szövettani jellemzői közötti lehetséges összefüggéseket. Vizsgálatunk alapján a *clock, per1, per2,* és *cry1* mRNS expresszió mérsékelt csökkenést mutatott a tumorokban a környező normál bőrhöz viszonyítva.
Továbbá a *clock* és *cry1* expresszió szignifikáns összefüggést mutatott a szövettani prognosztikai jellemzőkkel, így a Breslow féle tumor vastagság, a magasabb mitotikus arány, ulceráció jelenléte, és a primér tumor elhelyezkedése vonatkozásában.
Eddigi vizsgálataink alapján elsőként mutattuk ki egyértelműen , hogy a clock genek *per1, per2, clock,* and *cry1* mRNS jelen van a humán melanomás szövetekben az expressziójuk csökkent a környező ép szövetekhez viszonyítva. Eddigi vizsgálataink alapján a *clock* gén deregulációja rossz prognózist eredményez melanoma malignumban.

Támogatás: 3.000.000- HUF

GENETIC RESEARCH OF CLOCK GENES AND PROTEINS TO DETERMINE THE INFLUENCE OF ENVIROMENT LIFESTYLE ON MELANOMA MALIGNUM

Zita Battyáni, Zsuzsanna Lengyel, Zsolt Kádár
Department of Dematology, University of Pécs.

Epidemiological and genetic evidences suggest that disruption of circadian rhythms may lead to cancer formation. The role of circadian clock genes in skin tumorigenesis was not reported earlier. In our preliminary study, excised melanoma and adjacent normal skin biopsies were investigated for clock genes *per1, per2, clock,* and *cry1* mRNA expression using real-time RT-PCR. We also analyzed the possible associations between clock genes and histopathological features of malignant melanoma. Our data showed that mRNA amounts of *clock, per1, per2,* and *cry1* clock gene depict a modest decrease in melanoma tumors compared to adjacent normal skin tissues. Furthermore, *clock* and *cry1* expression showed significant associations with histopathological characteristics such as Breslow thickness, higher mitotic rate, presence of ulceration, and localization of the primary tumor. Our results provide evidence for the first time that clock genes *per1, per2, clock,* and *cry1* mRNAs are present in human melanoma in a decreased amount compared to paired non-cancerous adjacent skin. Our preliminary data raise the possibility that deregulation of *clock* transcription in melanoma malignum may be linked to worse prognosis.



Teljes támogatás: 3 000 000, 0 Ft

A PARP-1 fehérje *in vitro* és *in vivo* kölcsönhatása guanin-tetrád szerkezetekkel

PÁL I. BAUER
SE Orvosi Biokémiai Intézet

1./A PARP-1 fehérje kölcsönhatását vizsgáltuk a c-myc gén promoterének NHE III_1 régiójában lévő guaninban gazdag szakasszal, mely guanin-kvadruplex szerkezetet képezhet, és az egyszálú DNS szerkezet kialakulása a gén transzkripciójának gátlását okozza. Módszert dolgoztunk ki a fehérje-DNS kölcsönhatás vizsgálatára. A vad típusú szekvencia a PARP-1 fehérjéhez kötődik és a kölcsönhatást a TMPyP4 kationos porfirin koncentráció függően gátolja. A myc mutáns szekvenciát tartalmazó oligonukleotidokhoz a PARP-1 nem kötődik. A GQ szerkezettel való kölcsönhatás a PARP-1 fehérjét aktiválja. A PARP-1 fehérje expressziója PARP-1 -/- MEF sejtekben a c-myc-Luciferáz riporter plazmid aktivitását többszörösre emeli. ChIP-qPCR kisérletekkel kimutattuk, hogy a PARP-1 a c-myc promoter GQ és B-DNS formáját egyaránt felismeri. FRET mérésen alapuló kinetikai mérést dolgoztunk ki a GQ B-DNS formába történő átalakulás vizsgálatára, mely mérések alapján kimutattuk, hogy a PARP-1 felismeri a c-myc GQ szerkezetet és azt a B-DNS formába konvertálja. A PARP-1 a c-myc GQ szerkezet izomorf alakjai közötti átalakulást befolyásolja. Eredményeinket közlemény formájában összefoglaltuk és közlésre elküldtük.
2./ Folytattuk a PARP-1 fehérjével (génnel) a szintetikus letalitás kapcsolatában álló rendszerek azonosítását. Kináz gátlókat tesztelünk az általunk létrehozott PARP-1 -/- transzformált sejtvonalon. Több „lead" vegyületet azonosítottunk, a köréjük tervezett molekulák szintézise és további tesztelése más pénzforrások elnyerésére vár.
3./ Az iniparib (3-nitro-4-jodó-benzamid) a klinikai kipróbálás III. fázisában levő rákbetegség ellenes szerként tesztelt molekula, melynek aktív alakja a PARP-1 fehérje cink ujj szerkezetét oxidálja. Az aktiv forma a 3-nitrozó-4-jodó-benzamid a NO-hoz hasonlóan igen reaktiv molekula, mely számos sejtfehérjét módosít. Elképzelésünk szerint képes egy a PARP-1 fehérjével szintetikus letalitás kapcsolatában levő másik fehérjével is reagálni és így kiváltani a sejtpusztulást. Egyrészt ezt a molekulát keressük, másrészt a kiváltott sejtpusztulás formáját vizsgáljuk Dunai Zsuzsannával kooperálva. Úgy tűnik, hogy az iniparib tumorsejtek szelektív apoptótikus/nekrotikus pusztulását indukálja önmagában, míg nekroptózist indukál kaszpáz gátló molekula együttes jelenlétében, azzal szinergisztikusan. A ripoptoszóma komplex keletkezésének létrejöttét és annak körülményeit jelenleg vizsgáljuk.

E. Kun, J. Mendeleyev, E. Kirsten, A. Hakam, A.M. Kun, A. Fekete, P.I. Bauer, Z. Dunai, R. Mihalik,Regulation of malignant phenotype and bioenergetics by a π-electron donor-inducible mitochondrial MgATPase. International Journal of Molecular Medicine, 27(4), pp181-186 (2011); DOI: 10.3892/ijmm.2010.567. **IF: 1.814**
Z. Dunai, P.I. Bauer and R. Mihalik, Necroptosis: Biochemical, Physiological and Pathological Aspects,. Pathology and Oncology Research, 17(4), pp791-800 (2011).; DOI: 10.1007/s12253-011-9433-4. **IF: 1.483**

Budget: 3 000 000.0- HUF

Interactions of PARP-1 with guanine-tetrade structures

PAL I. BAUER
Department of Medical Biochemistry, Semmelweis University, Faculty of Medicine

1./ The interaction of PARP-1 with the GQ structure forming DNA strand present in the NHE III_1 region of the promoter of the c-myc gene. When formed from the B-DNA form this protruding single stranded structure prevents the transcription of the c-myc gene. We developed a binding assay and have shown that PARP-1 binds to the wild type GQ structure but not to the mutants forms displaying distorted structures. The cationic porphyrine TMPyP4 competes the binding of PARP-1 to the c-myc GQ structure. The enzymic activity of PARP-1 is increased by its binding to the c-myc GQ structure. Affinity pull-down experiments followed by mass spectra sequencing of the GQ structure bound proteins confirmed the interaction between PARP-1 and the c-myc GQ structure. Expression of PARP-1 in PARP-1 -/- MEF cells has caused a fourfold increase in the luciferase activity of a c-myc-promoter-luciferase gene containing reporter plasmid construct. ChIP-qPCR experiments have proven that PARP-1 is able to bind to the c-myc promoter region present both int he GQ or in theB-DNA form. A FRET based kinetic assay was set up to charcterize the conversion of the GQ structure into its double stranded B-DNA form. PARP-1 accelerates this conversion in a concentration dependent way. The first Zn-finger structure of PARP-1 participates in the reaction. Results of FRET-melting experiments suggest, that PARP-1 stabilizes one of the isomorphic structures present int he promoter of the c-myc gene.
2./ We continued to identify genes (proteins) which are in synthetic lethal condition with PARP-1. A kinase inhibitor library is tested using a transformed PARP -/- cell line. Leads were identified and structurally similar compounds are tested further.
3./ Iniparib (Sanofi-Aventis) is an irreversible inhibitor of PARP-1 is in Phase III of clinical trials as anticancer drug candidate.The active form of the drug, 4-iodo-3-nitroso-benzamide , similarly to NO is a very agressive compound reacting with several proteins of the treated cells. We are sequencing the nitrosylated proteins and are looking for those which are synthetic lethal condition with PARP-1. The signalling mechanism leading to death of the treated cells are also investigated.

E. Kun, J. Mendeleyev, E. Kirsten, A. Hakam, A.M. Kun, A. Fekete, P.I. Bauer, Z. Dunai, R. Mihalik, Regulation of malignant phenotype and bioenergetics by a π-electron donor-inducible mitochondrial MgATPase. International Journal of Molecular Medicine, 27(4), pp181-186 (2011); DOI: 10.3892/ijmm.2010.567. **IF: 1.814**
Z. Dunai, P.I. Bauer and Rudolf Mihalik, Necroptosis: Biochemical, Physiological and Pathological Aspects. Pathology and Oncology Research, 17(4), pp791-800 (2011); DOI: 10.1007/s12253-011-9433-4. **IF: 1.483**

Teljes támogatás: 4.500.000 forint

TECTOFUGÁLIS MULTIMODÁLIS SZENZOMOTOROS RENDSZER ELEKTRO-FIZIOLÓGIAI ÉS SZÖVETTANI VIZSGÁLATA ÉLETTANI ÉS KÓRÉLETTANI KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT

Benedek György[1], Nagy Attila[1], Berényi Antal[1], Braunitzer Gábor[1], Gombkötő Péter[1], Kincses Tamás[2]
[1]SZTE, Élettani Intézet, [2]SZTE, Neurológiai Klinika

A pályázat alapvető célkitűzése a felszálló tectofugális vizuális rendszerben zajló információfeldolgozás vizsgálata különböző állatkísérletes modellekben és humán pszichofizikai vizsgálatokban normál élettani és kórélettani körülmények között.

Anatómiai kísérleteinkben a tectofugális vizuális rendszer és a bazalis ganglionok anatómiai kapcsolatát vizsgáltuk. Házimacska agyában kimutattuk a SN pars reticularis (SNr) és a nucleus caudatus (NC) közötti vizuális pályát. A kapcsolatban döntő szerepe van a hátsó thalamus nucleus supraganiculatus (Sg) magjának, ami a SNr-ból jövő információt a NC-hoz továbbítja. Igazoltuk a colliculus superior (CS) és a vizuális asszociációs kéreg inzularis vizuális areaja közötti morfológiai kapcsolatot, ami egy kétszinapszsios pályán keresztül valósul meg, ahol szintén a thalamus Sg magja az átkapcsoló állomás (1,4). Kimutattuk továbbá a sulcus ectosylvius anterior és a NC közötti direkt vizuális pályát (12).

Altatott házimacska modellen végzett élettani kísérleteinkben megvizsgáltuk a colliculus superior középső rétegeinek (SCi), a Sg-nak és NC-nak időbeli és térbeli vizuális tulajdonságait. Azt találtuk, hogy mindhárom vizsgált képletből regisztrált neuronok extrém alacsony térbeli, valamint nagyon magas időbeli frekvenciákra adnak optimális választ, és keskeny időbeli és térbeli frekvenciahangolással rendelkeznek (2,5). Leírtuk a CS és a NC spektrális vizuális receptív mező szerveződését: mindkét képletben egyszerű, időbeli frekvenciahangolást, térbeli frekvenciahangolást és sebességhangolást mutató neuronokat találtunk (7). Eredményeink alapján azt gondoljuk, hogy a felszálló tectofugális vizuális rendszer a mozgások érzékelésében tölt be kulcsszerepet, és feltehetően az állat saját mozgása során történő vizuális változásokat érzékeli (6). Megvizsgáltuk SNr-ban levő vizuális neuronok receptív mezőinek belső struktúráját. Az egyszerű hangolást mutató neuronok mellett irányhangolást és sebességhangolást mutató neuronokat is találtunk. Találtunk továbbá egy stimulusparaméter-függő válaszkarakterisztikával rendelkező neuron csoportot is. Ez azt jelenti, hogy a bizonyos irány-sebesség-méret kombináció aktivitásfokozódást tudott kiváltani ugyanabból az idegsejtből, amelyik más stimulusparaméter kombináció alkalmazása esetén aktivitáscsökkenést mutatott (3). Igazoltuk, hogy a vizuális aktivitást mutató NC neuronok panoramikus lokalizációs képességgel bírnak, és bizonyítékot szolgáltattunk a térbeli vizuális információ megosztott populációs kódjára a NC-ban (10). Szimultán extracelluláris egysejt és mezőpotenciál regisztrációt végeztünk a NC-ban és a Sg-ban, és vizsgáltuk a vizuális ingerlés során szimultán felvett Sg-NC neuronpárokat. Keresztkorrelációs analízisünk a két képlet szoros kapcsolatát mutatta. Azt találtuk, hogy a NC és a Sg között kétirányú információáramlás van, és a vizuális ingerlés hatására szinkronizálódhatnak vagy deszinkronizálódnak a Sg-NC neuronpárok (13)

Humán kísérleteinkben a látási funkciók fejlődését vizsgáltuk iskoláskorú egészséges és migrénben szenvedő iskoláskorú gyermekekben, kontúrintegrációs és kontrasztérzékenységi vizsgálatokkal. Ezen kísérleteink során megállapítást nyert, hogy migrénes gyermekekben a magnocellularis látórendszerhez köthető funkciók fejlődése a kontrollokhoz képest jelentősen elmarad, ami a magnocellularis látórendszer hosszabb ideig fennálló fejlődési sérülékenységére mutat rá (8,9,11). Az alkalmazott orthostasissal kombinált kisebb volumenvesztéssel kiváltott hipoxiás modellben elvégzett tanulmánynak kettős célja

volt: egyfelől törekedtünk arra, hogy kidolgozzuk egy kisebb mértékű volumenvesztés nem invazív, és a jelenlegi sphygmomanometeren alapuló módszernél pontosabb becslési módszerét; másfelől cél volt az is, hogy felmérjük, kisebb volumenvesztés orthostasissal kombinálva előidéz-e változásokat egy egyszerű kognitív feladat végrehajtásában. Eredményeink szerint a minor volumenvesztés megbecslésére az általunk alkalmazott plethysmographiás módszer nyújtotta értékek biztonsággal felválthatják a hagyományos sphygmomanometria-alapú módszereket. A kognitív teljesítményt a modellezett volumenvesztés nem befolyásolta, változás a P300 kiváltott válasz jellemzőiben sem volt megfigyelhető. Ez megerősíti korábbi, hypobarikus hypoxiás körülmények közt tett megfigyeléseket, hogy a minor hypoxiát a központi idegrendszer teljes mértékben képes kompenzálni, ezért az a feladatmegoldásban sem okoz visszaesést. A minor hypoxia tűrése tehát függetlennek látszik a kialakulás körülményeitől (Tuboly G, Rudas L, Csillik A, Nagy A, Benedek K, Benedek G, Braunitzer G Haemodynamic parameters and cognitive function during modeled acute volume loss, beküldve az Acta Physiologica Hungarica folyóirathoz).

Publikációk

1. Hoshino K, Eördegh G, Nagy A, Benedek G, Norita M Overlap of nigrothalamic terminals and thalamostriatal neurons in the feline lateralis medialis-suprageniculate nucleus. ACTA PHYSIOL HUNG 96: pp. 203-211 (2009) IF: 0.75

2. Márkus Z, Berényi A, Paróczy Z, Wypych M, Waleszczyk WJ, Benedek G, Nagy A Spatial and temporal visual properties of the neurons in the intermediate layers of the superior colliculus. NEUROSCI LETT 454: pp. 76-80 (2009) IF: 1.925

3. Berényi A, Gombkötő P, Farkas Á, Paróczy Z, Márkus Z, Averkin R, Benedek G, Nagy A How moving visual stimuli modulate the activity of the substantia nigra pars reticulata NEUROSCIENCE 163: pp. 1316-1326 (2009) IF: 3.292

4. Hoshino K, Horie M, Nagy A, Berényi A, Benedek G, Norita M Direct synaptic connections between superior colliculus afferents and thalamo-insular projection neurons in the feline suprageniculate nucleus: a double-labeling study with WGA-HRP and kainic acid. NEUROSCI RES 66: pp. 7-13 (2010) IF: 2.096

5. Rokszin A, Márkus Z, Braunitzer G, Berényi A, Wypych M, Waleszczyk WJ Benedek G, Nagy A Spatio-temporal visual properties in the ascending tectofugal system. CENT EUR J BIOL 5: pp. 21-30 (2010) IF: 0.685

6. Rokszin A, Márkus Z, Braunitzer G, Berényi A, Benedek G, Nagy A Visual pathways serving motion detection in the mammalian brain. SENSORS 10: pp. 3218-3242 (2010) IF: 1.771

7. Nagy A, Berényi A, Wypych M, Waleszczyk WJ, Benedek G Spectral receptive field properties of visually active neurons in the caudate nucleus. NEUROSCI LETT 48: pp. 148-153 (2010) IF: 2.055

8. Braunitzer G, Rokszin A, Kóbor J, Benedek G Is the development of visual contrast sensitivity impaired in children with migraine? An exploratory study. CEPHALALGIA 30: pp. 991-995 (2010) IF: 4.265

9. Benedek K, Janáky M, Braunitzer G, Rokszin A, Kéri S, Benedek G Parallel development of contour integration and visual contrast sensitivity at low spatial frequencies. NEUROSCI LETT 472: pp. 175-178 (2010) IF: 2.055

10. Gombkötő P, Rokszin A, Berényi A, Braunitzer G, Utassy G, Benedek G, Nagy A Neuronal code of spatial visual information int he caudate nucleus. NEUROSCIENCE 182: pp. 225–231 (2011) IF: 3.215

11. Braunitzer G, Rokszin A, Kóbor J, Nagy A, Sztriha L, Benedek G Development of visual contour integration in children with migraine without aura. CEPHALALGIA 31: pp. 1048-1056 (2011) IF: 4.265

12. Nagy AJ, Berényi A, Gulya K, Norita M, Benedek G, Nagy A Direct projection from the visual associative cortex to the caudate nucleus in the feline brain. NEUROSCI LETT 503: pp. 52-57 (2011) IF: 2.055

13. Rokszin A, Gombköto P, Berényi A, Márkus Z, Braunitzer G, Benedek G, Nagy A Visual stimulation synchronizes or desynchronizes the activity of neuron pairs between the caudate nucleus and the posterior thalamus. BRAIN RES 1418: pp. 52-63 (2011) IF: 2.623

ELECTROPHYSIOLOGICAL AND HISTOLOGICAL INVESTIGATION OF THE TECTOFUGAL MULTIMODAL SENSORY SYSTEM IN PHYSIOLOGICAL AND PATHOPHYSIOLOGICAL CONDITIONS

György Benedek[1], Attila Nagy[1], Antal Berényi[1], Gábor Braunitzer[1], Péter Gombkötő[1], Tamás Kincses[2]
[1]Depertment of Physiology, University of Szeged, [2]Department of Neurology, University of Szeged

The basic goal was to analyze information processing in the ascending tectofugal visual system in animal models and in human subjects, in physiological and pathophysiological conditions.

In our anatomical experiments we examined the connectivity of the tectofugal visual system and the basal ganglia. We have succeeded in finding a visual pathway between the reticular part of the substantia nigra (SNr) and the caudate nucleus (NC) in the cat. A major role in this connection is played by the dorsal suprageniculate nucleus of the thalamus (Sg), which transmits information from SNr to NC. We have also corroborated the morphological connection between the superior colliculus (CS) and the insular visual area of the visual association cortex, a two-synapse connection with Sg as a relay station (1,4). A direct visual pathway between the anterior ectosylvian sulcus and the NC has also been described (12).

Physiological experiments on anaesthetized cats have been carried out to describe the temporal and spatial characteristics of Sg, NC and the medial layers of the superior colliculus (SCi). Our findings indicate that neurons in all three structures respond optimally to extreme low spatial and very high temporal frequencies. Furthermore, they exhibit a narrow spatial and temporal frequency tuning (2,5). We have described spectral receptive field organization in CS and NC; neurons with simple, temporal, spatial and velocity tuning have been found in both structures (7). Based on our results we assume that the ascending tectofugal system plays a key role in motion sensation and that it is specialized for the sensation of visual changes linked to the animal's own motion (6). We have examined the inner receptive field structure of visual neurons in SNr. Neurons of simple, direction and velocity tuning have been found. More intriguingly, a group of neurons with stimulus parameter - dependent response characteristics has been discovered, which means that these neurons increased their activity to certain combinations of direction, velocity and size, while to other combinations they responded with decreased activity (3). We have corroborated that NC neurons of visual activity have panoramic localizing capabilities and we have provided evidence for the distributed population coding of spatial visual information in NC (10). Simultaneous extracellular single unit and local field potential registrations have been carried out in NC and Sg; neuron pairs were analyzed during simultaneous visual stimulation. A cross-correlation analysis revealed that the two structures are closely connected. We found that the flow of information between the two structures is bidirectional and that Sg-NC neuron pairs exhibit either synchronization or desynchronization upon visual stimulation (13).

One aspect that we examined in our human studies was the development of visual functions in childhood migraine, as compared with healthy controls. Psychophysical methods for testing achromatic contrast sensitivity and contour integration were applied. These studies revealed that in pediatric migraine the development of magnocellular visual functions is

significantly delayed, which calls attention to the prolonged developmental vulnerability of the magnocellular visual system (8,9,11).

In an other human project we developed a model of hypovolaemic hypoxia, in which we combined minor volume loss (blood donation) with orthostasis (tiltable bed). The purpose of the study was to find a noninvasive way of detecting even smaller volume loss which is easier to carry out and possibly more precise than the currently used (mostly sphygmomanometer-based) methods. Hemodynamic and EEG measurements were performed in a simulated volume loss paradigm, involving blood donation and orthostatic challenges to assess adaptive responses and cognitive performance. Cognitive performance was assessed in an oddball task and changes of the evoked potential P300 were analyzed. Both hemodynamic and cognitive parameters were recorded in 'pre-donation' and 'post-donation' conditions for purposes of comparison. Our study indicates that traditional sphygmomanometer- based values can safely be replaced by values yielded by finger plethysmography, combined with brief orthostatic challenges and that P300 as a cognitive marker cannot be used to assess volume loss. Therefore, and corroborating the results of previous studies carried out in hypobaric conditions, the central nervous system seems to be able to offset the effects of mild hypoxia, regardless of the initiating factor (Tuboly G, Rudas L, Csillik A, Nagy A, Benedek K, Benedek G, Braunitzer G. Haemodynamic parameters and cognitive function during modeled acute volume loss, submitted to Acta Physiologica Hungarica).

References

1. Hoshino K, Eördegh G, Nagy A, Benedek G, Norita M Overlap of nigrothalamic terminals and thalamostriatal neurons in the feline lateralis medialis-suprageniculate nucleus. ACTA PHYSIOL HUNG 96: pp. 203-211 (2009) IF: 0.75

2. Márkus Z, Berényi A, Paróczy Z, Wypych M, Waleszczyk WJ, Benedek G, Nagy A Spatial and temporal visual properties of the neurons in the intermediate layers of the superior colliculus. NEUROSCI LETT 454: pp. 76-80 (2009) IF: 1.925

3. Berényi A, Gombkötő P, Farkas Á, Paróczy Z, Márkus Z, Averkin R, Benedek G, Nagy A How moving visual stimuli modulate the activity of the substantia nigra pars reticulata NEUROSCIENCE 163: pp. 1316-1326 (2009) IF: 3.292

4. Hoshino K, Horie M, Nagy A, Berényi A, Benedek G, Norita M Direct synaptic connections between superior colliculus afferents and thalamo-insular projection neurons in the feline suprageniculate nucleus: a double-labeling study with WGA-HRP and kainic acid. NEUROSCI RES 66: pp. 7-13 (2010) IF: 2.096

5. Rokszin A, Márkus Z, Braunitzer G, Berényi A, Wypych M, Waleszczyk WJ Benedek G, Nagy A Spatio-temporal visual properties in the ascending tectofugal system. CENT EUR J BIOL 5: pp. 21-30 (2010) IF: 0.685

6. Rokszin A, Márkus Z, Braunitzer G, Berényi A, Benedek G, Nagy A Visual pathways serving motion detection in the mammalian brain. SENSORS 10: pp. 3218-3242 (2010) IF: 1.771

7. Nagy A, Berényi A, Wypych M, Waleszczyk WJ, Benedek G Spectral receptive field properties of visually active neurons in the caudate nucleus. NEUROSCI LETT 48: pp. 148-153 (2010) IF: 2.055

8. Braunitzer G, Rokszin A, Kóbor J, Benedek G Is the development of visual contrast sensitivity impaired in children with migraine? An exploratory study. CEPHALALGIA 30: pp. 991-995 (2010) IF: 4.265

9. Benedek K, Janáky M, Braunitzer G, Rokszin A, Kéri S, Benedek G Parallel development of contour integration and visual contrast sensitivity at low spatial frequencies. NEUROSCI LETT 472: pp. 175-178 (2010) IF: 2.055

10. Gombkötő P, Rokszin A, Berényi A, Braunitzer G, Utassy G, Benedek G, Nagy A Neuronal code of spatial visual information int he caudate nucleus. NEUROSCIENCE 182: pp. 225–231 (2011) IF: 3.215

11. Braunitzer G, Rokszin A, Kóbor J, Nagy A, Sztriha L, Benedek G Development of visual contour integration in children with migraine without aura. CEPHALALGIA 31: pp. 1048-1056 (2011) IF: 4.265

12. Nagy AJ, Berényi A, Gulya K, Norita M, Benedek G, Nagy A Direct projection from the visual associative cortex to the caudate nucleus in the feline brain. NEUROSCI LETT 503: pp. 52-57 (2011) IF: 2.055

13. Rokszin A, Gombköto P, Berényi A, Márkus Z, Braunitzer G, Benedek G, Nagy A Visual stimulation synchronizes or desynchronizes the activity of neuron pairs between the caudate nucleus and the posterior thalamus. BRAIN RES 1418: pp. 52-63 (2011) IF: 2.623

Teljes támogatás: 4 500 000 Ft

A KÓROS AGYI VAZOMÓCIÓ ÉS VAZOSPAZMUS KIALAKULÁSÁNAK MOLEKULÁRIS ALAPJAI

Benyó Zoltán, Sándor Péter, Horváth Béla András, Ruisanchez Éva, Benkő Rita, Cselenyák Attila, Fekete Katalin, Iring András, Németh Tamás, Őrsy Petra

Semmelweis Egyetem, Klinikai Kísérleti Kutató- és Humán Élettani Intézet

Az agyi erek átmérőjének alacsony frekvenciájú (4-12 / perc), látszólag spontán fluktuációja (vazomóció), valamint az agyi véráramlás ezzel párhuzamos oszcillációja számos cerebrovaszkuláris kórállapot kísérő jelensége. Megfigyelték például, hogy a subarachnoidealis vérzést követően kifejlődő vazospasmust gyakran előzi meg vazomóció, mely a két jelenség hasonló kóreredetére utalhat. Kísérleteinkben az agyi vazomóció és vazospasmus kialakulásának molekuláris mechanizmusait vizsgáltuk és az alábbi főbb eredményekre jutottunk:

1. A tromboxán A_2 szerepe a nitrogén monoxid hiányos állapotban kialakuló agyi vazomócióban.

Az nitrogén monoxid (NO) hiányában megfigyelhető agyi vazomóció és véráramlás-oszcilláció kialakulásának mechanizmusát vizsgáltuk, különös tekintettel a tromboxán A_2 (TXA_2) szerepére. Hipotézisünk szerint NO-hiányos állapotban a tromboxán-receptorok (TP) által közvetített jelátvitel túlzott érzékenysége hozzájárul a vazomóció kialakulásához.

Először hím Wistar-patkányokból izolált arteria cerebri media (MCA) szegmenteken vizsgáltuk kis dózisú (100 nM) TP-receptor agonista (U-46619) hatásait in vitro. Kontrollerekben az U-46619 gyenge kontrakciót okozott (21±9%, a 124 mM K^+ hatásához viszonyítva), vazomóciót azonban nem tapasztaltunk. Az NO-szintézis 100 µM nitro-L-arginin-metil-észterrel (L-NAME) történő gátlását követően az U-46619 kontrakciós hatása jelentősen megnőtt (54±9%) és valamennyi érben vazomóciót okozott, mely eltűnt a Rho-kinázt gátló Y-27632 (10 µM) adását követően. Endothelin-1, melynek a cerebrovaszkuláris simaizomban feltárt jelátviteli folyamatai hasonlóak a TXA_2-éhez, szintén vazomóciót váltott ki NO hiányában, amely hatás visszafordítható volt Y-27632-vel.

In vivo kísérleteinkben az MCA ellátási területéhez tartozó parietális agykéreg véráramlását (CoBF) vizsgáltuk altatott patkányokban lézer-Doppler technikával. Fiziológiás körülmények között 1 µg/kg iv. adott U-46619 sem kvantitatív, sem kvalitatív változást nem okozott a CoBF-ben, és az általános vérkeringési paramétereket sem változtatta meg. L-NAME (100 mg/kg iv.) hatására a CoBF oszcillálni kezdett, melynek Fourier-analízissel meghatározott csúcsa 144±10 mHz-nél volt. Ezt követően U-46619 adására az oszcilláció jellemző frekvenciája nem változott (144±11 mHz), ugyanakkor amplitúdója 54±12%-kal fokozódott. Ezzel szemben a tromboxán-szintáz gátlószer ozagrel (10 mg/kg iv.) szignifikánsan csökkentette az NO-szintézis gátlását követően kialakuló véráramlás-oszcillációk amplitudóját. Eredményeink szerint az agyi érrendszer NO hiányában fokozott érzékenységet mutat a tromboxán-receptorok aktiválódására, és ez kórosan fokozott vazomócióhoz ill. vazospazmushoz vezethet.

2. Dinorfin A expressziója és erős vazokonstriktor hatása agyi erekben.

Számos természetes és szintetikus opiát-receptor agonistáról ismert, hogy jelentős hatásuk van az agyi véráramlásra, azonban a dinorfinokat ebből a szempontból alig vizsgálták. Immunhisztokémiai analízissel azt találtuk, hogy az agyi artériák adventitiájában kimutatható dinorfin A jelenléte, mégpedig a perivaszkuláris idegek végződéseiben. Az alkalmazott primer antitest specificitását vizsgálva igazoltuk, hogy az endogén dinorfinok közül a dinorfin A (1-17)-tel és (1-13)-mal reagál, még az (1-8)-cal nem, mint ahogy a dinorfin B-vel sem.

Ezt követően a különböző dinorfinok értónusra kifejtett hatásait vizsgáltuk patkányokból izolált MCA és a. basilaris (BA) szegmentekben. Mindkét érben a dinorfin A (1-17) és (1-13) rendkívül erős, a 124 mM K^+-al kiváltott referencia-kontrakciót meghaladó érösszehúzódást eredményezett, még a dinorfin A (1-8) és dinorfin B ilyen hatást nem mutatott. A továbbiakban a dinorfin A (1-13)

hatásait közvetítő jelátviteli folyamatokat vizsgáltuk. Mind a κ-opiát receptor antagonista nor-binaltorphimin, mind pedig a κ-opiát receptorok G_i-fehérjék általi jelátvitelét gátló pertussis toxin csökkentette a dinorfin A (1-13) kontrakciós hatását, de egyik gátlószer sem volt képes azt teljes mértékben megszüntetni. Ebből arra következtettünk, hogy a dinorfin A vazokonstriktor hatását csak részben közvetítik κ-opiát receptorok. E hipotézis mellett szól az a megfigyelésünk is, hogy a κ-opiát receptorokhoz nem kötődő dinorfin A (2-13) szignifikáns, de a dinorfin A (1-13)-nál gyengébb vazokonstrikciót okozott, ami rezisztens volt nor-binaltorphiminre.

Eredményeink szerint a dinorfin A (1-13) és (1-17) rendkívül erős agyi vazokonstriktor hatásaiért kettős mechanizmus felelős: a κ-opiát receptor aktivációja és egy ettől független folyamat, mely valószínűleg a 9-13 aminosavak jelenlétéhez köthető. Megfigyeléseink jelentőségét fokozza az a tény, hogy a dinorfin A (1-13) egyik fő metabolitja a cerebrospinális folyadékban a dinorfin A (2-13), így mind a κ-opiát receptorok által közvetített, mind pedig az attól független vazokonstrikció hatással lehet az agyi vérkeringésre a dinorfin A fokozott felszabadulásával járó kórállapotokban.

3. Féloldali artéria carotis elzárás hatása az agyi véráramlásra

Az a. carotis féloldali elzáródása gyakran nem, vagy csak minimális mértékben okoz neurológiai tüneteket, ami az agyi makro- és mikrocirkuláció kiváló adaptációs képességére utal. Távolabbi célunk ezen alkalmazkodási folyamat molekuláris mechanizmusainak megismerése transzgenikus egér-modellek alkalmazásával. Ennek első lépéseként azt vizsgáltuk, milyen változások alakulnak ki C57BL/6J egerek agykérgi mikrocirkulációjában féloldali carotis-elzáródást követően.

Altatott felnőtt hím egerekben az agykérgi véráramlást (CoBF) laser-speckle technikával mértünk mindkét parietális lebenyben. Carotis-elzárás hatására az érintett oldal véráramlása mintegy 10 %-kal csökkent, míg a túloldali CoBF nem változott szignifikánsan. Hypercapnia, (5 % CO_2) alatt mindkét félteke véráramlása hasonló mértékben fokozódott. A kis frekvenciájú CoBF-oszcillációk paraméterei egyik féltekében sem változtak a carotis-elzárást követően, hypercapniában viszont mindkét féltekében lecsökkent az amplitudójuk a jellemző frekvencia megváltozása nélkül. Mivel a tapasztalt változások az emberben leírtakhoz nagyon hasonlóak voltak, a modell alkalmasnak látszik a humán kórállapotban kialakuló adaptáció molekuláris mechanizmusainak a vizsgálatára.

Legfontosabb közlemények:

1. Horváth B, Lenzsér G, Benyó B, Németh T, Benkő R, Iring A, Hermán P, Komjáti K, Lacza Z, Sándor P, Benyó Z: Hypersensitivity to thromboxane receptor mediated cerebral vasomotion and CBF oscillations during acute NO-deficiency in rats. **PLoS ONE** 5: e14477, 2010 **(IF: 4.411)** (doi: 10.1371/journal.pone.0014477)
2. Buday A, Őrsy P, Godó M, Mózes M, Kökény G, Lacza Z, Koller Á, Ungvári Z, Gross M-L, Benyó Z, Hamar P: Elevated systemic TGF-ß impairs aortic vasomotor function through activation of NADPH oxidase-driven superoxide production and leads to hypertension, myocardial remodelling, and increased plaque formation in $apoE^{-/-}$ mice. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology** 299: H386-H395, 2010 **(IF: 3,880)**
3. Iring A, Horváth B, Benyó B, Tillson M, Bakken B, Benyó Z: Influence of unilateral caroid artery occlusion ont he cerebrocortical microcirculation in mice: a laser-speckle study. **Acta Physiologica Hungarica** 97: 447, 2010
4. Ruisanchez É, Németh T, Cselenyák A, Káldi K, Papp RS, Sándor P, Benyó Z: Perivascular expression and potent vasoconstrictor effect of dynorphin A in cerebral arteries. **PLoS ONE** under revision

Budget: 4 500 000 HUF

MOLECULAR MECHANISMS OF PATHOLOGICAL CEREBRAL VASOMOTION AND VASOSPASM

Zoltán Benyó, Péter Sándor, Béla András Horváth, Éva Ruisanchez, Rita Benkő, Attila Cselenyák, Katalin Fekete, András Iring, Tamás Németh, Petra Őrsy

Semmelweis University, Institute of Human Physiology and Clinical Experimental Research

Low frequency (4-12 cpm) spontaneous fluctuations of the cerebral vessel diameter (vasomotion) and oscillations of the cerebral blood flow (CBF) have been reported in several diseases associated with cerebrovascular dysfunction including stroke, diabetes and hypertension. It has also been reported that cerebral vasomotion often precedes the development of vasospasm, which may lead to ischemic lesion of the brain and ultimately to death. The aim of our studies was to investigate the molecular mechanisms involved in the development of cerebral vasomotion and vasospasm. The following results have been obtained:

1. Role of thromboxane A_2 in the development of cerebral vasomotion during NO-deficiency

Cerebrovascular endothelial dysfunction and impaired release of endothelium-derived nitric oxide (NO) has been implicated in the development of vasomotion and vasospasm. Since NO suppresses platelet aggregation as well as vascular release of thromboxane A_2, NO-deficiency is often associated with activation of thromboxane receptors (TP). We hypothesized that in the absence of NO, hypersensitivity of the TP-receptor mediated cerebrovascular signalling pathway promotes vasomotion.

In isolated rat middle cerebral arteries the TP-receptor agonist U-46619 in a concentration of 100 nM, which was without any effect under physiological conditions, induced sustained vasomotion after inhibition of the NO synthesis. Similarly, intravenous administration of 1 μg/kg U-46619 to anesthetized rats failed to induce any changes of the systemic or cerebral circulatory parameters under physiological conditions but aggravated CBF-oscillations after NO-blockade. Both the cerebral vasomotion in vitro and the CBF oscillations in vivo after inhibition of the NO-synthesis were sensitive to inhibitors of the TXA_2 synthase. Furthermore, inhibition of the signalling pathway mediated by the small G protein RhoA and Rho-kinase was able to reverse the vasomotion- and CBF-oscillation-inducing effects of U-46619. Therefore, our results indicate that hypersensitivity of the TP-receptor- and Rho-kinase- mediated signalling pathway is a pathogenic factor in the development of cerebral high-amplitude vasomotion which may propagate to vasospasm in pathophysiological states associated with NO-deficiency.

2. Sustained vasoconstrictor effect of dynorphin A in cerebral arteries

Numerous literary data indicate that dynorphin A (DYN-A) has a significant impact on the cerebral circulation, especially under pathophysiological conditions, but its potential direct influence on the tone of cerebral vessels is obscure. We aimed 1) to clarify if DYN-A is present in cerebral perivascular nerves, 2) to determine if it exerts any direct effect on the cerebrovascular tone and if so 3) to analyze the role of κ-opiate receptors in mediating the effect.

Immunohistochemical analysis revealed the expression of DYN-A in perivascular nerves of both human and rat cerebral arteries. DYN-A was co-localized with synaptophysin indicating its storage in presynaptic vesicles. In isolated rat basilar and middle cerebral arteries (BAs and MCAs) DYN-A (1-13) and (1-17) but not DYN-A (1-8) or dynorphin B (DYN-B) induced strong vasoconstriction in micromolar concentrations. The maximal effects (E_{max}), compared to a reference contraction induced by 124 mM K^+, were 115±6% and 104±10% in BAs and 113±3% and 125±9% in MCAs for DYN-A (1-13) and (1-17), respectively. The vasoconstrictor effects of DYN-A (1-13) could be inhibited but not abolished by both the κ-opiate receptor antagonist nor-Binaltorphimine (NORBI) or blockade of $G_{i/o}$-protein mediated signaling by pertussis toxin. Finally, des-Tyr^1 DYN-A (2-13), which reportedly fails to activate κ-opiate receptors, induced constriction of cerebral arteries with

an E_{max} of 45±11% in BAs and 50±5% in MCAs, and these effects were resistant to NORBI. Our results indicate that DYN-A is present in human and rat cerebral perivascular nerves and induce sustained contraction of rat cerebral arteries. This vasoconstrictor effect is only partly mediated by κ-opiate receptors and heterotrimeric $G_{i/o}$-proteins. To our knowledge our present findings are the first indications that dynorphin A has a direct cerebrovascular effect and that a dynorphin-induced vascular effect may be, at least in part, independent of κ-opiate receptors.

3. Effects of unilateral carotid artery occlusion on the cerebrocortrical blood flow

Unilateral occlusion of the carotid artery (CA) in humans usually results in no or minimal neurological symptoms, indicating that the cerebral circulation is able to adapt to changes of the perfusion pressure in the circle of Willis. Since we would like to identify the underlying molecular mechanisms of this phenomenon by investigating transgenic mouse models, as a first step we analyzed the effects of unilateral CA occlusion on the cerebrocortical microcirculation of control C57BL/6J mice.

Cerebrocortical blood flow (CoBF) was measured in anesthetized adult male mice with laser-speckle technique in the microcirculation of both hemispheres. After blood flow has been stabilized following surgery, the left common CA was ligated, and 10 minutes later the mice were exposed to 5 % CO_2. CoBF was determined under baseline conditions, after the CA ligation, and during hypercapnia. Low frequency (4-12 cpm) oscillations of the CoBF were characterized by the peak amplitude and the corresponding frequency of normalized power spectral density in order to evaluate, whether the vessels were dilated to their maximal degree, which is indicated by the disappearance of vasomotion. Mean CoBF in the ipsilateral hemisphere reduced by 10 % after CA occlusion, while remained unchanged in the contralateral side. During hypercapnia, the blood flow increased similarly in both hemispheres. Low-frequency CoBF-oscillations remained unaltered after CA ligation. During hypercapnia, however, their amplitude decreased significantly in both hemispheres, while the dominant frequency remained unchanged. Taken together, after CA ligation the blood flow diminished by a smaller degree than expected in contempt of the decrease of perfusion pressure, which observation indicates the development of compensatory vasodilatation. However, the presence of slow-wave oscillations indicates that the relaxation has not reached its maximal extent. This conclusion is also supported by the fact, that hypercapnia was able to enhance CoBF on the affected side and diminished the oscillations as well. Since the observed changes are similar to those described in humans after unilateral CA occlusion, the present experimental model appears to be suitable for further studies on the molecular mechanisms of the cerebrovascular adaptation.

Main Publications:

1. Horváth B, Lenzsér G, Benyó B, Németh T, Benkő R, Iring A, Hermán P, Komjáti K, Lacza Z, Sándor P, Benyó Z: Hypersensitivity to thromboxane receptor mediated cerebral vasomotion and CBF oscillations during acute NO-deficiency in rats. **PLoS ONE** 5: e14477, 2010 **(IF: 4.411)** (doi: 10.1371/journal.pone.0014477)
2. Buday A, Őrsy P, Godó M, Mózes M, Kökény G, Lacza Z, Koller Á, Ungvári Z, Gross M-L, Benyó Z, Hamar P: Elevated systemic TGF-ß impairs aortic vasomotor function through activation of NADPH oxidase-driven superoxide production and leads to hypertension, myocardial remodelling, and increased plaque formation in $apoE^{-/-}$ mice. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology** 299: H386-H395, 2010 **(IF: 3,880)**
3. Iring A, Horváth B, Benyó B, Tillson M, Bakken B, Benyó Z: Influence of unilateral caroid artery occlusion ont he cerebrocortical microcirculation in mice: a laser-speckle study. **Acta Physiologica Hungarica** 97: 447, 2010
4. Ruisanchez É, Németh T, Cselenyák A, Káldi K, Papp RS, Sándor P, Benyó Z: Perivascular expression and potent vasoconstrictor effect of dynorphin A in cerebral arteries. **PLoS ONE** under revision

Teljes támogatás: 3,300.000,- Ft

CEREBROVASCULARIS BETEGSÉGEK EPIDEMIOLÓGIAI ÉS KLINIKAI VIZSGÁLATA: TERÜLETI KÜLÖNBSÉGEK ÉS HATÁSUK A STROKE KIMENETELÉRE

Bereczki Dániel[1], Gunda Bence[1], Vastagh Ildikó[1], Fekete Klára[2], Kozák Norbert[2]
[1]Semmelweis Egyetem Neurológiai Klinika, [2]Debreceni Egyetem OEC Neurológiai Klinika

A pályázat során adatbázisokat hoztunk létre és alkalmaztunk a cerebrovascularis betegségek jellegzetességeit és kimenetelét befolyásoló tényezők vizsgálatára. Elemeztük az általunk létrehozott több mint 8000 beteg adatát tartalmazó Debreceni Stroke Adatbázist, a közel 1000 esetet tartalmazó, Marosvásárhely-Ungvár-Debrecen adatbázist, valamint a pályázat során létrehoztuk a Budapest VIII-XII kerületi adatbázist. A cerebrovascularis betegségeket befolyásoló szénhidrát anyagcsere zavarok hatásának vizsgálatára kiegészítő eset-kontroll vizsgálatokat végeztünk 1. típusú diabetes mellitusban, valamint gestatiós diabetesben. Elemeztük az agyi kisérbetegségek jellegzetességeit.
Megállapítottuk, hogy az ischemiás stroke acut szakaszában még az enyhe vércukorszint-emelkedés is magasabb 30-napos halálozással jár, és a magasabb vércukor érték általi kockázat nagyobb a nem diabeteses betegcsoportban. A nagy erek morfológiai és funkcionális vizsgálatával fiatal, 1. típusú diabetesben azt tapasztaltuk, hogy a nagy elasztikus arteriák jelentős morfológiai és funkcionális változásai 10 éves betegségtartam után jelennek meg, és legkorábban az érfalmerevség és az intima-media vastagság változik. Ennek megfelelően, a néhány hónapon át fennálló, jól kezelt gestatiós diabetesben morfológiai és funkcionális eltéréseket sem találtunk az elasztikus erekben a 3. trimeszterben. A stroke előtti dohányzás és alkoholfogyasztás következményeinek epidemiológiai vizsgálatakor nem találtunk kapcsolatot a kialakult acut stroke súlyossága és a korábbi dohányzás és alkoholizálás között. Bár vérzéses stroke-okban nagyobb volt a halálozási arány 30 napnál és 1 évnél is az alkoholizálók között, a teljes csoportban a stroke előtti alkoholfogyasztási és dohányzási szokások nem társultak a halálozással és a stroke kimenetelével 1 hónappal és 1 évvel a stroke után. Ezek alapján azt következtettük, hogy a dohányzás és az alkoholizálás ugyan növelik a stroke kockázatát, de nem társulnak jelentős mértékben a stroke súlyosságával és rövid- vagy hosszú távú kimenetelével. A marosvásárhelyi és debreceni adatok összehasonlításakor különbségeket találtunk a kezelt és nem kezelt magasvérnyomás arányában, illetve arra utaló adatokat találtunk, hogy a stroke acut szakában mind a nagyon alacsony, mind a nagyon magas vérnyomásértékek rontják a stroke kimenetelét. A hazai ellátás viszonyainak epidemiológiai elemzésekor azt találtuk, hogy 2009-ben a stroke esetek közel kétharmadát neurológiai osztályokon látták el, és az egyéb osztályon kezeltekhez képest a neurológiai stroke osztályokon történő kezelés mellett kisebb volt a halálozás és rövidebb az ápolási idő. A subarachnoidealis vérzések előfordulásának elemzésekor a korábban feltételezettnél nagyobb gyakoriságot (országosan 1000 fölötti éves esetszám), és relative alacsony kórházi halálozást (12,2%) találtunk. Egy osztály adatainak előzetes vizsgálatával felvetődött, hogy az életszínvonalnak jelentős hatása lehet a stroke kockázatára. A felvetés alapján hároméves követéses vizsgálatot végeztünk a budapesti VIII. és XII. kerületi stroke esetek elemzésére. Epidemiológiai módszerekkel anonimizált adatbázist hoztunk létre, mely a demográfiai adatok mellett a két kerületben 2007-ben kórházi ellátásban részesülő stroke esetek túlélését vizsgálta 3 évvel később. A két kerület jövedelmi viszonyait tekintve Budapest második és legutolsó kerületeit jelentik. A stroke után 3 évvel a halálozási arány nem különbözött jelentősen a két kerületben (36% és 31%, $p=0.24$). Az alapellátás intenzitása is hasonló (az egy háziorvosra jutó lakosságszám 554 és 544). A stroke-ok közül az agyvérzések jelentősen gyakoribbak a szegény kerületben. A halállal végződő stroke 12 évvel fiatalabb korban jelentkezett férfiakban az alacsonyabb életszínvonalú kerületben (70±13 és 82±9 év, $p<0.001$). Míg a szegényebb kerületben a férfiak a nőknél 5 évvel fiatalabb korban kapnak halállal végződő stroke-ot (70±13 és 75±12 év), a jobb életkörülményekkel rendelkező kerületben nem volt ilyen különbség a nemek között (82 ±9 és 82±8 év). Eredményeink alapján a nemzeti stroke programokban az elsődleges prevenciós tevékenységnek elsősorban a rosszabb életszínvonalú régiók férfi lakosságára kell koncentrálni.

Teljes támogatás: 3,300.000,- Ft

Az ismertetett eredményeket bemutató teljes terjedelmű közlemények jegyzéke:

Vastagh I, Horváth T, Nagy G, Varga T, Juhász E, Juhász V, Kollai M, Bereczki D, Somogyi A: Evolution and predictors of morphological and functional arterial changes in the course of type 1 diabetes mellitus. DIABETES METAB RES 26: pp. 646-655 (2010) IF: 3,094

Nagy J, Kovács T, Késői I, Tóth P, Sági B, Szapáry L, Vas T, Komoly S, Koller Á, Wittmann I, Bereczki D, Kiss I: Krónikus vesebetegségben a stroke gyakori, súlyos, de megelőzhető cardiovascularis szövődmény. HYPERTONIA ÉS NEPHROLOGIA 14: pp. 93-101 (2010) IF: 0.

Bereczki D, Csiba L, Ajtay A: Az akut stroke ellátás aktuális kérdései. Háziorvos Továbbképző Szemle 15: pp. 578-581 (2010) IF: 0

Vastagh I, Constantin T, Kéri A, Rudas G, Fekte G, Bereczki D: A Fabry-kór neurológiai szövődményei. IDEGGYOGY SZ 64: pp. 29-35 (2011) IF: 0,236

Bereczki D, Vastagh I: A perifériás és a centrális vérnyomás jelentősége a neurológus szemszögéből. HYPERTONIA ÉS NEPHROLOGIA 15: pp. 11-15 (2011) IF: 0

Gunda B, Chabriat H, Bereczki D: CADASIL és egyéb familiáris agyi kisérbetegségek. Az öröklődő ischaemiás stroke és dementia mind gyakrabban diagnosztizált háttere**.** IDEGGYOGY SZ 64: pp. 88-100 (2011) IF: 0,236

Bereczki D, Ajtay A: Neurológia 2009: helyzetfelmérés a magyarországi neurológiai kapacitásokról, azok kihasználtságáról és a szakorvosokról a 2009-es intézményi jelentések alapján. IDEGGYOGY SZ 2011;64: pp. 173-185. IF: 0,236

Vastagh I, Horváth T, Garamvölgyi Z, Rosta K, Folyovich A, Rigó J, Kollai M, Bereczki D, Somogyi A: Preserved structural and functional characteristics of common carotid artery in properly treated normoglycemic women with gestational diabetes mellitus. ACTA PHYSIOL HUNG 98: pp. 294-304 (2011) IF: 1,226

Kozák N, Szabó S, Ajtay A, Bereczki D: Adatok a magyarországi subarachnoidealis vérzésekről. A kórházak 2009. évi jelentései alapján készült elemzés. IDEGGYOGY SZ 64: pp. 394-398 (2011) IF: 0,236

Zsuga J, Gesztelyi R, Juhász B, Kemény-Beke Á, Fekete K, Csiba L, Mihálka L, Bereczki D: Different effect of hyperglycemia on stroke outcome in non-diabetic and diabetic patients – a cohort study. NEUROL RES 34: pp. 72-79 (2012) IF: 1,621

Szőcs I, Szatmári S, Fekete K, Orbán-Kis K, Vastagh I, Folyovich A, Ajtay A, Bereczki D: Egyéves követéses vizsgálat stroke után: megvalósíthatósági előtanulmány a budapesti Józsefvárosban. IDEGGYOGY SZ, 2012, in press. IF: 0,236

Fekete K, Szatmári S, Szőcs I, Szekeres C, Szász J, Mihálka L, Smolanka V, Kardos L, Csiba L, Bereczki D. Self-reported pre-stroke alcohol consumption and smoking are not associated with initial stroke severity, disability at discharge and case fatality at 30 days and 1 year. ***BMC Neurology***, közlésre benyújtva

Teljes támogatás: 3,300.000,- Ft

EPIDEMIOLOGICAL AND CLINICAL STUDIES OF CEREBROVASCULAR DISEASES: REGIONAL DIFFERENCES AND THEIR EFFECT ON STROKE OUTCOME

Dániel Bereczki[1], Bence Gunda[1], Ildikó Vastagh[1], Klára Fekete[2], Norbert Kozák[2]
[1]Department of Neurology, Semmelweis University, [2]Department of Neurology, University of Debrecen, Health Science and Medical Center

In the project we applied databases to analyze factors affecting the outcome of cerebrovascular diseases. We studied the Debrecen Stroke Database, established previously by us, with data of over 8000 consecutive patients with acute cerebrovascular disease; the Mures-Uzhgorod-Debrecen database with over 1000 cases, and during the period of this grant we established the Budapest Districts 8-12 stroke database. To evaluate the effects of disturbed carbohydrate metabolism on cerebrovascular diseases we performed supplementary case-control studies in type-1 diabetes and in gestational diabetes. We analyzed characteristics of cerebral small vessel disease.
We found that in the acute phase of ischemic stroke even mild elevation of blood glucose is associated with worse outcome defined as 30-day case fatality, and that the risk is higher in non-diabetics. In type-1 diabetes we evaluated morphological and functional features of large elastic arteries and found significant changes mostly after 10 years of disease duration. Arterial stiffness and intima-media thickness are the features that are affected relatively earlier in the course of the disease. In line with this observation, we found neither morphological nor functional alterations in short-lasting well-treated gestational diabetes in the 3rd trimester. In our study on the effect of pre-stroke smoking and alcohol consumption we found no association of these factors with the severity of stroke at onset. Although in hemorrhagic stroke there was a higher case fatality among alcohol consumers both at 30 days and at 1 year after stroke, in the whole stroke patient group pre-stroke alcohol and smoking habits were not associated with case fatality and stroke outcome at 1 month and at 1 year after stroke. We therefore concluded that although established risk factors, drinking and smoking habits are not associated with stroke severity and either short-term or long-term outcome. When comparing strokes between Marosvásárhely and Debrecen, we found differences in the rates of treated hypertension, and found that both low and extremely high blood pressure in the acute phase are associated with worse outcome. In the epidemiological evaluation of stroke services in Hungary we found that two-thirds of stroke patients are treated at neurological stroke units, and compared to stroke cases at other units, hospital case fatality is lower and hospitalization is shorter in neurological units. When analyzing national data on subarachnoid hemorrhage we found higher incidence (over 1000 cases per year) and lower hospital case fatality (12,2%) than estimated earlier. Our preliminary study suggested that standard of living may have an effect on stroke risk and outcome. Based on this assumption we performed a 3-year follow-up of hospitalized stroke cases in 2 districts of Budapest. District 12 has the second highest whereas district-8 the lowest income per person in Budapest. We established an anonymized database and analyzed survival status 3 years after the index stroke. Case fatality 3 years after stroke was similar in the 2 districts (36% and 31%, $p=0.24$). Intensity of primary care was also similar (554 and 544 inhabitants per GP). Hemorrhagic strokes were significantly more frequent in the poor district. Fatal strokes hit men 12 years earlier in the less wealthy district (70±13 and 82±9 years, $p<0.001$). Whereas men in the poor district had their fatal strokes at 5 years younger age than women (70±13 and 75±12 years), there was no such difference between genders in the wealthier district (82 ±9 and 82±8 years). Based on our findings we suggest that in national stroke programs primary prevention should focus more on the male population of less wealthy regions.

Teljes támogatás: 3,300.000,- Ft

Full text publications from this grant:

Vastagh I, Horváth T, Nagy G, Varga T, Juhász E, Juhász V, Kollai M, Bereczki D, Somogyi A: Evolution and predictors of morphological and functional arterial changes in the course of type 1 diabetes mellitus. DIABETES METAB RES 26: pp. 646-655 (2010) IF: 3,094

Nagy J, Kovács T, Késői I, Tóth P, Sági B, Szapáry L, Vas T, Komoly S, Koller Á, Wittmann I, Bereczki D, Kiss I: Krónikus vesebetegségben a stroke gyakori, súlyos, de megelőzhető cardiovascularis szövődmény. HYPERTONIA ÉS NEPHROLOGIA 14: pp. 93-101 (2010) IF: 0.

Bereczki D, Csiba L, Ajtay A: Az akut stroke ellátás aktuális kérdései. Háziorvos Továbbképző Szemle 15: pp. 578-581 (2010) IF: 0

Vastagh I, Constantin T, Kéri A, Rudas G, Fekte G, Bereczki D: A Fabry-kór neurológiai szövődményei. IDEGGYOGY SZ 64: pp. 29-35 (2011) IF: 0,236

Bereczki D, Vastagh I: A perifériás és a centrális vérnyomás jelentősége a neurológus szemszögéből. HYPERTONIA ÉS NEPHROLOGIA 15: pp. 11-15 (2011) IF: 0

Gunda B, Chabriat H, Bereczki D: CADASIL és egyéb familiáris agyi kisérbetegségek. Az öröklődő ischaemiás stroke és dementia mind gyakrabban diagnosztizált háttere**.** IDEGGYOGY SZ 64: pp. 88-100 (2011) IF: 0,236

Bereczki D, Ajtay A: Neurológia 2009: helyzetfelmérés a magyarországi neurológiai kapacitásokról, azok kihasználtságáról és a szakorvosokról a 2009-es intézményi jelentések alapján. IDEGGYOGY SZ 2011;64: pp. 173-185. IF: 0,236

Vastagh I, Horváth T, Garamvölgyi Z, Rosta K, Folyovich A, Rigó J, Kollai M, Bereczki D, Somogyi A: Preserved structural and functional characteristics of common carotid artery in properly treated normoglycemic women with gestational diabetes mellitus. ACTA PHYSIOL HUNG 98: pp. 294-304 (2011) IF: 1,226

Kozák N, Szabó S, Ajtay A, Bereczki D: Adatok a magyarországi subarachnoidealis vérzésekről. A kórházak 2009. évi jelentései alapján készült elemzés. IDEGGYOGY SZ 64: pp. 394-398 (2011) IF: 0,236

Zsuga J, Gesztelyi R, Juhász B, Kemény-Beke Á, Fekete K, Csiba L, Mihálka L, Bereczki D: Different effect of hyperglycemia on stroke outcome in non-diabetic and diabetic patients – a cohort study. NEUROL RES 34: pp. 72-79 (2012) IF: 1,621

Szőcs I, Szatmári S, Fekete K, Orbán-Kis K, Vastagh I, Folyovich A, Ajtay A, Bereczki D: Egyéves követéses vizsgálat stroke után: megvalósíthatósági előtanulmány a budapesti Józsefvárosban. IDEGGYOGY SZ, 2012, in press. IF: 0,236

Fekete K, Szatmári S, Szőcs I, Szekeres C, Szász J, Mihálka L, Smolanka V, Kardos L, Csiba L, Bereczki D. Self-reported pre-stroke alcohol consumption and smoking are not associated with initial stroke severity, disability at discharge and case fatality at 30 days and 1 year. ***BMC Neurology***, submitted for publication

Teljes támogatás: 3.000.000 ,-Ft

A HUMÁN KARNITIN HOMEOSZTÁZIS VIZSGÁLATA TANDEM TÖMEGSPEKTROMETRIÁVAL

Berenténé Bene Judit[1], Melegh Béla[1]
[1]PTE KK Orvosi Genetikai Intézet, Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ

A karnitin molekula jól ismert tulajdonsága, hogy enzimatikus reakciók segítségével zzírsavakkal észtereket képez. A gyakran klasszikusnak is nevezett élettani szerepe is a molekula ezen képességével függ össze: a karnitin regulatórikus szerepet játszik a hosszú szénláncú zsírsavak égetésében és ezzel kapcsolódóan a ketogenezisben. Habár a karnitin mennyiségének 99 %-a intracelluláris, a szérum acilkarnitinek (AC) és a szabad karnitin (FC) közötti kapcsolat nagyon érzékeny a mitokondriumon belüli anyagcsere változásokra.

A pályázati tervben kitűzött célok között szerepelt a veseelégtelenségben szenvedő betegek karnitin anyagcseréjének a vizsgálata. Munkánk első részeként a karnitin szupplementáció szerepét vizsgáltuk ezen betegcsoportban tandem tömegspektrometriával. A hemodialízisben részesülő betegek 12 héten keresztül, heti 3 alkalommal 1g/iv karnitint kaptak. A betegek monitorozása 29 héten át tartott. A vizsgálathoz éhgyomri szérum mintákat gyűjtöttünk. Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a kiindulási időpontban egy szignifikánsan csökkent szabad karnitin szint volt mérhető a betegekben, emellett az általunk vizsgált 27 acilkarnitinből 16 esetében 1,5-16-szoros koncentráció emelkedést észleltünk az egészséges kontrollokhoz képest. A karnitin szupplementációs időszakban a különböző észterek mennyisége 4-féle mintázat szerint változott: 1. az emelkedés gyors volt és korai telítésbe ment, 2. lassabb emelkedés, 3. még lassabb emelkedés egy késői platóval, 4. folyamatos emelkedés. Három hónappal a kezelés abbahagyását követően jelentős koncentráció csökkenést tapasztaltunk majdnem az összes észter esetében. A karnitin szupplementáció a cirkuláló észterek szintjét eltérő dinamikával és kinetikával befolyásolta, ami arra utalhat, hogy a tápanyagok egy szabályozott, nem véletlenszerű, adaptív módon reallokálódnak.

Munkánk második részeként a hemodialízis karnitin észter profilra gyakorolt hatását tanulmányoztuk veseelégtelenségben szenvedő betegek körében tandem tömegspektrometriával. A betegek a vizsgálat megkezdése előtt 12 héten keresztül karnitin szupplementációban részesültek, majd ezt követően a vizsgálathoz éhgyomri szérum mintákat gyűjtöttünk a betegektől dialízis előtt, a 4 órás dialízis alatt óránként és a dialízis után félórával. A natív szérumokból megfelelő mintaelőkészítés és származékképzést követően elvégeztük a tömegspektrometriás vizsgálatokat. A kutatás 20 beteg bevonásával történt, kontrollként 37 egészséges felnőtt ember mintáját használtuk. Vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a dialízis hatására progresszív csökkenés lépett fel a szabad karnitin valamint a rövid-, a közepes szénláncú zsírsavakkal és a dikarbonsavakkal képzett acilkarnitinek koncentrációjában. A csökkenés mértéke a közepes szénláncú észterek esetében kisebb, mint a rövid szénláncúaknál. Továbbá azt tapasztaltuk, hogy a dialízisnek nincs látszólagos hatása a hosszú szénláncú észterek szérumbeli koncentrációjára.

Munkánk harmadik részében a dialízist közvetlenül követő exogén karnitin bevitel megszakításának a karnitin észter profilra gyakorolt hatását vizsgáltuk 18 karnitinnel előzetesen szupplementált ESRD betegben. A vizsgálathoz a dialízis kezelés előtt és 44 órával dialízis után gyűjtöttünk mintákat. Vizsgálataink során a két dialízis közötti időszakban drámaian csökkent szabad karnitin, rövid- és közepes szénláncú zsírsavakkal képzett acilkarnitin szintet találtunk, mely szintek bár kezdtek visszaemelkedni, azonban nem érték el csak az 50-72%-át a dialízis előtti értéknek. Vizsgálataink azt mutatják, hogy egyetlen szupplementációs karnitin dózis kimaradása már drámai csökkenéssel és a karnitin észterek profiljának átrendeződésével jár.

Karnitin anyagcsere területén végzett kutatásaink során megvizsgáltuk 1-es, 2-es típusú diabetesben és metabolikus szindrómában szenvedő betegek esetén az alapbetegség karnitinészter profilra gyakorolt hatását. Az egyedi karnitin észterekben bekövetkező változások az egészséges kontrollokhoz képest hasonló mintázatot mutattak mindhárom vizsgált betegcsoportban. Jelentős emelkedést figyeltünk meg majdnem az összes rövid szénláncú acilkarnitin szintjében, ezzel

szemben a közepes és a hosszú szénláncú észterek többsége alacsonyabb volt. A szabad karnitin és az összkarnitin szintje mindegyik betegcsoportban alacsonyabb volt a kontrollokhoz képest. Mélyreható változásokat detektáltunk a karnitin észter profilban mindhárom betegcsoportban. A hasonlóságok a profil mintázatokban arra utalhatnak, hogy az azonos metabolikus rendszerek részvétele különböző mértékű a rendszer szemléletű biológiai megközelítés szempontjából.

Kutatási terveink között szerepelt újszülöttek karnitin anyagcseréjének a tanulmányozása. Anyatejjel ill. tápszerrel táplált koraszülött csecsemők szérum karnitinészter profiljának vizsgálatát végeztük el tandem tömegspektrométerrel. A vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy lényegesen eltért a tápszerrel táplált koraszülött csecsemők karnitin észter profilja az anyatejjel táplált koraszülött csecsemőkéhez képest. Adataink részletes kiértékelése még folyamatban van, előzetes eredményeink azonban máris újabb kísérleti alátámasztását adja annak, hogy a tápszerrel történő táplálás metabolikusan sem egyenértékű az anyatejes táplálással.

Vizsgálati mintáink többnyire intézetünk biobankjából származtak.

PUBLIKÁCIÓK:

Bene J, Csiky B, Komlosi K, Sulyok E, Melegh B: Dynamic adaptive changes of the serum carnitine esters during and after L-carnitine supplementation in patients with maintenance haemodialysis. SCANDINAVIAN JOURNAL OF CLINICAL & LABORATORY INVESTIGATION 71: pp. 280-286 (2011) IF: 1,629

Csiky B, Bene J, Wittmann I, Sulyok E, Melegh B: Effect of hemodialysis session on the dynamics of carnitine ester profile changes in L-carnitine pretreated end-stage renal disease patients. INTERNATIONAL UROLOGY AND NEPHROLOGY IF: 1,567 (publikálás alatt)

Bene J, Csiky B, Wittmann I, Sulyok E, Melegh B: Dramatic decrease of carnitine esters after interruption of exogenous carnitine supply in haemodialysis patients. RENAL FAILURE IF: 0,790 (publikálás alatt)

Bene J, Márton M, Mohád M, Bagosi Z, Bujtor Z, Oroszlán T, Gasztonyi B, Wittmann I, Melegh B: Similarities in serum acylcarnitine patterns in type 1, type 2 diabetes mellitus, and metabolic syndrome. ANNALS OF NUTRITION & METABOLISM IF: 2,173 (publikálás alatt)

Budget: 3.000.000 ,-Ft

STUDY OF CARNITINE HOMEOSTASIS IN HUMANS BY TANDEM MASS SPECTROMETRY

Berenténé Bene Judit[1], Melegh Béla[1]
[1]Department of Human Genetics, University of Pécs, Clinical Center

A well-known biochemical property of carnitine is its ability to form acyl-carnitine esters with organic acids in certain enzymatic reactions. Its classic physiological role can also be derived from this chemical property: carnitine is indipensable in the transport of activated long-chain fatty acids through the mitochondrial membrane. Although 99% of the carnitine amount is intracellular, the relationship between serum acylcarnitine (AC) and free carnitine (FC) is highly sensitive to intramitochondrial metabolic alterations.

The objectives of the grant application included the study of carnitine metabolism of renal failure patients. In the first part of our investigation the role of carnitine supplementation was studied in this patient group using tandem mass spectrometry. During 12 weeks 1g/iv carnitine was administered three times a week to the patients receiving haemodyalsis treatment. The patients were monitored over 29 weeks. Fasting serum samples were analysed. In our study we found that at baseline significantly decreased free carnitine and 1.5-16 fold elevation of 16 out of 27 acylcarnitines were detected in HD patients compared with the controls. In the carnitine supplementation period the increase-profile of the individual esters showed four different patterns: 1. the increase rate was rapid and became saturated, 2. slower increase, 3. it was the slowest and reached a late plateau, 4. almost gradual increase. Three months after the cessation of carnitine treatment marked concentration drops were found for almost all acylcarnitines. Carnitine administration affected the levels of circulating esters in different dynamics and kinetics suggesting a regulated, non-random adaptive reallocation of nutrients.

In the second part of our investigation the effect of haemodialysis on carnitine ester profile was studied in renal failure patients using tandem mass spectrometry. The patients were pretreated with carnitine for 12 weeks. Fasting serum samples were taken before haemodialysis (HD), hourly during the HD session, and 0.5 hour after the end of the HD. Twenty non-diabetic adult patients and 37 healthy controls were studied. In our study we observed that the HD session induced a progressive decline in the concentration of free carnitine as well as short-chain, medium-chain and dicarboxylic acylcarnitines. The rate of decline, however, proved to be more moderate in the medium-chain acylcarnitines than in the shorter carnitine metabolites. In addition we found that haemodialysis had no apparent influence on the serum levels of long-chain acylcarnitines.

In the third part of our investigation the impact of interruption of the exogenous carnitine intake right after the HD session on carnitine ester profile was examined in 18 L-carnitine pretreated ESRD patients. Serum samples were collected right before the HD session and 44 hour after the dialysis. In this study we found dramatic decrease in the level of FC, short- and medium-chain acylcarnitines in the interdialsysis period. Although the levels of free carnitine and different carnitine esters started to recover, at the end of this interdialysis period their levels do not achieved only 50-72 % of predialysis levels. Our investigation shows that omission of one single dosage of supplemental carnitine in long-term administration scheme results in dramatic decrease and reprofiling of carnitine esters.

We investigated the circulating acylcarnitine profiles in type 1, type 2 diabetes and metabolic syndrome. Changes of the individual acylcarnitines showed similar key pattern elements in the three different patient study groups. Considerable increase was detected in the levels of almost all short-chain carnitine esters, by contrast, most of the medium-chain and long-chain acylcarnitine levels were decreased. Decrease of free- and total carnitine levels were observed in all groups. Profound alterations were detected in carnitine ester profile in the three patient groups. Similarities in the patterns suggest different degree of involvement of the same metabolic systems in systems biology approach viewpoint.

Budget: 3.000.000 ,-Ft

Our research plans included the study of neonatal carnitine metabolism. We investigated the carnitine ester profiles in preterm neonates fed with human milk or preterm formula. In our study we found that the carnitine ester profile of formula-fed preterm infants is significantly deviated from that of human milk-fed preterm infants. A detailed evaluation of our data is still in progress, but preliminary results already provide a further experimental support of the statement that the formula-feeding is not metabolically equivalent to breast-feeding.

Most of the samples investigated came from the biobank of the Institute.

PUBLICATIONS:

Bene J, Csiky B, Komlosi K, Sulyok E, Melegh B: Dynamic adaptive changes of the serum carnitine esters during and after L-carnitine supplementation in patients with maintenance haemodialysis. SCANDINAVIAN JOURNAL OF CLINICAL & LABORATORY INVESTIGATION 71: pp. 280-286 (2011) IF: 1,629

Csiky B, Bene J, Wittmann I, Sulyok E, Melegh B: Effect of hemodialysis session on the dynamics of carnitine ester profile changes in L-carnitine pretreated end-stage renal disease patients. INTERNATIONAL UROLOGY AND NEPHROLOGY IF: 1,567 (under publication)

Bene J, Csiky B, Wittmann I, Sulyok E, Melegh B: Dramatic decrease of carnitine esters after interruption of exogenous carnitine supply in haemodialysis patients. RENAL FAILURE IF: 0,790 (under publication)

Bene J, Márton M, Mohád M, Bagosi Z, Bujtor Z, Oroszlán T, Gasztonyi B, Wittmann I, Melegh B: Similarities in serum acylcarnitine patterns in type 1, type 2 diabetes mellitus, and metabolic syndrome. ANNALS OF NUTRITION & METABOLISM IF: 2,173 (under publication)

Teljes támogatás: 3.000.000,- Ft

A GLUCOCORTICOSTEROID HORMON (GC) THERÁPIA HATÉKONYSÁGÁNAK PREDIKCIÓJÁRA ÉS MONITOROZÁSÁRA ALKALMAS ÚJ, IN VITRO LABORATÓRIUMI VIZSGÁLÓ MÓDSZER KIFEJLESZTÉSE

Berki Timea, Boldizsár Ferenc, Talabér Gergely, Szabó Mariann
PTE, KK, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet, Pécs

1. A pályázat elnyerése után elsőként a glucocorticoid receptor (GR) expressziós szintjét vizsgáltuk egészséges humán perifériás vér limfocita alcsoportjaiban, valamint annak változását *in vitro* GC analóg kezelés hatására. Elsőként összehasonlítottuk a leggyakrabban használt GC analógok (Dexamethasone, Prednisolone és Methylprednisolone) hatáserősségét. Azt tapasztaltuk, hogy 24 órás 10^{-6}M kezelés hatására a DX okozza a legkifejezettebb változásokat, ezért a továbbiakban ezt használtuk a kísérleteinkhez. Ehhez egészséges humán (önkéntes véradóktól) vérmintákból PBMC izolálása után a sejteket *in vitro* 10^{-5}, 10^{-6} és 10^{-7}M Dexamethasonnal (DX) kezeltük 24 és 48 óráig, majd sejtfelszíni jelölések után intracelluláris GR festést követően mértük a GR eloszlást áramlási citométerrel. Az egyes limfocita alcsoportokban eltérő alap GR expressziót mértünk, csökkenő sorrendben: B1 > NK >T citotoxikus> B2 > T helper. Összehasonlítva a nyugvó, aktivált és regulatórikus T sejtek (Treg) alap GR expresszióját azt tapasztaltuk, hogy a nyugvó T sejtek expresszálják a legkevesebb GR-t (MFI: 19,5), míg az aktivált és regulatórikus T sejtek ennek kb. kétszeresét (GR MFI: 33,7 és 39,9). Minden sejtcsoportban a DX kezelés koncentrációfüggő mértékben csökkentette a GR expressziót. A legfeltűnőbb csökkenést az aktivált, CD4+/CD25+ Thelper sejtek és a CD4+/CD25high+ Treg sejtek GR expressziójában tapasztaltunk. Ugyanakkor a túlélő sejtekben már 4 órával a DX kezelés után nő a glucocorticoid indukálta leucin zipper (GILZ) expresszió.

2. Annak bizonyítására, hogy a DX kezelés hatására lecsökkent GR expresszió együtt jár-e a sejtek GC rezisztenciájának kialakulásával *in vivo* egérkísérletet végeztünk. Balb/c egereket oltottunk 2 mg/kg DX-al 4 napon keresztül, majd vizsgáltuk a thymusban kiérő T sejtek összetételét. Azt tapasztaltuk, hogy a kezelés hatására megnő a CD4+/CD25high+/FoxP3+ Treg sejtek aránya a thymusban abszolút sejtszámuk növekedése nélkül, ami a GC rezisztenciájukat támasztja alá. Ezen jelenség része lehet a már számos közleményben leírt kettős antagonizmus elméletnek. Vagyis a Treg sejtek a saját antigénekkel érintkezve a T sejt receptoron (TcR) keresztül folyamatosan kapnak szignált, ami antagonizál a GC hormon hatására elinduló jelátviteli úttal.

3. Korábbi kísérleteink szerint ezen két jelátviteli útvonal összekapcsolódásának egyik kulcsmolekulája a TcR jelátviteli láncaihoz (CD3zeta) közvetlenül kapcsolódó ZAP-70 kináz. A GC hormon percek alatt a ZAP-70 molekula tyrozin foszforilációját eredményezi. Bizonyítani tudtuk tyrozin-fenilalanin (Y-F) pontmutáns ZAP-70-et expresszáló T sejteken, hogy a 492-es és 315-ös pozícióban elhelyezkedő Y felelős a GC hormon hatására létrejövő TcR jelátviteli út módosításáért, ami a Cbl és SLP-76 molekulák megváltozott foszforilációját és így a T sejtek csökkent Ca^{2+} szignálját eredményezi.

4. Apoptózis vizsgálatokat AnnexinV / PI kettős jelöléssel végeztük, míg az élő abszolút sejtszámot tripánkék festékkizárásos teszt segítségével mértük. A PBMC izolálás után mágneses gyöngyökkel B sejt depletálást (negatív szelekció) végeztünk. Az így nyert T sejt / NK sejteket kezeltük 10^{-6} M DX-al, majd 4 és 24 óra múlva meghatároztuk a kezelés hatására létrejövő limfocita sejtpusztulás mértékét. Azt tapasztaltuk, hogy 4 óra DX kezelés a limfociták 22,2%-át, míg 24 óra kezelés a sejtek 32,21%-ának pusztulását okozta. Meghatározva 24 óra múlva az apoptotikus sejtarányt áramlási citometriás módszerrel, a kevert T sejt populációban a 10^{-7}M DX kezelés 53,7%-al, a 10^{-6} M 64%-al míg a 10^{-5}M 67,3%-al emelte az apoptotikus sejtek arányát a kezeletlen kontrolhoz képest. A DX kezelést túlélő limfocitákban a Bcl-2 antiapoptotikus fehérje expressziójában nem láttunk lényeges változást, ugyanakkor a Bak és Bax proapoptotikus fehérjék expressziója

valamennyi esetben csökkent *in vitro* kísérletünkben. Ezek alapján a Bak és Bax expresszió változásának mértéke megbízhatóbb markernek látszik a GC érzékenység vizsgálatában.

5. A GC indukálta apoptózis mechanizmusának tisztázására ismét egér modellhez folyamodtunk. Vizsgáltuk a GC érzékeny kettős pozitív (DP) thymocitákon a GR ligandkötés hatására bekövetkező vándorlását egyrészt konfokális mikroszkópos módszerrel másrészt sejtfrakcionálást követően Western blot vizsgálatokkal. Mindkét módszerrel azt tapasztaltuk, hogy ligandkötés után 30 perccel a GR már a mitokondriumba vándorol éretlen T sejtekben. Ezzel párhuzamosan ezen sejtekben csökken a mitokondriális funkció, vagyis a GC hormon feltételezhetően mitokondriális úton fejti ki apoptotikus hatását. Vizsgáltuk továbbá, hogy a GR milyen proapoptotikus fehérjékkel illetve chaperonokkal lép kölcsönhatásba mitokondriális transzlokációja során, valamint az extrinsic és intrinsic apoptózis útvonal aktiválódásának molekuláris jeleit.

Eredményeink szerint a GR-Bak asszociáció, mind a citoplazmatikus mind a mitokondriális frakcióban megtalálható, de nem változik 30 perces DX kezelés hatására. Ugyanakkor GR-Bax asszociációt nem tudtunk kimutatni, de 2 órás *in vitro* DX kezelés után a Bax citoplazmából a mitokondiumba transzlokálódott, jelezve az intrinsic apoptózis útvonal aktiválódását. A GR a mitokondriumban a Hsp-60 chaperonnal koprecipitálódott 10 és 30 perces DX kezelés hatására. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a DP-sejtekben a GR már a citoplazmában komplexet képezhet a Bak fehérjével és együtt transzportálódnak a mitokondriumba, ahol a Hsp-90-ről leválva a Hsp-60 hősokkfehérjéhez kapcsolódik. Ugyanakkor meglepő módon DX kezelés után mind az intrinsic (caspase 9) mind az extrinsic apoptotikus útvonal (caspase 8) aktiválódása is megfigyelhető volt, melyet cytochrome c felszabadulás és caspase 3 aktiváció követett.

Közlemények:

Talaber G, Boldizsar F, Bartis D, Palinkás L, Szabo M, Berta G, Setalo G Jr, Nemeth P, Berki T.: Mitochondrial translocation of the glucocorticoid receptor in double-positive thymocytes correlates with their sensitivity to glucocorticoid-induced apoptosis.
Int. Immunol. 21: 1269-1276, (2009.) IF: 3,403

Boldizsar F, Talaber G, Szabo M, Bartis D, Palinkas L, Nemeth P, Berki T.: Emerging pathways of non-genomic glucocorticoid (GC) signalling in T cells. (review)
Immunobiology 215: 521-526, (2010.) IF: 3,586

Talaber G, Kvell K, Varecza Z, Boldizsar F, Parnell SM, Jenkinson EJ, Anderson G, Berki T, Pongracz JE.: Wnt-4 Protects Thymic Epithelial Cells Against Dexamethasone-Induced Senescence. Rejuvenation Res. 14(3): 241-48, (2011.) IF: 4,138

Szabo M, Czompoly T, Kvell K, Talaber G, Bartis D, Nemeth P, Berki T, Boldizsar F.
Fine-tuning of proximal TCR signaling by ZAP-70 tyrosine residues in Jurkat cells.
Int Immunol. (2011) Dec 29. [Epub ahead of print] IF: 3,403

Szabo M, Boldizsar F, Kvell K, Czompoly T, Talaber G, Bjorkan J, Bartis D, Nemeth P, Berki T: ZAP-70 tyrosines 315 and 492 transmit non-genomic glucocorticoid (GC) effects in Jurkat cells.
J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2012. (Közlésre benyújtva)

Teljes támogatás: 3.000.000,- Ft

DEVELOPMENT OF A NEW IN VITRO LABORATORY DETECTION SYSTEM FOR PREDICTION AND MONITORING THE EFFECTIVENESS OF GLUCOCORTICOSTEROID HORMONE THERAPY

Timea Berki, Ferenc Boldizsár, Gergely Talabér, Mariann Szabó
Department of Immunology and Biotechnology, University of Pécs, Clinical Center

1. Receiving the grant support first we determined the expression level of glucocorticosteroid hormone receptor (GR) in healthy human peripheral blood lymphocyte subpopulations, and its alterations after *in vitro* glucocorticosteroid hormone (GC) analogue treatment. We compared the effectiveness of the most frequently used GC analogues (Dexamethasone, Prednisolone and Methylprednisolone). We found, that 24 hours 10^{-6}M DX treatment caused the most pronounced changes, therefore we used DX for the further experiments. For this purposes we isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMC) form the samples of healthy human blood donors, and treated the cells *in vitro* with 10^{-5}, 10^{-6} and 10^{-7}M DX for 24 and 48 hours. After cell surface staining and intracellular GR labeling we determined the GR content of the lymphocyte subpopulations by flow cytometry. We have got different basal GR expression in the different cell populations, in descending order: B1 > NK > T cytotoxic > B2 > T helper cells. When we compared the GR expression of the resting, activated and regulatory T cell groups (Treg), we found, that the resting T cells express the lowest level of GR (MFI: 19,5), while the activated and regulatory T cells express double of this (GR MFI: 33,7 and 39,9). *In vitro* DX treatment caused concentration dependent down regulation of the GR expression. We detected the most significant reduction of GR expression in the activated CD4+/CD25+ Thelper cells and in the CD4+/CD25high+ Treg cell group. However in the surviving cells after 4 hours DX treatment increasing glucocorticoid induced leucin zipper (GILZ) expression could be observed.

2. We used an *in vivo* mouse model to show, weather the DX treatment induced GR downregulation is parallel to the development of the GR resistance of the cells. Balb/c mice were injected with 2 mg/kg DX for 4 days, followed by investigation of the composition of developing T cells in the thymus. The treatment caused an elevated CD4+/CD25high+/FoxP3+ Treg cell ratio in the thymus, without changes in the Treg total cell count, indicating their GC resistance. This phenomenon could be part of the dual antagonism model, described in the literature. Treg cells receive continuous signal through T cell receptor (TcR) by contact with self antigens, which antagonize the GC induced signal transduction pathway.

3. According to our previous data the key molecule of the convergence of this two signal transduction pathways is the ZAP-70 kinase which directly binds to the TcR/CD3 complex signal transduction chains (CD3zeta). Short term GC hormone treatment causes tyrosine phosphorylation of the ZAP-70 molecule. Using tyrosine-phenylalanine (Y-F) point mutant ZAP-70 expressing T cell lines we showed, that the 492 and 315 position Y-s are responsible for the GC induced changes of the TcR signal transduction pathway, causing altered phosphorylation of the Cbl and SLP-76 molecules and decrease of the Ca^{2+} signal.

4. Apoptosis detection was performed by flow cytometry using Annexin V / PI double staining, while the absolute live cell count was determined by the trypan blue dye exclusion test. After PBMC isolation we depleted B cells with magnetic beads using negative selection method. The resulting T /NK cell populations were treated with 10^{-6} M DX and the induced lymphocyte cell death was determined 4 and 24 hours later. In vitro 4 hours DX treatment caused 22,2%, while 24 hours treatment a 32,21% depletion of lymphocytes. We determined the apoptotic cell ratio with flow cytometric measurement, where 10^{-7}M DX treatment caused 53,7%, 10^{-6}M a 64%, while the 10^{-5}M DX a 67,3% elevation of the apoptotic cell ratio, compared to the untreated control. In the surviving lymphocytes we could not observe alteration in the level of the antiapoptotic Bcl-2

protein, while the proapoptotic Bak and Bax protein expression decreased in each *in vitro* treated blood sample. Based on these results, detection of Bak és Bax expression changes seems to be a reliable marker for the detection of GC sensitivity.

5. To clarify the mechanism of GC induced lymphocyte apoptosis we turned again to a mouse model. We followed the GR translocation in GC sensitive double positive (DP) thymocytes after ligand binding using confocal microscopy and after cell fractionation with Western blot technique. With both methods we have shown, that GR migrates to the mitochondria of the GR sensitive DP T cells 30 minutes after ligand binding. Parallel to this decreased mitochondrial function could be detected indicating, that the GC induce presumably the mitochondrial apoptotic pathway activation in the cells.
We also studied the GR association with proapoptotic proteins and chaperons during its mitochondrial translocation, and the signs of the extrinsic and intrinsic apoptotic pathway activation. We found GR-Bak association both in the cytoplasmic and mitochondrial fraction of the cells but this association did not change during 30 min DX treatment. We could not show GR-Bax association, but after 2 hours *in vitro* DX treatment we detected Bax translocation from the cytoplasm to the mitochondria, indicating the activation of the intrinsic apoptotic pathway. After 10 or 30 min DX treatment co-immunprecipitation of GR with the Hsp-60 chaperone was observed in the mitochondria. On the basis of these results GR forms a complex with the Bak protein in the cytoplasm of the DP cells and moves to the mitochondria where it dissociates from the Hsp-90 and binds to the Hsp-60 heat-shock protein. Surprisingly after in vitro DX treatment both the intrinsic (caspase 9) and extrinsic apoptotic pathway activation (caspase 8) could be observed, followed by cytochrome c release and caspase 3 activation.

Publications:

Talabér G, Boldizsár F, Bartis D, Pálinkás L, Szabó M, Berta G, Sétáló G Jr, Németh P, Berki T.: Mitochondrial translocation of the glucocorticoid receptor in double-positive thymocytes correlates with their sensitivity to glucocorticoid-induced apoptosis.
Int. Immunol. 21: 1269-1276, (2009.) IF: 3,403

Boldizsar F, Talaber G, Szabo M, Bartis D, Palinkas L, Nemeth P, Berki T.: Emerging pathways of non-genomic glucocorticoid (GC) signalling in T cells. (review)
Immunobiology 215: 521-526, (2010.) IF: 3,586

Talaber G, Kvell K, Varecza Z, Boldizsar F, Parnell SM, Jenkinson EJ, Anderson G, Berki T, Pongracz JE.: Wnt-4 Protects Thymic Epithelial Cells Against Dexamethasone-Induced Senescence. Rejuvenation Res. 14(3): 241-48, (2011.) IF: 4,138

Szabo M, Czompoly T, Kvell K, Talaber G, Bartis D, Nemeth P, Berki T, Boldizsar F.
Fine-tuning of proximal TCR signaling by ZAP-70 tyrosine residues in Jurkat cells.
Int Immunol. (2011) Dec 29. [Epub ahead of print] IF: 3,403

Szabo M, Boldizsar F, Kvell K, Czompoly T, Talaber G, Bjorkan J, Bartis D, Nemeth P, Berki T: ZAP-70 tyrosines 315 and 492 transmit non-genomic glucocorticoid (GC) effects in Jurkat cells.
J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2012. (Sent for Publication)

Teljes támogatás: 2.400.000,-Ft

ÉTREND-KIEGÉSZÍTŐK BIZTONSÁGOS ALKALMAZÁSÁNAK ÉS ESETLEGES KÁROS MELLÉKHATÁSAINAK TANULMÁNYOZÁSA OBESITASBAN

Blázovics Anna[1], Sárdi Éva[2], Stefanovits-Bányai Éva[2], Szentmihályi Klára[3], Lugasi Andrea[4], Fébel Hedvig[5], Bekő Gabriella[6], Hegedűs Viktor[1]
[1]Semmelweis Egyetem, Farmakognóziai Intézet, [2]Budapesti Corvinus Egyetem, [3]MTA Kémiai Kutatóközpont Anyag, és Környezetkémiai Kutató Laboratórium, [4]Országos Élelmezés- és Táplálkozástudományi Intézet, [5]Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet, [6]Semmelweis Egyetem, Központi Laboratórium Pest

Számos beszámoló ismert az étrend-kiegészítők vagy az alkoholos italok mérsékelt fogyasztásának életminőséget javító tulajdonságáról különböző betegségekben szenvedő páciensek esetében, bár a fiziológiai háttér nagyrészt ismeretlen, különösen az élelmiszerek hatását tekintve a transzmetiláló képességre (2-4,7). Ezért felmerül a kérdés, vajon a természetes készítmények számos bioaktív ágense képes-e módosítani az immunreaktivitást, megváltoztatni a jelátviteli utakat vagy befolyásolni a redox-homeosztázist. A redox-homeosztázis kedvezőtlen változásai citokin és szabad gyök túltermelést generálnak és csökkentik a transzmetilációs reakciókat. Ezek a molekulák a különböző májbetegségekben, sőt már alimentárisan kiváltott zsírmájban is sok intracelluláris jelátviteli utat befolyásolnak ugyanúgy, mint diabetesben vagy a rákos folyamatokban (2,3,5-7).
A cékla (*Beta vulgaris* L. ssp. *esculenta* var. rubra) és a répa (*Daucus carota* L.) liofilizátum bioaktív anyagokat, betaint, betaninokat, betaxantinokat, flavonoidokat, polifenolokat, glutamint, béta karotint, vitaminokat és folsavat tartalmaz, amelyek változásokat okoznak a különböző celluláris reakcióutakon.
Ezért egy liofilizált cékla- és répapor készítmény bioaktív vegyületeinek védőhatását tanulmányoztuk „short term" patkánykísérletben, zsírmájban. A nagyobb dózisú természetes termék (1g/ttkg/nap) jobban csökkentette az indukált szabadgyök-reakciókat, a ciklooxigenáz-2, az indukálható NO-szintetáz és a tumornekrózis-faktor alfa mRNS-szinteket mind az egészséges májban, mind a zsírmáj-szövetben. Bár a kezelések nem mutattak szignifikáns változásokat az összes globális antioxidáns paraméterben, a mobilizálható metilcsoportok koncentrációja nagyobb volt a kezelés hatására zsírmájban. Szintén kedvező tendenciákat figyeltünk meg a redox-homeosztázisban, zsírmájban a kezelés után.
Mint várható volt a liofilizált cékla- és répapor funkcionális élelmiszernek bizonyult patkányban alimentárisan kiváltott zsírmájban. Nem lehet kizárni kedvező hatását klinikai vonatkozásban (4,5).
A cékla hatással van számos biokémiai reakcióra, enzimekre, metabolit-szintézisekre és más tanulmányok is sugallják, a cékla fogyasztása megelőzheti a tüdő és bőrdaganatokat. Jól dokumentált, hogy számos citokin és növekedési faktor szérumszintje növekszik és az IL-2 szintje csökken metasztázisban a nyirokcsomókban és a csontban. Célunk volt, hogy megvizsgáljuk a szabályozott céklabevitel (*Beta vulgaris* L. ssp. *esculenta* var. rubra) jelentőségét a citokin-mintázatra és a redox-homeosztázisra metasztatikus prosztatarákban (4).
A kereskedelmi forgalomból származó természetes céklakészítményt 10 g/nap dózisban 1 hónapig kapta 24 (átlag életkor 68±8 év) hormon-rezisztens metasztatikus taxán-kemoterápiában részesült prosztatarákos beteg (akik átlag 3,6±2,8 éve számoltak be először betegségükről). Az adatok 18 férfi esetében voltak feldolgozhatók. A rutinlaboratóriumi vizsgálatokon kívül a HbA1c, 9 citokin, 3 növekedési faktor, a redox-homeosztázis globális paraméterei, néhány elem és azok fémionja, a Zn- és a szabad protoporfirin szintje, a transzmetiláló folyamatok lettek meghatározva a kezelés előtt és az 1 hónapos kezelés után. A proinflammatorikus citokinek szintjei csökkenő tendenciát mutattak, de ezek a változások nem voltak szignifikánsak (IL1a $p=0,084$; IL6 $p=0,154$; IL8 $p=0,578$). Ezek kedvező hatások voltak. Az antiinflammatorikus citokinek mért értékei szintén csökkentek (IL2 $p=0,204$), de az EGF szintje szignifikánsan nőtt ($p=0,003$). A legtöbb betegnél a cékla kedvező hatása érvényre jutott és

Teljes támogatás: 2.400.000,-Ft

a szignifikánsan magas Zn- és szabad protoporfirin-szintek csökkentek; továbbá a transzmetiláló folyamatok felerősödtek. Az eredményekkel összefüggésben úgy tűnik, hogy a moderált és folyamatos céklatermék fogyasztása kedvezően hat a betegek életkilátásaira. A céklafogyasztás csökkentette a proinflammatorikus citokineket és néhány betegnél (44%) növelte az IL2- szintet. Más betegeknél (52%) alacsony PSA szinteket mértünk. Ez reménykeltő eredmény, ámbár a növekvő EGF és több esetben a megnövekedett PSA értékek miatt orvosi kontroll szükséges a prosztatarákos, kemoterápiában részesülő betegeknél. További vizsgálatokat és korrelációs analízist kell végezni, ahol a betegeknél kedvező hatást figyeltünk meg (3,4,6).

A 2–es típusú diabetes mellitusban szenvedő betegek száma nő; az előfordulás gyakorisága világszerte 2000 és 2030 között várhatóan 37%-kal emelkedik. A mérsékelt alkoholfogyasztás redukálja mind a cardiovasculáris betegségek, mind a 2-es típusú diabetes mellitus rizikóját. A mérsékelt alkoholos italfogyasztás ráadásul emeli a HDL-koleszterin-szinteket, a gyulladáscsillapító és trombocitagátló tulajdonságokat és ugyancsak igazolható hatásukra az inzulin-érzékenység javulása.

Az inzulinérzékenység redukciója számos állapottal hozható kapcsolatba, mint a cardiovasculáris rizikó, ezen belül pl. a hypertensio, obesitás, hyperlipoprotenaemia.

Magyarországon az átlagos évi borfogyasztás az utóbbi években kb. 30 liter/fő volt hasonlóan az Európai országok közül Dániához és Ausztriához. Ezzel Magyarország a középmezőnyben van az európai országok között. Az alkoholos italok közül a bor és a sör, hasonlóan népszerűek Magyarországon. Ebben a tanulmányban két fehérbor, a rizlingszilváni és a Pintes hazai specialitás mérsékelt fogyasztásának hatásait tanulmányoztuk az inzulinérzékenységre metabolikus szindrómás egyedekben. A mérsékelt borfogyasztás hatása az inzulinérzékenységre manapság fontos kutatási terület. Ebben a prospektív, randomizált, kettős-vak tanulmányban 32 metabolikus szindrómás páciens moderált borfogyasztásának hatását tanulmányoztuk. A emberek egyrészt rizlingszilvánit (n=14), másrészt Pintest (n=18) kaptak 4 hétig. A klinikai paramétereket a borfogyasztás előtt és a fogyasztási periódust követően határoztuk meg. A rizlingszilvánit fogyasztó pácienseknél szignifikánsan csökkent a totál koleszterin- (5,4 ± 1,4 vs. 4,9 ± 1,2 mmol/l; p = 0,006) és az LDL-koleszterin-szint (3,9 ± 1,1 vs. 3,6 ± 1,2 mmol/l; p = 0,04); a Pintes csoportban nem találtunk különbséget sem a totál koleszterin (5,1 ± 0,6 vs. 5,0 ± 0,7 mmol/l; p = 0,25), sem az LDL-koleszterin (3,6 ± 0,6 vs. 3,6 ± 0,6 mmol/l; p = 0,5) koncentrációkban. A HOMA-index szignifikánsan csökkent mindkét fajta bor fogyasztásánál, összehasonlítva az alapértékekkel (rizlingszilváni csoport: 1,85 ± 2,1 vs. 1,06 ± 0,6; p = 0,03; Pintes csoport: 2,28 ± 2,04 vs. 1,08 ± 0,6; p = 0,002). Kísérleteink eredményei megerősítették, hogy a mérsékelt fehérbor-borfogyasztás növelte az inzulin-érzékenységet a metabolikus szindrómásoknál (1).

Irodalmak:

1. Ábel T, Blázovics A, Wimmer A, Bekő G, Gaál B, Blazics B, Eldin MG, Fehér J, Lengyel G: EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL NUTRITION (submitted 2011) IF.: 2,563
2. Balázs A, Tóth M, Blazics B, Héthelyi É, Szarka Sz, Ficsor E, Ficzek G, Lemberkovics É, Blázovics A: FITOTERAPIA (FITOTE-D-11-00859) (in press 201162012) IF.: 1,899
3. Blázovics A, Nyirády P, Bekő G, Székely E, Szilvás Á, Kovács-Nagy E, Horváth A, Szűcs M, Romics I, Sárdi É: CROATICA CHEMICA ACTA 84: pp. 127-131 (2011) felkérésre IF.: 0,713
4. Blázovics A, Nyirády P, Romics I, Szűcs M, Horváth A, Szilvás Á, Székely E, Szentmihályi K, Bekő G, Sárdi É: e-book InTech-Open Access Publisher Website: http://www.intechweb.org/ (előkészületben 2011) felkérésre
5. Hegedűs V, Gerő D, Mihály Z, Szíjártó A, Zelles T, Sárdi É: ORVOSI HETILAP 152: pp. 1035-1042 (2011) „Prof. Fehér János Emlékére Alapítvány" pályázatán díjat nyert kutatás
6. Nyirády P, Sárdi É, Bekő G, Szűcs M, Horváth A, Székely E, Szentmihályi K, Romics I., Blázovics A: ORVOSI HETILAP 151: pp. 1495-1503 (2010)
7. Virág V, May Z, Kocsis I, Blázovics A, Szentmihályi K: ORVOSI HETILAP 152: pp. 1075-1081 (2011) „Prof. Fehér János Emlékére Alapítvány" pályázatán díjat nyert kutatás

Teljes támogatás: 2.400.000,-Ft

THE SECURE APPLICATION OF DIETARY SUPPLEMENTS AND THE STUDY OF THEIR INCIDENTAL SIDE EFFECTS IN OBESITY

Anna Blázovics[1], Éva Sárdi[2], Éva Stefanovits-Bányai[2], Klára Szentmihályi[3], Andrea Lugasi[4], Hedvig Fébel [5], Gabriella Bekő[6], Viktor Hegedűs[1]
[1]Department of Pharmacognosy, Semmelweis University, [2]Corvinus University, Budapest, [3]Institute of Materials and Environmental Chemistry, CRC, Hungarian Academy of Sciences, [4]National Institute for Food Safety and Nutrition, [5] Research Institute of Animal Breeding and Nutrition, [6]Central Laboratory Pest, Semmelweis University

Several reports are known about the effects of nutrition supplements or moderate drinking of alcoholic beverages in the improvement of patient life quality with several diseases. However, the physiological background remains largely unknown, especially the effects of nutrition on transmethylation ability (2-4,7). Therefore the question arose, if natural products with several bioactive agents could modify the immune reactivity, alter signal routes or influence the redox homeostasis. Unbeneficial changes of redox-homeostasis generate cytokine and free radical overflow and diminish the transmethylation reactions. These molecules influence many intracellular signaling pathways in different liver diseases, and even in alimentary induced fatty liver as well as diabetes mellitus or cancerous processes (2,3,5-7). Table beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *esculenta* var. rubra) and carrot (*Daucus carota* L.) powder contained betaine, betanins, betaxanthins, flavonoids, polyphenols, glutamine, beta carotene, vitamins and folic acid bioactive components, which might produce changes in various cellular pathways. Therefore protecting effects of bioactive agents of a lyophilised table beet and carrot powder on fatty liver in a „short term" rat experiment were studied. The higher dose of this natural product (1g/bwkg/day), the better diminished the induced free radical reactions, cyclooxygenase-2, inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-mRNA-levels both in normal and fatty liver tissues. Although treatments failed to exert significant changes in all global antioxidant parameters, the mobilized methyl group concentrations were higher after treatment in fatty liver. Favorable tendencies were also noted in the redox-homeostasis of the fatty liver after treatment. As expected, lyophilised table beet and carrot proved to be a functional food in rats with alimentary induced fatty liver. It cannot be ruled out that this beneficial effect may have clinical relevance (4,5).
Since table beet affects numerous biochemical reactions, enzymes as well as metabolic-synthesis, and other studies suggest that beetroot ingestion can prevent lung and skin cancers**.** It is also well documented, that serum levels of several cytokines and growth factors are increased and IL-2 is decreased in the presence of metastasis in lymph nodes and bones. Our aim was to test the impact of regular table beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *esculenta* var. rubra) intake on cytokine pattern and redox homeostasis in metastatic prostate cancer (4).
Natural table beet product came from commercial service and was given twice 10g daily for 1 month for 24 patients (mean age 68±8 years) with hormone-resistant and metastatic prostate cancer treated with taxan chemotherapy (who report themselves first, mean 3.6±2.8 years ago with their complains). Data of 18 men were amenable after treatment for evaluation. In addition to routine laboratory examination values of HbA1c, 9 cytokines and levels of 3 growth factors, the global parameters of redox-homeostasis, few elements of their metal-ions, Zn- and level of free protoporphyrin, trans-methylation processes before and 1 month after treatment were determined. The levels of proinflammatory cytokines showed a declining tendency, but these changes were not significant (IL1a $P=0.084$; IL6 $P=0.154$; IL8 $P=0.578$). It was a beneficial effect. Measured parameters of anti-inflammatory cytokines also decreased (IL2 $P=0.204$), but the levels of EGF increased significantly ($P=0.003$). In most of the patients, favorable impact of table beet was enforced and significantly high levels of Zn- and free protoporphyrin decreased; furthermore, transmethylation processes fastened.

According to results, it seems that moderate and permanent consumption of table beet product affects the life expectancy of patients favorably. Consumption of table beet decreased the proinflammatory cytokines and in some of patients (44%) increased the level of IL2. In other patients (52%) we measured lower level of PSA. That was a hopeful result. However, due to the increasing values of EGF and in more cases PSA levels, medical control is necessary for patients with prostate cancer treated by chemotherapy. Further investigations and correlation analysis must be performed, in which patients beneficial effect was observed (3,4,6).

The number of patients with type 2 diabetes mellitus is increasing; its prevalence is expected to rise by 37% worldwide between 2000 and 2030. Moderate alcoholic beverage consumption reduces the risk of both cardiovascular diseases and type 2 diabetes mellitus. In addition to the elevating effect of moderate alcoholic beverage consumption on HDL-cholesterol levels, the antiphlogistic and antiplatelet properties as well as its insulin sensitivity-improving effect have also emerged. The reduction of insulin sensitivity is related to several conditions which are cardiovascular risk factors, including e.g. hypertension, obesity, hyperlipoproteinaemia. In Hungary the mean yearly per capita wine consumption was about 30 liters in recent years, similarly to that of Denmark and Austria of the European countries. With this, Hungary is in the middle field among European countries. Of alcoholic beverages, wine and beer are similarly popular in Hungary. In this study we investigated the effects of moderate consumption of two sorts of white wine, Müller-Thurgau and the domestic speciality Pintes on insulin sensitivity in subjects with metabolic syndrome. The effect of moderate wine consumption on insulin sensitivity is a topic of intense research nowadays. In this study we investigated the effect of moderate consumption of white wine in subjects with metabolic syndrome. 32 patients with metabolic syndrome participated in this prospective, randomised, double-blind study. The subjects received either Müller-Thurgau (n=14) or Pintes (n=18) sort of wine for 4 weeks. Clinical parameters were determined before and after the period of wine consumption. In patients consuming Müller-Thurgau there was a significant decrease of total cholesterol (5.4 ± 1.4 vs. 4.9 ± 1.2 mmol/L; p = 0.006) and LDL-cholesterol (3.9 ± 1.1 vs. 3.6 ± 1.2 mmol/L; p = 0.04) levels; in the Pintes group we found no difference neither in total cholesterol (5.1 ± 0.6 vs. 5.0 ± 0.7 mmol/L; p = 0.25), nor LDL-cholesterol (3.6 ± 0.6 vs. 3.6 ± 0.6 mmol/L; p = 0.5) concentrations. The HOMA-IR showed a significant decrease upon the consumption of both sorts of wine as compared to the baseline (Müller-Thurgau group: 1.85 ± 2.1 vs. 1.06 ± 0.6; p = 0.03; Pintes group: 2.28 ± 2.04 vs. 1.08 ± 0.6; p = 0.002). The results of our study confirm that moderate consumption of white wine increases insulin sensitivity in persons with metabolic syndrome (1).

References

1. Ábel T, Blázovics A, Wimmer A, Bekő G, Gaál B, Blazics B, Eldin MG, Fehér J, Lengyel G: EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL NUTRITION (submitted 2011) IF.: 2.563

2. Balázs A, Tóth M, Blazics B, Héthelyi É, Szarka Sz, Ficsor E, Ficzek G, Lemberkovics É, Blázovics A: FITOTERAPIA (FITOTE-D-11-00859) (in press 2011) IF.: 1.899

3. Blázovics A, Nyirády P, Bekő G, Székely E, Szilvás Á, Kovács-Nagy E, Horváth A, Szűcs M, Romics I, Sárdi É: CROATICA CHEMICA ACTA 84: pp. 127-131 (2011) *Invited author* IF.: 0.713

4. Blázovics A, Nyirády P, Romics I, Szűcs M, Horváth A, Szilvás Á, Székely E, Szentmihályi K, Bekő G, Sárdi É: e-book InTech-Open Access Publisher Website: http://www.intechweb.org/ (in preparation 2011) *Invited author*

5. Hegedűs V, Gerő D, Mihály Z, Szíjártó A, Zelles T, Sárdi É: ORVOSI HETILAP 152: pp. 1035-1042 (2011) *"Foundation for the Memory of János Fehér" prize winning research*

6. Nyirády P, Sárdi É, Bekő G, Szűcs M, Horváth A, Székely E, Szentmihályi K, Romics I., Blázovics A: ORVOSI HETILAP 151: pp. 1495-1503 (2010)

7. Virág V, May Z, Kocsis I, Blázovics A, Szentmihályi K: ORVOSI HETILAP 152: pp. 1075-1081(2011) *"Foundation for the Memory of János Fehér" prize winning research*

2 cm

Teljes támogatás: 2 000.000,- Ft

A DOHÁNYZÁS ÉS A MACROPHAG MIGRÁCIÓ INHIBITOR FACTOR KÖLCSÖNHATÁSÁNAK VIZSGÁLATA AZ ENDOMETRIOSIS PATHOMECHANISMUSÁBAN

Bódis József[1], Koppán Miklós[1], Vigh Éva[2], Balaskó Márta[2],Garai János[2]
Pécsi Tudományegyetem Általános Orvosi Kar, [1]Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika, [2]Kórélettani és Gerontológiai Int.

A Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központjának Regionális Kutatás-etikai Bizottságától az engedélyezési eljárás lefolytatását követően az igényelt hiánypótlások benyújtása után a klinikai vizsgálatra az etikai engedélyt 2010 04.07-én megkaptuk. (Mellékelve)

A jelentkezők beválogatása jelenleg is folyamatban van. Jelenleg 21 betegtől rendelkezünk peritoneális folyadékkal, melynek még a dupláját kívánjuk összegyűjteni. A önkéntes jelentkezők kis száma arra a megfontolásra sarkall, hogy a vizsgálatot a közeljövőben egyéb régiós centrumra is kiterjesszük.

Egy eredetileg Jones által javasolt állatkísérletes (patkány) endometriosis modellt adaptáltunk. (Jones RC.: Acta Endocrinol Copenh.1984; 106:282–8.). A képződött plakkok makroszkóposan és szövettanilag megfelelnek endometriotikus plakkoknak (ld. a mellékelt fotókat). A Pharmacológiai Intézet által felajánlott instrumentális segítséggel az állatokat dohányfüst expozíciója jelenleg folyik.

Időközben előzetes eredményeinkből nemzetközi szakfolyóiratban jelent meg publikáció: Koppán Á, Hámori J, Vranics I, Garai J, Kriszbacher I, Bódis J, Oehmke J, Tinneberg HR, Koppán M: Pelvic pain in endometriosis: is success of therapy gone in cigarette smoke? HEALTH 3: pp. 571-576 (2011) IF: 1.754 (2010-ben) (ld. mellékletben).

2 cm

Budget: 2 000,000.- HUF

STUDIES ON THE INTERACTION BETWEEN SMOKING AND MACROPHAGE MIGRATION INHIBITORY FACTOR IN THE PATHOMECHANISM OF ENDOMETRIOSIS

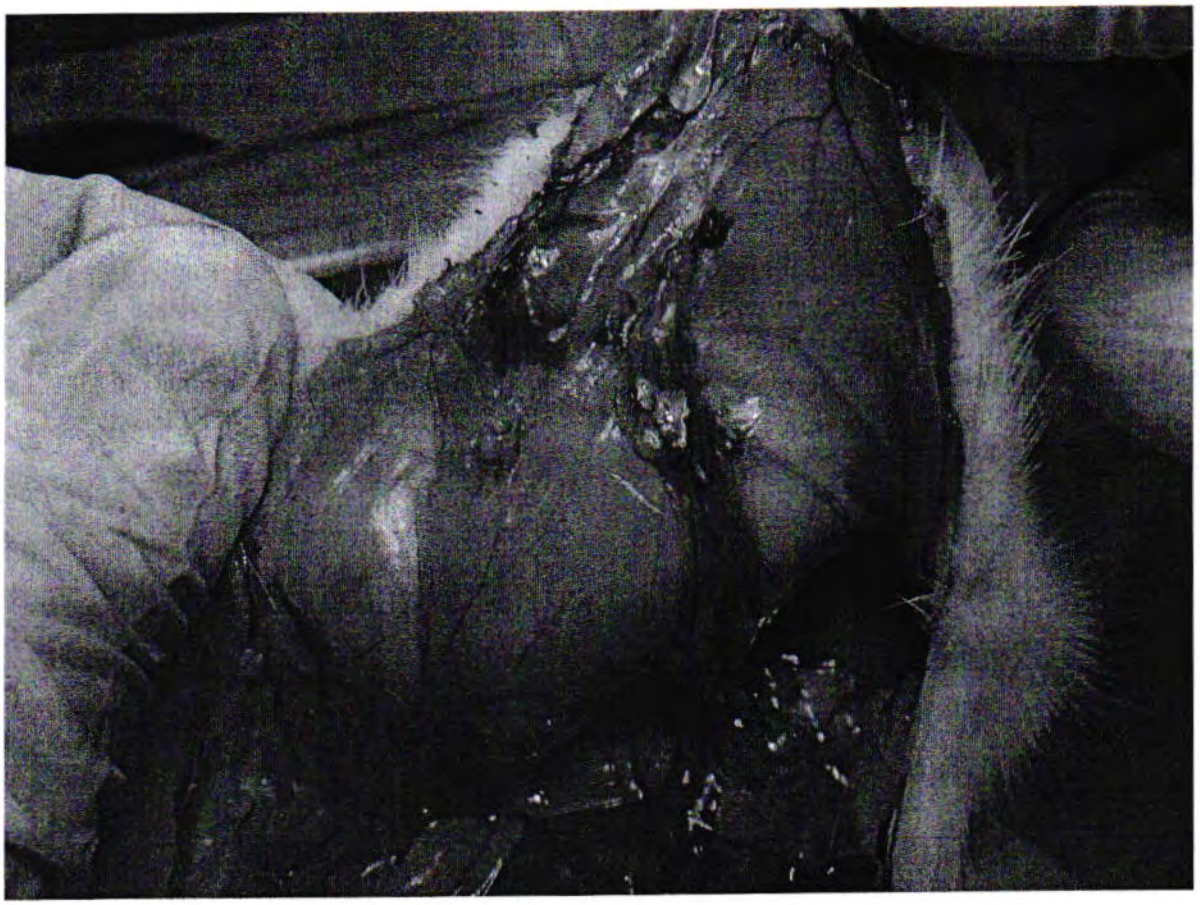
József Bódis[1], Miklós Koppán[1], Éva Vigh[2], Márta Balaskó[2]János Garai[2]
[1]Dept. of Obstetrics and Gynecology -, [2]Dept. of Pathophysiology and Gerontology
University of Pécs, Medical School

Ethical permit to conduct the study has been granted by the Regional Research Ethics Committe of the University of Pécs Medical School's Clinical Center in the 7th of April 2010 following the Committe's requests have been satisfied concerning some minor issues. (See in attachment)

The inclusion of volunteers is an ongoing process, at present peritoneal fluids have been collected from 21patients. At least twice as much is the aim by the end of the study. The reletive sluggish performance concerning the inclusion, might make it necessary to involve nearby centers in the study.

An in vivo rat endometriosis model suggested by Jones has been succesfully adapted. (Jones RC.: Acta Endocrinol Copenh.1984; 106:282–8.). The plaques formed resemble macroscopically and histologically to endometriotic tissue (see the attached photograps below). The smoke exposure of the rats is currently performed in the Pharmacology Dept using a special rat inhalator equipment.

A paper has been recently published with our preliminary results concerning the topic: Koppán Á, Hámori J, Vranics I, Garai J, Kriszbacher I, Bódis J, Oehmke J, Tinneberg HR, Koppán M: Pelvic pain in endometriosis: is success of therapy gone in cigarette smoke? HEALTH 3: pp. 571-576 (2011) IF: 1.754 (in 2010) (see in attachment)



Budget: 3.000,000.- HUF

PRIMER PREVENCIÓ A SZISZTÉMÁS AUTOIMMUN KÓRKÉPEKBEN, A NEM DIFFERENCIÁLT COLLAGENOSISBAN (NDC) ÉS SZISZTÉMÁS LUPUS ERYTHEMATOSUSBAN: ALFACALICDOL KEZELÉS HATÁSA A REGULATÓRIKUS T SEJTSZÁMRA ÉS FUNKCIÓRA, VALAMINT A TH1 ÉS A TH17 SEJTEK ÁLTAL TERMELT PROINFLAMMATÓRIKUS CITOKIN SZINTEKRE (INF-γ, TNF-α, IL-12, IL-17) 4 HÉTEN ÁT TARTÓ ALFACALCIDOL KEZELÉST KÖVETŐEN

Bodolay Edit[1], Zöld Éva[1], Csáthy László[2], Szodoray Péter[3], Baráth Sándor[1], Tarr Tünde[1], Gaál János[4], Gyimesi Edit[1], Sipka Sándor[1], Zeher Margit[1], Szegedi Gyula[1]
[1]DEOEC III Belgyógyászati Klinika, [2]DEOEC Klinikai Biokémiai és Molekular Patológiai Intézet, [3]Institute of Immunology Rikshospitalet, University of Oslo,[4]Kenézy Gyula Megyei Kórház, Reumatológiai Osztály, Debrecen

Az autoimmun kórképek kialakulásában a genetikai faktorok mellett a környezeti hatásoknak is alapvető szerepük van. A D-vitamin-hiány egyike lehet azoknak a tényezőknek, amelyek az autoimmun betegségek kialakulásáért felelősek. Több vizsgálat igazolta, hogy a D vitamin gátolja azoknak a gyulladásos sejteknek az aktivitását, amelyek a szisztémás autoimmun betegségek kialakulásáért felelősek. A D-vitamin egyik legfontosabb hatása, hogy csökkenti a Th1 és a Th17 sejtek működését, azok gyulladásos citokinjeinek termelését, és javítja a regulatórikus T-sejtfunkciót. Több közlemény megerősíti, az optimális D vitamin ellátottság kivédi egyes autoimmun kórképek, a rheumatoid arthritis (RA), szisztémás lupus erythematosus (SLE) és az 1-s típusú diabetes mellitus kialakulását, és mérsékli a már fennálló betegség súlyosságát.

A szisztémás autoimmun kórképeket megelőző állapotot Nem Differenciált Collagenosis (NDC) névvel jelölik. Az NDC-s betegek 30-40 %-a differenciálódik definitív szisztémás autoimmun betegségbe. A D vitamin hiányállapot egyik tényezője lehet a definitív autoimmun kórkép irányába történő progressziónak.

I. D vitamin szint meghatározása nem differenciált collagenosisban szenvedő betegekben.

A munka első részében vizsgálták az NDC stádiumában levő betegek D vitamin szintjét. Arra kerestek választ, hogy alacsony D vitamin szint mellett nagyobb kockázata van-e egy definitív autoimmun kórkép irányába történő progressziónak.
161 NDC-s beteg plazmájában a nyári és téli időszakban mért 25-hidroxi-D-vitamin [25(OH)D] szintet 66, korban azonos, egészséges egyén értékeivel hasonlították össze.
Eredmények: Az NDC-s betegek nyári és téli periódusban mért 25(OH)D-vitamin-értéke alacsonyabb volt, mint az egészséges kontroll csoportban. Az NDC-s betegekben a nyári és téli D-vitaminszint ingadozás szignifikáns volt, míg a kontroll csoportban nem volt jelentős a szezonális változás (NDC nyár: 33,0 ± 13,4 ng/ml vs. kontroll nyár: 39,5 ± 11,2 ng/ml; $p < 0,01$; NDC tél: 27,8 ± 12,48 vs. kontroll tél: 38,2 ± 12,1 ng/ml; $p < 0,001$). Alacsony (<30 ng/ml) D-vitamin-szint mellett gyakoribb volt a bőrtünetek ($p = 0,0046$) és a pleuritis ($p = 0,0346$) előfordulása.
A 161 NDC-s betegből 35 (21,7%) differenciálódott definitív kötőszöveti betegségbe. A legalacsonyabb D vitamin szintet azokban a betegekben mérték, akik definitív kötőszöveti betegségben differenciálódtak. Ennek a 35 betegnek a D-vitamin-szintje alacsony, 30 ng/ml vagy ez alatti volt.

Összegezve: Az NDC stádiumában a betegek D-vitamin-szintje alacsonyabb, mint az egészséges egyénekben, és jelentős mérvű a nyári-téli szezonalitás. A D-vitamin-hiányállapot egyike lehet azoknak a környezeti faktoroknak, melyek elősegíthetik a definitív kötőszöveti betegségbe történő progressziót. Az alacsony D vitamin szint mellett nagyobb a veszélye a definitív kórkép irányába történő progressziónak.

II. Természetes regulatórikus T sejtek száma és funkciója NDC-ben

Öt héten át tartó 0,5 μg/nap D-vitamin analóg (alfacalcidol) kezelés előtt es azt követően vizsgálták a természetes regulatív T-sejtek (CD4+CD25highFoxp3+T-sejtek; nTreg) mennyiségi meghatározását és funkcionális aktivitását NDC-ben. Mindemellett cél volt a CD4+Th17+T-sejtek

meghatározása, valamint a proinflammatórikus citokinek plazmaszintjének mérése. Huszonöt D-vitamin elégtelenségben szenvedő NDC-s beteg plazmájában mérték a 25(OH)D-szintet HPLC-technikával. Flow citometriát alkalmaztak az nTreg-sejtek és az IL-17 citokint expresszáló Th17-sejtek meghatározásához. Az interleukin (IL)-12, IFN-γ, IL-17, IL-23, IL-6 es IL-10 plazma citokin koncentrációk kimutatása ELISA-módszerrel történt.

Eredmények: A NDC-s betegek plazma 25(OH)D-vitaminszintje emelkedett D-vitamin analóg adását követően, bár az emelkedés mértéke nem volt szignifikáns. Az alfacalcidol terápiát követően mind a Th1 (IL-12 és IFN-γ), mind a Th17 (IL-17, IL-23, IL-6) citokinek szintje csökkent a NDC-s betegekben, míg a szolubilis IL-10 szintje emelkedett (IFN-γ: 41,5±12,0 pg/ml vs. 21,7±9,9 pg/ml, p<0,001; IL-12: 156,7±75,2 pg/ml vs. 87,5±42,1 pg/ml, p<0,001; IL-23: 385,2±82,2 pg/ml vs. 210,0±69,3 pg/ml, p<0,001; IL-17: 37,8±9,6 pg/ml vs. 17,8±4,5 pg/ml, p=0,009; IL-6: 39,4±11,3 pg/ml vs. 23,5±6,3 pg/ml, p<0,001, IL-10: 8,4±3,0 pg/ml vs. 21,4±9,7 pg/ml, p<0,001). A D-vitamin analóg adása javította a Th17/nTreg egyensúlyzavart NDC-s betegekben azáltal, hogy gátolta a Th17-sejtek IL-17 citokin termelését és növelte az nTreg-sejtek számát (Th17/nTreg: 0,8±0,7 vs. 0,23±0,15, p<0,005). A regulatív nTreg-sejtek funkciója hasonló volt az egészséges kontrollokéhoz, ugyanakkor a D-vitamin analóg adása javította a Treg-sejtek működését, az autológ CD4+CD25- sejtek proliferációjára kifejtett szuppresszióját.

Összegezve: A D-vitamin terápia a Th1 es Th17 által termelt citokinszinteket egyaránt csökkentette, ugyanakkor elősegítette a regulatív T-sejtek működését, növelte az nTreg-sejtek számát és funkcióját. NDC-s betegekben a D-vitamin szupplementáció javította a Th17/Treg egyensúlyának zavarát, ennél fogva hasznos terápia lehet a betegség kezelésében.

III.Mi az optimális D vitamin dózis, ami kedvezően befolyásolja az nTreg számot és funkciót?

Hét-hét NDC-s beteg (összesen 21 beteg) 5 héten keresztül 3 különböző dózisban (0,5, 1,0, ill. 1,5 μg/nap) kapott D-vitamin-analóg alfacalcidolt. A 3 különböző dózisban alkalmazott alfacalcidol-kezelést követően vizsgálták a betegek perifériás vérében a CD4+ T-sejtek intracitoplazmatikus IFN-γ-, IL-4-, és IL-10-tartalmát. A különböző alfacalcidol dózist kapó NDC-s beteg mindegyike D-vitamin-elégtelenségben szenvedett (D-vitamin-szintek <30 ng/ml).

Eredmények: A 0,5 μg/nap és az 1,0 μg/nap alfacalcidol-kezelés csökkentette a CD4+T-sejtek IFN-γ expresszióját, és az alfacalcidol ugyanezen adagja növelte a CD4+IL-10 és a CD4+IL-4+ expressziót a CD4+ T-sejtekben. A napi 1,5 μg/nap alfacalcidol-kezelés nem tudta tovább növelni a CD4+ T-sejtek INFγ-, IL-10- és IL-4-tartalmát.

A CD4+CD25high T-sejtek autológ CD4+CD25- T-sejtek proliferációjára kifejtett gátló hatását anti-CD3-mal és anti-CD28-cal történő stimuláció segítségével vizsgálták. Napi 1,0 μg dózist használva a CD4+CD25high T-sejtek szuppressziós aktivitása nőtt, és a 1,5 μg/nap alfacalcidol-kezelés hasonló mértékben javította a CD4+CD25high T-sejtek szuppresszor funkcióját, mint az 1,0 μg/nap alfacalcidol (proliferatív index alfacalcidol-kezelés előtt és után: 0,5 μg/nap: 0,397±0,190 *vs.* 0,247±0,09, p<0,08; 1,0 μg/nap: 0,473±0,146 *vs.* 0,264±0,05, p<0,004; 1,5μg/nap: 0,468±0,151 *vs.* 0,328±0,182, p<0,144). Negatív korrelációt találtak a CD4+CD25+Foxp3+nTreg sejtek száma és a proliferatív index között (r=−0,503, p=0,02).

Eredményeik alapján az 1,0 μg/nap alfacalcidol kezelés tűnik optimálisnak arra, hogy az NCD-s betegek nTreg sejtjeinek a száma és aktivitása növekedjen.

A munka gyakorlati eredménye: NDC-s betegek 41,6 %-ban D vitamin elégtelenségben szenved. Az NDC-s betegekben már az immunreguláció károsodására utaló eltérések észlelhetők, ami megnyilvánul az alacsony nTreg sejt száma és funkcióban, és a Th17 sejtek fokozott IL-17 termelésében. Az NDC-s betegek D vitamin hiánya tovább ronthatja a meglevő szabályozási mechanizmust, aminek következménye lehet az, hogy az NDC-ből poliszisztémás autoimmun betegség alakuljon ki. Eredményeink feljogosítanak minket arra, hogy kijelenthessük, hogy az autoimmun kórképek korai fázisában D vitamin pótlást kell alkalmazni.

Budget: 3.000,000.- HUF

PRIMARY PREVENTION IN SYSTEMIC AUTOIMMUNE DISEASES, IN UNDIFFERENTIATED CONNECTIVE TISSUE DISEASE (UCTD) AND SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS: THE NUMBER AND FUNCTION OF REGULATORY T CELLS AND SERUM LEVELS OF PROINFLAMMATORY CYTOKINES (INF-γ, TNF-α, IL-12, IL-17) AFTER ALFACALCIDOL TREATMENT

Edit Bodolay[1], Éva Zold[1], László Csáthy[2], Péter Szodoray[3], Sándor Baráth[1],Tünde Tarr[1],János Gaál[4], Edit Gyimesi[1],Sándor Sipka[1],Margit Zeher[1], Gyula Szegedi[1]
[1]Division of Clinical Immunology, 3rd Department of Medicine DEOEC, [2]Department of Clinical Biochemistry and Molecular Pathology, DEOEC,[3]Institute of Immunology, Rikshospitalet, University of Oslo,[4]Department of Rheumatology, Kenezy County Hospital Debrecen

Recent evidence suggests that both genetic and environmental factors play an important role in the development autoimmune diseases. Vitamin D deficiency may be one of the responsible factors in the development of autoimmune diseases. Several observations have shown that vitamin D inhibits proinflammatory process by suppressing the enhanced activity of immune cells that take part in the autoimmune reaction. One of the most important effects of vitamin D is the regulation of the number and the function of regulatory T cells. Optimal vitamin D levels might decrease the function of Th1 cells and improve that of the regulatory T cells.
Some reports imply that vitamin D may even be preventive in certain disorders, such as rheumatoid arthritis (RA), systemic lupus erythematosus (SLE) and diabetes type 1. Vitamin D supplementation may decrease the incidence and severity of autoimmune diseases.

The term undifferentiated connective tissue disease (UCTD) has been used since 1980 to describe a group of connective tissue disorders (CTDs) that were recognized as being in the early stages of a CTD but did not yet meet the standard criteria for a well-defined CTDs.
About 30–40% of patients with UCTD will evolve to defined CTDs, such as SLE, RA, and MCTD during years of follow-up. The vitamin D supplementation may be a very important preventive strategy to slow or prevent the progression of clinical signs in patients with UCTD. Both experimental and clinical data provide evidence that vitamin D deficiency in one of those important environmental factors that can increase the prevalence of autoimmune diseases.

1. The prevalence of vitamin D insufficiency in patients with undifferentiated connective tissue disease (UCTD).

Plasma 25(OH)D levels in 161 UCTD patients were measured in both summer and winter periods. Plasma levels of 25(OH)D in UCTD patients were significantly lower compared with controls in both summer and winter periods (UCTD summer: 33 ± 13.4 ng/mL versus control: 39.9 ± 11.7 ng/mL, $P = 0.01$; UCTD winter: 27.8 ± 12.48 ng/mL versus control: 37.8 ± 12.3 ng/mL, $P = 0.0001$). The presence of dermatological symptoms and pleuritis was associated with low levels of vitamin D. During the average follow-up period of 2.3 years, 35 out of 161 patients (21.7%) with UCTD further developed into well-established connective tissue disease (CTD). Patients who progressed into CTDs had lower vitamin D levels than those who remained in the UCTD stage (vitamin D levels: CTD: 14.7 ± 6.45 ng/mL versus UCTD: 33.0 ± 13.4 ng/mL, $P = 0.0001$).
Conclusion In patients with UCTD, a seasonal variance in levels of 25(OH)D was identified and showed that these levels were significantly lower than in controls during the corresponding seasons. Our results suggest that vitamin D deficiency in UCTD patients may play a role in the subsequent progression into well-defined CTDs.

II. Number and function of regulatory T cells in patients with UCTD

The aim of this study was to perform a quantitative and functional analysis of natural CD4+CD25highFoxp3+ regulatory T cells (nTregs) and CD4+IL-17+ T cells, and to assess the serum levels of proinflammatory cytokines in patients with undifferentiated connective tissue disease (UCTD) before and after 5 weeks of 0.5 μg/day alfacalcidol supplementation.
Twenty-five patients with UCTD were enrolled in an open-label trial of alfacalcidol. Plasma levels of 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] were assessed by a high-performance liquid chromatography

(HPLC) method. Flow cytometry was used for the quantification of nTregs and the IL-17 expression of T-helper (Th)17 cells. The serum concentrations of cytokines interleukin (IL)-12, interferon (IFN)-γ, IL-23, IL-17, IL-6, and IL-10 were measured by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Results: Alfacalcidol treatment decreased both Th1- (IL-12 and IFN-γ) and Th17-related (IL-23, IL-17, IL-6) cytokine levels in UCTD patients, while the soluble IL-10 level increased (IL-12: 156.7 ±75.2 vs. 87.5±42.1 pg/mL, $p < 0.001$; IFN-γ:41.5±12.0 vs. 21.7±9.9 pg/mL, $p < 0.001$; IL-23: 385.2±82.2 vs. 210.0 ±69.3 pg/mL, $p < 0.001$; IL-17: 37.8±9.6 vs. 17.8 ±4.5 pg/mL, $p = 0.009$; IL-6: 39.4 ±11.3 vs. 23.5 ±6.3 pg/mL, $p < 0.001$, IL-10: 8.4 ±3.0 vs. 21.4 ±9.7pg/mL, $p < 0.001$). Alfacalcidol improved the Th17/nTreg imbalance, as it inhibited the IL-17 expression of Th17 cells, and increased the number of nTregs. The alfacalcidol might increase the capacity of nTreg cells to suppress the proliferation of autologous CD4+CD25– cells.

Conclusion: Our findings support the idea that vitamin D influences the Th17/nTreg imbalance in vitamin D-insufficient patients with UCTD and could be beneficial in the management of the disease.

III. The main focus of our study was to assess the optimal dose of alfacalcidol, able to normalize the plasma concentrations of proinflammatory cytokines.

We applied three different doses (0.5 μg/day, 1.0 μg/day, and 1.5 μg/day) of alfacalcidol during 5 weeks.

Flow cytometric analysis of intracellular IFN-γ, IL-4, and IL-10 of CD4+ lymphocytes in patients with UCTD before and after vitamin D treatment:0.5 and 1.0 μg/day alfacalcidol treatment decreased significantly the IFN-γ expression of CD4+ T cells, while the same daily dose of alfacalcidol increased the expression both of the CD4+IL-10+ T cells, and CD4+IL-4+T cells. However 1.5 μg/day alfacalcidol did not further modify the IFN-γ, IL-10, and IL-4 expression of CD4+ T cells. Both 0.5 μg/day and 1.0 μg/day alfacalcidol decreased the IL-17 expression of CD4+ T cells, while after 1.5 μg/day alfacalcidol the IL-17 expression was lower than before treatment, however the difference was not significant. Both three doses of alfacalcidol increased the absolute number of nTreg (CD4+CD25brightFoxp3+) compared to the basal values. The absolute number of CD4+Th17 cells was markedly higher in UCTD patients before the administration of the vitamin D analogue, compared to the post-treatment values. The absolute rate of CD4+CD25brightFoxp3+/Th17 cells decreased after vitamin D treatment in UCTD patients, compared to the pretreatment values (CD4+CD25brightFoxp3/CD4+Th17+ ratio: before and after alfacalcidol treatment was significantly lower at the doses of 0.5 μg/day and 1.0 μg/day alfacalcidol ($p<0.05$ and $p<0.001$, respectively), while there was no effectivity of 1.5 μg/day alfacalcidol for the CD4+CD25brightFoxp+/Th17 ratio.

The capacity of CD4+CD25bright T cells to suppress the proliferation of autologous CD4+CD25− T cells was investigated, following stimulation with anti-CD3/anti-CD28 T cell expander microbeads in mixed cell cultures. After the alfacalcidol treatment the proliferative index of CD4+CD25− T cell was decreased (Proliferative index: before and after alfacalcidol:0.5 μg/day: 0.397±0.190 vs. 0.247±0.09, $p<0.08$; 1.0 μg/day: 0.473±0.146 vs. 0.264±0.05, $p<0.004$; 1.5 μg/day: 0.468±0.151 vs. 0.328±0.182, $p<0.144$), indicating that alfacalcidol treatment enhanced the suppressor activity of CD4+CD25+ T cells. We have found a negative correlation between the number of nTreg cells and the proliferative index ($r=-0.503$, $p=0.020$).

Summary: Vitamin D deficiency was found in 41.6 percent of patients with UCTD. Our data show a CD4+Th17/nTreg imbalance in patients with UCTD. These findings suggest a potential role for this immunoregulatory error in the progression from the UCTD stage towards well established CTDs. Taking these findings together, we suggest that vitamin D deficiency may play a pivotal role in the progression of UCTD by propagating a variety of proinflammatory processes, and therefore the supplementation of vitamin D can restore the immune-homeostatic disturbance and it may influence the Th17/nTreg imbalance. We consider that continuous vitamin D treatment is necessary and beneficial in patients with UCTD and may prevent or decelerate its transition to defined CTDs.

Teljes támogatás: 2,400,000- HUF

AZ OPIOID/NOCICEPTIN RENDSZER MŰKÖDÉSÉNEK MOLEKULÁRIS HÁTTERE EPILEPSZIÁBAN: ÁLLATMODELLEK ÉS HUMÁN VONATKOZÁSOK

Benyhe Sándor, Borsodi Anna, Páldy Eszter, Engin Bojnik
M.T.A. Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémiai Intézet

A fájdalomérzésben és –csillapításban kulcsszerepet játszó neuromodulator opioid/nociceptin rendszer számos fiziológiai funkció szabályozásában is részt vesz. Egyes patológiás állapotokban, beleértve a neurodegeneratív betegségeket is, működésük megváltozik.

A jelen kutatásokban **epilepszia** esetén tanulmányoztuk az opioid/nociceptin rendszer eltéréseit a normál állapotokétól. Célunk az volt, hogy jobban megértsük a kölcsönhatás mögött rejlő molekuláris és funkcionális hátteret.

A kísérleti megközelítésben állatmodelleket használtunk, illetve humán temporális neocortex és hippokampusz mintákat dolgoztunk fel, amelyek műtéti anyagokból származtak.

Kísérleteink azt mutatják, hogy a vizsgált *homloklebenyben* megnövekedett mu opioid receptor kötődés látható, amit specifikus agonista peptid alkalmazásával vizsgáltunk. A G-fehérje aktiválásának mértékében ez nem tükröződött, sőt a jellemző értékek csökkenését tapasztaltuk. Ezek az első megfigyelések arra vonatkozóan, hogy a mű receptor kötődés és a G-fehérje reguláció ellentétes irányban jelentkezik a betegségben. Érdekes megjegyezni, hogy ez az ellentétes hatás ismert pl. a krónikus heroinkezelés után patkányokban, ami deszenzitizációra utal, illetve a G-fehérjével való kapcsoltság megszűntét jelenti. Ez feltétlenül kihat a megváltozott receptor környezetre, valamint a későbbi transzdukciós folyamatokra.

További vizsgálataink azt mutatták, hogy ugyanezen betegek esetében a nociceptin kötődése csökken, de az általa stimulált GTP-kötődés nem változott, ami kompenzációs mechanizmusokkal magyarázható. A fenti eredmények nagymértékben függtek attól, hogy rövidebb vagy hosszabb epilepszia történettel állunk szemben, illetve a betegek kora is meghatározó szempontnak mutatkozott.

A vizsgálat egy másik vonala a mu receptor mRNS expressziójának és G-fehérje aktiválásnak a vizsgálata volt farmakorezisztens epilepsziás *hippokampuszban.* Az autopsziás mintákkal ellentétben a beteg egyedek hippokampusz műtéti mintáiban megnövekedett mRNS expresszió volt tapasztalható. A G-fehérje kapcsoltság alapállapotban magas szinten valósult meg, amit mű receptor agonistával továbbnövelni nem lehetett. Az eredmények egyértelműen arra utalnak, hogy ebben a szövetben is alapvető változások mutathatók ki a mű receptorok vonatkozásában, az egészséges egyedekkel összehasonlítva.

Teljes támogatás: 2,400,000- HUF

Vizsgálataink arra is fényt derítettek, hogy a dopaminerg rendszert is érintik a változások epilepszia esetén. Míg a dopamin transzporter megnövekedett értéket mutatott, a dopamin és metabolitjainak szintje csökkent. Neuropszichiátriai társbetegségek esetén a D2-indukálta G-fehérje aktiválás mértéke is eltérést mutatott. Az eredmények tehát arra utalnak, hogy a dopaminerg rendszer fontos szerepet játszik az epilepszia, a szorongásos betegségek és a depresszió patofiziológiájában.

Eredményeink hozzájárulnak az epilepszia komplex mechanizmusának a megértéséhez és irányt mutathatnak a jövőbeni kezelések korszerűsítésére. Következtetéseink közé tartozik, hogy a receptorkötődést követő intracelluláris események terápiás targetet szolgáltathatnak az epilepszia gyógyításához.

A vizsgálatok kollaborációban történtek, nemzetközileg elismert laboratóriumokkal, Mexikóban és Törökországban.

Közlemények

Rocha L, Orozco-Suarez S, Alonso-Vanegas M, Villeda-Hernandez J, Gaona A, Paldy E, Benyhe S, Borsodi A
Temporal lobe epilepsy causes selective changes in mu opioid and nociceptin receptor binding and functional coupling to G- proteins in human temporal neocortex
NEUROBIOL. DISEASE :**35**: pp. *466-473* (2009) IF: 4, 5

Cuellar-Herrera M, Velasco AL, Velasco F, Chavez L, Orozco-Suarez S, Armagan G, Turunc E, Bojnik E, Yalcin A, Benyhe S, Borsodi A, Alonso-Vanegas M, Rocha L.:
Mu opioid receptor mRNA expression, binding, and functional coupling to G-proteins in human epileptic hippocampus**.** HIPPOCAMPUS: 22 pp122-127 (2012) (Epub 2010 Nov 3.) IF:3.913

Rocha L, Alonso-Vanegas M., Villeda-Hernández J, Mújica M., Cisneros-Franco J, López-Gómez M., Zavala-Tecuapetla C, Frías-Soria C, Segovia-Vila J, Borsodi A.:
Dopamine abnormalities in the neocortex of patients with temporal lobe epilepsy
NEUROBIOL. DISEASE :45 pp.499-507 (2012) IF 4,5

Budget: 2,400,000- HUF

MOLECULAR BACKGROUND OF THE MECHANISM OF ACTION OF THE OPIOID/NOCICEPTIN SYSTEM IN EPILEPSY

Benyhe Sándor, Borsodi Anna, Páldy Eszter, Engin Bojnik
Institute of Biochemistry, Biological Research Center of the Hungarian Academy of Sciences, Szeged

The opioid/nociceptin system which plays an essential role in pain sensation and relief, participate in a wide variety of other physiological functions, and also in neurodegenerative disorders including epileptic activity. In the present investigations we studied the concomitant alterations in the opioid /nociceptin system during epilepsy. The aim was the better understanding of the molecular and functional background behind the interactions. For experimental approaches animal models were used. The investigations also covered studies on surgical samples from human *temporal neocortex* and *hippocampus*.
Our experiments indicate that patients with *temporal lobe epilepsy* present enhanced mu receptor binding and a simultaneous lower ability of the mu opioid receptor agonist DAMGO to stimulate the binding of [^{35}S]GTPγS, an effect associated with a decrease in maximal effect (E_{max}) and potency (EC_{50}). In addition, they represent the *first evidence* suggesting that, in spite of enhanced mu opioid receptor binding, the activation of G-protein mediated by mu opioid receptors is decreased in neocortex of patients with temporal lobe epilepsy.
It is important to notice that the above finding is similar to that detected after chronic heroin self-administration in rats, effect associated with receptor desensitization and *mu receptor-G-protein uncoupling*. This has a consequence in the interaction between the altered receptor systems and transduction mechanisms.
Moreover, our results indicate that patients with temporal lobe epilepsy exhibit reduced nociceptin binding in temporal neocortex. In spite of low [^{3}H]nociceptin binding, nociceptin-stimulated [^{35}S]GTPγS binding was not modified, probably as a result of compensatory mechanisms at G-proteins level.
The overall results are highly dependent on the shorter or longer history of epilepsy and the ages of the patients.

Another goal of the present study was to characterize the mu receptor mRNA expression, ligand binding, as well as G protein activation mediated by these receptors in *epileptic hippocampus* of patients with pharmacoresistant mesial temporal lobe epilepsy (TLE). In contrast with autopsy samples, hippocampus obtained from patients with mesial TLE demonstrated enhanced mRNA expression. Although mesial TLE group demonstrated high levels of basal binding for the G proteins DAMGO-stimulated [(35) S]GTPγS binding did not demonstrate significant alterations. These data provide strong evidence that the epileptic hippocampus of patients with pharmacoresistant mesial TLE presents significant alterations in MOR. Such changes may be due to adaptive mechanisms to compensate for other as yet unknown alterations

Experiments were also designed to evaluate different variables of the dopaminergic system in the temporal cortex of surgically treated patients with temporal lobe epilepsy (TLE) associated with mesial sclerosis (MTLE,) or with cerebral tumor or lesion. Both epileptic groups presented elevated binding to the dopamine transporter and low tissue content of dopamine and its metabolites. When compared with autopsies and patients with anxiety and depression, patients without neuropsychiatric disorders showed high D2-like induced activation of G proteins, an effect that correlated positively with age of patient and seizure onset age, and negatively with duration of epilepsy. This study suggests that alterations of the dopaminergic system result from epileptic

activity and could be involved in the pathophysiology of TLE and the co-morbid anxiety and depression.
The obtained results help to better understand the complex mechanisms behind the disorder and ultimately might give new guidelines to improved medications in the future. Postreceptor components such as G-proteins could be considered as potential therapeutic targets for the treatment of epilepsy.
The research was carried out in collaboration with well recognized international laboratories in Mexico and Turkey.

References

Rocha L, Orozco-Suarez S, Alonso-Vanegas M, Villeda-Hernandez J, Gaona A, Paldy E, Benyhe S, Borsodi A
Temporal lobe epilepsy causes selective changes in mu opioid and nociceptin receptor binding and functional coupling to G- proteins in human temporal neocortex
NEUROBIOL. DISEASE :**35**: pp. *466-473* (2009) IF: 4, 5

Cuellar-Herrera M, Velasco AL, Velasco F, Chavez L, Orozco-Suarez S, Armagan G, Turunc E, Bojnik E, Yalcin A, Benyhe S, Borsodi A, Alonso-Vanegas M, Rocha L.:
Mu opioid receptor mRNA expression, binding, and functional coupling to G-proteins in human epileptic hippocampus**.** HIPPOCAMPUS: 22 pp122-127 (2012) (Epub 2010 Nov 3.) IF:3.913

Rocha L, Alonso-Vanegas M., Villeda-Hernández J, Mújica M., Cisneros-Franco J, López-Gómez M., Zavala-Tecuapetla C, Frías-Soria C, Segovia-Vila J, Borsodi A.:
Dopamine abnormalities in the neocortex of patients with temporal lobe epilepsy
NEUROBIOL. DISEASE :45 pp.499-507 (2012) IF 4,5

Budget: 3.000,000.- HUF

A CYCLOPHILIN D SZEREPE AZ ÖREGEDÉST KÍSÉRŐ BETEGSÉGEK KIALAKULÁSÁBAN

Viktoria Vereczki[1], Ibolya Bodnar[2], Otto Pinter[3], Dora Zelena[3], Josef Mansour[4], Issa Pour-Ghaz[4], Lilla Kepes[1], Beata Torocsik[4], Oszwald Erzsébet[1], Vera Adam-Vizi[4], and Christos Chinopoulos[4]
[1]Anatomy, Histology and Embryology, [2]Deptartment of Human Morphology and Developmental Biology, [4]Department of Medical Biochemistry Semmelweis University, Budapest, [3]Institute of Experimental Medicine of the Hungarian Academy of Sciences

A mitokondriális cyclophilin D (cypD) fehérje fontos szerepét a nekrotikus sejthalálban genetikailag módosítot cypD knok-out egereken végzett kísérletekkel igazolták. A nagy tömegben elvégzett izolált mitokondriumot és egyéb in vitro modelleket használó kísérletek ellenére, a cypD vitathatatlan szerepét a leggyakoribb neurodegeneratív betegségben, az Alzheimer-kórban, csak nemrégiben mutatták ki: transzgenikus egerekben, melyek a mutáns amyloid prekurzort, az A-beta fehérjét túlexpresszálják, a cypD deficiencia javította a mitokondriális és szinaptikus funkciókat és elősegítette a tanulást idős és fiatal egyedekben egyaránt. A bizonyíték tudatában, hogy a cypD gén kiütése csökkenti a betegség jeleit olyan állatokban, melyekben elkerülhetetlenül kialakul az Alzheimer-kór, azt a feltételezést tettük, hogy ugyanez a genetikai módosításáltalánosságban kedvező hatással lehet az idősödő állatpopulációra. Ezért megvizsgáltuk két öregedési marker, a mGluR1 és a GFAP expresszióját öreg vad, heterozigóta és cypD kiütött egerek neuron és asztrocita szubpopulációin. Mindhárom csoportból 4 öreg egyedet (~24 hónap) acroleinnel és paraformaldehiddel perfundáltunk és cryoprotektánsban tartottunk. Az agyak metszeteit a mGluR1 és a GFAP ellenanyagaival festettük meg. Az eredmények kiegészítik az egyes csoportok agyából készült homogenátumainak western blottjait, a viselkedési teszteket és a túlélési tanulmányokat. Az erőfeszítéseink értékes információkkal szolgálhatnak a cyclophilin D gyógyszercélpontként való felismerésében egy öregedés elleni gyógyszer számára.
Eredmények: Kimutattuk, hogy a GFAP a vad típussal szemben upregulált cypD +/- egerekben, de downregulált a cypD -/- genotípusnál. Az mGluR1 szignifikáns különbséget mutatott az előfordulási mintázatában, a három csoportban. A CypD +/- genotipus az élettartam drámaian megnövekedését okozza. Ezek az eredmények még nem publikáltak, mivel még további kísérletek folynak más öregedési markerekkel.
A fentieken túlmenően néhány további eredmény már publikálásra került, melyek finanszírozásához a pályázat hozzájárult. Az 1, 2, 3 és 6-os referenciák nem kapcsolódnak közvetlenül a projekthez, de közös vegyszerek és eltöltött munkaórákon keresztül hasznukra vált a támogatás. A 4, 7 és 8-as referenciákban a cypD bioenergetikai szerepe a volt vizsgálva. Az 5-ös referenciában leírásra kerül egy módszer, melyet a közeljövőben fogunk használni a cypD vad és KO egerek bioenergetikájának összehasonlítására.

Budget: 3.000,000.- HUF

THE CONTRIBUTION OF CYCLOPHILIN D TO AGE-RELATED MALADIES

Viktoria Vereczki[1], Ibolya Bodnar[2], Otto Pinter[3], Dora Zelena[3], Josef Mansour[4], Issa Pour-Ghaz[4], Lilla Kepes[1], Beata Torocsik[4], Oszwald Erzsébet[1], Vera Adam-Vizi[4], and Christos Chinopoulos[4]
[1]Anatomy, Histology and Embryology, [2]Deptartment of Human Morphology and Developmental Biology, [4]Department of Medical Biochemistry Semmelweis University, Budapest, [3]Institute of Experimental Medicine of the Hungarian Academy of Sciences

Genetic proof that the mitochondrial protein cyclophilin D (cypD) plays a major role in the manifestation of necrotic cell death has been established by using genetically engineered cypD knock out mice. Inspite of the large body of work performed in isolated mitochondria and other in vitro models, the indisputable contribution of cypD to the most common neurodegenerative disease, Alzheimer's disease, has only being recently shown: in transgenic mice overexpressing mutant amyloid precursor protein and A-beta, cypD deficiency improved mitochondrial and synaptic function and learning/memory in both young and aged mice. Mindful of the recent evidence showing that genetic disruption of the cypD gene affords benefit to animals bound to develop Alzheimer's disease, we formulated the hypothesis that the same genetic manipulation may confer advantage to the aging animal population in general. We therefore examined the expression of mGluR1 and GFAP, two aging markers of a subpopulation of neurons and astrocytes, respectively, in cypD wild type, heterozygote and knock-out aged mice. 4 aged mice (~24 months old) from each group were perfused with paraformaldehyde plus acrolein and kept in cryoprotectant. Brains have been sectioned, and decorated with antibodies against mGlur1 and GFAP. These results complement findings on western blots of brain homogenates, as well as behavioral tests and survival studies of the respective mice groups. Our efforts may provide valuable information in terms of pinpointing cyclophilin D as a target for an aging-combating drug.
Findings: We show that GFAP is upregulated in cypD +/- mice, but downregulated in cypD -/-, compared to wild type mice. mGluR1 expression exhibited a significantly different pattern of expression in brain regions among the three groups. CypD +/- mice also exhibited a dramatic extension of lifespan. The above findings are yet to be published, as there is ongoing work with additional aging markers.
A number of additional findings have been already published, using funds from the current award. References 1, 2, 3, 6 are not directly related to the project, but benefited from the funding due to sharing of materials and work hours. In references 4, 7 and 8, the contribution of cypD to mitochondrial bioenergetics was directly addressed. In reference 5 a methodology is described that will be used in the very near future for assessing bioenergetic functions of cypD WT and KO mice.

1. Konràd C, Kiss G, Töröcsik B, Lábár JL, Gerencser AA, Mándi M, Adam-Vizi V, Chinopoulos C: A distinct sequence in the adenine nucleotide translocase from Artemia franciscana embryos is associated with insensitivity to bongkrekate and atypical effects of adenine nucleotides on Ca2+ uptake and sequestration. FEBS J. 278 pp. 822-36 (2011) IF: 3,129

2. Kawamata H, Starkov AA, Manfredi G, Chinopoulos C. A kinetic assay of mitochondrial ADP-ATP exchange rate in permeabilized cells: Anal Biochem. 407 pp. 52-7 (2010) IF: 3,238

3. Kawamata H, Tiranti V, Magrané J, Chinopoulos C, Manfredi G. adPEO mutations in ANT1 impair ADP-ATP translocation in muscle mitochondria: Hum Mol Genet. 20 pp. 2964-74 (2011) IF: 8,058

4. Doczi J, Turiák L, Vajda S, Mándi M, Töröcsik B, Gerencser AA, Kiss G, Konràd C, Adam-Vizi V, Chinopoulos C. Complex contribution of cyclophilin D to Ca2+-induced

permeability transition in brain mitochondria, with relation to the bioenergetic state: J Biol Chem. 286 pp.6345-53 (2011) IF: 5,328

5. Chinopoulos C, Zhang SF, Thomas B, Ten V, Starkov AA: Isolation and functional assessment of mitochondria from small amounts of mouse brain tissue. Methods Mol Biol. 793 pp. 311-24 (2011) IF: 1,167

6. Chinopoulos C. Mitochondrial consumption of cytosolic ATP: not so fast: FEBS Lett. 585 pp.1255-9 (2011) IF: 3,601

7. Chinopoulos C, Konràd C, Kiss G, Metelkin E, Töröcsik B, Zhang SF, Starkov AA. Modulation of F0F1-ATP synthase activity by cyclophilin D regulates matrix adenine nucleotide levels: FEBS J. 278 pp.1112-25 (2011) IF: 3,129

8. Chinopoulos C, Adam-Vizi V. Modulation of the mitochondrial permeability transition by cyclophilin D: Moving closer to F(0)-F(1) ATP synthase?: Mitochondrion in press (2012) IF: 3,238

Teljes támogatás: 4.200.000,- Ft

TÚLÉLÉSI ADATOK ÉRTÉKELÉSE KÖTŐSZÖVETI BETEGSÉGEKBEN VALAMINT A BETEGSÉG AKTIVITÁSÁNAK VIZSGÁLATA ÉS EGY ÚJ AKTIVITÁSI KOMPOZIT INDEX KIALAKÍTÁSA ÉS VALIDÁLÁSA SZISZTÉMÁS SCLEROSISBAN

Czirják László
PTE KK, Reumatológiai és Immunológiai Klinika

1. Új aktivitási index kidolgozása és validálása szisztémás sclerosisban.

a. A követéses adatok alapján az európai index validálását elvégeztük, és egy új, módosított indexet is publikáltunk (1). Az index további validálása („sensitivity to change") folyamatban van, 4 centrum adatait dogozzuk fel, az eddigi eredmények alapján még lehetséges, hogy további adatgyűjtés lesz szükséges. A nemzetközi kooperációban készült prognosztikus modell publikálásra került (2).

A biomarkerek vizsgálata folyik, eddig az aktivitást jelző biomarkerek közül eddig nem tudtunk egyet sem beilleszteni a scleroderma aktivitási indexbe. Az SPD és KL-6 markerek inkább súlyossági markerek, korlátozott prediktív értékkel. Az ezzel kapcsolatos vizsgálatokat befejeztük, a közlemény írjuk.

b. A korábban publikált bőr önkitöltő kérdőív további, nemzetközi validálása folyamatban van. A „baseline" adatok bíztatóak, a követéses vizsgálati adatok azonban még nem elegendőek, további adatgyűjtés szükséges. Egy román, egy magyar és egy szerb centrum bevonásával tovább folyik az adatgyűjtés.

2. Túlélési adatok vizsgálata szisztémás sclerosisban

Az adatbázist lezártuk, a statisztikai számítások elvégzése folyik. Az eddigi irodalmi adatok metanalizisét elvégeztük s publikáltuk (3).

3. Prospektív, követéses vizsgálatok a hazai prognózis vizsgálata céljából gyulladásos izombetegségekben és szisztémás lupus erythematosusban

a. Gyulladásos izombetegségben a saját adatok összegyűjtése és értékelése megtörtént (3), a közleményt publikálásra készen van.

b. Szisztémás lupus erythematosusban jelenleg még a prospektív adatgyűjtést lezártuk (több, mint 500 beteg adatai állnak rendelkezésre), néhány esetben szükséges még a „lost to follow-up" okának pontos tisztázása. A kereszmetszeti adatok analízisét már elkezdtük, a publikáció összeállítása néhány hónapon belül várható.

Irodalom

1. Minier T, Nagy Z, Bálint Z, Farkas H, Radics J, Kumánovics G, Czömpöly T, Simon D, Varjú C, Németh P, Czirják L. Construct validity evaluation of the European Scleroderma Study Group activity index, and investigation of possible new disease activity markers in systemic sclerosis. Rheumatology (Oxford). 2010; 49: 1133-45.

2. Fransen J, Popa-Diaconu D, Hesselstrand R, Carreira P, Valentini G, Beretta L, Airo P, Inanc M, Ullman S, Balbir-Gurman A, Sierakowski S, Allanore Y, Czirjak L, Riccieri V, Giacomelli R, Gabrielli A, Riemekasten G, Matucci-Cerinic M, Farge D, Hunzelmann N, Van den Hoogen FH, Vonk MC. Clinical prediction of 5-year survival in systemic sclerosis: validation of a simple prognostic model in EUSTAR centres. Ann Rheum Dis. 2011 Jul 21.

3. Komócsi A, Vorobcsuk A, Faludi R, Pintér T, Lenkey Z, Költő G, Czirják L. The impact of cardio-pulmonary manifestations on the mortality of SSc: a systematic review and meta-analysis of observational studies. Rheumatology (Oxford). 2012 Jan 5. [Epub ahead of print]

4. Varjú C, Minier T, Péter M, Parti K, Pintér T, Kehl D, Pál E, Berki T, Simon D, Kumánovics G, Czirják L. Klinikai tüneteken és szerológiai eredményeken alapuló klasszifikációs rendszerek idiopathiás gyulladásos izombetegségekben. MRE Vándorgyűlés, 2011. szeptember 22–24., Eger

EVALUATION OF SURVIVAL DATA IN PATIENTS WITH SYSTEMIC AUTOIMMUNE DISEASES AND ASSESSMENT OF DISEASE ACTIVITY IN SYSTEMIC SCLEROSIS BY THE DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A NEW COMPOSITE INDEX

László Czirják
Department of Rheumatology and Immunology, Medical Center, University of Pécs, Pécs, Hungary

1. Development of a new activity index for systemic sclerosis

a. We have completed the validation of the European Scleroderma Activity Index, and also developed a new modified instrument for the assessment of disease activity in scleroderma (1). Further evaluation steps („sensitivity to change") is ongoing, we have involved four European centers. Based on the preliminary data, further data collection seems to be necessary. A prognostic model for scleroderma has also been published (2).

We continue the investigation of the biomarkers. Until now no single biomarker proved to be appropriate as a part of either the European or our new composite activity index. The SPD and KL-6 biomarkers proved to be severity markers with a limited predictive value. We are currently completing the publication on this particular issue.

b. We continue the validation of the skin self assessment questionnaire. Further data collection is necessary. We involved four centers into this particular data collection.

2. Survival analysis in systemic sclerosis

We have closed the database, and started the statistical calculations. We have completed and published a metaanalysis of the previous data (3).

3. Prospective, follow-up studies on inflamatory myopathies and systemic loupus erythematosus

a. With regard to the inflammatory myopathies we have completed the data collection, we are completing the paper.

b. In systemic lupus erythematosus, we closed the database. We have all the clinical data of more than 500 patients, and started the evaluation of the cross sectional data. In a few cases we need to trace down some patients „lost to follow-up". It is necessary for the survival studies. We complete this latter task within a few months.

References

1. Minier T, Nagy Z, Bálint Z, Farkas H, Radics J, Kumánovics G, Czömpöly T, Simon D, Varjú C, Németh P, Czirják L. Construct validity evaluation of the European Scleroderma Study Group activity index, and investigation of possible new disease activity markers in systemic sclerosis. Rheumatology (Oxford). 2010; 49: 1133-45.

2. Fransen J, Popa-Diaconu D, Hesselstrand R, Carreira P, Valentini G, Beretta L, Airo P, Inanc M, Ullman S, Balbir-Gurman A, Sierakowski S, Allanore Y, Czirják L, Riccieri V, Giacomelli R, Gabrielli A, Riemekasten G, Matucci-Cerinic M, Farge D, Hunzelmann N, Van den Hoogen FH, Vonk MC. Clinical prediction of 5-year survival in systemic sclerosis: validation of a simple prognostic model in EUSTAR centres. Ann Rheum Dis. 2011 Jul 21.

3. Komócsi A, Vorobcsuk A, Faludi R, Pintér T, Lenkey Z, Költő G, Czirják L. The impact of cardio-pulmonary manifestations on the mortality of SSc: a systematic review and meta-analysis of observational studies. Rheumatology (Oxford). 2012 Jan 5. [Epub ahead of print]

Teljes támogatás: 2.700.000 Ft

HUMÁN FEHÉRVÉRSEJTEK HORMON TARTALMÁNAK VIZSGÁLATA: DIAGNOSZTIKAI ÉS PROGNOSZTIKAI LEHETŐSÉGEK.

Csaba György[1], Pállinger Éva[2]

[1]Semmelweis Egyetem Genetikai, Sejt és Immunbiológiai Intézete, [2]Magyar Tudományos Akadémia és Semmelweis Egyetem Gyulladásbiológiai és Immungenomikai Kutatócsoportja

A kutatás elsődleges célja annak megismerése volt, hogy emberi immunsejtekben ugyanúgy megtalálhatók-e a hormonok, mint a kísérleti állatokéban, van-e különbség az egyes immunsejt típusok hormon tartalmában, illetve van-e különbség ebből a szempontból az egészséges ember és a hematológiai (daganatos) betegségben szenvedők immunsejtjei között. Kiegészítő kísérletekként állat (patkány) modellben vizsgáltuk a hormonok jelenlétét és annak befolyásolhatóságát. Az emberi immunsejteket monoklonalis antitestek és áramlási citometria segítségével fenotipizáltuk

A kutatási ciklus első részében a korábbi ciklusban elkezdett vizsgálatokat folytattuk és fejeztük be (1). Ennek keretében vizsgáltuk hisztamin, szerotonin és trijódtironin (T_3) mennyiségét perifériás vér fehérvérsejtjeiben akut limphoid leukémiás és kontroll gyermekekben, többszínű áramlási citometriás módszerrel, a betegség diagnózisakor, a kezelések alatt és az ezt követő időszakban.

Szignifikánsan kevesebb szerotonin volt jelen a T sejt alcsoportokban (Th, Tc és aktivált T sejt) leukémiásokban, mint a kontrollokban a diagnózis alkalmával és a fenntartó terápia alatt, sőt a Tc és Th sejtekben még egy évvel a kezelés befejezése után is. A hisztamin és T_3 tartalomban nem volt különbség a diagnózis idején, de csökkent a fenntartó terápia és a kezelés befejezése után.

A szerotonin és T_3 tartalom alacsonyabb volt diagnóziskor és kezelés alatt az NK és NKT sejtekben. Hasonló szerotonin csökkenés volt megfigyelhető a B sejtekben. Bár a diagnóziskor nem volt különbség a B sejtek T_3 tartalmában, a terápia alatt ez szignifikánsan csökkent. A B és NK sejtek szerotonin tartalma a kezelés után évekig alacsonyabb maradt .

A továbbiakban három másik hormon, az adrenalin, inzulin és ACTH jelenlétét és változásait vizsgáltuk. E hormonok jelen vannak mind a normál, mint a leukémiás gyermekek fehérvérsejtjeiben. A különböző sejtcsoportok (T, Tc, Th, B, NK) sejtjeinek hormon tartalmában nem találtunk különbséget. A normális és kóros sejtek hormon tartalmának összehasonlító vizsgálata és kiértékelése még folyamatban van.

A kiegészítő (patkány) vizsgálatokban annak lehetőségét vizsgáltuk meg, hogy van-e az immunsejtek között az általuk termelt hormonok által végzett szabályozás. Hisztamin beta-endorfin és T_3 termelésére való hatását tanulmányoztuk. A hisztamin rendkívül alacsony (10^{-15} és 10-18 M) koncentrációban jelentősen csökkentette az immunsejtek endorfin tartalmát és növelte a T_3 szintet (2).

A jelen és korábbi kísérleteink, valamint irodalmi adatok alapján feltételezhető, hogy az immunrendszernek jelenős endokrin funkciója van. Ez egyrészt abban különbözik az endokrin rendszer funkciójától, hogy egyetlen sejt képes minden endokrin sejt hormonális tevékenységét elvégezni, másrészt, hogy a sejtek a hormonokat a szükséges helyre tudják szállítani és ott leadni, illetve helyben termelni. Ez egy ökonomikus megoldás, mely kevés hormon termelését igényli, de ez célzottan szállítódik. Ez az elgondolás eredményezte az immunrendszer általi sejtes szállítmányozás teóriáját (3,4). Ugyanakkor az immunsejtek –más sejteknél jobban- alá vannak vetve a perinatálisan, vagy későbbi kritikus periódusokban történő hormonális imprintingnek (5,6), mivel a felnőtt korban is osztódó és differenciálódó sejtekből fejlődnek, ami kialakítja az érett korra jellemző endokrin potenciát.

Irodalom:

1.Pállinger É, Horváth Zs, Csóka M, Kovács GT, Csaba G: Decreased hormone content of immune cells in children during acute lymphocytic leukemia (ALL) – effect of treatment. ACTA MICROBIOLOGICA ET IMMUNOLOGICA HUNGARICA 58: pp. 41-50 (2011) IF: 0.625

2.Csaba G, Pállinger É: Is there a possibility of intrasystem regulation by hormones produced by the immune cells? Experiments with extremely low concentrations of histamine. Acta PHYSIOLOGICA HUNGARICA 96: pp. 369-374 (2009) IF: 0.750

3.Csaba G: The immuno-endocrine system: hormones, receptors and endocrine function of immune cells. The packed-transport theory. ADVANCES IN NEUROIMMUNE BIOLOGY 1: pp: 71-85 (2011)

4.Csaba G: Az immun-endokrin rendszer. Egy új endokrin elmélet: a sejtes szállítmányozás problémája. ORVOSI HETILAP 152: pp. 777-784 (2011)

5.Csaba G: The biological basis and clinical significance of hormonal imprinting, an epigenetic process. CLINICAL EPIGENETICS 2: pp 187-196 (2011)

6.Csaba G: Hormonális imprinting – a kiszámíthatatlan jövő, ORVOSI HETILAP 151: pp 1323-1330 (2010)

Budget: 2.700.000 Ft.

INVESTIGATIONS ON THE HORMONE CONTENT OF HUMAN WHITE BLOOD CELLS: DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC POSSIBILITIES[1]

[1]György Csaba and [2]Éva Pállinger

[1]Department of Genetics, Cell and Immunobiology, Semmelweis University, [2]Research Team for Inflammation Biology and Immune Genomics, Hungarian Academy of Sciences and Semmelweis University

The main purpose of the experiments was to study the presence of hormones in human immune cells, the difference between the hormone profile of immune cells and the difference between the normal (healthy) and hematologically ill (leukemic) children's immune cells from this point of view. As supplementary experiments, rats were studied for the presence of hormones and for the influence of different factors on the hormone content. Human immune cells were immunophenotyped and flow cytometric analysis was done as well as the measurement of size and granulation.

In the first part of the reserch-cycle the earlier investigations were continued (1). In the frame of this research the amount of histamine, serotonin ond triiodothyronine (T_3) was studied in leukemic (ALL) children as well as in control ones, in the time of diagnosis and maintenance therapy, and one year after finishing the treatment. Significantly less serotonin was found in the T cell subsets (Th, Tc and activated Tc) in the time of diagnosis, during maintenance therapy and one year after finishing the treatment. There was not difference in the histamine and T_3 content at the time of diagnosis however, there was a significant decrease during therapy and after it.

The serotonin and T_3 content was less at diagnosis and during therapy in the NK and NKT cells. Similar serotonin decrease was observed in the B cells. Although there was not difference in the T_3 content of B cells at diagnosis, this significantly diminished during therapy. The serotonin content of B and NK cells remained low years after therapy.

Later the presence and changes of other three hormones (epineprine, insulin and ACTH) were studied. The hormones were present indeed in the healthy as well as in the leukemic childrens' white blood cells. There was not difference in the hormone content of different (T, Tc, Th. B, NK) cell types. The comprative study and evaluation of normal and pathological cells are in progress.

In the supplementary (rat) experiments the possibility of hormonal regulation between the immune cells by hormones, produced by them, was studied. The effect of histamine on the production (by immune cells) of beta-endorphin and T_3 was investigated. Histamine, in extremely low concentrations (10^{-15} and 10^{-18} M) significantly decreased the endorphin content and significantly elevated T_3 content of the immune cells.

On the basis of our present and earlier experiments as well, as literary data, the important endocrine function of immune cells can be supposed. This partly different from the function of the real endocrine system, as a single immune cell is able to produce all the hormones of the endocrine system and the immune cells can transport the hormones to different places where they are needed or they are able to produce these hormones locally. This seems to be a very

economic process, which requires the production of minimal amounts of hormones with targeted transport. This induced the packed transport theory of the neuroimmune system. (3,4). At the same time the the immune cells are rather subjected to hormonal imprinting (5,6) as they develop from dividing and differentiating cells of the adult age, which determines the immuno-endocrine potencies characteristic to this period.

References

1.Pállinger É, Horváth Zs, Csóka M, Kovács GT, Csaba G: Decreased hormone content of immune cells in children during acute lymphocytic leukemia (ALL) – effect of treatment. ACTA MICROBIOLOGICA ET IMMUNOLOGICA HUNGARICA 58: pp. 41-50 (2011) IF: 0.625

2.Csaba G, Pállinger É: Is there a possibility of intrasystem regulation by hormones produced by the immune cells? Experiments with extremely low concentrations of histamine. ACTA PHYSIOLOGICA HUNGARICA 96: pp. 369-374 (2009) IF: 0.750

3.Csaba G: The immuno-endocrine system: hormones, receptors and endocrine function of immune cells. The packed-transport theory. ADVANCES IN NEUROIMMUNE BIOLOGY 1: pp: 71-85 (2011)

4.Csaba G: Az immun-endokrin rendszer. Egy új endokrin elmélet: a sejtes szállítmányozás problémája. ORVOSI HETILAP 152: pp. 777-784 (2011)

5.Csaba G: The biological basis and clinical significance of hormonal imprinting, an epigenetic process. CLINICAL EPIGENETICS 2: pp 187-196 (2011)

6.Csaba G: Hormonális imprinting – a kiszámíthatatlan jövő, ORVOSI HETILAP 151: pp 1323-1330 (2010)

Teljes támogatás: 3.000.000,- Ft

PIRIDIN-NUKLEOTIDOK REDOX ÁLLAPOTA AZ ENDOPLAZMÁS RETIKULUMBAN MINT AZ ELHÍZÁSSAL JÁRÓ BETEGSÉGEK GYÓGYSZERES KEZELÉSÉNEK TÁMADÁSPONTJA

Csala Miklós, Konta Laura, Kereszturi Éva, Révész Katalin, Tüttő Anna Judit
Semmelweis Egyetem, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet

BEVEZETÉS

A kortizon lokális redukciója kortizollá a glukokortikoid hatás fontos meghatározója a sejtekben, és bizonyítottan szerepet játszik az elhízás, a metabolikus szindróma, valamint a diabetes kialakulásában. Az endoplazmás retikulumban (ER) zajló folyamat két kulcsenzime közül a hexóz-6-foszfát-dehidrogenáz (H6PD) glukóz-6-foszfát (G6P) felhasználásával NADPH-t termel, míg az 1-es típusú 11β-hidroxi-szteroid-dehidrogenáz (11βHSD1) NADPH felhasználásával redukálja a kortizont. A két enzim kapcsolt működését biztosítja, hogy az ER membrán nem átjárható a piridin-nukleotidok számára, vagyis az ER lumen – a két enzim által közösen használt – elkülönült NADP-NADPH készlettel rendelkezik.

Feltételeztük, hogy a H6PD szubsztrátellátása révén a tápanyagkínálat jelentősen befolyásolhatja a rendszer működését. Vizsgálataink ezért elsősorban a H6PD tulajdonságaira és szerepére, valamint a táplálékkínálat és a fruktóz-anyagcsere hatásaira irányultak. Azt is vizsgáltuk, hogy a legismertebb teakatekin (epigallokatekin-gallát, EGCG), amely számos tanulmány szerint csökkenti az elhízás, és ahhoz kapcsolódó metabolikus betegségek kialakulásának kockázatát, befolyásolja-e a lokális kortizoltermelést az ER-ben.

EREDMÉNYEK

A H6PD expressziója patkány és humán szövetekben: A H6PD kétlépéses reakciót katalizál: a G6P NADP-függő oxidációját és a keletkezett 6-foszfoglukonolakton hidrolízisét. Szisztematikusan összehasonlítottuk különböző patkány és humán szövetek (máj, zsírszövet, vese, agy, szív, izom, tüdő, lép, here) H6PD expresszióját. A mintákban az mRNS-szintek (real time RT-PCR) mellett – ahol lehetett – a fehérje mennyiségét (Western blot) és az enzim mindkét aktivitását is mértük. A H6PD az összes tanulmányozott szövetben hasonló szinten fejeződött ki, az expresszió egy nagyságrenden belül ingadozott. Mindkét enzimaktivitás jól korrelált az mRNS- és fehérjeszintekkel. Az eredmények egyrészt alátámasztják a fehérje és génje „housekeeping" jellegét, másrészt arra is utalnak, hogy az enzim a prereceptoriális glukokortikoid-aktiválás mellett egyéb funkcióval is rendelkezik. A vizsgált szövetek között ugyanis van néhány (pl. vázizom, szív, vese), amelyek nem vagy alig tartalmaznak 11βHSD1 enzimet, így az itt található sejtek ER-jében a luminális NADPH-termelés más okból szükséges. Saját korábbi megfigyeléseink is utaltak a luminális [NADPH]:[NADP] arány fenntartásának kortizoltermeléstől független vitális fontosságára, és feltételezhető, hogy a megfelelő mennyiségű NADPH az organellum antioxidáns védekezéséhez is nélkülözhetetlen.

Éhezés és jóllakottság hatása az ER kortizoltermelő képességére: Megvizsgáltuk, hogy a szervezet tápanyag-ellátottsága hogyan befolyásolja az ER luminális piridin-nukleotidjainak redox állapotát, és ezen keresztül az ER kortizoltermelő képességét. A kísérleti patkányok egy csoportja szabadon hozzáfért a táplálékhoz, egy-egy pedig 12 vagy 36 órán át éhezett, mielőtt májukból mikroszóma frakciót izoláltunk. A luminális piridin-nukleotidok redox állapotát kétféle módszerrel vizsgáltuk. Közvetlen, fluorimetriás méréseink azt mutatták, hogy a máj mikroszóma [NADPH]:[NADP] aránya az éhezés előre haladtával folyamatosan csökken, vagyis az ER lumen egyre oxidáltabbá válik. Ezzel összhangban voltak azok az eredmények, amelyeket a mikroszóma endogén kortizonredukáló (kortizoltermelő) és kortizoloxidáló (kortizontermelő) kapacitásának mérésével kaptunk. A kortizoltermelés az éhezéssel egyre csökkent, ugyanakkor a kortizontermelés fokozatosan nőtt. Éhezés során tehát a májsejtek ER-jében fokozatosan csökken a [NADPH]:[NADP] arány, és ez az elsőként általunk észlelt redox eltolódás együtt jár a

kortizoltermelő képesség változásával is. Mindez azt támasztja alá, hogy a vizsgált rendszer fiziológiás körülmények között valóban tápanyag-szenzor funkciót tölthet be.

Fruktóz-anyagcsere lehetséges hatása az ER kortizoltermelő képességére: A metabolikus betegségek kapcsán növekvő érdeklődés irányul a fruktózfogyasztás szerepére, ezért a fruktóz-anyagcsere prereceptoriális glukokortikoid-termelésre gyakorolt hatásait is megvizsgáltuk.
Patkány máj mikroszómához fruktóz-6-foszfátot (F6P) adva ugyanolyan hatékonyan tudtuk serkenteni a kortizoltermelést, mint G6P-vel. Kimutattuk, hogy a F6P bejuthat az ER-be, és ebben a fehérjemediált transzportban a G6P ismert transzportere (G6PT) nem vesz részt. A lumenbe jutott F6P ugyan nem szubsztrátja a H6PD enzimnek, azonban egy – elsőként általunk leírt – ER-foszfoglukóz-izomeráz közreműködésével G6P-tá alakul, így táplálni tudja a luminális NADPH-termelést. A még azonosítatlan izomeráz gátolható fruktóz-1,6-bisz-foszfáttal, de különbözik a citoplazmában elhelyezkedő izomeráztól. Azt is bizonyítottuk, hogy a rekombináns, tisztított H6PD nem rendelkezik saját izomeráz-aktivitással. A fruktózmetabolizmus jelentősen fokozhatja a kortizoltermelést az ER-ben, és ez elősegítheti a zsírsejtek differenciálódását, illetve hozzájárulhat az inzulinrezisztencia kialakulásához is.

EGCG hatása az ER kortizoltermelő képességére: A teakatekinek elhízás- és diabetes-ellenes hatása régóta ismert, ezért megvizsgáltuk, hogyan befolyásolja az EGCG a fent ismertetett rendszer működését. Folyamatban lévő kutatásaink szerint az EGCG már kis koncentrációban hatékonyan gátolja az ER-ben zajló kortizonredukciót. Ezt a hatást nem az érintett transzporter (G6PT) vagy enzimek (H6PD és a 11βHSD1) gátlása, hanem – a metiraponhoz hasonlóan – a luminális [NADPH]:[NADP] arány csökkenése révén fejti ki. Az észlelt jelenség jelentős szerepet játszhat a teaflavanolok ismert antidiabetikus hatásához.

KÖVETKEZTETÉSEK

Eredményeink megerősítették kiinduló hipotézisünket, mely szerint az ER-ben zajló kortizoltermelés közvetlenül sejtszinten összekapcsolja az intermedier anyagcserét az endokrin szabályozással, és ezáltal az organellumnak tápanyag-szenzor funkciót biztosít. Adataink szerint a tápanyagkínálat és a fruktóz-anyagcsere intermedierei fokozzák a lokális kortizoltermelést. A leírt jelenség a fiziológiás kontroll új mechanizmusát jelenti, amelynek valószínűleg szerepe van a metabolikus betegségek kialakulásában is.
A szabályozás megismerése egyúttal potenciális gyógyszer-támadáspontokat is kínál. Ahogy ezt az EGCG-vel kapott eredmények mutatják, a G6PT, a H6PD és a 11βHSD1 mellett a luminális [NADPH]:[NADP] arány is fontos beavatkozási pont lehet. Megfigyeléseink tehát rendkívüli jelentőséggel bírnak az elhízás, a metabolikus szindróma, illetve a diabetes megelőzése és terápiája szempontjából.

Senesi S, Legeza B, Balázs Z, Csala M, Marcolongo P, Kereszturi E, Szelényi P, Egger C, Fulceri R, Mandl J, Giunti R, Odermatt A, Bánhegyi G, Benedetti A: ENDOCRINOLOGY 151: pp. 4830-4839. (2010) IF: 4,993
Kereszturi É, Kálmán F S, Kardon T, Csala M, Bánhegyi G: FEBS LETTERS 584:(22) pp. 4703-4708. (2010) IF: 3,601
Marcolongo P, Senesi S, Giunti R, Csala M, Fulceri R, Banhegyi G, Benedetti A: JOURNAL OF STEROID BIOCHEMISTRY & MOL. BIOLOGY 126:(3-5) pp. 57-64. (2011) IF: 2,886
Konta L, Száraz P, Magyar J É, Révész K, Bánhegyi G, Mandl J, Csala M: BIOFACTORS 37:(6) pp. 468-476. (2011) IF: 2,793
Csala M, Kereszturi É, Mandl J, Banhegyi G: ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING [Epub ahead of print] (2011) IF: 8,209
Banhegyi G, Margittai E, Szarka A, Mandl J, Csala M: ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING [Epub ahead of print] (2011) IF: 8,209

Budget: 3,000,000.- HUF

REDOX STATE OF PYRIDINE NUCLEOTIDES IN THE ENDOPLASMIC RETICULUM AS A DRUG-TARGET IN OBESITY-RELATED DISEASES

Miklós Csala, Laura Konta, Éva Kereszturi, Katalin Révész, Anna Judit Tüttő
Department of Medical Chemistry, Molecular Biology and Pathobiochemistry, Semmelweis University

INTRODUCTION

Reduction of cortisone to cortisol is a key factor in local glucocorticoid effect in the cells and plays an important role in the development of obesity, the metabolic syndrome and diabetes. The process takes place in the endoplasmic reticulum (ER) and involves two enzymes. The hexose-6-phosphate dehydrogenase (H6PD) produces NADPH on expense of glucose-6-phosphate (G6P) while the type 1 11β-hydroxysteroid dehydrogenase (11βHSD1) reduces cortisone on expense of NADPH. Coupled activity of these two enzymes is due to the impermeability of the ER membrane to pyridine nucleotides, i.e. the ER lumen possesses an isolated NADP-NADPH pool, which is utilized by both enzymes.

We assumed that the activity of this system is largely affected by nutrient supply through the substrate availability of H6PD. Therefore, the properties and role of H6PD, as well as the effects of food intake and fructose metabolism were in the focus of our investigations. It was also studied whether the cortisol production is influenced by the best known tea catechin (epigallocatechin-3-gallate, EGCG), which had been reported to reduce the risk of obesity and associated metabolic disorders.

RESULTS

Expression of H6PD in rat and human tissues: H6PD catalyzes a two-step reaction: NADP-dependent oxidation of G6P and hydrolysis of the intermediate 6-phosphogluconolactone. H6PD expression was systematically compared in a variety of rat and human tissues (liver, adipose tissue, kidneys, brain, heart, muscle, lungs, spleen and testis). Besides the mRNA levels (real time RT-PCR), protein levels (Western blot) and both activities of the enzyme were assessed in the samples wherever it was possible. The expression was found to be similar in all tissues and the levels varied within an order of magnitude. Both enzyme activities well correlated with the mRNA and protein levels. Our results strongly support the „housekeeping" feature of H6PD gene and protein, and also suggest that the enzyme is involved in functions other than just glucocorticoid activation. Some of the tissues investigated in our studies (e.g. muscle, heart, and kidneys) have no or very little 11βHSD1 activity, thus the luminal NADPH production in these cells must be important for some other reasons. Earlier observations of our own had indicated that the maintenance of luminal [NADPH]:[NADP] ratio is of vital importance independently of cortisol production. A certain amount of NADPH is also likely necessary for the antioxidant defense of the organelle.

Effect of starvation and fed state on the cortisol producing capacity of the ER: It has been assessed whether nutrient supply in vivo influences the redox state of pyridine nucleotides in the ER lumen and consequently modulates the activation of cortisol. The control group of rats had had free access to chow while the others had been starved for 12 or 36 hours before microsomes were prepared from their livers. The redox state of luminal pyridine nucleotides was determined in two ways. Direct fluorimetry indicated a parallel decrease in microsomal [NADPH]:[NADP] ratio with the progress of starvation, i.e. the ER lumen became gradually more oxidized. This was in accordance with the alterations in the endogenous cortisone reducing (cortisol producing) and cortisol oxidizing (cortisone producing) capacities of the microsomes. Cortisol production progressively decreases while cortisone production increases in starvation. In summary, food restriction lowers [NADPH]:[NADP] ratio in the hepatic ER, and this redox shift is accompanied by the modulation of cortisol production. These findings strongly support the assumed nutrient sensor function of the system in physiological conditions.

Possible effect of fructose metabolism on cortisol production in the ER: Association between fructose consumption and metabolic disorders attracts a growing scientific interest; hence we investigated the effect of intermediates of fructose metabolism on pre-receptor glucocorticoid production.
Cortisol production was equally well driven by fructose-6-phosphate (F6P) and G6P in rat liver microsomes. It has been demonstrated that F6P enters the ER through a protein, which is different from the identified G6P translocase (G6PT). Although F6P is not a substrate for H6PD, it can be converted to G6P in the ER lumen by a novel ER phosphohexose isomerase, and so it can fuel local NADPH production. The yet-unidentified isomerase is sensitive to fructose-1,6-bisphosphate like the cytosolic enzyme, yet the two proteins are not identical. It has also been proved that recombinant purified H6PD possesses no isomerase activity of its own. Fructose metabolism might remarkably enhance cortisol production in the ER; and this can favor adipocyte differentiation and can also contribute to the development of insulin resistance.

Effect of EGCG on cortisol production in the ER: The anti-obesity and anti-diabetic activities of tea catechins have long been known; therefore, the possible effect of EGCG on the above detailed system has been also investigated. Our ongoing research revealed that even low concentrations of EGCG efficiently inhibit cortisone reduction in the ER. The molecular target, however, is neither the transporter (G6PT) nor the enzymes (H6PD and 11βHSD1) involved in the process. EGCG – similarly to metyrapone – interferes with cortisole production through decreasing the luminal [NADPH]:[NADP] ratio. This phenomenon might significantly contribute the anti-diabetic effect of tea flavanols.

CONCLUSIONS

Our results support the original hypothesis that cortisol production in the ER links intermediary metabolism with endocrine regulation directly at cellular level, i.e. the organelle fulfils a nutrient sensor function. Our data reveal that nutrient supply and intermediates of fructose metabolism enhance local cortisol production. The presented phenomenon is a novel mechanism of physiological control, which likely plays a role in the development of metabolic diseases too.
Discovery of the regulatory mechanism also offers some potential new drug targets. As it is evident from the effect of EGCG, the luminal [NADPH]:[NADP] ratio is an important point of interference besides G6PT, H6PD and 11βHSD1. Our observations, therefore, bear great relevance with regard to prevention and treatment of obesity, the metabolic syndrome as well as diabetes.

Senesi S, Legeza B, Balázs Z, Csala M, Marcolongo P, Kereszturi E, Szelényi P, Egger C, Fulceri R, Mandl J, Giunti R, Odermatt A, Bánhegyi G, Benedetti A: ENDOCRINOLOGY 151: pp. 4830-4839. (2010) IF: 4,993
Kereszturi É, Kálmán F S, Kardon T, Csala M, Bánhegyi G: FEBS LETTERS 584:(22) pp. 4703-4708. (2010) IF: 3,601
Marcolongo P, Senesi S, Giunti R, Csala M, Fulceri R, Banhegyi G, Benedetti A: JOURNAL OF STEROID BIOCHEMISTRY & MOL. BIOLOGY 126:(3-5) pp. 57-64. (2011) IF: 2,886
Konta L, Száraz P, Magyar J É, Révész K, Bánhegyi G, Mandl J, Csala M: BIOFACTORS 37:(6) pp. 468-476. (2011) IF: 2,793
Csala M, Kereszturi É, Mandl J, Banhegyi G: ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING [Epub ahead of print] (2011) IF: 8,209
Banhegyi G, Margittai E, Szarka A, Mandl J, Csala M: ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING [Epub ahead of print] (2011) IF: 8,209

Teljes támogatás: 3 000 000,- Ft

KATIONPERMEÁBILIS CSATORNÁK JELENTŐSÉGE EGYES SEJTFUNKCIÓK SZABÁLYOZÁSÁBAN, ÉS LEHETSÉGES SZEREPÜK A ROSSZINDULATÚ DAGANATOK KIALAKULÁSÁBAN

Csernoch László[1], Szűcs Géza[1], Rusznák Zoltán[1], Szentesi Péter[1], Kovács Ilona[2], Ruzsnavszky Olga[1], Nagy Dénes[1]
[1]DE OEC, Élettani Intézet, [2]Kenézy Gyula Kórház-Rendelőintézet, Patológia Osztály

Jelen vizsgálatsorozatban elsősorban a következő jelenségek tanulmányozására összpontosítottunk: (a) a TASK-3-csatornák szerepe a melanoma sejtek mitokondriális funkciójának biztosításában; (b) a muszkarinos receptorok (MR) jelentősége a melanoma sejtek Ca^{2+}-homeosztázisában; (c) az UV-B besugárzás hatása a HaCaT keratinocyák által expresszált purinreceptorokra; (d) az 1-es típusú, tranziens receptorpotenciált kialakító csatornák (TRCP1) hozzájárulása a C2C12 sejtek cytoplasmaticus Ca^{2+}-koncentrációjának változásaihoz. (a) Ismert volt, hogy a TASK-3-csatornák a mitokondriumokban is megtalálhatóak, továbbá fokozott expressziójuk javítja a malignus transzformáción átesett sejtek életképességét. A csatornák pontos funkciója ugyanakkor ismeretlen volt. A jelen munka keretében egy olyan melanoma sejtvonalat kívántunk létrehozni, amiben a TASK-3-fehérje szintézise gátolva van. Vizsgálni kívántuk továbbá, hogy a TASK-3-csatornák expressziója milyen módon járul hozzá a mitokondriális funkcióhoz. Eredményeink szerint a TASK-3-fehérjék bioszintézisének gátlása jellegzetes morfológiai változásokat okoz a melanoma sejtekben, redukálja a tenyészetben található DNS mennyiségét, valamint csökkenti a sejtek metabolikus aktivitását és mitokondriális funkcióját. Megfigyeléseink szerint a TASK-3-csatornák hozzájárulnak a melanoma sejtek mitokondriális funkciójához, így nélkülözhetetlenek a sejtek proliferációjához és/vagy túléléséhez. (b) Különbségeket kerestünk primaer és metastaticus melanoma sejtvonalak MR által közvetített intracelluláris Ca^{2+}-szignalizációja között. Eredményeink szerint a receptorfehérjék expressziós szintje mind a primaer, mind a metastaticus sejtvonalakban hasonló. Ca^{2+}-tranziensek minden vizsgált sejtvonalban kiválthatók voltak, bár a primaer melanoma sejtek között kisebb volt a reagáló sejtek aránya. A Ca^{2+}-tranziensek időbeli lefutása igen változatos volt; egyes esetekben egy késői komponens (plató) is megfigyelhető volt, aminek kialakulása nagyban függött az extracelluláris Ca^{2+} jelenlététől. A Ca^{2+}-tranziensek időtartama az extracelluláris Ca^{2+}-koncentráció csökkentésekor megrövidült. Ez a változás a metastaticus sejtvonalakban erőteljesebbnek bizonyult. Nem találtunk ugyanakkor jelentős különbséget a primaer és a metastaticus melanoma sejtvonalakban megfigyelhető, MR által közvetített Ca^{2+}-szignalizációban. Úgy véljük, hogy az általunk leírt kvantitatív különbségek hozzájárulhatnak a metastaticus sejtvonalak fokozott malignitásának és migrációs hajlamának kialakításához. (c) Ismert volt, hogy a különböző purinreceptorok meghatározó szerepet játszanak a sejtproliferáció és -differenciáció szabályozásában – előbbiben P2Y-, utóbbiban pedig P2X-receptorok révén. A jelen kísérletsorozatban megmutattuk, hogy az UV-B besugárzás (40 $mJ \cdot cm^{-2}$) szignifikánsan csökkenti az életképes HaCaT sejtek számát és az azok által expresszált P2X1- és P2Y2-receptorok mennyiségét egyaránt; az apoptosis elindításában különösen nagy jelentőséggel bíró P2X7-receptorok pedig teljesen eltűntek a túlélő sejtekből. Az ATP által kiváltott Ca^{2+}-tranziensek alakja szintén megváltozott a besugárzott sejtekben: az amplitúdó és a felszállási szár meredeksége csökkent, a tranziensek hossza pedig jelentősen megnövekedett. Megfigyeléseink megerősítik, hogy ép sejtekben főleg ionotróp, míg besugárzott sejtekben döntően metabotróp receptorok közvetítik az ATP hatásait. Úgy véljük, hogy a purinreceptorok expressziós mintázatában bekövetkező módosulás magyarázhatja az ATP által kiváltott apoptosis csökkenését, és hozzájárulhat a HaCaT keratinocyták malignus transzformációjához. (d) Annak érdekében, hogy rávilágíthassunk a TRCP1 harántcsíkolt izom Ca^{2+}-homeosztázisában betöltött jelentőségére, a TRCP1 fehérjét C2C12 myoblastokban overexpresszáltuk. Rámutattunk, hogy a TRCP1 overexpressziója – egyebek között – fokozza a „raktár-vezérelt” Ca^{2+}-belépést, késlelteti a sejtdifferenciálódást, és a sejtmorfológia jellegzetes változásait okozza. Úgy véljük, hogy ezen hatások hátterében egyes nuclearis fehérjék megváltozott expressziója állhat.

Total grant: 3 000 000,- HUF

THE SIGNIFICANCE OF CATION PERMEABLE CHANNELS IN THE REGULATION OF CERTAIN CELLULAR FUNCTIONS, AND THEIR POSSIBLE INVOLVEMENT IN THE GENESIS OF MALIGNANT TUMOURS

László Csernoch[1], Géza Szűcs[1], Zoltán Rusznák[1], Péter Szentesi[1], Ilona Kovács[2], Olga Ruzsnavszky[1], Dénes Nagy[1]
[1]DE OEC, Department of Physiology, [2]Kenézy Gyula Infirmary, Department of Pathology

As part of our efforts to investigate the contribution of various cation permeable channels to the cellular function in general and malignant transformation in particular, we have been concentrating on (a) the roles of TASK-3 channels in maintaining the mitochondrial function of melanoma cells; (b) the significance of muscarinic receptors (MRs) in the Ca^{2+} homeostasis of melanoma cells; (c) the effect of UV-B irradiation on purinergic receptors expressed by HaCaT keratinocytes; (d) the contribution of transient receptor potential canonical type 1 channels (TRPC1) to the Ca^{2+} handling of C2C12 mouse myoblast cells. (a) It has been known that TASK-3 channel overexpression facilitates the survival of malignantly transformed cells. In addition, it has been indicated that TASK-3 channels are present in the mitochondria, but their exact role was still uncertain. One of the key aims of our present work was, therefore, to establish a TASK-3 knockdown melanoma cell line and to shed light onto the significance of the mitochondrial TASK-3 channel expression. We provided evidence that reduction of the TASK-3 protein biosynthesis induces characteristic changes of cell morphology, reduces the amount of DNA, and decreases both the metabolic activity and mitochondrial function of melanoma cells maintained in cell culture. These observations indicate that TASK-3 channels are indispensable for the proliferation and/or survival of melanoma cells by contributing to their mitochondrial functions. (b) We sought differences between cultured primary and metastatic melanoma cell lines by characterising their MR-mediated intracellular Ca^{2+} signalizations. Our data indicate that the expression levels of the receptor proteins are the same in both the metastatic and primary cell lines. Accordingly, Ca^{2+} transients could be evoked in all cell lines investigated, although the proportion of the responding cells was smaller amongst the primary melanoma cells. The time courses of the Ca^{2+} transients were highly variable. In some instances they showed a late (plateau-like) component whose presence crucially depended on the influx of extracellular Ca^{2+}. When the extracellular Ca^{2+} concentration was reduced, the duration of the Ca^{2+} transients was decreased — a phenomenon that was more pronounced in the metastatic cell lines. Although no fundamental differences were explored in the MR-mediated Ca^{2+} signalization of the primary and metastatic melanoma cell lines, we suggest that quantitative differences revealed in our work may contribute to the increased malignancy and migratory potential of the metastatic cells. (c) It has been known that different purinergic receptors play essential roles in regulating cell proliferation (via P2Y receptors) and differentiation (via P2X receptors). In the present project we demonstrated that UV-B irradiation (40 $mJ \cdot cm^{-2}$) significantly decreases the number of viable HaCaT cells along with a significant reduction of the amounts of both P2X1 and P2Y2 receptors. In addition, P2X7 receptors, which are associated with the induction of apoptosis, were no longer present in the surviving cells. The morphology of the ATP-induced Ca^{2+} transients was altered in the irradiated cells: the amplitude and the rate of rise were decreased along with a massive increase of the duration of the Ca^{2+} transients. Our observations underscore that in control cells mostly ionotropic, while in irradiated cells mostly metabotropic receptors mediate the effects of ATP. We conclude that this switch in the expression pattern of purinergic receptors may explain the reduced rate of the ATP-induced apoptosis and it may also contribute to the malignant transformation of keratinocytes. (d) To elucidate the significance of TRPC1 in the Ca^{2+} handling of skeletal muscle, TRPC1 was overexpressed in C2C12 myoblasts. We showed that an enhanced expression of TRPC1 — amongst other things — increases store-operated Ca^{2+} entry, delays the start of cell differentiation, and induces characteristic changes in cell morphology. We conclude that these effects may be mediated by the altered expression of various nuclear proteins.

Teljes támogatás: 4 500.000,- Ft

SAJÁTFEJLESZTÉSŰ MOZGÁSÉRZÉKELŐVEL SZERZETT TAPASZTALATOK AKUT STROKE BETEGEK REHABILITÁCIÓJÁBAN

Vér Csilla[1], Hofgárt Gergely[1], Szima Gábor[2], Kovács Gábor[3], Nyisztor Zoltán[3], Kardos László[4], Csiba László[1] [1]Debreceni Egyetem, DEOEC, Neurológiai Klinika, [2]Diaware Kft. Debrecen [3]Ortoprofil Kft. Debrecen, [4]Független statisztikus

A neurológiában napi feladat a stroke, sclerosis multiplex, polyneuropathiás, parkinsonos betegek mozgásmennyiség javulásának mérése. Erre a célra nemzetközi skálákat használnak, melyek sok szubjektív elemet tartalmaznak. Célunk, olyan, mind a négy végtagra szerelhető, miniatűr mozgásmennyiség-érzékelő hardver és szoftver kifejlesztése volt, mely a tér 3 dimenziójában mozgó négy végtag mozgásmennyiségét kantitativan és folyamatosan méri wireless üzemmódban. A sajátfejlesztésű szoftver az időbeli változásokat ill. a paretikus és nem paretikus végtag mozgásmennyiségének változását és arányát statisztikusan értékeli (t-próba, Kruskal-Wallis teszt, Wilcoxon rank-sum teszt és többszörös lineáris regressziós modellek). A vizsgálatokat a Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottság hagyta jóvá.
Anyag és módszer:a triaxialis gyorsulásmérő érzékenység: 0,1 m/s2, mérési sebesség:50/s RF frekvencia:868 MHz. Negyven karóra-méretű készülék hardvere, szoftvere készült el, klinikai körülmények között tesztelve, kooperációban (DEOEC, Diaware Kft és Ortoprofil Kft).
A készüléket az Alice-V polysomnograph mozgásérzékelőjével validáltuk. Eddig hetven, különböző eredetű paresisben szenvedő beteget és 22 paresis nélküli cardiovascularis beteget javulását követtük több napig, 24 órán keresztül. Az adatokat nemzetközi skálákkal (National Institute Health Stroke Scale, European Stroke Scale, mRankin Scale, Glasgow Coma Scale) is összehasonlítottuk.
Eredmények:a paresis nélküli jobbkezes kontroll csoportban a jobb felsővégtagok mozgásmennyisége nagyobb volt mint baloldalié, jelezve a készülék érzékenységét, mely a kezűséget is detektálni képes. A kontroll személyek felső végtagjainak mozgásmennyisége szignifikánsan nagyobb mint a stroke betegek nem paretikus végtagjának mozgásmennyisége.
Az NIHSS skálán mért érték nemcsak a paretikus ($p=0.0047$), hanem a nem-paretikus ($p=0.009$) végtagok mozgásmennyiségével is szignifikáns összefüggést jelzett (főleg az NIHSS 0-18 között).
Készülékeink jelezték a tudatállapot rosszabbodását (szignifikáns korreláció a Glasgow kóma skálával $p=0.0382$). Fordított összefüggést mértünk a rokkantság súlyossága (magas mRankin scale értékek) és a mozgásmennyiség között.
Következtetés:az általunk kifejlesztett készülék adatai érzékenyen tükrözik a klinikai állapot változásait, alkalmas a paretikus és ép végtagok mozgásmennyiség-különbségeinek kvantitativ mérésére és alkalmazási területe bővithető (alarmfunkció, tremor-therápia, epilepsziás végtagmozgások detektálása). Szabadalmazási folyamata megkezdődött.

Kulcsszavak: stroke, hemiparesis, akcelerométer, mozgásérzékelő-rehabilitáció

1. Vér C, Hofgárt G, Csiba L: European Journal of Neurology ed: M. Hillbom 2011;18.(Supp.2), 442.
2. Vér Csilla, Hofgárt Gergely, Szima Gábor, Kovács Gábor, Nyisztor Zoltán, Kardos László, Csiba László:Sajátfejlesztésű mozgásérzékelővel szerzett tapasztalatok akut stroke betegek rehabilitációjában. Ideggyógyászati Szle/Clin. Neuroscience 2012 (subm). IF. 0,236
3. Hofgart G., Vér Cs, Szima G, Kovács G, Kardos L, Csiba L:Measuring the amount of movement int he upper extremity by self-developed accelerometry-based movement monitoring system in hemiparetic stroke-patients int he acut phase. J Rehabilitation Medicine 2012. (subm.) IF. 1,965.
4. Szabadalmazásra benyújtva (2012.01.30)

2 cm 2 cm

Budget: 4 500,000.- HUF

MEASURING THE AMOUNT OF MOVEMENT BY A SEL-DEVELOPED ACCELEROMETRY-BASED MOVEMENT MONITORING SYSTEM IN ACUTE STROKE PATIENTS.

Csilla Vér [1], Gergely Hofgárt [1], Gábor Szima [2], Gábor Kovács [3], Zoltán Nyisztor [3], László Kardos [4], László Csiba [1] [1]Debrecen University, DEOEC, Department of Neurology, [2]Diaware Ltd. Debrecen [3]Ortoprofil Ltd. Debrecen, [4] Independent statistician

International scales have been developed for evaluation of clinical improvement of paresis caused by stroke, multiple sclerosis, polyneuropathy, but the scales contain subjective elements. Our aim was to develop a miniature motion detector (both hardware and software) that could be fixed onto the upper and lower extremities for continuous detecting and quantitative measuring of 3-D amount of motions (AMO) of paretic and non-paretic extremities by wireless way. Our self-developed software statistically analyzes the time dependent changes, compares the data of paretic and non-paretic extremities (t-probe, Kruskal-Wallis test, Wilcoxon rank and linear regression model). The investigations have been approved by EC.

Material and methods:the sensitivity of 3-axial accelerometer 0,1 m/sec^{2,} the measuring velocity 50/sec, RF frequency 868 MHz. We produced 40 devices (sizes of a watch, water and shock-resistant) in cooperation with Diaware Ltd. and Ortoprofil Ltd. The device was validated by the commercially available motion detector of polysomnograph (Alice-V, USA). Up till now, control persons, 70 patients suffering from hemiparesis of vascular origin and 22 cardiovascular patients (without any paresis) were investigated. The measurements were performed continuously for days. The data provided by our devices were also compared with international clinical scales ((National Institute Health Stroke Scale, European Stroke Scale, mRankin Scale, Glasgow Coma Scale). Our right-handed cardiovascular patient (without any paresis) had R>L AMO illustrating the sensitivity of our measurement. The AMO of upper extremities of control persons were significantly higher than that of non-paretic extremities of stroke patients. The values of NIHSS correlated significantly not only with the AMO of paretic ($p=0.0047$), but also with the AMO of non-paretic limbs ($p=0.009$) (strong correlation between 0-18 NIHSS).
Our device detected the worsening of consciousness (significant correlations with Glasgow Coma scale $p=0.0382$). Inverse correlation could be found between mRankin scale and AMO.
Conclusion:data of our self developed device sensitively reflect the changes of clinical conditions, quantitatively measure the differences between the paretic and non-paretic limbs and its appication can be widened (alarm-detector, control of tremor-therapy, detecting of epileptic fits). Licensing is in progress.

Keywords: stroke, hemiparesis, accelerometer, motion-detector-rehabilitation.

1. Vér C, Hofgárt G, Csiba L . European Journal of Neurology ed.: Matti Hillbom 2011;18 (Suppl.2), 442.
2. Vér Csilla, Hofgárt Gergely, Szima Gábor, Kovács Gábor, Nyisztor Zoltán, Kardos László, Csiba László:Sajátfejlesztésű mozgásérzékelővel szerzett tapasztalatok akut stroke betegek rehabilitációjában. Ideggyógyászati Szle/Clin. Neuroscience 2012 (subm.) IF. 0,236

3. Hofgart G., Vér Cs, Szima G, Kovács G, Kardos L, Csiba L:Measuring the amount of movement int he upper extremity by self-developed accelerometry-based movement monitoring system in hemiparetic stroke-patients int he acut phase. J Rehabilitation Medicine 2012. (subm.) IF. 1,965.

4.Submitted for licensing (30.01.2012).

Teljes támogatás: 3.000.000 Ft

B és T sejt homeosistasis myositisekben

Dr. Dankó Katalin[1], Prof. Dr. Zeher Margit[1], Dr. Gyetvai Ágnes[1], Dr. Baráth Sándor[1], Dr. Váncsa Andrea[3], Dr. Gergely Lajos[1], Dr. Constantin Tamás[2], Dr. Ponyi Andrea[2]

1: DEOEC III. sz. Belgyógyászati Klinika, 2: SE II. sz. Gyermekgyógyászati Klinika 3: DEOEC Reumatológia Tanszék

A DEOEC III. sz. Belgyógyászati Klinikájának Dermatomyositis/Polymyositis szakrendelésén, valamint a SE II. sz. Gyermekgyógyászati Klinikájának Nephrológia-Immunológia osztályán működő két centrumban több mint 700 felnőtt és gyermek myositises beteg áll gondozás alatt. Ez a szám világméretekben is a legnagyobb. Évente 25-30 új beteg került diagnosztizálásra. A nagy beteglétszám révén lehetőségünk nyílik a betegek követése során felhalmozódott klinikai tapasztalatok releváns elemzésére. Kutatásaink több területet is érintenek.

Genetikai vizsgálatok során megállapítottuk, hogy az Idiopáthiás Inflammatorikus Myopáthiák kialakulásában a gyakoriságelemzés alapján a HLA DRB1*03, a HLA DRB1*14, DRB1*16 és a DQB1*05 allél hordozása biztosan rizikófaktornak tekinthető a myositis kialakulása szempontjából. Polymyositisben szenvedő betegeink esetében a HLA-DRB1*03 jelentősen gyakoribb. Dermatomyositisben leggyakrabban a DRB1*03, *04, a DQA1*03, *0501 és DQB1*0201 allélek fordultak elő. Overlap myositisben szenvedő betegeinknél a DRB1*03, *07, a DQA1*0201, valamint a DQB1*05 és *0202 hordozása lehet rizikófaktor. A

Az életminőséget vizsgálva a jellemző paraméterek átlagértékei minden esetben különbözőek a myositisek alcsoportjaiban és az egészségesekétől is eltérnek, de csak az Általános állapot esetében kaptunk szignifikáns különbséget. Az eltérések változatosak. A fizikális funkció, a fizikai szerep, a szociális szerepvállalás és az emocionális egészség értékei a betegek mindhárom csoportjában alacsonyabbak az egészségesekénél. A testi fájdalmat és az általános állapotot jellemző paraméterek esetében az egészségesek átlagértékei alacsonyabbak a betegekénél. A vitalitás átlagértéke DM-ben tér el jelentősen a többi csoport értékeitől. A mentális egészséget jellemző pontértékek átlaga a PM-ben szenvedő betegeink esetében igen alacsony. Az életminőséget jellemző paraméterek közül a fizikális funkció, fizikai szerep, testi fájdalom, általános állapot, emocionális egészség pontértékeinek eloszlása különbözik a betegek és egészségesek alcsoportjaiban. A IIM-ák mindhárom alcsoportjában az átlagos Health Assessment Questionnarie Disability Index (HAQDI) értékek az enyhén, illetve a közepes mértékben csökkent funkcionális aktivitású tartományokba esnek. Ezzel szemben az egészségesek csoportjában az átlagérték 0, ami megtartott funkcionális aktivitást jelöl. Az egészséges egyének többsége (92%) a normál aktivitású csoportba tartozik. A betegek közül az említett csoportba mindössze 14%

tartozik. A funkcionális aktivitást jellemző HAQDI értékeinek eloszlása eltérő az egészségesekétől, de lényeges különbséget nem mutat a betegek alcsoportjaiban.

Betegeink között a közepes aktivitású és életminőségű csoportban a DRB1*04 és DQA1*03, az enyhén csökkent aktivitású személyeknél a DRB1*15, DQB1*06 és a DQA1*0201 HLA allél fordul elő gyakrabban.

A B- és T-sejt szubpopulációk vizsgálata során jelentős különbségeket fedeztünk fel a betegek és a kontroll csoport között. Nagyobb százalékban mutattunk ki CD3/69 +, CD56/3 +, CD8+CD45RA +/CD62L- sejteket IIM betegek szérumában ($p < 0,05$).

Lézer-doppler vizsgálattal (LDI) kimutatható a steady state cutaneous perfusion (SSCP) a betegek esetében szignifikánsan csökkent a kontroll csoporthoz képest ($p < 0,0001$). Szignifikáns negatív korrelációt találtunk IIM-ben az SSCP csökkenés és CD3/69 + sejtek jelenléte között. Eredményeink támogatják azt az elképzelést, hogy IIM betegek perifériás mikrocirkulációs rendellenességeiben tükröződnek az egyedi immunológiai rendellenességek. Hisszük, hogy ezek az immunológiai szabálytalanságok és mikrocirkulációs rendellenességek fontos elemei a jövőben az IIM terápiás protokollok összeállításában, valamint a LDI hasznos, non-invazív eszköz lehet a mikrocirkuláció hibáinak és a terápiára adott válasz kimutatásában IIM betegek esetében.

Autoantitest vizsgálataink során a betegeink 27,27%-nál találtunk myositis specifikus autoantitesteket (MSA) és 47,93% esetében volt kimutatható myositis asszociált antitest (MAA) pozitivitás. A leggyakoribb MSA az MSA pozitív betegek között az anti-Jo1 antitest: 48,5%. Az anti-PL-12 csak Dermatomyositishez társult, a többi MSA leggyakrabban PM betegeknél fordult elő. A leggyakoribb MAA az MAA pozitív betegek között az anti-SSA antitest 46,6% . Vizsgáltuk az MSA-k és MAA-k társulását is. Eredményeink szerint MAA leggyakrabban anti-Jo1 pozitív betegek esetében mutatható ki 17,24%. Elmondhatjuk, a MSA-k és MAA-k gyakorisága a magyar IIM betegek szérumában megegyezik a korábbi nemzetközi tanulmányok által igazolt gyakorisággal. A leggyakoribb MSA-k az anti-Jo-1 és anti-Mi-2-antitestek. Mindkettő főleg a PM betegek szérumában jelenik meg. A MAA-kat vizsgálva az anti-SSA és anti-SSB autoantitesteket találtuk jelentősen gyakoribbnak a betegeink szérumában. Az anti-Jo-1 és anti-SSA antitestek fordulnak elő együtt a legtöbb esetben.

Debrecen, 2012. január 16.

témavezető **intézményvezető**

ph.

Budget: 3.000.000 HUF

B and T cell homeostatis in myositis

Dankó K[1], Zeher M[1], Gyetvai Á[1], Baráth S[1], Váncsa A[3], Gergely L[1], Constantin T[2], Ponyi A2

1: 3rd Dept. Of Internal Medicine DEOEC, 2: 2nd Dept. Of Pediatry of Semmelweis University 3: Dept. of. Rheumatology DEOEC

The outpatient clinic of 3rd Department of Internal Medicine of University of Debrecen of dermatomyositis / polymyositis and the Department of Immunology and Nephrology of 2nd Dept. of Paediatry of Semmelweis University take care of more than 700 Idiopathic Inflammatory Myopathies (IIM) patients both adult and children with myositis. This number is the largest in Europe. 25-30 new patients are diagnosed annually. A large number of patients allows us to follow patients through the pursuit of accumulated clinical experience relevant to the analysis.

Genetic studies have revealed that in the development of idiopathic inflammatory myopathy the HLA DRB1 * 03, HLA-DRB1 * 14, DRB1 * 16 and DQB1 * 05 allele surely be considered as risk factor. Polymyositis(PM) appears significantly more often in patients with the HLA-DRB1 * 03 allel. In Dermatomyositis(DM) DRB1 * 03, * 04, DQA1 * 03, * 0501 and DQB1 * 0201 alleles have been reported the most common. Our patients suffering from overlap myositis may carry DRB1 * 03, *07, DQA1*0201, DQB1*05 and *0202 alleles as risk factors.

Examining the quality of life, the average values of parameters were different each cases between the subsets of myositis and healthy subjects. We got significant difference in the general condition. The differences varied. The values of physical function, physical role, social activity and emotional health of patients in all three IIM subgroup were lower than in the group of healthy controls. The average values of body pain and general condition parameters were lower in healthy people than in the patients. The average value of vitality differs significantly in DM from the other IIM group values. The average scores of mental health were very low in PM patients. The distribution of points described the quality of life parameters of the physical function, physical role, body pain, general condition, emotional health were different in subsets of IIM patients and healthy controls. The average value of Health Assessment Questionnarie Disability Index (HAQDI) showed slightly or moderately reduced functional ability in all three IIM subgroups. In contrast in the healthy group, the mean value is 0, which indicates normal functional ability. The majority of healthy individuals (92%) belonged to the normal functional ability group. From the patients only 14% belongs of that group. The distribution of patient's HAQDI values differed significantly from those of healthy subjects, but does not show significant differences in subgroups of IIM patients. Among our patients in the group with moderately reduced functional ability and quality of life

DRB1 * 04 and DQA1 * 03 were the most frequent alleles. In the mildly decreased functional ability group DRB1 * 15, DQB1 * 06 and HLA-DQA1 * 0201 alleles occured more frequently.

Examining B- and T-cell subsets significant differences were detected between the patients and the control group: higher percentages of CD3/69+, CD56/3+, CD8+CD45RA+/CD62L- cells were found in IIM ($p< 0.05$). Functional evaluation of SSCP with LDI showed significantly reduced SSCP in both ROI1 and ROI2 of IIM patients when compared to controls ($p< 0.0001$). Significant negative correlation was found in IIM between ROI1 and CD3/69+ cells. Logistic regression showed 95.8% confidence while differentiating between ROI2 results of IIM and healthy individuals. Our findings support the idea of microcirculation abnormalities in IIM patients, reflected by specific peripheral immunological defects. We believe that the therapeutical modulation of these immunological irregularities might be an important element in the future management of microcirculation abnormalities in IIMs, as well as LDI could be a useful, non-invasive tool in detection of microcirculation defects in IIM patients.

During the autoantyibody analysis 27,27% (n=99) of the patients showed MSA and 47,93% (n=174) MAA positivity. The most frequent MSA among MSA positive patients was anti-Jo1 Abs 48,5% (n=48). The anti-PL-12 Abs had been associated with DM, the other MSAs had been found mostly in PM patients. The most common MAA among MAA positive patients was anti-SSA Abs 46,6% (n=81). We studied the association of MSAs and MAAs too. According to our results MAAs are commonly associated to anti-Jo1 Abs 17,24% (n=30). In conclusion we can declare that the frequency of MSAs and MAAs in the serum of Hungarian patients with Idiopathic Inflammatory Myopathies corresponds with former international studies. The most frequent MSAs are anti-Jo-1 and anti-Mi-2 antibodies. Both appear mostly in the sera of PM patients. Examinating MAAs we found the anti-SSA and anti-SSB autoantibodies the most common in our patient's sera. Concerning the associations of MSAs and MAAs, the anti-Jo-1 and anti-SSA antibodies appear in most cases.

Debrecen, 16th January 2012.

Project manager **Head of Department**

ph.

Teljes támogatás : 3.000.000,- Ft.

AZ ÜVEGIONOMER CEMENTEK SZERKEZETI ÉS MECHANIKAI TULAJDONSÁGAIT CÉLZÓ VIZSGÁLATOK A MOLEKULÁRIS SZINTTŐL A KLINIKAI GYAKORLATIG

Dobó-Nagy Csaba[1], Fejérdy, Pál[2], Chasse, Gregory A[3], Darvell, Brian W[4], Tian, Kun[1]
[1]Department of Oral Diagnostics, Semmelweis University, [2]Department of Prosthodontics, Semmelweis University, [3]Queen Mary London University, [4]Hong Kong University

A 3D fraktográfiai kiértékelés érdekében a Darwell-féle Hertzes indentációs módszert fejlesztettük tovább a következő képen: Üvegionomer cement (GIC) mintákat két méretben készítettünk, a standard méret 2 mm vastag és 10mm átmérőjű volt, a kisméretű pedig 0,2mm vastag és 1mm átmérőjű. A kisméretű mintára azért volt szükségünk, hogy a mikroCT leképezés nagyfelbontással megvalósíthassuk. A mikroCT szeleteket szegmentáltuk porozitás mérés érdekében. A mintában lévő alkotók röntgensugár abszorpciója eltérő, ezért tudtuk a bentrekedt levegőbuborékokat szegmentálni, majd ezután jellemző tulajdonságait numerikusan kiértékelni. Az üvegtöltelékek látszódtak ugyan a mintában, de nem sikerült szegmentálni.Minden mintában 3-3 darab 0,2mm vastag és 0,3mm magas henger alakú térfogatot jelöltünk ki (VOI) a részletes porozitás méréshez. A VOI-kat a minta tetején és alján is kijelöltük. A kiértékelést a pórus térfogat, felszín, felszín/térfogat arány, vastagság és szerkezeti model index (SMI) számokkal jellemeztük. A standard minták 2D fraktográfiai vizsgálatait is kiegészítettük 90-szeres nagyítású optikai sztereomikroszkópos (Meiji, Kína) és 1500-szeres nagyítású pásztázó elektronmikroszkópos. A geometriában lévő hasonlóságokat a kis és nagyminták között összehasonlíthatóvá teszi az adatokat. A GIC minták 3D értékelése lehetővé tette a törésvonalak leképezését, a minta aljáról kiinduló, de a felszínt el nem érő repedési vonalak pontos, részletgazdag felismerését. A repedési vonalak jellegzetesen a pórusok mentén futnak végig. Ez a módszertani fejlesztés alkalmazható hasonló tulajdonságokkal bíró bioanyagok tervezésére, jellemzésére és optimatizálására.

Tian Kun munkatársunk részt vesz az ISIS-ben, Rutherford Appleton Laboratory-ban (Chilton, Didcot, UK), ahol neutron vizsgálatokat végzünk az angol társkutatókkal együtt. A G338-as számú, kísérleti üvegionomer cementet vizsgáltuk neutron spektroszkópia módszerrel. A GIC minden atomja (F, Ca, O, Na, Al, Si, P) beazonosítható volt jellegzetes görbéje alapján. Az atomokhoz tartozó görbék csúcsival jellemezték a kötőerőt. A GIC kötése során ezek a kötőerők dinamikusan változtak.

A következő vizsgálatok a kötés folyamatát kívánják elemezni az egyes atomok kötéserő változásának függvényében.

Teljes támogatás : 3.000.000,- Ft.

Az előzetes eredmények informatívak. A tervezett vizsgálatok segítenek tisztázni az atomi szerkezetet és a kötésdinamikáját az üvegionomer cementeknek.

Közlemények:

Blazsek J, Dobó Nagy C, Blazsek I, Varga R, Vecsei B, Fejérdy P, Varga G
Aminobisphosphonate stimulates bone regeneration and enforces consolidation of titanium implant into a new rat caudal vertebrae model.
PATHOLOGY & ONCOLOGY RESEARCH 15:(4) pp. 567-577. (2009)
IF: 1.152

Keremi B, Lohinai Z, Komora P, Duhaj S, Borsi K, Jobbagy-Ovari G, Kallo K, Szekely A D, Fazekas A, Dobo-Nagy C, Sikiric P, Varga G
Antiinflammatory effect of BPC 157 on experimental periodontitis in rats.
JOURNAL OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY 60 Suppl 7: pp. 115-122. (2009)
IF: 1.489

Kovács M, Danyi R, Erdélyi M, Fejérdy P, Dobó-Nagy C
Distortional effect of beam-hardening artefacts on microCT: a simulation study based on an in vitro caries model.
ORAL SURGERY ORAL MEDICINE ORAL PATHOLOGY ORAL RADIOLOGY AND ENDODONTICS 108:(4) pp. 591-599. (2009)
IF: 1.499

Kertesz Z, Gyori D, Kormendi S, Fekete T, Kis-Toth K, Jakus Z, Schett G, Rajnavolgyi E, Dobo-Nagy C, Mocsai A
Phospholipase Cγ2 is required for basal but not oestrogen deificency-induced bone resorption.
EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION &:(41) pp. &-..... (2011)
IF: [2.736*]

G. Skaliczki, M. Weszl, K. Schandl, T. Major, M. Kovács, J. Skaliczki, H. Redl, M. Szendrői, K. Szigeti, D. Máté, Cs. Dobó-Nagy, Zs. Lacza
Compromised bone healing following spacer removal in a rat femoral defect model
ACTA PHYSIOLOGICA HUNGARICA: () pp. &… (2012)
IF: [1.226*]

Tian VK, Nagy P, Chasse GA, Fejerdy P, Nicholson JW, Csizmadia I, Dobo-Nagy C
Qualitative assessment of microstructure and Hertzian indentation failure in biocompatible glass ionomer cements
JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE: MATERIALS IN MEDICINE: (DOI: 10.1007/s10856-012-4553-2) pp.&…(2012)
IF: [2.325*]

Teljes támogatás : 3.000.000,- Ft.

CHARACTERIZATION OF THE STRUCTURE AND MECHANICAL PROPERTIES OF GLASS-IONOMER CEMENTS: FROM THE MOLECULAR LEVEL TO CLINICAL USE

Dobó-Nagy Csaba[1], Fejérdy, Pál[2], Chasse, Gregory A[3], Darvell, Brian W[4], Tian, Kun[1]
[1]Department of Oral Diagnostics, Semmelweis University, [2]Department of Prosthodontics, Semmelweis University, [3]Queen Mary London University, [4]Hong Kong University

For 3D fractographic analysis the Hertzian indentation described by Darwell, this method was improved as following: Samples of glass ionomer cements (GICs) were prepared in two sizes: the quasi-standard size of Hertzian indentation samples at 2 mm thick × 10 mm diameter, complemented by miniature samples 0.2 mm thick × 1 mm diameter. The latter smaller size is of optimal resolution to enable thorough investigation by μCT, while maintaining the geometrical shape of the larger samples. The scanned data with μCT were also segmented for porosity characteristic determination. Due to the nonlinear character of adsorption-density functions, pores were easily detected while the porosity characteristics were determined numerically. Although glass particles could be visualised, they could not be detected by the software. Three VOIs (volume of interest, 0.2 mm thickness × 0.3 mm diameter cylinders) of each sample were chosen for more detailed pore analyses. This involves determination of pore volume, surface area, surface/volume ratio, thickness and structure model index (SMI) - detected in the top layer (top 30 slices ≡ 60 μm), bottom layer (bottom 30 slices ≡ 60 μm) and in the whole volume of the sample, respectively. Complimenting 2D fractographic investigation the larger samples were examined after mechanical testing with an ptical stereo microscope (Meiji, China) at up to 90 × magnification, as well as with a scanning electron microscope (Hitachi S-2460N, Tokyo, Japan) at up to 1500 × magnification, under vacuum. This geometrically similar arrangement proved to be mechanically comparable to the larger samples and fracture loads were found to be scaled with sample size. 3D analysis of GIC samples allowed fracture branching and incomplete bottom-initiated cracking to be accurately determined. Specifically, cracks grew to link pores while propagating along glass-matrix interfaces. The methodological development herein is exploitable on related biomaterials and represents a new tool for the rational characterisation, optimisation and design of novel materials for clinical service.

Tian Kun takes part in the ongoing neutron experiments on these two instruments at ISIS neutron source led by our UK collabratos. Profiles of fitted data and separated contribution of each atom in G338 powder. The peak width of each atom can be calculated and it is the value of bonding strength. Comparison of the calculated peak width value of each atom in G338 glass powder to the setting cement provids the dynamics of the GIC. The preliminary results

show that for example, Al ions were tightly bound in the powder, probably as replacement of Si in the SiO_2 tetrahedral structure, and the bonding strength reduced at 5 min after mixing, probably some of the Al ions were released as free ions, and the bonding strength increased as setting went longer, probably they started to form salt bridges with the polyacrylic acid in 4-, 5-, 6-coordination sequence. The trend was in agreement with the literature.

The subsequent test on the long-term setting cement will show evolution of the bonding strength of each atom in the cement as it sets and track the setting dynamics.

The preliminary results are informative. The future experiment results will help elucidate the atomic structure and setting dynamics of GICs.

List of Publications:

Blazsek J, Dobó Nagy C, Blazsek I, Varga R, Vecsei B, Fejérdy P, Varga G
Aminobisphosphonate stimulates bone regeneration and enforces consolidation of titanium implant into a new rat caudal vertebrae model.
PATHOLOGY & ONCOLOGY RESEARCH 15:(4) pp. 567-577. (2009)
IF: 1.152

Keremi B, Lohinai Z, Komora P, Duhaj S, Borsi K, Jobbagy-Ovari G, Kallo K, Szekely A D, Fazekas A, Dobo-Nagy C, Sikiric P, Varga G
Antiinflammatory effect of BPC 157 on experimental periodontitis in rats.
JOURNAL OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY 60 Suppl 7: pp. 115-122. (2009)
IF: 1.489

Kovács M, Danyi R, Erdélyi M, Fejérdy P, Dobó-Nagy C
Distortional effect of beam-hardening artefacts on microCT: a simulation study based on an in vitro caries model.
ORAL SURGERY ORAL MEDICINE ORAL PATHOLOGY ORAL RADIOLOGY AND ENDODONTICS 108:(4) pp. 591-599. (2009)
IF: 1.499

Kertesz Z, Gyori D, Kormendi S, Fekete T, Kis-Toth K, Jakus Z, Schett G, Rajnavolgyi E, Dobo-Nagy C, Mocsai A
Phospholipase Cγ2 is required for basal but not oestrogen deificency-induced bone resorption.
EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION &:(41) pp. &-..... (2011)
IF: [2.736*]

G. Skaliczki, M. Weszl, K. Schandl, T. Major, M. Kovács, J. Skaliczki, H. Redl, M. Szendrői, K. Szigeti, D. Máté, Cs. Dobó-Nagy, Zs. Lacza
Compromised bone healing following spacer removal in a rat femoral defect model
ACTA PHYSIOLOGICA HUNGARICA: () pp. &… (2012)
IF: [1.226*]

Tian VK, Nagy P, Chasse GA, Fejerdy P, Nicholson JW, Csizmadia I, Dobo-Nagy C
Qualitative assessment of microstructure and Hertzian indentation failure in biocompatible glass ionomer cements

Teljes támogatás : 3.000.000,- Ft.

JOURNAL OF MATERIALS SCIENCE: MATERIALS IN MEDICINE: (DOI: 10.1007/s10856-012-4553-2) pp.&…(2012)
IF: [2.325*]

Teljes támogatás: 4500.000,- Ft

SÚLYOS KOPONYASÉRÜLTEK ELLÁTÁSÁNAK MONITOROZÁSÁRA SZOLGÁLÓ AUDIT RENDSZER KIDOLGOZÁSA: PROSPEKTÍV TANULMÁNY

Prof. Dr. Dóczi Tamás
PTE ÁOK KK Idegsebészeti Klinika

A kutatási program a 2002-ben végzett, a súlyos koponyasérültek ellátására vonatkozó országos felmérés tapasztalatai és adatbázis-elemzése alapján kívánta meghatározni a koponyasérült-ellátás jelenlegi honi helyzetét, megfelelő indikátorokat biztosítandó az ellátás későbbi auditálása számára.

A vizsgálatok első részében a fenti történeti adatbázisban szereplő sérültek nemzetközi prognosztikai kalkulátor algoritmusok alapján becsült kimenetelét a valós kezelési eredménnyel összevetve, megállapítottuk, hogy különösen az enyhe koponyasérültek esetében a valós kezelési eredmény elmaradt a várhatótól. A kimenetelt felvételi adatok alapján becslő szakorvosok prognosztikai eredménye szintén túlbecsülte a várható kimenetelt, azaz a fejlett országokban alkalmazott kalkulátor algoritmusok jóslatát követte, szemben a valós hazai halálozással. Eredményeink megerősítették, hogy bár hazánk a fejlett országok közé sorolható, az egészségügy működésében sajnálatos módon a kimeneteli kalkulátorok a „low and middle income countries" esetében leírt torzítással működnek!

További vizsgálataink során a Pécsi Súlyos Koponya-Agysérült Adatbázis adatait is bevonva és megfelelő kontroll csoport neuro-pszichológiai teljesítményével egybevetve azt találtuk, hogy a fiatal férfiak súlyos koponyasérülés vonatkozásában észlelt kiemelt kockázata legalábbis részben valószínűleg az ún. „fiatal férfi szindrómára" vezethető vissza, mely az evolúció során ismert, a párválasztásban szerepet játszó versengő, kockázatvállaló magatartás.

A GYEMSZI adatbázisának felhasználásával elkészítettük a koponyasérültekre vonatkozó 2004-2011. közötti betegforgalmi adatok elemzését. Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a vizsgálat időszakban az egészségpolitikai intézkedések (szervezeti változtatások, ellátási irányelvek megalkotása, közzététele) ellenére semmilyen érdemi javulás nem állt be az ellátásban. A vizsgált hét év során elemzett több mint 7000, műtéti beavatkozáson átesett koponyasérült korai halálozása meghaladja a 30%-t, fél éves halálozása az 50%-ot, azaz minden második, koponyasérülés miatt operált magyar beteg a műtét után fél évvel halott! Ez különösen azért szembeszökő, mert a vizsgálat magában foglalta a műtétre kerülő enyhe és középsúlyos eseteket is. Az elemzés alapján a kimenetel egyértelműen összefüggést mutat az ellátott esetek számával, míg a korai valamint a késői letalitás összevetése során észlelt, meredeken emelkedő halálozási érték (pl. a PTE KK esetében az első hét 16%-os mortalitása a hatodik hónap végére 42%) a szubakut- illetve a krónikus rehabilitáció hiányának szerepét veti fel.

Bár a kutatási programot az eredetileg tervezett költségvetés töredékéből, teljességgel átalakult egészségpolitikai intézményi környezetben és kollaborációs körrel kellett megvalósítani, a vizsgálatok összességében lehetővé tették olyan indikátorok azonosítását, melyek a szakmai kollégiumi ajánlásokba kerülve-, továbbá az ellátás auditálását szolgáló monitoring rendszerekben illetve programokban felhasználhatók. A kutatócsoport alapvető jelentőségűnek látja a GCS érték kötelező adatszolgáltatási körbe történő bevonását, a koponyaűri nyomás-monitorozás finanszírozási rekordon szerepeltetését. Elemzésünk alapvető indikátorként azonosította az egy intézményben évente ellátott koponyasérültek számát, az első hét-, az első hónap-, és a hatodik hónap végén észlelt mortalitást, valamint az agynyomás monitorozását célzó kamrai drainage rutinszerű alkalmazását.

Eredményeink tudományos értéke a súlyos koponyasérültek kimenetelét prognosztizáló módszerek pontosításában, fejlesztésében jelenik meg, míg népegészségügyi jelentőséget az érintett szakmai kollégiumok elé benyújtandó, az audit-rendszer kidolgozására szolgáló javaslatokban áll.

Budget: 4500,000.- HUF

PROSPECTIVE STUDY ON THE TREATMENT OF SEVERE TRAUMATIC BRAIN INJURY: CONSTRUCTION OF A QUALITY ASSURANCE PROGRAM

Prof. Tamás Dóczi
[1]Department of Neurosurgery, University of Pécs;

This research project was based on the experiences and database gained from a nationwide survey of 2002 and aimed to analyze contemporary care for the head injured in Hungary with an attempt to provide outcome indicators for quality assurance purposes.

At the first part of the investigations we have compared the actual outcome of the patients enrolled to the above defined database with the outcome prognosticated by international prognostic calculators. We have demonstrated that particularly in the less severely injured cases the real outcome was far behind the forecasted one. Similarly, those Hungarian neurosurgeons who tried to define the purported outcome of these patients on the basis of the on admission criteria did also overestimate the actual outcome. This well-known phenomenon recapitulated in our study had been described in case of low or middle income countries but should not have been detected in the case of a high income country, like Hungary.

In additional studies expanded by data from the Pécs Severe Traumatic Brain Injury Database and analyzed by standardized neuropsychological tests also applying matched control cases we proved that the relatively higher ratio of young male individuals among victims of traumatic brain injury could be explained –at least partially- by an evolutional phenomenon referred to as "young male syndrome". Such a risk taking behavior is part of the show up during mating and thereby evolutionarily imprinted into human behavior.

We have also analyzed insurance records of all Hungarian patients operated for traumatic brain injury from 2004 to 2011. Surprisingly enough we were not able to detect any beneficial effect of health policy interventions executed at that period (guideline development and implementation, centralization of care). During these seven years more than 7000 patients have undergone surgery for traumatic brain injury of various severity with an early (7day) mortality over 30% and a 6month mortality over 50% meaning that every second Hungarian who has undergone surgical intervention for head injury will be dead in six months. This figure is particularly shocking when we consider that it is also including mild and moderate cases like extradural hematomas.

The results also indicated that mortality figures are closely associated with the case load of a hospital and the steep increase in mortality over time (like in the case of Pécs University a raise from 16% 7day mortality to 42% 6month mortality) is at least partially explained by the lack of appropriate sub-acute and chronic rehabilitation facilities.

Although the project had to be executed from a fragment of the requested budget and the research was conducted in a health care structure under major and continuous reorganization the results obtained enabled us to identify indicators of care that could be presented for policy makers including the College of Neurosurgeons and the Secretary of Health as potential indicators of outcome and markers for quality control. We posited that inclusion of GCS and neuro-monitoring data on insurance reports as mandatory information should be enforced by health care law. Basic indicators for the audit of care were also named including annual number of cases covered, mortality at various time points post-injury as well as routine application of intracranial pressure monitors/ventriculostomy.

Scientific merit of these investigations is associated with a more meticulous use of prognostic calculators in traumatic brain injury while the impact on public health is represented by the identification of indicators available for health care policy makers making them possible to introduce novel methods in quality assurance and the audit of care.

Budget: 4500,000.- HUF

Publication:
Endre Czeiter, Stefania Mondello, Noémi Kovács, János Sándor, Andrea Gabrielli, Kara Schmid, Frank Tortella, Kevin K.W. Wang, Ronald L. Hayes, Pál Barzó, Erzsébet Ezer, Tamás Dóczi, and András Büki:
Brain Injury Biomarkers May Improve the Predictive Power of the IMPACT Outcome Calculator.
JOURNAL OF NEUROTRAUMA 29:1770–1778 (2012)

Acknowledgments: The authors would like to thank the staff personnel at the study sites who participated in the enrollment of the patients, and facilitated serum and CSF sampling as well as clinical data collection, for their valuable assistance. This study was primarily sponsored by Department of Defense Award numbers DAMD17-03-1-0772 and DAMD17- 03-1-0066; we also acknowledge additional funding support from the National Institutes of Health (R01-NS049175-01, R01-NS052831-01, and R01-NS051431-01), Navy grant no. N00014-06-1-1029 (University of Florida), and Developing Competitiveness of Universities in the South Transdanubian Region (SROP-4.2.1.B-10/2/KONV-2010-0002), as well as the MTA-PTE Clinical Neuroscience MR Research Group and **ETT grant no. 269/2009.**

Teljes támogatás: 3.9M Ft

Az angiogén apelin molekula szerepe nem-kissejtes tüdőrákban

Döme Balázs[1]
[1]Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet

Berta Judit[1,4], Kenessey István[2], Dobos Judit[3], Tóvári József[1], Walter Klepetko[4], Hegedűs Balázs[2,4], Rényi-Vámos Ferenc[3,4], Keszthelyi Magdolna[1], Rózsás Anita[1], Tímár József[2], Strausz János[1], Döme Balázs[1,4]

[1]Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet, Tumorbiológiai Osztály
[2]Semmmelweis Egyetem, II. sz. Patológiai Intézet
[3]Országos Onkológiai Intézet, Sebészi és Molekuláris Daganatpatológiai Centrum
[4]Department of Thoracic Surgery, Medical University of Vienna

Az apelin szerepe nem-kissejtes tüdőrákok prognózisában és érképződésében
The role of apelin in the prognosis and angiogenesis of non-small cell lung cancer

Egy a közelmúltban felfedezett bioaktív peptidről, az apelinről már leírták, hogy különböző *in vitro* és *in vivo* kísérleti rendszerekben serkenti az endotél sejtek növekedését és xenograft tumorok beereződését. Ennek ellenére még nem határozták meg az apelin szerepét a humán tumorok angiogenezisében, és nem ismert e peptid klinikopatológiai jelentősége sem. Éppen ezért megvizsgáltuk az apelin hatását humán nem-kissejtes tüdőrákban (NSCLC), és tanulmányoztuk a kapcsolatot az apelin expresszió és a tumorok beereződése és klinikai viselkedése között. Vizsgálatainkba 94 I-IIIA stádiumú nem-kissejtes tüdőrákban szenvedő beteget vontunk be. Daganatmintákon és 6 NSCLC sejtvonalon teszteltük az apelin megjelenését immunhisztokémiával, ELISA-val és kvantitatív PCR-rel. Megvizsgáltuk az exogén apelin hatását a sejtvonalak proliferációjára. Továbbá apelin expressziós vektorral transzfektált sejtekben vizsgáltuk az apelin kifejeződését és a sejtek szaporodását *in vitro*, valamint ezen módosított sejtek *in vivo* növekedését is. Mind a humán, mind a xenograft tumorokban az erek morfometriai változóit anti-CD31 jelöléssel határoztuk meg. Bár az apelin kezelés és apelin kódoló vektorral történt transzfekció nem befolyásolta a tumorsejtek proliferációját *in vitro,* az apelint kifejező transzfektált sejtek subcutan tumorai szignifikánsan gyorsabban nőttek *in vivo*, és az intratumorális erek száma és átmérője is szignifikánsan nagyobb volt a kontroll tumorokhoz képest. Az apelin mRNS szint szignifikánsan magasabb volt humán NSCLC mintákban a normál tüdőszövethez képest, és a magas apelin koncentráció megnövekedett érdenzitással és rosszabb túléléssel párosult. Eredményeink azt mutatják, hogy az apelin egy új angiogén faktor humán NSCLC-ben. Elsőként mutattuk ki a kapcsolatot az apelin expresszió és egy humán daganattípus klinikai viselkedése között.

Közlemény: Berta J, Kenessey I, Dobos J, Tovari J, Klepetko W, Jan Ankersmit H, Hegedus B, Renyi-Vamos F, Varga J, Lorincz Z, Paku S, Ostoros G, Rozsas A, Timar J, Dome B. Apelin expression in human non-small cell lung cancer: role in angiogenesis and prognosis. J Thorac Oncol. 2010 Aug;5(8):1120-9. IF: 4.086

Budget: 3,9M HUF

The role of the angiogenic apelin molecule in non-small cell lung cancer

Balázs Döme[1]
[1]Naional Koranyi Institute of TB and Pulmonology

J Thorac Oncol. 2010 Aug;5(8):1120-9.

Apelin expression in human non-small cell lung cancer: role in angiogenesis and prognosis.

Berta J, Kenessey I, Dobos J, Tovari J, Klepetko W, Jan Ankersmit H, Hegedus B, Renyi-Vamos F, Varga J, Lorincz Z, Paku S, Ostoros G, Rozsas A, Timar J, Dome B.

INTRODUCTION: The recently discovered bioactive peptide, apelin, has been demonstrated to stimulate angiogenesis in various experimental systems. However, its clinical significance and role in tumor vascularization have not yet been investigated in a human malignancy. Therefore, our aim was to study whether apelin expression is associated with angiogenesis and/or tumor growth/behavior in human non-small cell lung cancer (NSCLC).
METHODS: A total of 94 patients with stage I-IIIA NSCLC and complete follow-up information were included. Apelin expression in human NSCLC samples and cell lines was measured by quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction, enzyme-linked immunosorbent assay, and immunohistochemistry. Effects of exogenous apelin and apelin transfection were studied on NSCLC cell lines in vitro. In vivo growth of tumors expressing apelin or control vectors were also assessed. Morphometric variables of human and mouse tumor capillaries were determined by anti-CD31 labeling.
RESULTS: Apelin was expressed in all of the six investigated NSCLC cell lines both at the mRNA and protein levels. Although apelin overexpression or apelin treatments did not increase NSCLC cell proliferation in vitro, increasing apelin levels by gene transfer to NSCLC cells significantly stimulated tumor growth and microvessel densities and perimeters in vivo. Apelin mRNA levels were significantly increased in human NSCLC samples compared with normal lung tissue, and high apelin protein levels were associated with elevated microvessel densities and poor overall survival.
CONCLUSIONS: This study reveals apelin as a novel angiogenic factor in human NSCLC. Moreover, it also provides the first evidence for a direct association of apelin expression with clinical outcome in a human cancer.

Related publication: Berta J, Kenessey I, Dobos J, Tovari J, Klepetko W, Jan Ankersmit H, Hegedus B, Renyi-Vamos F, Varga J, Lorincz Z, Paku S, Ostoros G, Rozsas A, Timar J, Dome B. Apelin expression in human non-small cell lung cancer: role in angiogenesis and prognosis. J Thorac Oncol. 2010 Aug;5(8):1120-9. IF: 4.086

Teljes támogatás: 3.000.000,- Ft

HUMÁN ZSÍRSZÖVET GÉNEXPRESSZIÓS (mRNS ÉS microRNS) PROFILVIZSGÁLATA AZ ELHÍZÁS SZÖVŐDMÉNYEINEK KIALAKULÁSÁNAK, VAGY ELMARADÁSÁNAK PREDIKCIÓJA ÉRDEKÉBEN

Éder Katalin[1], Érsek Barbara[2], Molnár Viktor[2], Fülöp A. Kristóf[2], Falus András [1,2]
[1]MTA, Gyulladásbiológiai és Immungenomikai Kutatócsoport, [2]Semmelweis Egyetem, Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet

Napjainkban az elhízás népbetegség, egyes adatok szerint a magyar népesség 60%-a túlsúlyos, vagy elhízott. Az elhízás kialakulása után az életkor előrehaladtával különböző szövődmények, mint magas vérnyomás és 2-es típusú diabetes alakulhatnak ki. Azonban az egyes közép-, illetve időskorú, évtizedek óta elhízott betegek obezitás szövődményeinek kialakulása között lényeges eltérés mutatkozik. Egyes betegeknél nem jelentkezik szövődmény sok évtizedes obez előzményt követően sem, míg más betegeknél az obezitás megjelenését követően rövid idő múlva lépnek fel szövődmények.
A jelenség okának megismerése, a protektív genetikai jellegzetességek feltárása hozzájárulhat az elhízás patomechanizmusának és a szövődmények kialakulásának jobb megértéséhez.

Előzetes vizsgálataink során 3 elhízott és 4 nem elhízott egészséges páciens szubkután zsírszövetének expressziós vizsgálata történt meg, 53 génben találtunk szignifikáns eltérést messengerRNS (mRNS) szinten és 7 génben microRNS (miRNS) szinten. Mivel humán minták esetében ez a mintaszám nagyon alacsony populációs szinten is értelmezhető eltérések leírásához, a pályázat keretében növeltük a vizsgált betegek számát.
Bár az irodalomban viszonylag sok adat áll már rendelkezésre a zsírszövet expressziós profiljáról, főként csak a viscerális szövetet vizsgálják, nagyon kevés adat van a viscerális és a szubkután zsírszövet összehasonlításával kapcsolatban. Ugyan irodalmi adatok szerint a viscerális zsírszövet nagyobb mértékben járul hozzá az elhízás kialakulásához, ismert, hogy a szubkután zsírszövet szerepe sem elhanyagolható. Ezért munkánk során célul tűztük ki az elhízott és egészséges páciensek szubkután és viscerális zsírszöveti expressziójának összehasonlítását is.

3 csoportban, egészséges, elhízott és elhízott magasvérnyomású páciensektől hasi műtét során nyertünk szubkután és viscerális zsírszövet mintát, összesen 18 pácienstől. A páciensek anamnézise és családi anamnézisük is elkészült, valamint obezitásukkal, szenvedélybetegséggel kapcsolatos adatokat is felvettünk. A páciensektől nyert összes zsírszövet mintából RNS-t izoláltunk. Sajnos az RNS minták bomlottabbak lettek, mint amilyen minőséget az expressziós microarray vizsgálat megkíván – feltételezhetően ez a bomlás a műtét típusa, a nagy hasi műtét közben fellépő szövetkárosodás miatt következhetett be-, így csak a miRNS microarray vizsgálatot tudtuk elvégezni. Azonban így is rendkívül hasznos és érdekes eredményekhez jutottunk.

A microarray vizsgálatok során 20 miRNS-ben találtunk szignifikáns eltérést a különböző csoportok között. A szövet típusától függetlenül változott elhízás hatására a mir-125a-3p, a mir-335, a mir-320 a mir-342-3p, a mir-365 és a mir-575. Ezek közül korábbi mintáink elemzése során már ugyancsak megtaláltuk a mir-125a és a mir-335 miRNS-ek változását a szubkután szövetmintákban. Csak szubkután mintákban változott elhízás hatására a mir-143, a mir-144, a mir-572 és a mir-638. Csak a viscerális zsírszövetben találtuk szignifikánsan változónak a mir-199b-3p és -5p, a mir-22, mir-26b, mir-801, mir-92a, let-7a, let-7f és let-7g kis RNS-eket.
A megtalált miRNS-ek nagyrészét még csak főként tumorokkal kapcsolatban írták le, de van néhány, amit bár humán vizsgálatokban konkrétan az elhízással még nem hozták összefüggésbe, de metabolikus folyamatokban ismert a szerepük. Ilyen például a mir-335 és a mir-125a-3p, mindkettőt a lipid metabolizmus szabályozásával hozták összefüggésbe. A mir-335 szerepét már genetikailag obez egerekben is vizsgálták, a mir-125a-t pedig a 2-es típusú diabétesz patkány modelljében találták emelkedettnek.

Teljes támogatás: 3.000.000,- Ft

A mir-143 microRNS-t már több esetben hozták összefüggésbe az elhízással állatmodelleken és a zsírsejtek fejlődésével adipocita sejtekben. Érdekes módon kísérletünkben csak a szubkután zsírszövetben találtunk szignifikáns csökkenést az elhízottak esetében.
A mir144 RNS-t egy cikkben írták le, mint a 2-es típusú diabetes lehetséges biomarkerét patkány modellben.
A let-7 microRNS családról viszont egereknél leírták, hogy a cukor homeosztázist és az inzulin érzékenységet szabályozza, a let-7 túltermelése csökkentette az egerek testméretét és testsúlyát, ezzel teljesen megfelelően csökkent expressziót kaptunk az elhízottak zsírszövetében.
A többi microRNS esetében egyelőre nem áll rendelkezésre irodalmi adat az elhízással, vagy szövődményeivel kapcsolatban.
Érdekes módon az elhízott, magas vérnyomású páciensek és az elhízott páciensek zsírszövetének vizsgálatakor csupán egy miRNS-ben találtunk szignifikáns eltérést, emelkedett mir-21 szintet. Bár a mir-21 emelkedett szintjét leírták magas zsírdiétán tartott elhízott egerek zsírszövetében, illetve adipocita fejlődés kapcsán. Mi szignifikáns emelkedést elhízás esetében nem, csak magas vérnyomással együtt találtunk. Azonban az irodalomban több adat is utal arra, hogy mind gyulladásos, mind kardiovaszkuláris betegségekben szerepe lehet. További vizsgálatok lennének szükségesek az emelkedett vérnyomással talált kapcsolat ok-okozati viszonyainak felderítésére.

Mivel a microRNS-ek szabályozó szerepüket a mRNS-ek expressziójának befolyásolásával érik el, funkciójuk feltárásához tudnunk kell mely mRNS-ekhez kötődhetnek. Ennek vizsgálatára in silico módszerek, ún. target predikciós programok állnak rendelkezésre. Munkánk során a PicTar, TargetScan és DIANA microT online szoftvereket használtuk. A prediktált gének nagyrésze mint YOD1, PLAG1, CALU, CHFR, FIGN szerepe nem ismert elhízásban és magasvérnyomásban. Azonban néhány gén szerepét, mint TNFSF4 és IL12A szerepét gyulladásos folyamatokban már vizsgálták, továbbá a FOXP2 kópiaszám variációját (CNV) találták gyermekkori elhízásban, míg pl. az irodalom alapján a let-7 család által szabályozott LIN28 fontos szerepet játszik a glükóz metabolizmus szabályozásában.
A predikciós programok nem csak egyedi kapcsolódások, de a feltételezett szabályozott jelátviteli utak feltárására is lehetőséget adnak. Az általunk érdekesnek talált miRNS-eket a DIANA mirPath programmal analizálva is azt kaptuk, hogy a vizsgált miRNS-eknek az általuk szabályozott mRNS-eken keresztül szerepük lehet az zsírsav bioszintézis, a 2-es típusú diabétesz kialakulásának és a különböző jelátviteli utak (inzulin szignaling, adipokin szignaling, MAPK szignaling, JAK-STAT szignaling) szabályozásában.

Kutatásunk fő jelentősége tehát, hogy az elhízás kialakulásában feltételezhetően szerepet játszó miRNS-eket mind szubkután, mind viscerális zsírszövet mintákon megvizsgáltuk, találtunk mindkét szövetben, illetve csak egyik-egyik szövetben speciálisan megtalálható microRNS-eket, és kimutattuk, hogy a mir-21 microRNS a magas vérnyomásban szenvedő elhízottak zsírszövetében emelkedett szinten van jelen, így valószínűleg szerepet játszhat az elhízás szövődményeként megjelenő magas vérnyomás kialakulásának szabályozásában.

Teljes támogatás: 3.000.000,- Ft

mRNA AND microRNA EXPRESSION PROFILING OF HUMAN ADIPOSE TISSUE TO PREDICT THE DEVELOPMENT OR AVOIDANCE OF COMPLICATIONS OF OBESITY

Katalin Éder [1], Barbara Érsek [2], Viktor Molnár [2], Kristóf A. Fülöp [2], András Falus[1,2]
[1]Research Group for Inflammation Biology and Immunogenomics of the Hungarian Academy of Sciences, [2] Department of Genetics, Cell- and Immunobiology, Semmelweis University

Nowadays we can say that obesity is widespread disease. In Hungary, more than half of the population (~60%) is now considered either overweight or obese. Carrying excess body weight is a potentially dangerous condition because it is associated with an increased risk of developing insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, cardiovascular disease including stroke, fatty liver, musculoskeletal diseases, and some cancers. However substantial differences appear in the development of complication between some middle aged and elderly peoples who are overweight or obese for decades. Some patients have no complications even after many decades of obesity, while in other patients the complications arise after a short time. Recognition a reason of this phenomenon, protective genetic traits may contribute to exploring the pathogenesis of obesity and a better understanding of the complications.

In our earlier study the analysis of subcutan fat tissue collected from 3 obese patients and 4 control patients revealed significant changes in the expression of 53 messengerRNAs (mRNAs) and 7 microRNAs (miRNAs). Because in case of human samples, this number is very low to interpret a differences on a population level in this work we increased the number of studied patients.

Although in the literature a lot of data is available about the gene expression profile of adipose tissue, mostly/especially the visceral adipose tissue is examined, only a few data accessible about the comparison of visceral and subcutan adipose tissue. Although literature data indicate that visceral fat contributes more to the onset of obesity, it is known that the subcutaneous adipose tissue is not negligible role. Therefore, in our work we aim to compare the expression of subcutaneous and visceral fat tissue in obese and healthy patients.

Patients undergoing elective abdominal surgical procedures were invited take part in the study. In three groups, healthy, obese and obese with high blood pressure, adipose tissue biopsies were obtained from intra-abdominal subcutaneous and visceral fat depots, from a total of 18 patients. Total RNA, including miRNAs, was extracted and purified from all adipose tissues. Unfortunately, the integrity of the RNA samples were worse such as the quality of expression microarray studies requires - presumably this bad integrity/ the decomposition of the RNA could be come about the type of surgery, the onset of tissue damage could happen during major abdominal surgery, so that only the miRNA microarray study was performed. However, we got useful and interesting results.

In our microarray experiments we found significant differences in 20 miRNA between the groups. Independently of tissue type mir-125a-3p, mir-335, mir-320, mir-342-3p, mir-365 and a mir-575 level were changed in groups in the case of obesity. In a previous analysis in seven subcutan sample we also found the change of mir-125a and mir-335. Only in subcutan samples were changed the expression of mir-143, mir-572 and mir-638 in obese samples. And only in visceral adipose tissues were significantly modulated the level of mir-199b-3p and -5p, mir-22, mir-26b, mir-801, mir-92a, let-7a, let-7f and let-7g microRNAs.

Found miRNAs mainly have been tumors related reported, but there are some that, although in human studies have not been associated specifically with obesity, but its role in metabolic processes is known. For instance the mir-335 and the mir-125a-3p, both have been associated with the regulation of lipid metabolism. The role of the mir-335 was studied in genetic obese mice, while the mir-125a level was elevated in the rodent model of type 2 diabetes.

The mir-143 microRNA has already been implicated in several cases of obesity in animal models and the development of adipose tissue and adipocytes. Interestingly, in our experiment only in the subcutaneous adipose tissue was found a significant reduction in obese patients. The mir-144 RNA was described in an article such as type 2 diabetes potential biomarkers in a rat model of diabetes.

About the let-7 miRNA family in mice has been reported that they regulate sugar homeostasis and insulin sensitivity, the let-7 overproduction reduced the mouse body size and weight. In compliance with it, we obtained a reduced expression in obese adipose tissue.
In the case of other microRNS there is no published data on obesity, or related complications.
Interestingly compering the obese samples with obese hypertension sample we found only one significantly expressed miRNA; the mir-21 was elevated in obese with high blood pressure's adipose tissue. Although elevated levels of mir-21 has been reported at high-fat diet obese mice adipose tissue and in relation to development of adipocytes. In obesity we found a significant increase only along with high blood pressure. However, more data in the literature suggests that mir-21 may play a role both inflammatory and cardiovascular diseases. Further studies would be needed to detect a causal relationship at the elevated blood pressure.

miRNAs may regulate cellular gene expression at the transcriptional or post-transcriptional level, by suppressing translation of protein coding genes, cleaving target mRNAs to induce their degradation through imperfect pairing, or a combination of the two, exploring the functions we need to know which mRNAs are the targets. Computational target prediction algorithms have been developed to identify mRNA targets. Several different methods have been developed for computational miRNA target prediction; three programs were selected for the purposes of this study, PicTar, TargetScan and DIANA microT freely available software. Most of the predicted genes as YOD1, PLAG1, CALU, CHFR, and FIGN's role are not known in obesity and hypertension. However the effect of some predicted genes as TNFSF4 and IL12A has been investigated in inflammatory processes. Furthermore the copy number variation was found in childhood obesity. While it is known as well, that the LIN28 regulated by let-7 miRNA family plays an important role in the regulation of glucose metabolism.
Some of the target prediction methods are suitable to identify molecular pathways that could be altered by miRNAs as well. The analyzes with DIANA mirPath software on miRNAs of interest have been shown that our predicted mRNAs may be involved in regulation of fatty acid biosynthesis, development of type 2 diabetes and controlling a variety of signaling pathway such as insulin signaling, adipokine signaling, MAPK and JAK-STAT signaling.

Main relevance of our research is that microRNAs presumably involved in development of obesity were examined in both subcutaneous and visceral adipose tissue samples. We found one tissue specific, or in both tissue (subcutan and visceral) expressed miRNAs. It was also revealed that mir-21 is present in elevated level in adipose tissue of obese patients with hypertension. Therefore possibly plays a role in the regulation of high blood pressure which appears in a complication of obesity.

Teljes támogatás: 1,000,000.- HUF

Ca^{2+} JELEK APOPTÓZISBAN ÉS NEKRÓZISBAN

Padányi Rita[1], Pászty Katalin[2], Antalffy Géza[2], Hegedűs Luca[3], Enyedi Ágnes[1]
[1]Országos Vérellátó Szolgálat, Molekuláris Sejtbiológia Osztály, [2]Membránbiológiai és Immunkórtani Kutatócsoport, MTA-SE, [3]ELTE TTK

A Ca^{2+} lényeges szerepet játszik számos sejtfunkció; a szekréció, kontrakció, transzkripció, valamint az apoptózis és nekrózis szabályozásában. A megfelelő citoszólikus Ca^{2+} koncentráció kialakításában be- és kikapcsoló („on" és „off") mechanizmusok játszanak szerepet. A kikapcsoló mechanizmusok egyik fő eleme a plazmamembrán Ca^{2+}ATPáz (PMCA). Ismeretes, hogy a citoszólikus Ca^{2+} koncentráció kontrollált növekedése apoptózist válthat ki, míg a túlzott mértékű Ca^{2+} szint emelkedés nekrózishoz és ezzel együtt reaktív oxigén gyökök felszabadulásához vezethet. A sejt Ca^{2+} homeosztázisának felborulása számos daganatos illetve idegrendszeri eredetű betegséget okozhat, mint például iszkémia, epilepszia, Alzheimer vagy Parkinson kór, és szklerózis multiplex. A sejtek patológiás Ca^{2+} szint emelkedését ellensúlyozzák a polarizált, vagy nem polarizált sejtek megfelelő membránkompartmentjében expresszálódó plazmamembrán Ca^{2+}ATPázok. Ezért vizsgáltuk, hogyan befolyásolja a PMCA expresszió illetve a membránban elfoglalt helyzete a Ca^{2+} homeosztázist élő és pusztuló sejtekben.

A PMCA élő valamint pusztuló sejtekben betöltött funkciójának vizsgálatára kifejlesztettünk egy „dupla jelérzékelő" rendszert, ami lehetővé teszi az intracelluláris Ca^{2+} koncentráció valamint a PMCA helyzetének egyidejű monitorozását konfokális mikroszkóp segítségével. A Ca^{2+} szignál követésére egy genetikusan kódolt Ca^{2+} indikátort alkalmaztunk (GCaMP2), mely kiválóan megfelelt a Ca^{2+} jelek hosszútávú követésére is a nekrotikus illetve apoptotikus folyamatok során. A GCaMP2 (Junichi Nakai, RIKEN Brain Science Institute, Saitama, JAPAN) egy olyan fluoreszcens fehérje, melyet a cirkulárisan permutált zöld fluoreszcens fehérje (circularly permuted Green Fluorescent Protein, cpGFP) valamint a kalmodulin és a kalmodulin-kötő peptid (M13) fúziójával hoztak létre. A PMCA expresszió és lokalizáció követésére mCherry vagy EGFP fluoreszcens fehérjével jelölt PMCA változatokat hoztunk létre. Kísérleteinkben epitél eredetű HeLa vagy MDCK sejteket transzfektáltunk külön-külön és egyidejűleg a megfelelő plazmidokkal. Az mCherry-vel jelölt PMCA segítségével elkülönítve vizsgáltuk a Ca^{2+} pumpa fluoreszcens jelét a GFP alapú GCaMP2 szignáltól.

Első lépésben különféle, EGFP-vel jelölt PMCA változatok sejten belüli lokalizációját tanulmányoztuk polarizált MDCKII sejtekben. Kimutattuk, hogy a PMCA2w/b variáns a sejtek apikális membránjában lokalizálódik, szemben a PMCA2z/b és PMCA2x/b formákkal, amelyeket elsősorban a sejtek laterális membránjában figyeltünk meg. Emellett azt találtuk, hogy a PMCA2w/b és a NHERF2 apikális állványfehérje közti kölcsönhatás a PMCA2w/b fehérje apikális koncentrációjának növekedését eredményezi azáltal, hogy a NHERF2 fehérjén keresztül az apikális sejtvázhoz kapcsolódik (Padányi et al, JBC 2010 Enyedi & Strehler, CIB 2011).

A továbbiakban a PMCA2w/b fehérjét stabilan kifejező MDCKII sejtvonalat hoztunk létre. Azt találtuk, hogy a PMCA2w/b apikális lokalizációja nagymértékben fokozódott a teljesen polarizált MDCKII sejtekben. Kimutattuk továbbá, hogy a PMCA2w/b apikális lokalizációját az endogén NHERF2 és ezrin fehérjék stabilizálják azáltal, hogy a PMCA2w/b az állványfehérjéken keresztül az apikális citoszkeletonhoz kapcsolódik. GCaMP2 Ca^{2+}-szenzor fehérjével transzfektált, PMCA2w/b-t stabilan kifejező sejtvonalak vizsgálatával megállapítottuk, hogy a PMCA2w/b magas aktivitást mutat az MDCKII sejtvonalban is (Antalffy et al, BBRC 2011).

Ezt követően a PMCA fehérjék „w" izoforma variánsára jellemző w-inszertet az alternatív *splicing* által érintett pozícióba helyeztük a PMCA4x/b fehérjében. Az így létrehozott PMCA4(2w)/b kiméra vizsgálata során kimutattuk, hogy a PMCA4x/b formára jellemző laterális membránlokalizáció

helyett a w-inszert hatására a PMCA4(2w)/b kiméra fehérje apikális membránlokalizációt mutat. Funkcionális vizsgálataink során megállapítottuk, hogy mind az apikális sejtmembránban lokalizálódó PMCA4(2w)/b, mind a laterális sejtmembránban megfigyelhető PMCA4x/b hasonló kinetikájú ATP indukált Ca^{2+} szignált mutat, ami alapján feltételezhető, hogy az izoforma-specifikus funkcionális jellemzők a membrán lokalizációtól függetlenül megmaradnak (Antalffy et al, Cell Calcium, 2011).

Az újonan kifejlesztettt dupla jelérzékelő rendszer segítségével vizsgáltuk, hogyan befolyásolja a PMCA a sejtek intracelluláris Ca^{2+} szint változásait apoptózis illetve oxidatív stressz során, illetve azt hogy az eltérő sejthalál folyamatai során hogyan változik a PMCA sejten belüli pozíciója. E rendszer segítségével egyidejűleg követtük az apoptotikus sejtek citoszólikus Ca^{2+} koncentrációjának valamint morfológiájának változásait. Kimutattuk, hogy a PMCA expressziója gátolja a sejtek túlzott mértékű Ca^{2+} szint emelkedését az apoptózis korai szakaszában, ezáltal megakadályozza a másodlagos nekrózis kialakulását. Vizsgálataink hozzájárulnak a programozott sejthalál fiziológiás körülményeinek megismeréséhez, valamint elősegítik a sejthalál kiváltásához illetve megakadályozásához szükséges stratégiák kidolgozását.. Eredményeink segítik az abnormális Ca^{2+} szignalizációval társuló betegségek mechanizmusának jobb megértését is. (Pászty et al, kézirat)

Közlemények:

1. Padányi R, Xiong Y, Antalffy G, Lór K, Pászty K, Strehler EE, Enyedi A.: Apical scaffolding protein NHERF2 modulates the localization of alternatively spliced plasma membrane Ca^{2+} pump 2B variants in polarized epithelial cells. J BIOL CHEM. 285(41): pp. 31704-12. (2010) IF 5.328

2. Antalffy G, Caride AJ, Pászty K, Hegedus L, Padanyi R, Strehler EE, Enyedi A.: Apical localization of PMCA2w/b is enhanced in terminally polarized MDCK cells. BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN. 410(2): pp. 322-7. (2011) IF 2.595

3. Enyedi A, Strehler EE.: Regulation of apical membrane enrichment and retention of plasma membrane Ca ATPase splice variants by the PDZ-domain protein NHERF2. COMMUN INTEGR BIOL. 4(3): pp. 340-3. (2011) Addendum.

4. Géza Antalffy, Amy S. Mauer, Katalin Pászty, Luca Hegedus, Rita Padányi, Ágnes Enyedi, Emanuel E. Strehler,: Plasma membrane calcium pump (PMCA) isoform 4 is targeted to the apical membrane by the w-splice insert from PMCA2, CELL CALCIUM, *Available online 15 January* (2012), *http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2011.12.010* IF 3.553

Teljes támogatás: 1,000,000.- HUF

Ca^{2+} SIGNALING DURING APOPTOSIS AND NECROSIS.

Padányi Rita[1], Pászty Katalin[2], Antalffy Géza[2], Hegedűs Luca[3], Enyedi Ágnes[1]
[1]Department of Molecular Cell Biology, National Blood Center, [2]Membrane Research Group, MTA-SE, [3]ELTE TTK

Ca^{2+} is a key signaling element that regulates a wide variety of cellular functions, such as secretion, contraction, gene transcription, as well as apoptosis and necrosis. The cytosolic Ca^{2+} concentration is tightly controlled by several „on" and „off" mechanisms including the plasma membrane Ca^{2+}ATPases (PMCAs) which are the major "off" mechanisms of the Ca^{2+} signal in many cells. A controlled increase in cytosolic Ca^{2+} can initiate apoptosis however; an abnormal Ca^{2+} overload leads to necrosis that may associate with the generation of reactive oxigen species. Disturbances in cellular Ca^{2+} homeostasis result in the development of cancer and several neurodegenerative disorders such as ischemia, epilepsy, Alzheimer- and Parkinson diseases and sclerosis multiplex. The physiological mean to protect cells from pathological Ca^{2+} overload is the expression of the plasma membrane Ca^{2+} transport ATPases (PMCAs) that are correctly located at specific membrane domains of both polarized and non-polarized cells. Therefore, our aim was to study how changes in the expression and localization of PMCAs affect Ca^{2+} homeostasis in cells at some stages of life and death.

To study the function of the PMCAs in live cells and during the course of apoptosis we developed a "double recording" system that allowed us to follow changes in intracellular Ca^{2+} concentration and localization of the PMCA at the same time using confocal fluorescence microscopy. To follow Ca^{2+} signaling we used the genetically encoded Ca^{2+} indicator GCaMP2 (a generous gift of *Junichi Nakai, RIKEN Brain Science Institute, Saitama, JAPAN*) which is a fluorescent Ca^{2+} probe based on fusion of a circularly permuted Green Fluorescent Protein (cpGFP) with calmodulin and the calmodulin-binding peptide M13. To monitor localization and expression of the PMCAs we tagged them with mCherry or EGFP. In our experiments we transfected epithelial HeLa or MDCK cells with the appropriate plasmids. GCaMP2 turned out to be a perfect tool for long term tracking of Ca^{2+} signaling of both apoptotic and necrotic cells while the mCherry-tagged PMCAs made it possible to distinguish the pumps from the GFP-based GCaMP2 fluorescence signal.

First, we studied the localization of different GFP-tagged PMCA variants in polarized MDCK cells. We demonstrated that the PMCA2w/b splice variant is located in the apical membrane compartment, whereas the PMCA2z/b and PMCA2x/b variants are mostly expressed laterally. In addition, we showed that specific interaction with an apical scaffold protein, NHERF2 enhances the apical concentration of PMCA2w/b by anchoring it to the apical membrane cytoskeleton (Padányi et al, JBC 2010; Enyedi & Strehler, CIB 2011).

Next, we generated MDCK cell lines stably expressing the non-tagged PMCA2w/b protein and found that apical localization was greatly enhanced in terminally polarized MDCK cells. We also showed that PMCA2w/b was stabilized in the apical membrane via the apical membrane cytoskeleton with the help of endogenous NHERF2 and ezrin. We transfected the cells with the GCaMP2 Ca^{2+} sensor and demonstrated that PMCA2w/b was highly active in MDCK cells (Antalffy et al, BBRC 2011).

Further, we showed that inserting the alternatively spliced w-insert of PMCA2wb into the corresponding location of the PMCA4 isoform confers apical targeting to this normally lateral pump. Functional studies showed that both apical PMCA4(2w)/b and lateral PMCA4x/b handled ATP-induced Ca^{2+} signals with similar kinetics, suggesting that isoform-specific functional characteristics are retained irrespective of membrane targeting (Antalffy et al, Cell Calcium, 2011).

The newly developed double recording system is especially well suited to study how PMCAs affect cellular Ca^{2+} levels in the course of apoptosis and oxidative stress and how cell death affects the localization of PMCAs. Using this system we can follow changes in cytosolic Ca^{2+} concentrations and apoptotic cell morphology, simultaneously. We found that the level of PMCA expression prevented early Ca^{2+} overload and thus, necrotic cell death during receptor mediated apoptosis. Our studies help understanding of the physiological conditions that influence the complex cell death program, and develop strategies to adequately prevent, or induce cell death. Our studies may also contribute to the understanding of the mechanisms of diseases associated with abnormal Ca^{2+} signaling (Pászty et al. manuscript in preparation).

Publications:

1. Padányi R, Xiong Y, Antalffy G, Lór K, Pászty K, Strehler EE, Enyedi A.: Apical scaffolding protein NHERF2 modulates the localization of alternatively spliced plasma membrane Ca^{2+} pump 2B variants in polarized epithelial cells. J BIOL CHEM. 285(41): pp. 31704-12. (2010) IF 5.328

2. Antalffy G, Caride AJ, Pászty K, Hegedus L, Padanyi R, Strehler EE, Enyedi A.: Apical localization of PMCA2w/b is enhanced in terminally polarized MDCK cells. BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN. 410(2): pp. 322-7. (2011) IF 2.595

3. Enyedi A, Strehler EE.: Regulation of apical membrane enrichment and retention of plasma membrane Ca ATPase splice variants by the PDZ-domain protein NHERF2. COMMUN INTEGR BIOL. 4(3): pp. 340-3. (2011) Addendum.

4. Géza Antalffy, Amy S. Mauer, Katalin Pászty, Luca Hegedus, Rita Padányi, Ágnes Enyedi, Emanuel E. Strehler,: Plasma membrane calcium pump (PMCA) isoform 4 is targeted to the apical membrane by the w-splice insert from PMCA2, CELL CALCIUM, *Available online 15 January* (2012), *http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2011.12.010* IF 3.553

Teljes támogatás: 3.900.000.- Ft

7. Rizikófaktorok a diabéteszes nefropátia progressziójában: az aszimmetrikus dimetil-arginin (ADMA) és a renin-angiotenzin rendszer szerepe

Fekete A[1], Szabó A[1], Wagner L[2], Vér A[3], Rosta K[2], Bánki NF, Prókai Á[1]
[1]Semmelweis Egyetem I.sz. Gyermekklinika, [2]Semmelweis Egyetem Transzplantációs és Sebészeti Klinika, [3]Semmelweis Egyetem Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézet

Bevezetés: A diabétesz mellitusz (DM) a felnőttkori krónikus veseelégtelenség vezető oka, mely kiemelt népegészségügyi probléma, a betegek 20-40%-át érinti. A vércukor-emelkedés a renin-angiotenzin rendszer (RAAS) aktiválódását, az emelkedett angiotenzin II (ANGII) szint a diabéteszes vesekárosodás további romlását eredményezi. Korábbiakban kimutattuk, hogy a DM és az ANGII kezelés vesefunkciót rontó hatása összeadódik, ún. „rárakódásos" vesekárosodást hoz létre. A folyamat pontos hatásmechanizmusa nem ismert, továbbá a klinikai gyakorlatban alkalmazott különböző RAAS gátlókkal ezirányú experimentális vizsgálatok nem történtek.

A pályázatban megadott célkitűzések:

1. Hogyan változik a vese funkcionális és strukturális működése DM hatására?
2. Hogyan változik DM-ben a veseműködés szempontjából kiemelt jelentőségű NKA és a HSP72 expressziója és regulációja? Milyen szignál transzdukciós út szabályozhatja a NKA működését?
3. Visszafordíthatók-e ezek a változások RAAS gátló: *aliskiren, enalapril, lozartán, spironolakton* ill. *eplerenon* adagolását követően?
4. Különbözik-e a hiperglikémia és az inzulinopénia hatása?

Eredmények:

I. Vérnyomás: Sem a DM, sem a kezelések nem változtatták a vérnyomást az egyes csoportok között. Mindez alátámasztja, hogy ezek a gyógyszerek az alkalmazott dózisban mellékhatásként szisztémás hipotenziót nem okoznak. Az aldoszteron-antagonisták a DM állatok bradikardiáját kivédik, ami felveti, hogy ez a gyógyszercsoport - a hipertónia indukciója nélkül - képes a DM-ben csökkent baroreflex aktivitás visszaállítására.

II. Veseműködés és szénhidrát anyagcsere: A DM következtében kialakuló nefropátiát jelzik az emelkedett vesefunkciós értékek, a hiperkalémia, a fokozott Na és fehérjeürítés *(1. táblázat)*, melyet az alkalmazott kezelések javítanak. DM-ben hiperglikémia és glükozúria alakul ki, nő a vese/testtömeg arány. A kezelések (az aliskiren kivételével) ezeket a paramétereket is csökkentik, így feltételezhető, hogy az ACE-gátló, ARB és aldoszteron-antagonista szerek DM-ben a szénhidrát-anyagcserét is jótékonyan befolyásolják, renoprotektív hatásuk mellett.

*1. **táblázat Veseműködés és szénhidrát anyagcsere paraméterek***

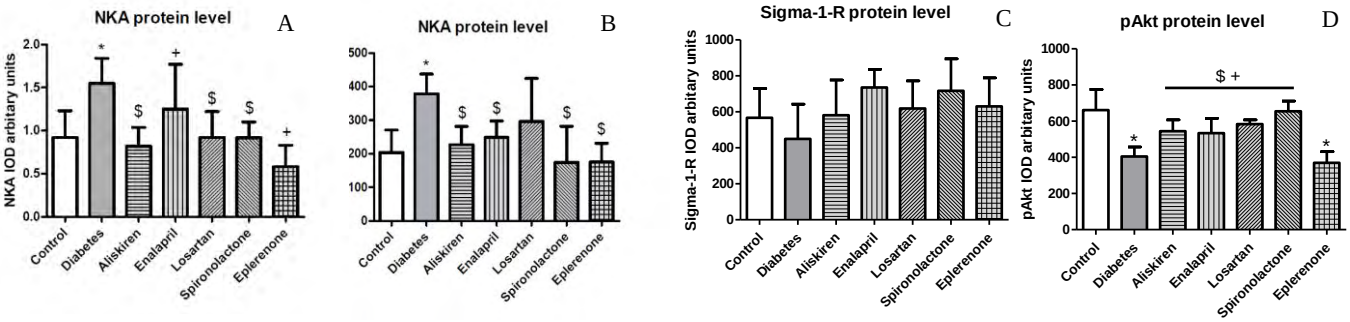
Parameter	Control	Diabetes	Aliskiren	Enalapril	Losartan	Spironolactone	Eplerenone
Serum Creatinine (μmol/L)	55.6 ± 5.4	64.6 ±6.7*	64.5 ± 5.9	57.8 ± 9.8	54.8 ± 7.1$	56.7 ± 4.5$	69.3 ± 7.3
BUN (mmol/L)	7.12 ± 0.28	15 ± 3*	12 ± 3$	11.9 ± 2.4$	11.93 ± 1.5$	8.61 ± 1.05$	11.4 ± 2.3$
Serum Na (mmol/L)	154 ± 8	135 ± 3*	137 ±3$	137 ± 3	138 ± 1	141 ± 2$	140 ± 2$
Serum K (mmol/L)	5.78 ± 0.43	7.26 ± 0.86*	7.3 ± 1.8	7.24 ± 1.08	6 ± 0.5$	5.34 ± 1.39$	6.12 ± 0.8$
FeNa	1.09 ± 0.3	2.57 ± 1.4*	1.6 ± 0.7	1.16 ± 0.51$	0.6 ± 0.1$	1.2 ± 0.3$	1.06 ± 0.38$
Proteinuria (mg/L)	312 ±33	663 ± 500*	105 ± 93$	118±50$	180±70$	358 ± 130$	135 ± 10$
Serum glucose (mmol/L)	111.6 ± 1.1	43.6 ± 3.2*	40.5 ± 6.7	35.6 ± 5.2$	36.1 ± 5.9$	33.2 ± 2.4$	35.8 ± 1.6$
Body weight (g)	342 ± 13	260 ± 29*	266 ± 83	256 ± 42	250 ± 64.5	349 ± 29$	273 ± 55
Right kidney/body weight	4.2 ± 0.4	6.5 ± 0.9*	6.2 ±0.7	5.3 ± 0.9$	5.7 ± 0.6$	5.5 ± 1.1$	6 ± 0.5$
Glucosuria	0.28 ± 0.19	408 ± 25*	427 ± 38	414 ± 40	335 ± 32$	472 ± 35$	445 ± 19

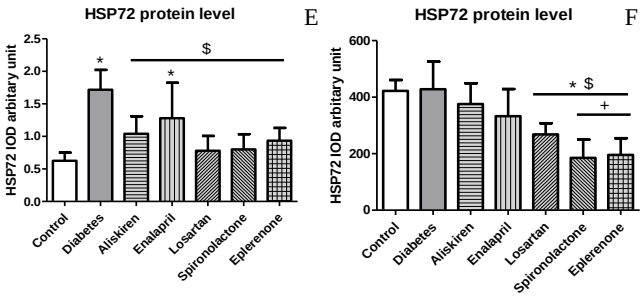
Karbamid nitrogén (BUN), nátrium (Na), kálium (K) és a frakcionált Na (FeNa) (*p<0.05 vs. Control; $p< 0.05 vs. Diabetes; n=8-10/csoport)

III. A NKA és a Sigma 1 receptor (Sigma1R) -Akt szignál transzdukciós út változása

Kimutattuk, hogy a kezelések a DM (1. ábra A) , illetve hiperglikémia (B) által megnövelt NKA mennyiségét csökkentik. A Sigma1R (C) és az Akt foszforilációja (D) is csökken, melyet a RAAS

gátlók mérsékelnek és kontroll szintjére állítanak vissza. Ezek az eredmények felvetik az Akt aktiváció szerepét a NKA membránhoz történő lokalizációjában, és a kezelések hatására történő fokozott Akt aktivitásra utalnak, melynek hátterében a Sigma1R megnövekedett mennyisége állhat.



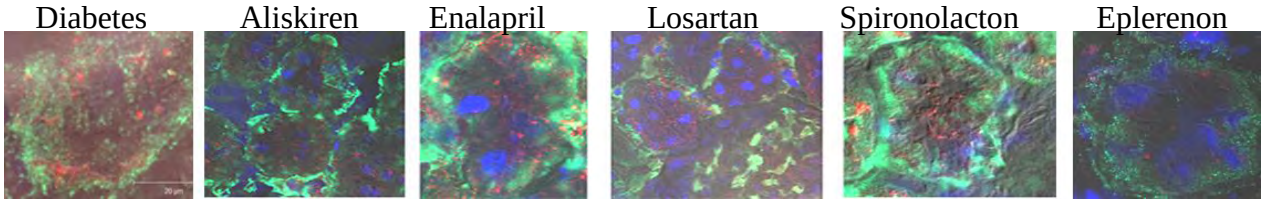


IV. HSP72 változása

Chaperon hatása révén a HSP72 is szerepet játszik a NKA bazolaterális lokalizációjában. DM-ben a HSP72 nőtt (E), melyet az összes kezelés mérsékelt. A hiperglikémiás modellben nem találtunk a cukor hatására hasonló változást (F). A patomechanizmus tisztázása további vizsgálatokat igényel.

V. A NKA és HSP72 tubuláris lokalizációja

A tubulus epithelsejtek NKA alfa-1 alegysége DM-ben átkerül a citoszólba, illetve az apikális membránra. Ezzel párhuzamosan a HSP72 expressziója nő, lokalizációja a NKA-val megegyezik. Bár különböző mértékben, de mindegyik kezelés kivédi a NKA kihelyeződését.



2. ***ábra* HSP72 (piros) és NKA alfa-1 (zöld) tubuláris lokalizációja** sejtmag (kék) (Zeiss)

Összefoglalás

Eredményeink alapján cukorbetegségben nő a tubuláris NKA és HSP72 mennyisége, lokalizációja megváltozik, melynek hátterében inkább a hiperglikémia, mint az inzulinopénia szerepe feltételezhető. A RAAS gátló kezelések - az ACE inhibitorok kivételével - a NKA mennyiségét csökkentik, kihelyeződését megakadályozzák, részben a fokozott chaperonhatás, részben az Akt foszforiláció serkentésén keresztül. Az egyes RAAS gátlók eltérő hatás-mintázattal védik ki / gátolják a diabéteszes nefropátia okozta károsodásokat, mely magyarázhatja eltérő klinikai hatékonyságukat a cukorbetegség szövődményeinek megelőzésében.

Publikációk

1. Bánki NF, Vér Á, Wagner L, Fekete A. KIDNEY INT under review (2012) IF:6.105
2. Wagner L, Fekete A, Rudolf A et al. TRANSPLANT PROC under review (2012) IF:0.993
3. Rusai K, Prókai Á, Fekete A et al. CELL PHYSIOL BIOCHEM 27; pp 27-38 (2011) IF:3.986
4. Prókai Á, Fekete A, Bánki NF et al. SURGERY 150; 39-47 (2011) IF:3.603
5. Prókai Á, Fekete A, Pásti K et al. PEDIATRIC DIABETES 1399-1407 (2011) IF:2.171
6. Rusai K, Bánki NF, Fekete A TRANSPLANT PROC 42; 2309-2311 (2010) IF: IF:0.993
7. Rosta K, Enzsoly E, Fekete A et al. ACTA PHARMACOL SIN 30; 1616-1624 (2009) IF:7.783

Budget: 3.900.000.- HUF

Risk factors in the development and progression of diabetic nephropathy: the role of asymetric dimethyl-arginin (ADMA) and renin-angiotensin system

Fekete A[1], Szabó A[1], Wagner L[2], Vér A[3], Rosta K[2], Bánki NF, Prókai Á[1]
[1]1st Dept of Pediatrics, [2]Dept. of Transplantation and Surgery, [3]Dept. of Medical Chemistry Molecular Biology and Pathobiochemistry, Semmelweis University of Budapest

Introduction: Diabetes (DM) is a complex metabolic disorder, in which suffer 171 million people worldwide, and it is the predominant cause of chronic kidney disease. In DM the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) is activated, with increased renal angiotensin II (ANGII) and aldosterone activity. Previously we showed that Na/K ATPase (NKA) is activated and ANG II leads to superimposed renal progression in a rat model of diabetic nephropathy, but the pathomechanism and therapy are still remain elusive.

Aim of the study:

1. To test the effect of experimental DM on kidney structure and function
2. To test the DM-induced changes on renal NKA and HSP72 and to investigate the activated signal transduction pathways
3. To test the effect of different RAAS inhibitors: *aliskiren, enalapril, losartan spironolakton* ill. *eplerenon* on these changes
4. To differentiate the effect of hyperglycemia and insulinopenia per se

Results:

I. Blood pressure MAP remained unchanged after 7 weeks of untreated diabetes and after the 5-7 week treatment with each RAAS inhibitor, reflecting the non-depressor dose of the substances. Heart rate was lower in diabetic animals, but was restored to the level of controls by aldosterone antagonists.

II. Renal and metabolic parameters: Parameters representing metabolic and kidney function were affected as shown in Table 1. In DM renal function parameters, Na and protein excretion increased while all was ameliorated by the treatments. Diabetic animals had higher blood glucose level, lower body weight and significant glucosuria, which were all improved by different RAAS blockers. This suggest that beside renoprotection, these agents have pleiotropic beneficial effect on DM induced metabolic abnormalities

1. table **Metabolic and renal function parameters**

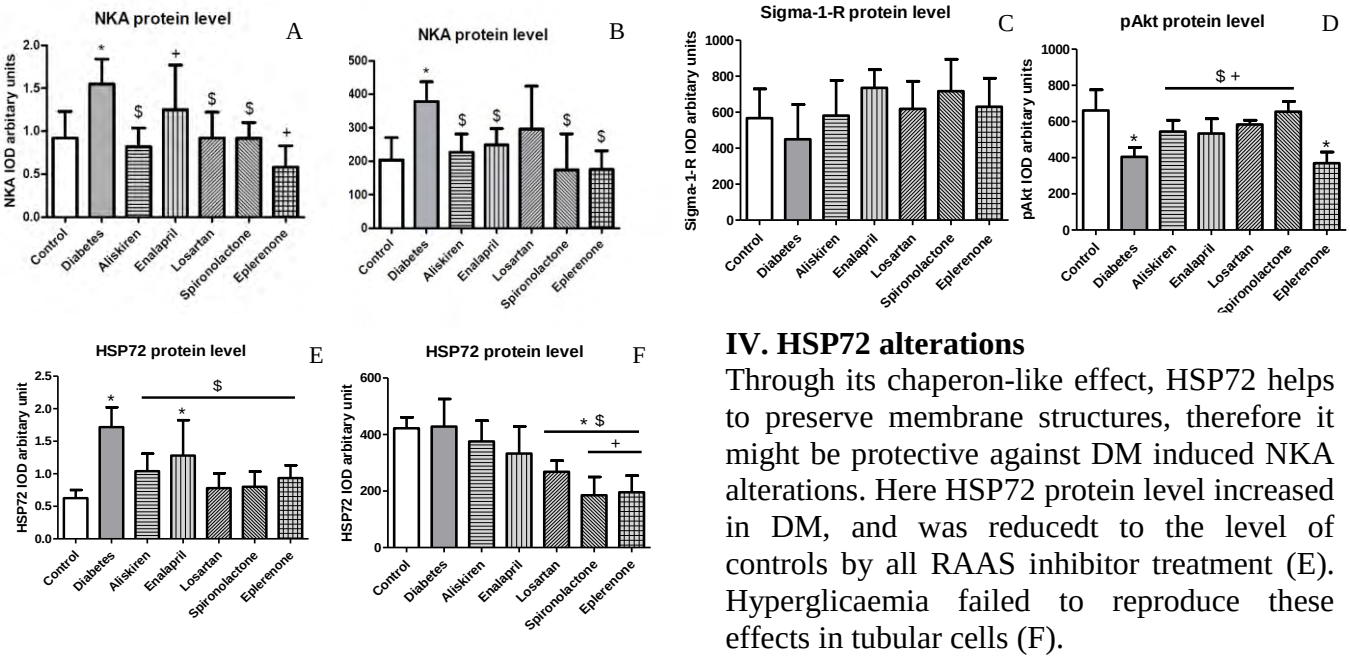
Parameter	Control	Diabetes	Aliskiren	Enalapril	Losartan	Spironolactone	Eplerenone
Serum Creatinine (μmol/L)	55.6 ± 5.4	64.6 ±6.7*	64.5 ± 5.9	57.8 ± 9.8	54.8 ± 7.1$	56.7 ± 4.5$	69.3 ± 7.3
BUN (mmol/L)	7.12 ± 0.28	15 ± 3*	12 ± 3$	11.9 ± 2.4$	11.93 ± 1.5$	8.61 ± 1.05$	11.4 ± 2.3$
Serum Na (mmol/L)	154 ± 8	135 ± 3*	137 ±3$	137 ± 3	138 ± 1	141 ± 2$	140 ± 2$
Serum K (mmol/L)	5.78 ± 0.43	7.26 ± 0.86*	7.3 ± 1.8	7.24 ± 1.08	6 ± 0.5$	5.34 ± 1.39$	6.12 ± 0.8$
FeNa	1.09 ± 0.3	2.57 ± 1.4*	1.6 ± 0.7	1.16 ± 0.51$	0.6 ± 0.1$	1.2 ± 0.3$	1.06 ± 0.38$
Proteinuria (mg/L)	312 ±33	663 ± 500*	105 ± 93$	118±50$	180±70$	358 ± 130$	135 ± 10$
Serum glucose (mmol/L)	111.6 ± 1.1	43.6 ± 3.2*	40.5 ± 6.7	35.6 ± 5.2$	36.1 ± 5.9$	33.2 ± 2.4$	35.8 ± 1.6$
Body weight (g)	342 ± 13	260 ± 29*	266 ± 83	256 ± 42	250 ± 64.5	349 ± 29$	273 ± 55
Right kidney/body weight	4.2 ± 0.4	6.5 ± 0.9*	6.2 ±0.7	5.3 ± 0.9$	5.7 ± 0.6$	5.5 ± 1.1$	6 ± 0.5$
Glucosuria	0.28 ± 0.19	408 ± 25*	427 ± 38	414 ± 40	335 ± 32$	472 ± 35$	445 ± 19

Blood urea nitrogen (BUN), sodium (Na), potassium (K) fractionated Na excretion (FeNa) (*p<0.05 vs. Control; $p< 0.05 vs. Diabetes; n=8-10/group)

III. Protein levels of NKA, HSP72 and activation of Sigma1R-Akt pathway

Losartan, Spironolactone and Eplerenone prevented diabetes induced increase in NKA protein level and enzyme translocation to the cytosol (A). The increased NKA protein level seen in HG cells (B) was reversed by Enalapril, Spironolactone and Eplerenone. Diabetes-induced decrease of Sigma-1R (C) and phospho-Akt (D) level was restored by RAAS inhibition.

Figure 1. Protein level of Sigma1R, pAkt, NKA pathway and HSP72



IV. HSP72 alterations

Through its chaperon-like effect, HSP72 helps to preserve membrane structures, therefore it might be protective against DM induced NKA alterations. Here HSP72 protein level increased in DM, and was reducedt to the level of controls by all RAAS inhibitor treatment (E). Hyperglicaemia failed to reproduce these effects in tubular cells (F).

VI. Tubular localization of NKA and HSP72

NKA distribution showed a cytoplasmic or even to an apical membrane associated staining in diabetic animals. RAAS inhibitors prevented this mislocation, although the linear basolateral staining of NKA was slightly widened. NKA was co-localized with HSP72.

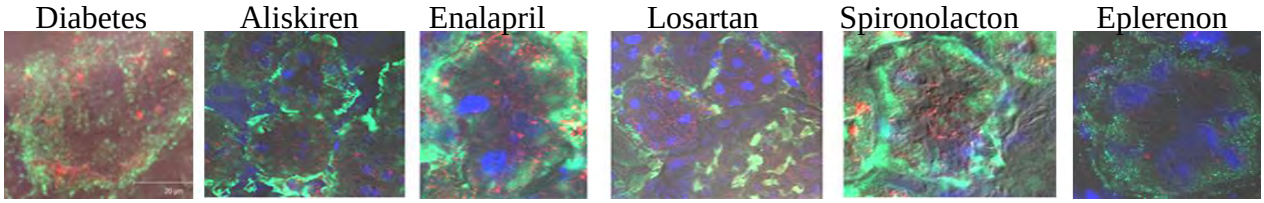


Figure 2. Immunohistochemical localization of HSP72 (red) and NKA alfa-1 (green) (nucleus (blue, 63x, Zeiss-LSM microscope)

Summary

According to our results tubular NKA and HSP72 is increased, while the enzyme is misloclated in DM. These alterations are attributed rather to hyperglicaemia than to insulinopenia. In summary, RAAS antagonists might be beneficial in the prevention of STZ-induced DN. Since ACE inhibitors and ARBs attenuate but do not abrogate progression of renal dysfunction, add-on aldosterone antagonists could be effective in enhancing renal protection. Furthermore the alteration of the Sigma-1R – Akt – NKA pathway could represent a novel pathophysiological feature of DN and might serve as an additional target of RAAS blockers.

Publications

1. Bánki NF, Vér Á, Wagner L, Fekete A. KIDNEY INT under review (2012) IF:6.105
2. Wagner L, Fekete A, Rudolf A et al. TRANSPLANT PROC under review (2012) IF:0.993
3. Rusai K, Prókai Á, Fekete A et al. CELL PHYSIOL BIOCHEM 27; pp 27-38 (2011) IF:3.986
4. Prókai Á, Fekete A, Bánki NF et al. SURGERY 150; 39-47 (2011) IF:3.603
5. Prókai Á, Fekete A, Pásti K et al. PEDIATRIC DIABETES 1399-1407 (2011) IF:2.171
6. Rusai K, Bánki NF, Fekete A TRANSPLANT PROC 42; 2309-2311 (2010) IF: IF:0.993
7. Rosta K, Enzsoly E, Fekete A et al. ACTA PHARMACOL SIN 30; 1616-1624 (2009) IF:7.783

Támogatás: 4500000.- HUF

ÚJ KARDIOPROTEKTÍV MAKROMOLEKULÁK: A BIGLIKÁN ÉS EGYÉB PROTEOGLIKÁNOK

ETT nyilvántartási szám: 476-06/2009

Prof. Dr. Ferdinandy Péter, egyetemi tanár
SZTE ÁOK BIOKÉMIAI INTÉZET, KARDIOVASZKULÁRIS KUTATÓCSOPORT

A szív-érrendszeri betegségek világszerte a vezető halálokok közé tartoznak az iparilag fejlett országokban. Az iszkémiás szívbetegsében szenvedők 70%-a miokardiális infarktusban hal meg. Ezért olyan kardioprotektív molekulák fejlesztése, amelyek javítják a szív pumpafunkcióját, csökkentik az aritmiák előfordulási gyakoriságát, mérséklik a nekrózist és az iszkémia/reperfúzió okozta sejtelhalást, nagy klinikai jelentőséggel bírnak. Előzetes eredményeink szerint, egy endogén proteoglikán, a biglikán lehetséges kardioprotektív szerepe merült fel.

Ezért a jelen projekt főbb célkitűzései a következőek voltak:

1. Az exogén biglikán alkalmazásával történő kardioprotekció/citoprotekció vizsgálata iszkémia/reperfúziós kísérleti rendszerekben.
2. A biglikán endogén úton történő aktivitásának növelése, transzgén módszerrel egerekben, valamint a szív védelmezhetőségének vizsgálata a transzgén állatokon.
3. A biglikán alkalmazásával kiváltott kardioprotekció hatásmechanizmusának vizsgálata, biokémiai és molekuláris biológiai módszerekkel, illetve egyéb proteoglikánok esetleges kardioprotektív hatásának vizsgálata, mint pl. decorin.

Eredményeink azt mutatják, hogy az exogén biglikán alkalmazásával dózisfüggő kardioprotekció hozható létre kardiomiocitákon hipoxia/reoxigenizációs modellben. Ezen hatás nagymértékben függ az alkalmazott biglikán dózisától. Ezen kívül vizsgáltuk az iszkémiás károsodásra adott génexpressziós választ az oxidatív/nitrozatív stresszben szerepet játszó génekre, valamint a NO-szintázra fókuszálva. A NO a szolubilis guanilát-ciklázt aktiválva fokozza a sejtekben a cGMP mennyiségét és a PKG aktivációját. Ezen eredményekből kiindulva megvizsgáltuk, hogy az exogén biglikán citoprotektív hatása hogyan befolyásolja a NO-cGMP-PKG útvonalat, valamint a mátrix metalloproteinázok (MMP) aktivitását, majd azt teszteltük, hogy az exogén biglikán citoprotektív hatását hogyan befolyásolja a NO-peroxinitrit-MMP útvonal aktivitása. Munkánk során kombinációs kezelésben alkalmaztunk biglikánt és nem szelektív NO szintáz és MMP inhibítorokat, valamint biglikánt és a peroxinitrit elbontását katalizáló vegyületet, FeTPPS-t. A NO szintáz inhibítor jelenléte részben csökkentette, a peroxinitrit es MMP gátlók jelenléte nem védte ki a biglikán citoprotektív hatását. A fenti kísérleteken kívül olyan in vitro molekuláris biológiai módszereket állítottunk be, melyek segítségével hatékonyan vizsgálhatóak a proteoglikánok (biglikán) mennyiségi változásai szöveti mintákból. A projekt eredményeként 7 nemzetközi közlemény összesen 30,1 impakt faktor értékkel jelent meg.

Nemzetközi közlemények:

1. Giricz Z, Görbe A, Pipis J, Burley DS, Ferdinandy P, Baxter GF. Hyperlipidaemia induced by a high-cholesterol diet leads to the deterioration of guanosine-3',5'-cyclic monophosphate/protein kinase G-dependent cardioprotection in rats. BR J PHARMACOL. 2009 Nov;158(6):1495-502. IF:4,925

2. Kocsis GF, Csont T, Varga-Orvos Z, Puskas LG, Murlasits Z, Ferdinandy P. Expression of genes related to oxidative/nitrosative stress in mouse hearts: effect of preconditioning and cholesterol diet. MED SCI MONIT. 2010 Jan;16(1):BR32-9.
IF:1,699

Támogatás: 4500000.- HUF

3. Csont T, Görbe A, Bereczki E, Szunyog A, Aypar E, Tóth ME, Varga ZV, Csonka C, Fülöp F, Sántha M, Ferdinandy P. Biglycan protects cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation injury: Role of nitric oxide. J MOL CELL CARDIOL. 2010 Apr;48(4):649-652.
IF:5,376

4. Csonka C, Kupai K, Kocsis GF, Novák G, Fekete V, Bencsik P, Csont T, Ferdinandy P. Measurement of myocardial infarct size in preclinical studies. J PHARMACOL TOXICOL METHODS. 2010 Mar-Apr;61(2):163-70.
IF:2,22

5. Gorbe A, Giricz Z, Szunyog A, Csont T, Burley DS, Baxter GF, Ferdinandy P Role of cGMP-PKG signaling in the protection of neonatal rat cardiac myocytes subjected to simulated ischemia/reoxygenation. BASIC RES CARDIOL. 2010 Sep;105(5):643-50.
IF:6,128

6. Ovize M, Baxter GF, Di Lisa F, Ferdinandy P, Garcia-Dorado D, Hausenloy Heusch G, Vinten-Johansen J, Yellon DM, Schulz R; Working Group of Cellular Biology of Heart of European Society of Cardiology. Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand? Position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. CARDIOVASC RES. 2010 Aug 1;87(3):406-23.
IF:6,051

7. Bencsik P, Kupai K, Giricz Z, Görbe A, Pipis J, Murlasits Z, Kocsis GF, Varga-Orvos Z, Puskás LG, Csonka C, Csont T, Ferdinandy P. Role of iNOS and peroxynitrite-matrix metalloproteinase-2 signaling in myocardial late preconditioning in rats. AM J PHYSIOL HEART CIRC PHYSIOL. 2010 Aug;299(2):H512-8.
IF:3,71

Szeged, 2012 január 31.

Prof. Dr. Ferdinandy Péter
Témavezető

Prof. Dr. Szabó Gábor
rektor, intézményvezető

Dr. Majó Zoltán,
Gazdasági és műszaki főigazgató

Támogatás: 4500000.- HUF

NOVEL CARDIOPROTECTIVE MACROMOLECULES: BIGLICAN AND RELEATED PROTEOGLYCANS

ETT register number: 476-06/2009

Prof. Dr. Ferdinandy, Péter, professor
Department of Biochemistry, University of Szeged, Szeged, Hungary; Cardiovascular Research Group

Ischemic heart disease is the leading cause of death in the industrialized world. About 70% of the people with ischemic heart disease die due to acute myocardial infarction. Therefore, development of cardioprotective agents to improve myocardial function, decrease the incidence of arrhythmias, delay the onset of necrosis, and limit the total extent of infarction during ischemia/reperfusion injury is of great clinical importance. Our preliminary results revealed the potential cardioprotective role of an endogenous proteoglycan, biglycan.

Therefore, our major aims in the present project were:

1. To explore the effects of exogenous biglycan application on cardioprotection/cytoprotection using ischemia/reperfusion injury models.
2. The induction of endogenous biglycan activity via genetic transfer in mice and the investigation of myocardial protection in transgenic animals.
3. The investigation of the mechanisms of biglycan-induced cardioprotection using biochemical and molecular biological methods and the analysis of the potential cardioprotective effects of other proteoglycans, such as decorin.

Our results showed that biglycan protects cardiac myocytes aginst hypoxia/reoxygenation injury in is dose-dependent manner in cardiac myocytes. We tested the effect of ischemia/reperfusion injury on cardiac gene expression patterns in mouse hearts focusing on genes involved in free radical signalling and oxidative/nitrosative stress as well as nitric oxide (NO) synthase. We have shown that overexpression of biglycan induces cardioprotective genes including NO-synthase in the heart of a transgenic mouse model. Since NO is protective against ischemia-reperfusion injury as it increases intracellular cGMP level via activation of soluble guanylate cyclase and PKG, we examined if biglycan may affect the NO-cGMP-PKG pathway and the activation of matrix metalloproteinases. Therefore, we examined the cardioprotective effect of exogenous biglycan in the presence of a non-selective NO synthase inhibitor, a non-selective MMP inhibitor, or a peroxinitrite decomposition catalyst, FeTPPS. The NO synthase inhibitor decreased the cytoprotective effect of biglycan, but neither MMP inhibition nor FeTPPS influenced its cytoprotective effect. On top of the abovementioned results, we implemented new molecular biology methods, which helps to determine endogen biglycan from tissue samples. As a results of the 3-year project, we published 7 papers with 30.1 total impact factors.

Peer-reviewed publications:

1. Giricz Z, Görbe A, Pipis J, Burley DS, Ferdinandy P, Baxter GF. Hyperlipidaemia induced by a high-cholesterol diet leads to the deterioration of guanosine-3',5'-cyclic monophosphate/protein kinase G-dependent cardioprotection in rats. BR J PHARMACOL. 2009 Nov;158(6):1495-502.
IF:4.925

2. Kocsis GF, Csont T, Varga-Orvos Z, Puskas LG, Murlasits Z, Ferdinandy P. Expression of genes related to oxidative/nitrosative stress in mouse hearts: effect of preconditioning and cholesterol diet. MED SCI MONIT. 2010 Jan;16(1):BR32-9.
IF:1.699

3. Csont T, Görbe A, Bereczki E, Szunyog A, Aypar E, Tóth ME, Varga ZV, Csonka C, Fülöp F, Sántha M, Ferdinandy P. Biglycan protects cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation injury: Role of nitric oxide. J MOL CELL CARDIOL. 2010 Apr;48(4):649-652.
IF:5.376

4. Csonka C, Kupai K, Kocsis GF, Novák G, Fekete V, Bencsik P, Csont T, Ferdinandy P. Measurement of myocardial infarct size in preclinical studies. J PHARMACOL TOXICOL METHODS. 2010 Mar-Apr;61(2):163-70.
IF:2.22

5. Gorbe A, Giricz Z, Szunyog A, Csont T, Burley DS, Baxter GF, Ferdinandy P Role of cGMP-PKG signaling in the protection of neonatal rat cardiac myocytes subjected to simulated ischemia/reoxygenation. BASIC RES CARDIOL. 2010 Sep;105(5):643-50.
IF:6.128

6. Ovize M, Baxter GF, Di Lisa F, Ferdinandy P, Garcia-Dorado D, Hausenloy Heusch G, Vinten-Johansen J, Yellon DM, Schulz R; Working Group of Cellular Biology of Heart of European Society of Cardiology. Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand? Position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. CARDIOVASC RES. 2010 Aug 1;87(3):406-23.
IF:6.051

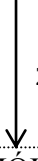
7. Bencsik P, Kupai K, Giricz Z, Görbe A, Pipis J, Murlasits Z, Kocsis GF, Varga-Orvos Z, Puskás LG, Csonka C, Csont T, Ferdinandy P. Role of iNOS and peroxynitrite-matrix metalloproteinase-2 signaling in myocardial late preconditioning in rats. AM J PHYSIOL HEART CIRC PHYSIOL. 2010 Aug;299(2):H512-8.
IF:3.71

Szeged, January 31, 2012

Prof. Dr. Ferdinandy Péter
Project leader

Prof. Dr. Szabó Gábor
rector

Dr. Majó Zoltán,
Financial and technical director



Teljes támogatás: 6.000.000,- Ft

SEJTHALÁL ÉS GYULLADÁSOS REAKCIÓK SZEREPE A PREADIPOCITÁK DIFFERENCIÁLÓDÁSÁNAK ÉS AZ OBEZITÁS KIALAKULÁSÁNAK FOLYAMATÁBAN

Balajthy Zoltán[1], Sárvári Anitta[1], Petrovski Goran[1], Hodrea Judit[1], Majai Gyöngyike[2], Rajnavölgyi Éva[3] Kristóf Endre[1], ZahuczkyGábor[4], Mádi András[4], Doan Minh[5] , Bacsó Zsolt[5] Fésüs László[1]
Debreceni Egyetem OEC AOK [1]Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, [2]Klinikai Immunológia Tanszék, [3]Immunológia Tanszék, [4]MTA Apoptózis és Genomika kutatócsoport, [5]Sejtbiológiai Tanszék

Az utóbbi években egyértelművé vált, hogy a kövérség kisebb-nagyobb mértékű gyulladásos állapottal jár együtt a zsírszövetben, ami nagymértékben hozzájárul a cukorbetegség, a metabolikus szindróma kialakulásához és a kövér emberek csökkent élettartamához. Kutatásaink során abból a feltételezésből indultunk ki, hogy a nagy test tömeg index-szel járó obesitas során a zsírszövetekben fennálló gyulladásos állapot az egyik meghatározó oka, hogy ott nagy számban halnak el adipociták olyan módon, hogy az a makrofágok aktiválásához, az elhaló sejtek csökkent fagocitózisához vezet és ezzel másodlagosan is adipocita nekrózis és még fokozottabb gyulladásos válasz alakul ki. E folyamatok modellezéséhez és részleteinek feltárásához kutatásaink során elkezdtük megismerni az adipociták apoptózissal és nekrózissal történő elhalásának, az elhalt sejtek fagocitózisának molekuláris részleteit, gyulladást kiváltó és szabályozó tulajdonságait. Kerestük azokat a lehetséges sejthalál és fagocitózis jelátviteli mechanizmusokat, amelyek befolyásolásával esély nyílhat a gyulladásos folyamatok gátlására és ezzel a súlyos krónikus következmények megelőzésére vagy csökkentésére.

Legfontosabb eredményeink és megállapításaink a következők:

- *In situ* festési eljárások segítségével humán preadipocita sejtvonal és zsírszövetből izolált mezenchimális őssejtek adipocita irányba történő differenciálódását és részbeni elhalását lézer pásztázó mikroszkóppal sejtkultúrákban közvetlenül és folyamatosan tanulmányoztuk, kidolgozva az ehhez szükséges új módszert. Ezzel a módszerrel közvetlenül figyelhettük meg a differenciálódás során egyre fokozódó spontán apoptózissal és nekrózissal, valamint különböző stimulusok (TNFα, hipoxia, UV) hatására elhaló sejtek fagocitózisát; a mikroszkópos eredményeket FACS analízissel ellenőrizve standardizálható módszertani hátteret teremtettünk kutatásainkhoz.
- Az elhaló adipociták gyulladásos citokin termelést indítanak el a makrofágokban és eltérően az egyéb típusú sejtek apoptózisától a spontán elhaló adipociták nem tudják gátolni az egyéb gyulladáskeltő ágensek (így LPS) citokin termelést kiváltó hatását.
- Amikor a makrofágok fagocitálják az autofágiával elhaló sejteket a fagocitózis során gyulladásos válasz jön létre. Ennek oka nem valamilyen felszíni receptor függő jelátviteli folyamat, hanem a citszolban található inflammaszóma aktiválása, a következményes kaszpáz-1 aktiválást követő IL-1beta hasítás, illetve szekréció. A folyamatnak jelentősége lehet az adipociták elhalása során, amikor szintén megfigyelhetők autofágiás jelenségek, továbbá tumorok növekedésében, ahol az autofágiás sejthalál bekövetkezte gyulladásos folyamatokat indíthat el, akár kemoterápiás kezelés hatására is, amely inkább segíti elő mint csökkenti a növekedő tumorokban a daganatos sejtek burjánzását.
- Monocita eredetű dendritikus sejtekben igazoltuk, hogy i) a spontán elhaló neutrofil granulocitákat a monocita eredetű dendritikus sejtek CD1a- altípusa hatékonyabban veszi el, mint a CD1a+ alpopuláció, ii) az apoptótikus sejtek megkötésében és felvételében a dendritikus sejtekre jellemző DC-SIGN lektin receptor is részt vesz, iii) az elhalt allogén apoptótikus sejtek bekebelezése a dendritikus sejtek aktivációját váltja ki és gyulladásos citokin választ eredményez, melynek mértéke korrelációt mutat az apoptótikus sejt felvétellel, iv) az adipociták differenciálódásában meghatározó szerepet játszó PPARgamma magreceptor szintetikus ligandummal történő aktivációja kedvez a CD1a- dendritikus sejtek képződésének és fokozza az apoptótikus sejtfelvételt, miközben gátló hatást fejt ki a T limfociták gyulladásos irányú polarizációjára.

- A monociták makrofággá differenciálódásuk során tesznek szert arra a képességükre, hogy hatékonyan fagocitálják és bontják le a környezetükbe került elhaló sejteket. Szteroid származékok, így a dexametazon jelenlétében differenciálódó makrofágok apoptótikus sejteket fagocitáló képessége ezen túlmenően is igen jelentősen nő, ami hozzájárul a gyulladásos válasz lecsendesítéséhez. Erre a célra kifejlesztett, az apopto-fagocita gének kifejeződésének mértékét meghatározó „Tachman Low Density array (TLDA)" segítségével tisztáztuk, hogy mely gének szteroid receptor függő fokozottabb kifejeződése figyelhető meg differenciálódás során, majd géncsendesítéssel („knock-down" technikával) és blokkoló antitestekkel részben megakadályoztuk a fokozott fagocitózis képesség létrejöttét. Megállapítottuk, hogy a szteroidok ezen a gyulladások lefolyását lényegesen befolyásoló hatása mögött elsősorban a mer-tirozin kináz gén fokozottabb kifejeződése és funkciója áll.
- A dexametazon a monocita eredetű dendritikus sejtek differenciálódása során is fokozza az apoptótikus neutrofil granulociták felvételét. A fentiekben leírt TLDA, illetve blokkoló antitestek valamint kiegészítő állatkísérletek segítségével megállapítottuk, hogy a dexametazon hatásért dendritikus sejtekben egyrészt a mer-tirozin kináz, másrészt az adenozin 3 receptor fokozott kifejeződése a felelős. Ugyanakkor azt is megfigyeltük, hogy az apoptotikus neutrofil granulociták felvétele szteroiddal kezelt dendritikus sejtekben gyulladásos citokin választ vált ki; ez a megfigyelésünk a szteroid terápia következményeinek átértékeléséhez is vezethet
- Kimutattuk, hogy a dexametazon jelentősen csökkenti a makrofágok felszíni szialiláltságát. Ez a változás elsősorban az annexin II és egy MHC II fehérjét érinti és fontos szerepet játszik a makrofágok fagocitózis kapacitásának növekedésében, mely elősegíti az apoptotikus sejtek eliminálását.

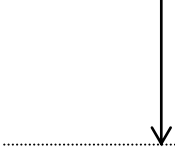
Közlemények:

1. Majai G, Gogolák P, Ambrus C, Vereb G, Hodrea J, Fésüs L, Rajnavölgyi E: PPAR{gamma} modulated inflammatory response of human dendritic cell subsets to engulfed apoptotic neutrophils. JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY 88: pp. 981-991. (2010) IF: 4.626
2. Hodrea J, Majai G, Doró Z, Zahuczky G, Pap A, Rajnavölgyi E, Fésüs L: The glucocorticoid dexamethasone programs human dendritic cells for enhanced phagocytosis of apoptotic neutrophils and inflammatory response. JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY 91: pp. 127-136 (2012) IF: 4.626
3. Zahuczky G, Kristóf E, Majai G, Fésüs L: Differentiation and glucocorticoid regulated apopto-phagocytic gene expression patterns in human macrophages. Role of Mertk in enhanced phagocytosis. PLOS ONE 6(6): e21349 (2011) IF: 4.411
4. Petrovski G, Gizem A, Majai Gy, Hodrea J, Benkő Sz, Mádi A, Fésüs L:Phagocytosis of cells dying through autophagy induces inflammasome activation IL-1beta release in human macrophages. AUTOPHAGY 7: pp. 1-10. (2011) IF: 6.643
5. Fésüs L, Demény MÁ, Petrovski G: Autophagy shapes inflammation. ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING 14:pp. 2233-2243 (2011) IF: 8.209
6. Mádi A, Majai G, Koy C, Vámosi G, Szántó A, Glocker MO, Fésüs L:Altered sialylation on the cell-surface proteins of dexamethasone-treated human macrophages contributes to augmented uptake of apoptotic neutrophils. IMMUNOLOGY LETTERS 135: pp. 88-95 (2011) IF: 2.511
7. Sárvári A, Vereb Z, Fésüs L, Balajthy Z: Atypical antipsychotics can induce expression of pro-inflammatory genes, especially during long-term treatment, in human adipocytes in vitro. J Psychopharmacology, submitted
8. Doan M, Sárvári A, Balajthy Z, Bacsó Zs, Fésüs L: Characterization of adipocyte differentiation and cell death by laser scannning microscopy. manuscript in preparation

2 cm

2 cm

2 cm



Budget: 6.000.000 - HUF

POSSIBLE ROLE OF CELL DEATH AND INFLAMMATORY REACTIONS IN PEADIPOCYTE DIFFERENTIATION AND OBESITY

Zoltán Balajthy[1], Anitta Sárvári[1], Goran Petrovski[1], Judit Hodrea[1], Gyöngyike Majai[2], Éva Rajnavölgyi[3], Endre Kristóf[1], Gábor Zahuczky[4], András Mádi[4], Minh Doan[5], Zsolt Bacsó[5], László Fésüs[1]

[1]Department of Biochemistry and Molecular Biology, [2]Department of Clinical Immunology, [3]Department of Immunology, [4]Apoptosis and Genomics Research Group of the Hungarian Academy of Sciences, [5]Department of Cell Biology, University of Debrecen

During the last few years it has become obvious that obesity is associated with various degrees of inflammatory processes in the adipose tissues which contribute to the development of diabetes, metabolic syndrome and reduced life expectancy of obese individuals. We have based our research project on the following observations and working hypothesis: in obesity cases with a high body mass index (BMI) chronic inflammation is maintained by a high frequency of adipocyte cell death. This process leads to macrophage activation and reduced phagocytosis of dead cells, which in turn results in secondary adipocyte necrosis and enhanced inflammatory response. We have studied adipocyte cell death via apoptosis or necrosis , the molecular mechanisms of the phagocytosis of dead cells and their properties triggering and regulating inflammation. We have explored signaling pathways of cell death and phagocytosis which could be targeted in the obesity to inhibit the concomitant effects of the inflammatory processes and prevent or diminish the consequences of this severe chronic condition.

Our most important results and conclusions are the followings:

- We have developed a new method using laser scanning microscopy to study directly and continuously the differentiation to adipocytes of a human pre-adipocyte cell line and mesenchymal stem cells isolated from white adipose tissue. with the help of this technique we can directly observe cell death by apoptosis or necrosis occurring with increasing frequency spontaneously during differentiation of adipocytes and following their induction with various treatments (TNFα, hypoxia, UV) and the phagocytosis of the dying these cells. The results obtained by microscopy could be confirmed by FACS analysis providing a solid basis for our investigations.
- The dying adipocytes induce production of pro-inflammatory cytokines in macrophages and unlike the apoptosis of other types of cells the spontaneously dying adipocytes can not inhibit cytokine production provoked by other pro-inflammatory stimuli, such as LPS.
- When macrophages engulf apoptotic cells dying through autophagy an inflammatory response is developed. The signaling mechanism leading to this unusual response does not go through cell surface receptors but the consequence of inflammasome activation in the cytosol with a consequent activation of caspase-1, then cleavage and secretion of IL-1β. This may have significance in the adipose tissue, where autophagy also occurs in the dying cells, and in tumor growth where autophagic death may initiate inflammatory reactions even after chemotherapeutic treatment which in turn rather promote and does not decrease proliferation of malignant cells.
- We have shown that in case of monocyte-derived dendritic cells i) the CD1a- subtypes can take up more spontaneously dying human neutrophils than the CD1a+ subpopulation , ii) the dendritic cell specific lectin DC-SIGN also participate in binding and phagocytosis of apoptotic neutrophils iii) the engulfment of allogenic apoptotic cells leads to the activation of dendritic cells and secretion of pro-inflammatory cytokines from them in correlation with the engulfed dying, iv) activation of the PPARγ receptor, which plays a critical role in the differentiation of white adipose tissue, with synthetic ligands facilitate formation CD1a- dendritic cells and increases the phagocytosis of apoptotic cells while inhibits polarization of T lymphocytes toward an inflammatory response.

- The monocytes acquire their potential to take up and eliminate dying cells during their differentiation to macrophages. Macrophages differentiating in the presence of steroids, such as dexamethasone, have an even higher capacity to eliminate which contributes significantly to the well-known anti-inflammatory effect of steroids. With the help of a newly developed „Tachman Low Density array (TLDA)" specific for the apoptotic-phagocytic genes we could clarify which genes are up-regulated by steroids during differentiation and with the help of gene silencing techniques and blocking antibodies against these genes and gene products we could inhibit the increased phagocytosis. It could be concluded that the increased expression and function of the mer-tyrosine kinase gene was responsible for the phagocytosis promoting effect of steroids.
- Dexamethasone, when it is present during differentiation, can also increase the phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte derived dendritic cells. Based on results obtained by TLDA, blocking antibodies and experiments with knock-out mice we could clarify that the dexamethasone effect in dendritic cell can be explained by the increased expression of the mer-tyrosine kinase and the adenosine 3 receptor. It has been also observed and reported that engulfment of apoptotic neutrophils by steroid treated dendritic cells leads to the production of pro-inflammatory cytokines; this finding may lead to the re-consideration of some aspects of steroid therapies
- We could demonstrate that dexamethasone treatment decreases the syaliation of macrophage cell surface proteins, particularly of annexin II és one MHC II protein, which may have an important role in the potentiation of phagocytic capacity of macrophages and thereby the elimination of apoptotic cells.

Publications:

1. Majai G, Gogolák P, Ambrus C, Vereb G, Hodrea J, Fésüs L, Rajnavölgyi E: PPAR{gamma} modulated inflammatory response of human dendritic cell subsets to engulfed apoptotic neutrophils. JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY 88: pp. 981-991. (2010) IF: 4.626
2. Hodrea J, Majai G, Doró Z, Zahuczky G, Pap A, Rajnavölgyi E, Fésüs L: The glucocorticoid dexamethasone programs human dendritic cells for enhanced phagocytosis of apoptotic neutrophils and inflammatory response. JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY 91: pp. 127-136 (2012) IF: 4.626
3. Zahuczky G, Kristóf E, Majai G, Fésüs L: Differentiation and glucocorticoid regulated apopto-phagocytic gene expression patterns in human macrophages. Role of Mertk in enhanced phagocytosis. PLOS ONE 6(6): e21349 (2011) IF: 4.411
4. Petrovski G, Gizem A, Majai Gy, Hodrea J, Benkő Sz, Mádi A, Fésüs L:Phagocytosis of cells dying through autophagy induces inflammasome activation IL-1beta release in human macrophages. AUTOPHAGY 7: pp. 1-10. (2011) IF: 6.643
5. Fésüs L, Demény MÁ, Petrovski G: Autophagy shapes inflammation. ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING 14:pp. 2233-2243 (2011) IF: 8.209
6. Mádi A, Majai G, Koy C, Vámosi G, Szántó A, Glocker MO, Fésüs L:Altered sialylation on the cell-surface proteins of dexamethasone-treated human macrophages contributes to augmented uptake of apoptotic neutrophils. IMMUNOLOGY LETTERS 135: pp. 88-95 (2011) IF: 2.511
7. Sárvári A, Vereb Z, Fésüs L, Balajthy Z: Atypical antipsychotics can induce expression of pro-inflammatory genes, especially during long-term treatment, in human adipocyts in vitro. J Psychopharmacology, submitted
8. Doan M, Sárvári A, Balajthy Z, Bacsó Zs, Fésüs L: Characterization of adipocyte differentiation and cell death by laser scannning microscopy. manuscript in preparation

2 cm

2 cm

Teljes támogatás: 3.900.000,- Ft

KORSZERŰ MÓDSZEREK A VASCULARIS ELASZTICITÁS NON-INVAZÍV VIZSGÁLATÁRA

Forster Tamás[1], Nemes Attila[1]
[1]SZTE, II. Belgyógyászati Klinika és Kardiológiai Központ

Az artériás rendszer tágulékonyságának vizsgálata igen fontos jelentőséggel bír a korszerű kardiológiai diagnosztikában. Mint ismeretes, a verőerek funkcionalitásának eltérései gyakran megelőzik a morfológiai eltéréseket, így az olyan korszerű diagnosztikus eljárások, melyekkel ezek az eltérések mérhetők, theoretikusan elősegíthetik a korai diagnózis felállítását. Intézetünkben számos korszerű eljárás érhető el az arteriák funkcionalitásának vizsgálatára. Ilyen pl. az artériás merevség (stiffness) mérésére szolgáló echocardiographiás és pulzushullám analízisen alapuló Arteriographiás vizsgáló eljárások. Az aktuális vérnyomásértékek és az echocardiographia során mért aorta átmérő adatok birtokában az aorta tágulékonysága jellemezhető számos számított modulus (Peterson és Young-féle elasztikus modulus, aortic strain, distensibility és stiffness index) segítségével. Számos tanulmány igazolta azt is, hogy az arteriás pulzushullám analízis (pl. Arteriograph) segítségével az aorta merevsége másképpen is jellemezhető. Szintén echocardiographia során mérhető a koszorúerek funkcionalitását jellemző coronaria áramlási rezerv (CFR) érték. Számítása értágító (vazodilatátor dipyridamol) hatására létrejövő, a maximális értáguláskor (hyperaemiás) és a nyugalmi coronaria áramlási sebességek arányaként történik. Klinikánkon a fenti módszerekkel évek óta foglalkozunk és széleskörű tapasztalatokat szereztünk.

Jelen kutatásaink során összefüggést találtunk az echocardiographia során mért aorta elaszticitási jellemzők és az Arteriograph-fal mért pulzushullám terjedési sebesség (PWV) között egészségesekben. Ezzel a tanulmánnyal igazoltuk, hogy az aorta tágulékonyságának különböző módon mért jellemzői között szoros összefüggés van. Igazoltuk továbbá, hogy a két módszerrel mért számos, az aorta elaszticitását jellemző paraméter összefüggést mutat a paraszimpatikus idegrendszeri funkcióval. Ezzel a tanulmánnyal rávilágítottunk arra, milyen összefüggések állhatnak fenn a vascularis és vegetatív idegrendszeri funkció között egészségesekben. Igazoltuk az aorta tágulékonyságának és az inzulin szenzitivitásának összefüggéseit egészségesekben. Igazoltuk továbbá, hogy öröklött génhibáknak köszönhetően kialakuló, a balkamra falainak aszimmetrikus megvastagodásával együttjáró hypertrophiás cardiomyopathiában az aorta elaszticitásának fenn említett valamennyi jellemzője (echocardiographiás elaszticitás jellemzők és PWV) eltéréseket mutat. Azt is bemutattuk, hogy az aorta merevségének eltérései előrejelezhetik a koszorúerek CFR értékének csökkenését feltételezett koszorúérbetegségben szenvedő egyénekben. A fentieken túl vizsgáltuk az aorta tágulékonyságának eltéréseit acromegaliában is. Ebben az endocrinológiai kórképben, feltételezhetően többek között az emelkedett növekedési hormon szintnek, az aorta elaszticitása csökkent függetlenül attól, hogy milyen módszerrel mértük. Az is igazolást nyert, hogy az echocardiographia segítségével számított aortic stiffness index-nek prediktív értéke van acromegaliában a később kialakuló események előrejelzésében. Igazoltuk továbbá, hogy a bal coronaria leszálló szárának sikeres perkután intervencióját és sztent-beültetését követően a nemcsak a koszorúér funkcionalitását jellemző CFR érték, de az aorta tágulékonysága is megjavul. Magyar nyelvű összefoglaló közleményünkben a jelenleg elérhető irodalmi adatok segítségével bemutattuk, hogy az aorta billentyű szűkületével (stenosis), beleértve a kongenitalis bicuspidalis aorta billentyűt is, számos vaszkuláris eltérés járhat együtt. Bemutattuk azt is, hogy az echocardiographiás coronaria áramlási sebesség mérés segíthet a határérték koszorúérszűkületben szenvedő betegek funkcionális megítélésében.

A fent részletezett eredményeink rávilágíthatnak arra a fontos tényre, hogy sok információ elérhető már különböző kardiális és nem kardiális megbetegedésekkel együttjáró korai vaszkuláris eltérésekről, de sok mindent még nem tudunk. További vizsgálatok szükségesek még ahhoz, hogy ebben a témában tudásunkat tovább mélyíthessük.

Teljes támogatás: 3.900.000,- Ft

A kutatási témához csatlakozó eredeti közlemények jegyzéke:

Nemes A, Ungi I, Csanády M, Forster T: Simultaneous improvement in aortic distensibility and coronary flow velocity reserve after successful coronary interventions. ECHOCARDIOGRAPHY 27: pp. 311-316 (2010) IF: 1,415

Ruzsa Z, Nagy E, Ungi I, Forster T, Pálinkás A, Nemes A: Additional help to diagnose functionally significant left main coronary artery stenosis: doppler echocardiography. HELLENIC JOURNAL OF CARDIOLOGY 51: pp. 540-543 (2010) IF: 1,172

Nemes A, Takács R, Gavallér H, Várkonyi TT, Wittmann T, Forster T, Lengyel C: Correlations between aortic stiffness and parasympathetic autonomic function in healthy volunteers. CANADIAN JOURNAL OF CARDIOLOGY AND PHARMACOLOGY 88: pp. 1166-1171 (2010) IF: 1,849

Nemes A, Takács R, Gavallér H, Várkonyi TT, Wittmann T, Forster T, Lengyel C: Correlations between Arteriograph-derived pulse wave velocity and aortic elastic properties by echocardiography. CLINICAL PHYSIOLOGY AND FUNCTIONAL IMAGING 31: pp. 61-65 (2011) IF: 1,302

Gavallér H, Sepp R, Csanády M, Forster T, Nemes A: Az aorta tágulékonyságának vizsgálata echokardiográfiával hipertrófiás cardiomyopathiás betegekben. CARDIOLOGIA HUNGARICA 41: pp. 8-12 (2011)

Nemes A, Forster T: Az aortabillentyű szűkületével járó funkcionális vascularis eltérések. ORVOSI HETILAP 152: pp. 993-999 (2011)

Gavallér H, Sepp R, Csanády M, Forster T, Nemes A. Hypertrophic cardiomyopathy is associated with abnormal echocardiographic aortic elastic properties and arteriograph-derived pulse-wave velocity. ECHOCARDIOGRAPHY 28: pp. 848-852 (2011) IF: 1,415

Budget: 3,900,000.- HUF

MODERN METHODS FOR NON-INVASIVE EVALUATION OF VASCULAR ELASTICITY

Tamás Forster[1], Attila Nemes[1]
[1] 2nd Department of Medicine and Cardiology Center, University of Szeged

Evaluation of the arterial distensibility has an essential importance in modern cardiology. It is known that alterations in arterial functionality come before morfological ones. Therefore modern diagnostic tools which quantificate these alterations could help early diagnosis. Several modern methods evaluating arterial functionality are available in our institute including measurement of arterial stiffness by echocardiography and Arteriography-derived pulse-wave analysis. Owning actual blood pressure and echocardiography-based aortic diameter data aortic distensibility could be characterized by several calculated modulus (Peterson and Young's moduli, aortic strain, distensibility and stiffness index). Over this echocardiographic method, aortic stiffness could be measured by pulse-wave analysis, as well (Arteriograph). Coronary flow reserve (CFR), as a characteristic of the functionality of coronary arteries could also be evaluated by echocardiography. Calculation of CFR is based on the ratio of posthyperaemic (vasodilator dipyridamol) and resting coronary flow velocities. We use all these methods for years in our department and own wide experiences.

In our recent study, a close correlation was found between echocardiography-derived aortic elasticity and pulse-wave velocity (PWV) measured by Arteriograph in healthy subjects. It has been demonstrated with this study that there is a close relationship between characteristics of aortic distensibility evaluated by different methods. It has also confirmed that aortic elastic properties measured by both methods are showing correlations with parasympathetic autonomic function. This study could highlight our attention on the fact that relationship exists between vascular function and vegetative autonomic function in healthy subjects. Relationship between aortic distensibility and insulin sensitivity has also been demonstrated in healthy volunteers. Hypertrophic cardiomypathy (HCM) is an inherited cardiac disease which is associated with thickened asymmetric left ventricular walls. In HCM, all the above mentioned aortic elasticity parameters were found to be altered (echocardiographic aortic elastic properties and PWV). It has also been demonstrated, that alterations in aortic stiffness could predict reduction in CFR in patients with suspected coronary artery disease. Over these studies, aortic distensibility alterations have even been found in acromegaly. In this endocrinological disease, probably due to elevated growth hormone level, aortic elasticity is decreased regardless the method of assessment. It has been demonstrated that aortic stiffness index has a predictive value for future events in acromegaly. It was found that after successful percutan intervention and stent-implantation of left anterior descending coronary artery stenosis, not only CFR characterizing coronary functionality but aortic distensibility improves, as well. In a hungarian review paper based on literature we tried to summarize, that aortic valve stenosis including bicuspid aortic valve could be associated with vascular alterations. It has also been demonstrated that echocardiography-derived coronary flow velocities could help functional evaluation of patients with borderline coronary artery stenosis.

All the above detailed results could highlight on the important facts, that a lot of information available on different cardiac and non-cardiac disease-associated early vascular alterations, but a lot of things are not known. Further studies are warranted to deep our knowledge in these topics.

Budget: 3,900,000.- HUF

List of original papers related to research topic:

Nemes A, Ungi I, Csanády M, Forster T: Simultaneous improvement in aortic distensibility and coronary flow velocity reserve after successful coronary interventions. ECHOCARDIOGRAPHY 27: pp. 311-316 (2010) IF: 1,415

Ruzsa Z, Nagy E, Ungi I, Forster T, Pálinkás A, Nemes A: Additional help to diagnose functionally significant left main coronary artery stenosis: doppler echocardiography. HELLENIC JOURNAL OF CARDIOLOGY 51: pp. 540-543 (2010) IF: 1,172

Nemes A, Takács R, Gavallér H, Várkonyi TT, Wittmann T, Forster T, Lengyel C: Correlations between aortic stiffness and parasympathetic autonomic function in healthy volunteers. CANADIAN JOURNAL OF CARDIOLOGY AND PHARMACOLOGY 88: pp. 1166-1171 (2010) IF: 1,849

Nemes A, Takács R, Gavallér H, Várkonyi TT, Wittmann T, Forster T, Lengyel C: Correlations between Arteriograph-derived pulse wave velocity and aortic elastic properties by echocardiography. CLINICAL PHYSIOLOGY AND FUNCTIONAL IMAGING 31: pp. 61-65 (2011) IF: 1,302

Gavallér H, Sepp R, Csanády M, Forster T, Nemes A: Az aorta tágulékonyságának vizsgálata echokardiográfiával hipertrófiás cardiomyopathiás betegekben. CARDIOLOGIA HUNGARICA 41: pp. 8-12 (2011)

Nemes A, Forster T: Az aortabillentyű szűkületével járó funkcionális vascularis eltérések. ORVOSI HETILAP 152: pp. 993-999 (2011)

Gavallér H, Sepp R, Csanády M, Forster T, Nemes A. Hypertrophic cardiomyopathy is associated with abnormal echocardiographic aortic elastic properties and arteriograph-derived pulse-wave velocity. ECHOCARDIOGRAPHY 28: pp. 848-852 (2011) IF: 1,415

Budget: 3,900,000.- HUF

Budget: 3.000,000.- HUF

AZ ISCHEMIÁS STROKE PATHOGENEZISÉBEN ÉS AZ INFEKCIÓS SZÖVŐDMÉNYEIBEN SZEREPET JÁTSZÓ KOMPLEMENTTŐL-FÜGGŐ ÉS EGYÉB GYULLADÁSOS FOLYAMATOK GENETIKAI SZABÁLYOZÁSA. ÚJ TERÁPIÁS ELJÁRÁSOKAT ELŐKÉSZÍTŐ VIZSGÁLATOK.

Füst György[1], Szilágyi Ágnes[1], Varga Lilian[1], Széplaki Z[2], Bereczki D[3], Illés Zs[4], Folyovich András[5], Kéki Sándor[6]
[1]Semmelweis Egyetem, III. Sz Belgyógyászati Klinika, [2]Semmelweis Egyetem Neurológiai Csoport, [3]Semmelweis Egyetem, Neurológiai Klinika, [4]Pécsi Egyetem, Neurológiai Klinika, [5]Szt. János Kórház, Neurológiai Osztály, [6]Debreceni Egyetem, Alkalmazott Kémiai Tanszék

Korábbi vizsgálataink (*Széplaki et al, Atherosclerosis, 2009*) és egyéb újonnan megjelent irodalmi adatok szerint a komplement rendszer aktivációja a lektin-reakcióúton át közreműködik az ischemiás stroke pathomechanizmusában. Ezt a reakcióutat a mannose binding lectin (MBL) valamint a ficolin-2 és a ficolin-3 különböző ligandokhoz való kötődése indíthatja meg. A ficolinok szerepét az ischemiás stroke-ban még senki sem vizsgálta. A projekt keretében végzett vizsgálat első részének keretében 65 ischemiás stroke-os beteg a kórházba kerülésük után azonnal levett (felvételi minta) és 3-4 nappal később nyert (utánvizsgálati minta) szérumában mértük meg ELISA módszerrel a ficolin-2 és a ficolin-3 koncentrációját. Kontrollként 100 egészséges egyén és 135 szignifikáns carotis artéria stenosisban szenvedő beteg szérummintáját vizsgáltuk. Ugyanazokban a mintákban megmértük a C-reaktív protein (CRP) szintjét is a particle-enhanced immunturbidimetriás eljárás segítségével. . Mindkét fajta ficolin szintje szignifikánsan ($p<0.001$) alacsonyabb volt mind a felvételi mind az utánvizsgálati mintákban mindkét kontrollcsoporthoz viszonyítva. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a stroke acut fázisában mért alacsony ficolin szintek a stroke-ban lezajló ischemia-reperfúzió következtében alakulnak ki. Az utánvizsgálati mintákban mért ficolin-3 szintek negatívan korreláltak a stroke-nak az NIH skálán mért súlyosságával és az S100β szinttel, amely az agyi infarctus méretének indikátora. Azoknak a betegeknek, akiknek alacsony volt a ficolin-3 szérumszintje és magas volt a CRP szintje szignifikánsan magasabb volt a kockázata arra, hogy a stroke - módosított Rankin skálán mért - kimenetele kedvezőtlen legyen (adjusztált OR 5.6 ill. 3.9) a magas ficolin-3 szintű, ill. alacsony CRP szintű betegekhez hasonlítva. A ficolin-3 és a CRP hatása egymástól függetlennek mutatkozott. Megfigyeléseink arra mutatnak, hogy ficolin-3-tól függő lectin komplement reakcióút- aktiválódás jelentős mértékben közreműködik az ischemiás stroke pathomechanizmusában, és ez a hatás hozzáadódhat az egyéb (pl. CRP-mediált) gyulladásos folyamatok hatásához. - A project keretében végzett vizsgálatok második részében az l-arginine, ADMA (asymetric dymathylarginine) and SDMA (symetric dimethylarginine) szintjét határoztuk meg 56 stroke-os beteg felvételi és utánvizsgálati szérumában és 54 szignifikáns carotis stenosisos beteg szérummintájában. Mind az ADMA, mind az SDMA koncentrációk szignifikánsan ($p<0.0001$) magasabbak voltak a stroke-os mint a carotis stenosisos betegkben, míg az l-arginin szintekben különbség nem volt kimutatható . Másrészt, az l-arginin szintek szignifikáns pozitív korrelációt ($R=0.33$, $p=0.0176$) mutattak az azonos mintákban mért ficolin-3 szintekkel. Ez arra mutat, hogy az l-arginin szintek befolyásolhatják a ficolin-mediált komplement aktiváció mértékét.

Fust G, Munthe-Fog L, Illes Z, Szeplaki G, Molnar T, Pusch G, Hirschberg K, Szegedi R, Szeplaki Z, Prohaszka Z, Skjoedt MO, Garred P: Low ficolin-3 levels in early follow-up serum samples are associated with the severity and unfavorable outcome of acute ischemic stroke. J NEUROINFLAMMATION. 29: pp 185-193 (2011), IF: 5,79

2 cm

2 cm

Budget: 3.000,000.- HUF

GENETIC REGULATION OF THE COMPLEMENT-DEPENDENT AND – INDEPENDENT INFLAMMATORY PROCESSES WHICH CONTRIBUTE TO THE PATHOGENESIS AND INFECTIOUS COMPLICATIONS OF ISCHEMIC STROKE. STUDIES TO ALLOW INTRODUCTION OF NEW THERAPEUTIC MODALITIES.

Füst György[1], Szilágyi Ágnes[1], Varga Lilian[1], Széplaki Z[2], Bereczki D[3], Illés Zs[4], Folyovich András[5], Kéki Sándor[6]

[1]Semmelweis University, 3rd Department of Internal Medicine, [2]Semmelweis University Neurological Research Group, [3]Semmelweis University, Department of Neurology, [4]University of Pécs, Department of Neurology [5]St János Hospital, Department of Neurology, [6]University of Debrecen, Department of Applied Chemistry

Our previous findings (*Széplaki et al, Atherosclerosis, 2009*) and other more recent literature data indicate that the lectin pathway of complement activation contributes to the pathomechanism of ischemic stroke. The lectin pathway may be triggered by the binding of mannose-binding lectin (MBL), ficolin-2 or ficolin-3 to different ligands. The role of ficolins in the ischemic stroke has not been examined. Sera for the first part of our present study were obtained within 12 hours after the onset of ischemic stroke (admission samples) and 3-4 days later (follow-up samples) from 65 patients with ischemic stroke . The control group comprised 100 healthy individuals and 135 patients with significant carotid stenosis (patient controls). The concentrations of ficolin-2 and ficolin-3, initiator molecules of the lectin complement pathway, were measured by ELISA methods. Concentration of C-reactive protein (CRP) was also determined by a particle-enhanced immunturbidimetric assay. Concentrations of both ficolin-2 and ficolin-3 were significantly ($p<0.001$) decreased in both the admission and in the follow-up samples of patients with definite ischemic stroke as compared to healthy subjects. Concentrations of ficolin-2 and ficolin-3 were even higher in patient controls than in healthy subjects, indicating that the decreased levels in sera during the acute phase of stroke are related to the acute ischemic event. Ficolin-3 levels in the follow-up samples inversely correlated with the severity of stroke indicated by NIH scale on admission. In follow-up samples an inverse correlation was observed between ficolin-3 levels and concentration of S100β, an indicator of the size of cerebral infarct. Patients with low ficolin-3 levels and high CRP levels in the follow up samples had a significantly worse outcome (adjusted ORs 5.6 and 3.9, respectively) as measured by the modified Rankin scale compared to patients with higher ficolin-3 and lower CRP concentrations. High CRP concentrations were similarly predictive for worse outcome, and the effects of low ficolin-3 and high CRP were independent. Our findings indicate that ficolin-mediated lectin pathways of complement activation contribute to the pathogenesis of ischemic stroke and may be additive to complement-independent inflammatory processes. – In the second part of the study concentrations of l-arginine. ADMA (asymetric dymathylarginine) and SDMA (symetric dimethylarginine) were determined in the admission sera of 56 patients with ischemic stroke and 54 patients with sygnificant carotid artery stenosis. Both ADMA and SDMA concentration were found to be significantly ($p<0.0001$) higher in the sera of the stroke than carotid stenosis patients while no difference in the l-arginine levels were found. On the other hand, l-arginine levels positively ($R=0.33$, $p=0.0176$) correlated to the ficolin-3 levels indicating that the concentration of l-arginine affect complement activation.

Fust G, Munthe-Fog L, Illes Z, Szeplaki G, Molnar T, Pusch G, Hirschberg K, Szegedi R, Szeplaki Z, Prohaszka Z, Skjoedt MO, Garred P: Low ficolin-3 levels in early follow-up serum samples are associated with the severity and unfavorable outcome of acute ischemic stroke. J NEUROINFLAMMATION. 29: pp 185-193 (2011), IF: 5,79

2 cm

2 cm

Teljes támogatás: 4.200.000,- Ft

A SZEKRETORIKUS LIPÁZ GÉNCSALÁD LIP5 TAGJÁNAK SZEREPE A HUMÁN PATOGÉN CANDIDA ALBICANS PATOGENEZISÉBEN.

Gácser Attila
Szegedi Tudományegyetem, Mikrobiológiai Tanszék

Az invazív candidémiák általános egészségügyi problémát jelentenenek világszerte, az opportunista patogén *Candida albicans* (*Ca*) jelenleg egyértelműen a leggyakrabban izolált faj a *Candida* nemzettségen belül. A *Ca* elsősorban az intenzív osztályok nozokómiális fertőzéseiért, illetve immunológiailag károsodott páciensek és újszülött csecsemők gombás megbetegedéseiért felelős. Annak ellenére, hogy az évek során fokozatosan emelkedik a *Candida* fertőzések esetszáma, és ennek következtében az egészségügyi ellátás anyagi kiadásai is egyre nőnek, meglehetősen keveset tudunk a gomba virulenica faktorairól, a betegség lefolyásáról, illetve a gazda esetleges *Ca* specifikus válaszáról. Intenzíven kutatott patogenitási tényezők a gomba által szekretált hidrolitikus enzimek, amelyek részt vesznek a fehérjék, foszfolipidek és a lipidek lebontásában. A proteázok és a foszfolipázok aktívan kutatott területek, genetikai hátterük és szerkezetük nagymértékben ismert, míg a lipázok eddig kevesebb figyelmet kaptak. A *Ca* szekretált lipázait egy legalább 10 tagból álló géncsalád kódolja (LIP1-10). A lipáz gének nagy száma szerepet játszhat abban, hogy a patogén képes kibocsátani egy specifikus enzimatikus választ a fertőzések különböző fázisaiban. Korábbi munkánk alapján fertőzéses kísérletekkel igazoltuk, hogy az egyes lipáz gének különbözőképpen szabályozódnak: egyes tagokra hosszan tartó expresszió jellemző, mások átmeneti expressziót mutatnak, vagy csendesek. A vizsgálatok kimutatták, hogy a 7. kromoszómán található, egymással magas homológiát mutató *LIP5* és *LIP8* folyamatosan expresszálódik a fertőzés során. Korábban bizonyítottuk, hogy a Lip8 fehérje fontos virulencia faktor *Ca* esetében. Így jelen kutatási programon belül kísérleteink a *Ca LIP5* gén által kódolt fehérje vizsgálatára irányultak. Munkánk során létrehoztuk a *Ca* szekretált lipázt termelő *LIP5* gén deléciós vektorát. A génkiütés módszerének a kutatási tervben bemutatott flipáz redszert választottuk. A *caSAT1* nourseothricin (NAT) rezisztenciát kódoló szelekciós markert, illetve a *caFLP Candida* kodonhasználatra optimalizált helyspecifikus rekombinázt hordozó pSFS2 vektor felhasználásával *LIP5* specifikus transzformációs vektorokat hoztunk létre. A korábban kidolgozott *Candida albicans*-ra optimalizált transzformációs körülmények alkalmazásával NAT rezisztens mutáns törzseket szelektáltunk. A mutánsok Southern blott elemzése során allelikus heterogenitást detektáltunk, amely az adatbankban (candidagenome.org) elérhető szekvenciák alapján nem volt előrejelezhető. A különböző heterozigóta háttereken homozigóta mutánsokat állítottunk elő, majd az eredeti genomi lókuszban rekonstruáltuk a vad típusú alléleket. Így létrehoztuk a teljes mutáns repertoárt. A fenotípusos elemzések során különböző stresszorok (hő, pH, oxidatív stressz) alkalmazásával összehasonlítottuk a mutánsok fiziológiai jellemzőit. Patogenitási vizsgálatokat végztünk egér

makrofág szerű sejtvonalakon (J774.2). Eredményeink szerint a *LIP5* homozigóta és heterozigóta deléciós mutáns törzsek növekedése különböző összetételű és kémhatású táptalajokon és különböző hőmérsékleten nem mutat eltérést. Nem találtunk változást a különböző indukciós környezetekben nevelt törzsek pszeudohifa/hifa képző képességében sem. A fertőzési kísérletek során nem tapasztaltunk jelentős eltérést a vad típusú és a deléciós törzsek között a J774 egér makrofág-szerű sejtekkel szemebeni virulenciában. Kísérleteink eredményei arra utalnak, hogy a Ca LIP5 fehérje az általunk használt kísérleti rendszerben vagy nem játszik szerepet a növekedésben és a gomba virulenciájában, vagy pedig a vele nagy homológiát mutató és azonos mintázatban expresszálódó LIP8 fehérje a LIP5 hiányában kompenzáló hatással bír. Ennek igazolására további kísérleteket tervezünk, így további célkitűzéseink a következőek:

A *LIP5* deléciós mutáns törzsek virulenciájának vizsgálata humán perifériás mononukleáris sejtekből differenciáltatott makrofágokkal szemben, ugyanis ezen immunsejtek használata jobban szimulálja az emberi szervezetben lezajló fertőzést.
Vizsgálni tervezzük a *LIP8* gén expresszióját a *LIP5* mutánsokban. Illetve, fontosnak tartjuk olyan deléciós mutáns törzsek létrehozását, amelyekben deletáljuk mind a *LIP5*, mind a *LIP8* gént.

Budget: 4.200.000.- HUF

THE ROLE OF *LIP5* – THE MEMBER OF THE SECRETED LIPASE GENE FAMILY – IN THE PATHOGENESIS OF *CANDIDA ALBICANS*

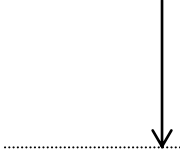
Attila Gácser
Department of Microbiology, University of Szeged

Invasive candidiasis is a major global health problem and *Candida albicans* (*Ca*) is the most common cause of invasive candidiasis worldwide. This fungus is a leading cause of fungal infection in hospitalized and immunocompromised hosts where endogenous dissemination takes place. Although, relevant virulence factors during *Ca* infection such as aspartic proteinases and phospholipase B are well characterized, other hydrolytic enzymes like lipases have been widely neglected. Secreted lipases of *Ca* are encoded by a gene family with at least 10 members (LIP1-LIP10). Our previous finding illustrated that individual lipase genes are differentially regulated in a mouse model of systemic candidiasis as well as in an experimental model of oral infection or in human specimens. The lipase encoding genes *LIP1-10* have been expressed in *Saccharomyces cerevisiae* and lipolytic activities were detected only when *LIP4*, *LIP6*, *LIP8* or *LIP10* were expressed. The *LIP4* gene, belonging to the second subgroup of lipases, was used for detailed characterization of a recombinant enzyme that behaved as a true lipase displaying activity towards insoluble triglycerides. *LIP5* and *LIP8*, situated on chromosome 7 of *Ca*, are two closely related, highly homologous genes also belonging to the second subgroup of the lipase gene family. Both were found to be expressed with constitutive or predominant transcript levels in *in vivo* experimental systems. *LIP8* was selected for further study, as it has been shown to be the only lipase that is uniformly upregulated 4 hours after infection in a systemic murine infection. We have constructed *LIP8* knockout mutants, reconstituted strains and over-expression mutants to further explore the role of lipases in *Ca* pathogenesis. *LIP8 k*nockout mutants produced more mycelium, particularly at higher temperatures and pH $\geq$ 7, and growth was reduced in lipid media. In contrast to Wt, heterozygous or reconstituted strains, infection with *LIP8* homozygous deletion mutants was non-lethal in a murine intravenous infection model. The results show that lipases are major virulence factors in clinically important *Candida* species and therefore lipases are potential targets for drug development. Thus, we investigated in this ETT supported project, the potential role of *LIP5* in the pathogenesis of *Ca*. We successfully used a transformation system for clinical isolates of *Ca* that achieves targeted gene disruption by sequential use of neurseothricin as a selection marker. For this work, we have constructed a cassette that, in addition to the ca*SAT1* selection marker, contained an inducible *MAL2P-FLP* fusion and is flanked by direct repeats of the minimal FLP recognition site (*FRT*). We successfully designed a knock-out vector to specifically target the *Ca LIP5* gene. To restore the targeted gene's activity, a linear DNA fragment containing the open reading frame of the *LIP5* gene as well as required upstream and downstream sequences were

constructed and was transformed into the knock-out mutants. The generated homozygous mutants and the reconstituted strains were analyzed by Southern blotting and by RT-PCR. Notably, the hybridization results indicated a yet unknown allelic heterozygosity in *LIP5*. The complete mutant collection was analyzed to evaluate the effects of gene deletion on the rate of fungal growth, cell and colony morphology under various growth conditions (different media, pH, temperature) and virulence capacity. The analysis of phenotypic properties showed no significant differences in mutant strains in comparison to that of the wild type. Similarly, the capacity of hyphae/pseudohyphae formation was identical both in the mutants and the wild type strains. The *in vitro* infection studies using murine macrophage like cell line J774.2 revealed no alteration in pathogenesis of the mutant cells. Thus, we concluded that the deletion of the *LIP5*, somewhat surprisingly, in our experimental setting has no effect nor on the physiology or in the virulence of *Ca*. An explanation of this finding can be a potential compensatory effect by the highly homolog *LIP8* gene product that was still present in our system. To further investigate this hypothesis we plan additional experiments:

To investigate the interaction of human PBMC derived macrophages with *LIP5* mutant cells, since this *in vitro* infection system is more appropriate to model the clinical situation.

We plan to investigate the expression pattern of the *LIP8* in the *LIP5* mutants, to examine the potential over-expression as a compensatory mechanism. Furthermore, we will generate double knock outs where both *LIP5* and *LIP8* genes will be deleted and these mutants will be employed for further physiological and virulence studies.



Teljes támogatás: 3.600.000,- Ft

A PAJZSMIRIGYHORMON METABOLIZMUS ELHÍZÁST BEFOLYÁSOLÓ MOLEKULÁRIS SZABÁLYOZÓ MECHANIZMUSAINAK JELLEMZÉSE

Zeöld Anikó, Fekete Csaba, Gereben Balázs

MTA Kísérleti Orvostudományi Intézet, Endokrin Neurobiológiai Osztály

Az elhízás napjaink egyik legsúlyosabb népegészségügyi problémája, ami más súlyos és költséges egészségügyi megbetegedések előfordulásának kockázatát is jelentősen megnöveli. Az elhízás rendkívül súlyos közegészségügyi és gazdasági következményei ellenére a leküzdésére alkalmas megfelelő terápia jelenleg nem áll rendelkezésre. A pajzsmirigyhormonok a test zsírtartalmának fontos szabályozói. A kettes-típusú dejodáz (D2) a pajzsmirigyhormon metabolizmus kulcsenzime, ami a prohormon tiroxint a pajzsmirigyhormon magreceptorhoz kötődni képes aktív formává, T3-á alakítja. Ezáltal a D2 felelős a pajzsmirigyhormon hatás első, kulcsfontosságú lépéséért.

Célunk annak mélyebb megértése volt, hogy milyen molekuláris folyamatok hangolják össze a zsírmetabolizmus és a T3 jelátvitel közti kapcsolatot: vizsgáltuk a D2-t kódoló emberi *dio*2 gén és a zsíranyagcsere szabályozás kulcsfontosságú szereplője, az LXR receptor közötti molekuláris összefüggéseket, továbbá ezek egyes idegrendszeri vonatkozásait.

Megmutattuk, hogy az emberi *dio*2 gén kifejeződése szupresszálható LXR/RXR heterodimerekkel. A jelenség az aktiváló dejodázok tekintetében D2-specifikus, mivel az egyes típusú dejodáz (D1) enzim nem szabályozódik ezen az útvonalon. Promóter vizsgálatokkal az emberi *dio*2 gén koleszterin érzékenységéért felelős régióját a transzkripciós indítóhelyhez viszonyított -901- -584 szakaszban azonosítottuk. Kizártuk, hogy a *dio*2 gén szupressziójáért RXR homodimerek lennének felelősek. Mivel ismert, hogy a T3 csökkenti a májban a koleszterin szintet, az adataink által feltárt mechanizmus egy olyan szabályozási kör létezését valószínűsíti, ami magában foglalja a D2 általi T3 képződés koleszterin és retinsav (az LXR/RXR ligandjai) mediálta csökkentését.

Vizsgáltuk továbbá, hogy ez a mechanizmus működhet-e az idegrendszer fő metabolikus szenzorának szerepét betöltő hipotalamuszban. Mivel ezen az agyterületen a D2 egyrészt tanicitákban, az agy fő T3 generáló központját képező specializált glia sejtekben, másrészt asztrocitákban expresszálódik, ezért *in situ* hibridizációval vizsgáltuk az LXR receptor jelenlétét ezekben a sejtekben. Megállapítottuk, hogy tanictiákban az LXRbéta és a D2 enzim koexpresszálódik, míg hipotalamikus asztrocitákban nem találtunk kimutatható LXRbéta expressziót. Mivel így az LXR alapú D2 szabályozás a hipotalamuszban is működőképes lehet,

olyan mechanizmusokat kívántunk feltárni, amelyek a hipotalamikus T3 szint beállításának hátterében állhatnak. Bizonyítottuk, hogy a gliális D2 által generált T3 közvetlen, parakrin úton képes befolyásolni a neuronális génexpressziót, ami valószínűsíti, hogy az LXR/RXR útvonal által szabályozott gliális T3 termelés közvetlen hatást gyakorolhat metabolikusan fontos idegsejt csoportokra. Kimutattuk továbbá, hogy a hipotalamikus neuroszekretoros idegsejtek axonjai jelentős mértékben expresszálják az MCT8 T3 transzportert, ami a D2 által előállított T3 axonális felvételét tesz lehetővé. Azt találtuk. hogy a T3 szint további szabályozása valósulhat meg az axonokban lokalizálódó, T3 bontó hármas típusú dejodáz (D3) enzim segítségével. Ez a mechanizmus a hipotalamikus T3 szabályozás új útját jelenti.

Munkánk olyan új celluláris és molekuláris mechanizmusok felismeréséhez járult hozzá, melyek a pajzsmirigyhormon háztartás és a zsírmetabolizmus közötti funkcionális kapcsolatok szabályozásáért felelősek.

2 cm

2 cm

Christoffolete MA*, Doleschall M*, Egri P, Liposits Zs, Zavacki AM, Bianco AC and Gereben B: Regulation of thyroid hormone activation via the LXR/RXR pathway. J. OF ENDOCRINOLOGY 205(2):179-86 (2010) *megosztott első szerzők IF: 3,099

BCG Freitas*, B Gereben*, M Castillo, I Kalló, A Zeöld, P Egri, Zs Liposits, AM Zavacki, RMB Maciel, S Jo, P Singru, E Sanchez, RM Lechan, AC Bianco: Paracrine signaling by glial cell-derived triiodothyronine activates neuronal gene expression in the rodent brain and human cells. CLIN INVEST 120(6):2206–2217 (2010) *megosztott első szerzők IF: 14,152

Mohácsik P*, Zeöld A*, Bianco AC., Gereben B: Thyroid hormone and the neuroglia: both source and target. JOURNAL OF THYROID RESEARCH, Special issue: thyroid hormones and their receptors: from development to disease (2011) Volume 2011, Article ID 215718, 16 pages doi:10.4061/2011/215718 *megosztott első szerzők

2 cm

2 cm

Budget: 3,600,000.- HUF

CHARACTERIZATION OF OBESITY RELATED MOLECULAR REGULATORY MECHANISMS OF THYROID HORMONE METABOLISM

Anikó Zeöld, Csaba Fekete, Balázs Gereben

Department of Endocrine Neurobiology, Institute of Experimental Medicine, Hungarian Academy of Sciences

Obesity is presently one of the most severe public health problems also accompanied with increased risk for the occurrence of other devastating and costly curable diseases. Despite the high impact of obesity on public health and economy, reasonable medical therapy is currently unavailable. Thyroid hormones are important regulators of body fat content. Type 2 deiodinase enzyme (D2) is the key player of thyroid hormone metabolism, converting the prohormone thyroxine to T3, the active form that is able to bind the thyroid hormone receptor. D2 is therefore responsible for the first critical step of thyroid hormone action.

We aimed to deeper understand molecular mechanisms linking fat metabolism to thyroid hormone signaling: we studied the molecular link between the D2 encoding *dio*2 gene and LXR receptor, the master regulator of fat metabolism, and specific brain related aspects of this mechanism.
We have shown that transcription of the human *dio*2 gene is repressed by LXR/RXR heterodimers. This is D2-specific among activating deiodinases, since type 1 deiodinase (D1) is not regulated by this mechanism. Our promoter studies mapped the cholesterol responsive region of the human *dio*2 gene to the -901- -584 regions related to the transcriptional start site. We could exclude the role of RXR homodimers in this process. Since T3 decreases liver cholesterol the revealed mechanism could represent a regulatory machinery involving cholesterol/retinoic acid (ligands for LXR/RXR) mediated decrease of D2 generated T3 production.

We also investigated whether this mechanism could be functional in the hypothalamus serving as the main metabolic sensor of the brain. In this brain region D2 is expressed both in tanycytes, the specialized glial cells forming the most important T3 generating center of the brain, and astrocytes. Therefore we used *in situ* hybridization to study whether the LXR receptor is expressed in these cells. We found that LXRbeta and the D2 enzyme are coexpressed in tanycytes but we could not detect LXRbeta in hypothalamic astrocytes. Since these data suggested that LXR-mediated D2 regulation could work in the hypothalamus, we aimed to reveal mechanisms underlying the regulation of hypothalamic T3 levels. We could demonstrate that glial D2 generated T3 exerts a direct and paracrine effect on neuronal gene expression. This suggests that LXR/RXR mediated T3 generation could affect metabolically relevant neuronal groups. We also revealed that the T3

transporter MCT8 is abundantly present in hypothalamic axons that allows axonal uptake of D2 generated T3 into neurosecretory neurons. We found that the axonal T3 content is subjected to local regulation via type 3 deiodinase (D3). This represents a novel pathway for hypothalamic T3 regulation.

Our studies reveled novel cellular and molecular mechanism responsible to link thyroid hormone economy and fat metabolism.

Christoffolete MA*, Doleschall M*, Egri P, Liposits Zs, Zavacki AM, Bianco AC and Gereben B: Regulation of thyroid hormone activation via the LXR/RXR pathway. J. OF ENDOCRINOLOGY 205(2):179-86 (2010) *equally contributed IF: 3.099

BCG Freitas*, B Gereben*, M Castillo, I Kalló, A Zeöld, P Egri, Zs Liposits, AM Zavacki, RMB Maciel, S Jo, P Singru, E Sanchez, RM Lechan, AC Bianco: Paracrine signaling by glial cell-derived triiodothyronine activates neuronal gene expression in the rodent brain and human cells. J CLIN INVEST 120(6):2206–2217 (2010) *equally contributed IF: 14.152

Mohácsik P*, Zeöld A*, Bianco AC. Gereben B: Thyroid hormone and the neuroglia: both source and target. JOURNAL OF THYROID RESEARCH, SPECIAL ISSUE: THYROID HORMONES AND THEIR RECEPTORS: FROM DEVELOPMENT TO DISEASE (2011) Volume 2011, Article ID 215718, 16 pages doi:10.4061/2011/215718 *equally contributed

2 cm

2 cm

2 cm

Teljes támogatás: 2400000- Ft

HUMÁN HERPESZ-, POLYOMA- ÉS PARVOVÍRUS-FERTŐZÉSEK VIZSGÁLATA VESETRANSZPLANTÁLTAKBAN

Gergely Lajos[1], Csoma Eszter[1], Murvai Melinda[1]
[1]DE OEC OrvosiMikrobiológiai Intézet

A WU és KI polyomavírusokat (WUPyV, KIPyV) PCR módszerrel más kutatók már kimutatták légúti mintákban, vérben, székletben és limfoid szövetekben, ám vizeletben nem. A vírusok gyakrabban fordultak elő immunszuppresszált betegek mintáiban. Vizsgálataink során vesetranszplantált betegek és egészséges kontrollszemélyek légúti mintájából, véréből és vizeletéből nukleinsavat izoláltunk, majd nested PCR-rel vizsgáltuk a WU és KI vírusok prevalenciáját. A PCR termékeket szekvenáltuk, a vírusok mennyiségi meghatározását kvantitatív real-time PCR-rel végeztük. Vesetranszplantált betegek esetében a plazma mintákban (3,6%; 7/195), vizeletben (14%; 7/50) és a légúti mintákban (10%; 9/90) is kimutattuk a WU és KI vírusokat, ám egészséges betegek esetében sem a vérmintákban (0/200),sem a vizeletben (0/36) nem volt jelen egyik vírus sem.
Igazoltuk, hogy mindkét vírus esetében kialakulhat viruria, ezért a vizelet a fertőzés forrása lehet. A vírusok kópiaszáma alacsony volt a pozitív mintákban, és főként a transzplantációt követő rövid időn belül voltak kimutathatóak. A WU vírus gyakoribbnak mutatkozott plazma és vizelet mintákban, míg a KI prevalenciája magasabb volt légúti mintákban. Feltételezhető, hogy a transzplantációval együttjáró immunszuppresszió a WU és KI vírusok reaktivációját okozhatja vagy növelheti a fogékonyságot az ezen vírusokkal történő fertőzésekre.

Csoma E, Mészáros B, Asztalos L, Kónya J, Gergely L: Prevalence of WU and KI Polyomaviruses in Plasma, Urine and Respiratory Samples from Renal Transplant Patients. JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 83(7): pp. 1275-1278 (2011) IF: 2,895

Budget: 2.400 000- HUF

STUDY OF HUMAN HERPES-, POLYOMA- AND PARVOVIRUS INFECTONS IN RENAL TRANSPLANTED PATIENTS

Lajos Gergely[1], Eszter Csoma[1], Melinda Murvai[1]
[1]Department of Medical Microbiology, Medical and Helath Science Centre, University of Debrecen

WU and KI polyomaviruses (WUPyV, KIPyV) have been detected in respiratory, blood, stool, and lymphoid tissue, but not in urine samples. PCR based detection revealed higher frequency in immunocompromised individuals. In our study the prevalence of WUPyV and KIPyV was analyzed in respiratory, urine, and blood samples from renal transplant patients compared with healthy individuals. WUPyV and KIPyV were detected by nested PCR. The PCR products were sequenced and viral DNA loads were determined by quantitative real-time PCR. WUPyV and KIPyV were found in plasma (3.6%; 7/195), urine (14%; 7/50), and respiratory samples (10%; 9/90) of renal transplant patients, but not in plasma (0/200) and urine (0/36) specimens from healthy blood donors. This study revealed that viruria with WUPyV and KIPyV can occur, so urine can also be a source of infection.WUPyV and KIPyV were detected mainly early after renal transplantation and the viral loads were low. A higher prevalence of WUPyV was found in plasma and urine samples, KIPyV was found more frequently in respiratory samples from renal transplant patients. It is hypothesized that immunosuppression due to the transplantation may result in reactivation of these viruses or may establish greater susceptibility to infection with KIPyV and WUPyV.

Csoma E, Mészáros B, Asztalos L, Kónya J, Gergely L: Prevalence of WU and KI Polyomaviruses in Plasma, Urine and Respiratory Samples from Renal Transplant Patients. JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY 83(7): pp. 1275-1278 (2011) IF: 2,895

Budget: 4.500.000.- HUF

A MECHANIKAI INGER HATÁSAINAK ÉS A MECHANOTRANSZDUKCIÓ MÓDJÁNAK VIZSGÁLATA AZ *IN VITRO* PORCKÉPZŐDÉS SORÁN

Gergely Pál[1], Zákány Róza[2], Matta Csaba[2], Juhász Tamás[2]
[1]Orvosi Vegytani Intézet, [2]Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet, ÁOK, Debreceni Egyetem

Az ízületi porcban található porcsejtek az átlagos fizikai aktivitás következtében folyamatosan nyomóerők hatásainak vannak kitéve, ami a porcsejtek anyagcsere-folyamatainak szabályozása révén a megfelelő összetételű extracelluláris matrix fenntartásában is fontos szerepet tölt be. Az érett vázrendszerre jellemző szövetek mechanotranszdukciós útvonalaival kapcsolatosan részletes adatokkal rendelkezünk, a fejlődő porcszövetet érő mechanikai ingerek hatásairól azonban kevés adat áll rendelkezésre. Az optimális mértékű ritmikus mechanikai inger a porcszövet különböző gyulladásos eredetű megbetegedéseinek (pl. rheumatoid arthritis, osteoarthritis) regenerációját is segíti. Munkánkban a fejlődő porcszövet mechanoszenzitivitásával és mechanotranszdukciós útvonalaival kapcsolatos celluláris és extracelluláris történéseket vizsgáltuk. Kísérleteinket 4 napos csirkeembriók disztális végtagtelepeiből izolált kondroprogenitor sejtekből előállított primer kondrogenikus sejtkultúrákon végeztük. Kezdetben a Ser/Thr kinázok közé tartozó PKCdelta porcdifferenciálódásban betöltött szerepét vizsgáltuk. A növényi eredetű rottlerin – amelyről ismert, hogy igen hatékonyan gátolja a PKCdelta aktivitását – a kísérleti modellként alkalmazott kultúrákban nem gátolta az enzim aktivitását, ugyanakkor jelentősen csökkentette a porcképződés mértékét. Érdekes azonban megjegyezni, hogy sejtmentes *in vitro* enzimaktivitási méréseink során a rottlerin valóban gátolta a PKCdelta-aktivitást. A kultúrák sejtjeinek PKCdelta shRNS-sel történő tranziens transzfekciója megakadályozta a porcképződést. Eredményeink alapján a PKCdelta az ERK1/2 aktivitásának csökkentésével serkenti a porcképződést (1). Patch-clamp, RT-PCR és Western blot vizsgálatok segítségével kimutattuk, hogy a csirkeembriók végtagtelepeiből előállított primer porcosodó kultúrák feszültségfüggő $Na_V1.4$, $K_V1.1$, $K_V1.3$ és $K_V4.1$ ioncsatornákat expresszálnak. Eredményeink alapján a $K_V1.1$ működése fontos a sejtek végső elköteleződésének időpontjában. A membránpotenciál változásai befolyásolják a porcsejtek differenciációját és a sejtosztódást, mely ténynek terápiás vonatkozásai is lehetnek (2). A pályázat segítségével egy professzionális "mechanikai ingerlő" készülék előállításának költségeit is fedeztük (jelenleg szabadalmi eljárás alatt álló készülék prototípusának leírása a projekttervben is szerepelt). Kísérleteinkben a kondrogenikus sejtek elköteleződésének idején (a tenyésztés 2. és 3. napján) rövid ideig (30–30 percig) alkalmazott ciklikus, uniaxiális nyomóerő a matrixtermelésben szerepet játszó enzimek és matrixfehérjék expressziójának stimulálása révén fokozta a porcmatrix képződését. A mechanikai terhelés elősegítette a porcsejtek érését, amit a Sox9 (a porcképződésért felelős transzkripciós faktor) emelkedett mértékű expressziójával, valamint csökkent sejtosztódási rátával igazoltunk; megjegyzendő ugyanis, hogy az érett porcsejtek nem képesek osztódni. A mechanikai inger érzékelésében vélhetőleg szerepet játszó plazmamembrán-receptorok azonosítása során kimutattuk, hogy az NMDA-típusú glutamátreceptorok esszenciális komponense, az NR1 alegység expressziójának mértéke mechanikai stimulus hatására mintegy 5-szörösére emelkedett. Ezen ioncsatorna szerepét a mechanikai terhelés következtében módosuló intracelluláris Ca^{2+}-koncentráció változásai is valószínűsítik. A mechano-transzdukciós útvonal egyik lehetséges intracelluláris célpontjaként az ERK1/2 faktort azonosítottuk (3).

Matta C, Juhász T, Szíjgyártó Z, Kolozsvári B, Somogyi C, Nagy G, Gergely P, Zákány R: PKCdelta is a positive regulator of chondrogenesis in chicken high density micromass cell cultures. BIOCHIMIE 93: pp.149-159 (2011) IF: 3,787

Varga Z, Juhász T, Matta C, Fodor J, Katona É, Bartok A, Oláh T, Sebe A, Csernoch L, Panyi G, Zákány R: Switch of voltage-gated K+ channel expression in the plasma membrane of chondrogenic cells affects cytosolic Ca^{2+}-oscillations and cartilage formation. PLOS ONE 6: e279572011 (2011) IF: 4,411

Juhász T, Somogyi Cs, Matta Cs, Csernoch L, Fodor J, Oláh T, Sződy R, Karácsonyi Z, Zákány R, Gergely P: Mechanical loading enhances chondrogenesis via N-methyl-D-aspartate type glutamate receptor-ERK1/2 pathway in chicken micromass cultures. BONE (manuscript number: D-12-00024)

Budget: 4.500.000.- HUF

EFFECT OF MECHANICAL STRESS AND MECHANOTRANSDUCTION ON CARTILAGE FORMATION *IN VITRO*

Gergely Pál[1], Zákány Róza[2], Matta Csaba[2], Juhász Tamás[2]
[1]Department of Medical Chemistry, [2]Department of Anatomy, Histology and Embryology, Medical and Health Science Center, University of Debrecen

Chondrocytes in articular cartilage are continuously exposed to compressive forces during normal physical activity, which is indispensable to proper metabolic activity of chondrocytes and in this way contributes in maintenance of proper composition of the cartilage extracellular matrix. While mechanotransduction pathways of mature skeletal tissues have been extensively studied, our knowledge is considerably limited regarding how mechanical forces (*e.g.*, embryonic movements) affect developing cartilage. Optimal intermittent biomechanical activation is also required for regeneration of cartilage in various inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis and osteoarthritis. In our experiments we aimed to characterize cellular and extracellular events of developing cartilage that are related to mechanosensitivity and mechanotransduction. We performed our experiments in a chicken primary chondrogenic cell culture model, in which chondroprogenitor cells were isolated from limb buds of 4-day-old embryos. First, we investigated the role of the Ser/Thr kinase PKCdelta in chondrogenesis. Rottlerin, a plant compound which is accepted as a potent inhibitor of PKCdelta, failed to inhibit the activity of this enzyme in chicken primary chondrogenic cell cultures, although it reduced chondrogenesis. It is noteworthy that rottlerin inhibited PKCdelta activity in cell-free *in vitro* assays. Transient transfection with a shRNA to PKCdelta diminished cartilage formation. PKCdelta was found as a positive regulator of chondrogenesis probably exerting this effect via reducing the activity of ERK1/2 (1). Using patch-clamp, RT-PCR and Western-blot experiments, we found that chondrogenic cells in primary micromass cell cultures obtained from embryonic chicken limb buds expressed voltage-gated $Na_V1.4$, $K_V1.1$, $K_V1.3$ and $K_V4.1$ channels. $K_V1.1$ function seems especially critical during the final commitment period. We show the critical role of voltage-gated cation channels in the differentiation of non-excitable cells with potential therapeutic use (2).

With help of the present financial support, we were able to cover the costs of the manufacturing of a professional “mechanical stimulator instrument” which was based on a prototype (under patent application) that was described in our research proposal. We found that cyclic uniaxial compressive force applied at the time of the commitment of chondrogenic cells (i.e. days 2 and 3 of culturing, for 30-30 minutes) stimulated the cartilage matrix production as a result of elevated expression of either matrix producing enzymes or matrix proteins. The mechanical load promoted maturation of chondrogenic cells, as it was revealed by elevated sox9 (the master transcription factor of cartilage differentiation) expression and reduced cell proliferation rate; it is worth to mention that mature chondrocytes do not proliferate. As far as the possible cell surface receptors involved in mechanosensitivity are concerned, we found that the expression of NR1 subunit, the essential component of NMDA-type glutamate receptors, exhibited approximately 5-fold elevation under the effect of mechanical load. The role of this ion channel was also supported by the fact that mechanical load altered the intracellular Ca^{2+}-concentration of chondrogenic cells. As a possible intracellular molecular target of mechanotransduction we identified ERK1/2 (3).

Matta C, Juhász T, Szíjgyártó Z, Kolozsvári B, Somogyi C, Nagy G, Gergely P, Zákány R: PKCdelta is a positive regulator of chondrogenesis in chicken high density micromass cell cultures. BIOCHIMIE 93: pp.149-159 (2011) IF: 3,787

Varga Z, Juhász T, Matta C, Fodor J, Katona É, Bartok A, Oláh T, Sebe A, Csernoch L, Panyi G, Zákány R: Switch of voltage-gated K+ channel expression in the plasma membrane of chondrogenic cells affects cytosolic Ca^{2+}-oscillations and cartilage formation. PLOS ONE 6: e279572011 (2011) IF: 4,411

Juhász T, Somogyi Cs, Matta Cs, Csernoch L, Fodor J, Oláh T, Sződy R, Karácsonyi Z, Zákány R, Gergely P: Mechanical loading enhances chondrogenesis via N-methyl-D-aspartate type glutamate receptor-ERK1/2 pathway in chicken micromass cultures. BONE (manuscript number: D-12-00024)

Teljes támogatás: 4.800.000,- Ft

A KÖRNYEZETI SZENNYEZŐ ARZENÁT ÉS DIMETILÁLT METABOLITJÁNAK BIOTRANSZFORMÁCIÓJA SOKKAL MÉRGEZŐBB TRIVALENS ALAKOKKÁ – TOXIKÁLÁSI MECHANIZMUSOK FELTÁRÁSA

Gregus Zoltán, Németi Balázs
Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvosi Kar, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

A környezetben domináns szervetlen arzénvegyület, az arzenát (AsV), a szervezetben sokkal mérgezőbb arzenitté (AsIII) redukálódik, amely a háromvegyértékű metilált arzénmetabolitokkal együtt felelős az arzén mérgező és tumorkeltő hatásáért. Az AsV redukció mechanizmusát kutatva korábban megállapítottuk, hogy foszforolitikus-arzenolitikus hasítást katalizáló enzimek (mint a purin-nukleozid-foszforiláz, a glikogén-foszforiláz, a glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz, az ornitin-karbamoil-transzferáz, és a foszfotranszacetiláz) elősegítik az arzenát redukcióját a sokkal mérgezőbb arzenitté, mert ezek az enzimek a szervetlen arzenátot arzenilált szerves vegyületté alakítják, amelyeket tiolok (pl. glutation, GSH) könnyen arzenitté redukálnak (Gregus et al., Toxicol. Sci. 110: 282-292, 2009). Azt is megállapítottuk, hogy izolált mitokondriumok is gyorsan redukálják az arzenátot arzenitté (Németi and Gregus, Toxicol. Appl. Pharmacol. 182: 208-218, 2002), de az arzenát mitokondriális redukciójának mechanizmusát akkor még nem értettük.

Korábbi eredményeink alapján azt a hipotézist állítottuk fel, hogy a mitokondriumok azért redukálják gyorsan az AsV-ot, mert AsV jelenlétében ATP helyett ADP-arzenátot képeznek, amit aztán a mátrixterükben lévő GSH gyorsan redukál. E hipotézist tesztelendő igazoltuk, hogy az ADP-arzenát homológját, az AMP-arzenátot képző RNS-hasító enzim – a polinukleotid foszforiláz – szintén fokozza az AsV redukcióját, amikor a PNPase enzimet az AsV-tal az enzim szubsztrátja (poli-adenilát) és GSH jelenlétében inkubáltuk [1, 2]. Izolált patkánymáj mitokondriumokon végzett kísérleteink igazolták, hogy a mitokondriális AsV-redukció az ADP-arzenát képződésén alapul. Az ADP-arzenátot az ATP szintáz képzi, amikor az ADP-t nem foszforilálja foszfáttal, hanem arzenilálja arzenáttal. Valóban, az ADP nem foszforilálható (és nem arzenilálható) analógja az α–β-metilén-ADP, az ATP szintáz gátlója az oligomicin, valamint a GSH depléciója a mitokondriumokból csaknem megszüntette az arzenát redukcióját a mitokondriumokban [1].

Egy újabb enzim, amely szintén képezhet ADP-arzenátot és elősegítheti az AsV redukcióját arzenitté a glutation-szintetáz (GS). A GS a tripeptid glutation (Glu-Cys-Gly; GSH) szintézisének két végső lépését katalizálja: Glu-Cys + Mg-ATP ↔ Glu-Cys-P + Mg-ADP (1), és Glu-Cys-P + Gly ↔ Glu-Cys-Gly + P_i (2). E lépések megfordíthatók; ekkor foszfát (P_i) jelenlétében a GSH foszforolízise, AsV jelenlétében pedig a GSH arzenolízise megy végbe két lépésben: Glu-Cys-Gly + AsV ↔ Glu-Cys-AsV + Gly (1), és Glu-Cys-AsV + Mg-ADP ↔ Mg-ADP-AsV + Glu-Cys (2). Feltételeztük, hogy a GS is képes támogatni az AsV redukcióját azáltal, hogy a GSH arzenolízise során ADP-arzenátot (Mg-ADP-AsV) képez, amelyeket a GSH tiol csoportja könnyen redukál. E feltételezésünket rekombináns emberi GS enzimmel végzett kísérleteink igazolták [3].

Összefoglalva: az elmúlt évek során számos enzimről igazoltuk, hogy úgy képes elősegíteni az arzenát redukcióját sokkal mérgezőbb arzenitté, hogy a szervetlen arzenátot egy szerves vegyületbe viszi (arzenát észtert vagy anhidridet képez), amelyben az arzenát tiol-vegyülettel (pl. glutationnal) könnyen redukálhatóvá válik. Mivel sok ilyen enzim van, nehéz meghatározni, hogy az azonosított enzimek milyen mértékben járulnak hozzá az arzenát toxikálásához a szervezetben.

Közlemények: [1] Németi, B., Regonesi, M.E., Tortora, P., Gregus, Z.: Polynucleotide phosphorylase and mitochondrial ATP synthase mediate reduction of arsenate to the more toxic arsenite by forming arsenylated analogues of ADP and ATP. *Toxicol. Sci.* 117: 270-281, 2010. (IF=4.814) Ezt a közleményünket a folyóirat „Toxicological Highlight”-ként kiemelte és egy rövid cikkben mutatta be: Thomas, D.J.: Arsenolysis and thiol-dependent arsenate reduction. *Toxicol. Sci.* 117: 249-252, 2010. [2] Németi, B., Regonesi, M.E., Tortora, P., Gregus, Z.: The mechanism of the polynucleotide phosphorylase-catalyzed arsenolysis of ADP. *Biochimie* 93: 624-627, 2011. (IF=3.897) [3] Németi, B., Anderson, M.E., Gregus, Z.: Glutathione synthetase promotes the reduction of arsenate via arsenolysis of glutathione. *Biochimie* 94: 1327-1333, 2012.

Budget: 4.800.000,- HUF

BIOTRANSFORMATION OF THE ENVIRONMENTAL CONTAMINANT ARSENATE AND ITS DIMETHYLATED METABOLITE TO MUCH MORE TOXIC TRIVALENT FORMS – EXPLORING THE TOXIFICATION MECHANISMS

Zoltán Gregus, Balázs Németi
Dept. of Pharmacol. and Pharmacother., Toxicology Section, University of Pécs, Medical School

Arsenate (AsV), the environmentally prevalent inorganic arsenical, is reduced in the body to the much more toxic trivalent arsenite (AsIII) which, together with its trivalent methylated arsenic metabolites, is responsible for the toxic and carcinogenic effect of arsenic. When searching for the mechanism of AsV reduction, we found that enzymes catalyzing phosphorolytic-arsenolytic cleavage of their substrates (e.g., purine nucleoside phosphorylase, a glycogen phosphorylase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, ornithine carbamoyl transferase, and phosphotransacetylase) promote reduction of AsV to the more toxic AsIII, because these enzymes convert inorganic AsV to arsenylated organic compounds which are easily reduced by thiols (e.g., glutathione, GSH) (Gregus et al., Toxicol. Sci. 110: 282-292, 2009). We also found that isolated mitochondria also can reduce AsV to AsIII (Németi and Gregus, Toxicol. Appl. Pharmacol. 182: 208-218, 2002), however, the mechanism of mitochondrial AsV reduction was not understood then.

Based on our previous findings, we hypothesized that mitochondria can reduce AsV because in presence of AsV they produce ADP-arsenate (instead of ATP) which is rapidly reduced to AsIII by GSH present in their matrix space. When testing this hypothesis, we demonstrated that polinucleotide phosphorylase (an RNA-cleaving enzyme) that produces AMP-arsenate (the homologue of ADP-arsenate) also mediates AsV reduction when the enzyme was incubated with AsV in presence of its substrate (poly-adenylate) and GSH [1, 2]. Our experiments on isolated rat liver mitochondria indicated that mitochondrial AsV reduction is coupled to ADP-arsenate production. ADP-arsenate is formed by ATP synthase, when it arsenylates ADP with arsenate, instead of phosphorylating it with phosphate. Indeed, α–β-methylene-ADP, an ADP analogue that cannot be phoshorylated (or arsenylated), oligomycin, an inhibitor of ATP synthase, and depletion of GSH from the mitochondria almost abolished the reduction of AsV in these cell organelles [1].

Yet another enzyme that may produce ADP-arsenate and may facilitate reduction of AsV to AsIII is glutathione synthetase (GS). GS catalyzes the last two steps of the synthesis of the tripeptide glutathione (Glu-Cys-Gly): Glu-Cys + Mg-ATP ↔ Glu-Cys-P + Mg-ADP (1), and Glu-Cys-P + Gly ↔ Glu-Cys-Gly + P_i (2). These reactions are reversible; in presence of phosphate in (P_i) phosphorolysis of GSH takes place. However, in presence of AsV arsenolysis of GSH occurs in two steps: Glu-Cys-Gly + AsV ↔ Glu-Cys-AsV + Gly (1), és Glu-Cys-AsV + Mg-ADP ↔ Mg-ADP-AsV + Glu-Cys (2). We hypothesized that GS supports AsV reduction by forming ADP-arsenate (Mg-ADP-AsV) in the course of GSH arsenolysis, which is then reduced by the thiol group of GSH. We have proven this hypothesis in studies using human recombinant GS [3].

In summary, over the past years we have demonstrated that several enzymes can promote the reduction of AsV to the much more harmful AsIII by incorporating the inorganic AsV into an organic compound (as arsenate ester or anhydride) in which the pentavalent As is easily reduced by a thiol, such as GSH. Because there are several such enzymes, it is difficult to determine to what degree the enzymes we have identified contribute to the toxification of arsenate in the body.

Publications: [1] Németi, B., Regonesi, M.E., Tortora, P., Gregus, Z.: Polynucleotide phosphorylase and mitochondrial ATP synthase mediate reduction of arsenate to the more toxic arsenite by forming arsenylated analogues of ADP and ATP. *Toxicol. Sci.* 117: 270-281, 2010. (IF=4.814) This publication was selected by the journal as „Toxicological Highlight" and our results were discussed in the following communication: Thomas, D.J.: Arsenolysis and thiol-dependent arsenate reduction. *Toxicol. Sci.* 117: 249-252, 2010. [2] Németi, B., Regonesi, M.E., Tortora, P., Gregus, Z.: The mechanism of the polynucleotide phosphorylase-catalyzed arsenolysis of ADP. *Biochimie* 93: 624-627, 2011. (IF=3.897) [3] Németi, B., Anderson, M.E., Gregus, Z.: Glutathione synthetase promotes the reduction of arsenate via arsenolysis of glutathione. *Biochimie* 94: 1327-1333, 2012.

Teljes támogatás: 3.000.000, - Ft

CENTRÁLIS RECEPTOROK VALAMINT ENDOGÉN ÉS EXOGÉN LIGANDJAINAK SZEREPE A GASZTROPROTEKCIÓBAN

Gyires Klára[1], Fürst Zsuzsanna[1], Mátyus Péter[2], Zádori Zoltán[1], Al-Khrasani Mahmoud[1] Shujaa-Aldeen Nashwan[1]
Farmakológiai és Faramakoterápiás Intézet, Semmelweis Egyetem, [2]Szerves Vegytani Intézet, Semmelweis Egyetem

A gyomorfekély kialakulásában a savelválasztás fokozódása mellett, a gyomornyálkahártya defenzív folyamatainak a csökkenése is szerepet játszhat. Többek között a NSAID-ok által okozott gyomorfekély és a stressz fekély kialakulásában alapvető a mukozális védelem gyengülése. Kezelésük ill. megelőzésük nem megoldott kérdés, az általuk okozott morbiditás és mortalitás csökkentése sürgető igény.
Épp ezért igen fontos feladata az alapkutatásnak feltárni azon mechanizmusokat, melyek a gyomornyálkahártya védelmi képességét erősítik. A perifériás mechanizmusok mellett a 90-es évek közepétől a kutatások előterébe került a mukozális védelem centrális szabályozásának analízise. Az ETT pályzat célkitűzése alapvetően a gyomorvédelem centrális ill. perifériás szabályozásában szerepet játszó mechanizmusok vizsgálata. A kíséreletek során elért eredmények az alábbiakban foglalhatók össze:

1. Opioid rendszer központi szerepe a nyálkahárya integritás fenntartásában.

Korábbi kísérleteink szerint számos, centrálisan (intracerebroventricularisan (icv.)) injiciált exogén és endogen vegyület - pl. az α_2-adrenoceptor agonisták, cannabinoidok, nocicepetin, P anyag (SP) gasztroprotektív hatását gátolták az opioid antagonisták. Kísérleteink arra keresetek választ, hogy az endogen opioidok közül az endomorphin-2 szerepet játszik-e a fenti vegyületek védőhatásában. Eredményeink szerint i./Az intraciszternálisan (ic.) injiciált endomorphin-2 anti-szerum gátolta az α_2-adrenoceptor agonista clonidine (470 pmol), a nem szelektív cannabinoid receptor agonista anandamide (11.5 nmol), a cannabinoid CB_1-receptor szelektív ACEA (arachidonyl-2-chloroethylamide) (1.3 nmol) és P anyag (18 pmol) centrálisan (icv.) indukált gasztroprotektív hatását. ii./ Az endomorphin-2 (0.1-20 pmol) gasztroprotektív hatást indukált ic. injiciálva. iii./Az endomorphin-2 lebontásáért felelős dipeptidil-aminopeptidáz IV gátlása diprotin A-val (1 μmol icv.) szintén gasztroprotektiv hatást eredményezett, melyet az endomorphin-2 anti-szerum felfüggesztett. iiii./ Az alkohol-okozta csökkent mukozális CGRP (1.22 ±0.06 vs. 0.62±0.05 fmol/mg) és somatostatin (15.1±0.5 vs. 0.89±0.1 fmol/mg) szintek az endomorphin-2 (0.1 pmol icv.) injciálását követően a kontroll szintre emelkedtek (1.05±0.028 and 14.6±0.047 fmol/mg CGRP ill. somatostatin esetében). Tehát az endomorphin-2 nagy valószínűséggel jelentős szereppel bír a mukozális nyálkahártya integritás fenntartásában.

2. Az α_2 -adrenoceptor szubtípusok szerepének további analízise a gyomor védelemben, és további α_2 -adrenoceptor mediált hatásokban.

α_2-adrenoceptorok aktiválása gyomorvédő hatást fejt ki mind sav-dependens mind sav-independens fekély modelleken. Kísérletünk célja a gasztroprotekcióban szerepet játszó szubtípus (α_{2A}, α_{2B} vagy α_{2C}) meghatározása. Különböző α_2-adrenoceptor agonistákat és antagonistákat icv. injiciáltunk az α_{2A}-, α_{2B}-, α_{2C}-adrenoceptor szubtípus hiányos C57BL/6 egereknek. Mind a nem-szelektív α_2-adrenoceptor agonista clonidin (0.3 - 2.8 nmol), mind az $\alpha_{2B/C}$-adrenoceptor szubtípust preferáló agonista ST-91 (0.5 - 11.5 nmol) gasztroprotektív hatást fejtett ki mind a vad típusú, mind az α_{2A}-, α_{2B}- and α_{2C}-szubtípus hiányos egereken icv. injciálva. Ezzel szemben az α_{2A}-adrenoceptor szubtípus agonista oxymetazolin (0.7 - 84 nmol icv.) nem befolyásolta az alkohol-okozta léziókat. Továbbá a clonidin hatását gátolta a nem-szelektív α_2-adrenoceptor antagonista yohimbin (12.5 nmol), az $\alpha_{2B/C}$-adrenoceptor antagonista ARC 239 (10.4 nmol), míg az α_{2A}-adrenoceptor antagonista BRL 44408 (7.5 nmol) hatástalan volt. Az ARC 239 gátolta a clonidin védőhatását az α_{2B}- and α_{2C}-KO egereken, míg a szelektív α_{2C}-adrenoceptor antagonista JP 1302 (52 nmol) gátló

hatást fejtett ki az α_{2B}-adrenoceptor szubtípus hiányos egereken, de hatástalan volt az α_{2C}-KO egereken. Következésképp az α_{2B}- and α_{2C}-adrenoceptor szubtípus egyaránt szerepet játszik α_2-adrenoceptor agonista-indukálta gyomrvédő hatásban.
Az α_2-adrenoceptor szubtípusok szerepét vizsgáltuk a gyomor motilitás szabályozásában is. Ennek kapcsán elektromosan ingerelt egér gyomor fundus strip preparátumon vizsgáltuk az α_2-adrenoceptor stimulansok kontrakciót gátló hatását. Eredményeink szerint i./A kontrakciókat gátolta a clonidin (EC_{50}: 19.35 ±1.3 nM), az α_{2A}-adrenoceptor szubtípus szelektív agonista oxymetazolin (EC_{50}: 3.90 ± 1.1 nM) és az α_{2B}-adrenoceptor szubtípus agonista ST-91 (EC_{50}: 28.73 ± 4.3 nM). ii./Mindhárom vegyület gátló hatását felfüggesztette az α_{2A}-adrenoceptor antagonist BRL 44408, de hatástalan volt az $\alpha_{2B/2C}$-adrenerg receptor antagonista ARC-239. iii./A clonidin és az ST-91 gátolta az elektomos ingerléssel kiváltott gyomorkontrakciókat mind a vad típusú, mind az α_{2B}- és α_{2C}-adrenoceptor deficiens egereken, de hatástalanok voltak az α_{2A}-deficiens egereken. Következésképp, elsőnek mutattuk ki, hogy egéren az α_2-adrenoceptor agonisták-indukálta gyomor motilitás gátlást kizárólag az α_{2A}-adrenoceptor szubtípusok mediálják.

3. A cannabinoidok gasztroprotektiv hatásának elemzése

A cannabinoidok hatásának elemzése során arra kerestünk választ, hogy a centrális cannabinoid receptorok aktiválása szerepet játszik-e a gyomorvédelmben. Az irodalom adatai szerint cannabinoidok hatását csak perifériás beadás során vizsgálták. Eredményeink szerint az anandamid, methanandamid és WIN55,212-2 gátolták az alkohol-okozta mukozalis leziókat mind perifériás (0.28-5.6 μmol/kg, 0.7-5.6 μmol/kg és 0.05-0.2 μmol/kg iv.) mind centrális (2.9-115 nmol, 0.27-70 nmol és 1.9-38 nmol icv.) adást követően. Az anandamid lebontását gátló URB 597 (2.9 nmol icv.) szintén gasztroprotektív hatásúnak bizonyult. Az anadnamid gasztroprotektív hatását felfüggesztette a CB_1-receptor antagonista SR141716A (2.16 nmol i.c.v.), míg a naloxon (27.5 nmol icv.) antagonizálta az icv. és iv. injiciált anandamid and WIN55,212-2 hatását, de kevéssé befolyásolta a methanandamid indukált hatást. Következésképp, eredményeink elsőként mutatták ki, hogy a centrális CB_1-receptorok aktiválása gasztroprotektív hatást eredményez, melyben legalábbis részben az opioid rendszer is szerepet játszik. Továbbá az anandamid szintjének emelése ugyancsak gyomrvédelmet indukált, tehát az endocannabinoidok szerepet játszhatnak a mukozális integritás fenntartásában.

Irodalom:

Zadori ZS, Shujaa N, Brancati SB, Hein L, Gyires K
EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY **669:**(1-3) *pp. 115-120.* (2011)
IF: 2.737

Shujaa N, Al-Khrasani M, Zadori ZS, Rossi M, Matyus P, Nemeth J, Hein L, Gyires K
NEUROCHEMISTRY INTERNATIONAL **58:**(6) *pp. 708-713.* (2011)
IF: 3.601

Shujaa N, Zadori ZS, Ronai AZ, Barna I, Mergl Z, Mozes MM, Gyires K.
JOURNAL OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY **60 Suppl 7:***pp. 93-100.* (2009)
IF: 1.489

Gyires K, Zadori ZS, Shujaa N, Al-Khrasani M, Pap B, Mozes MM, Matyus P
INFLAMMOPHARMACOLOGY **17:**(3) *pp. 171-179.* (2009)

Gyires K, Zadori ZS, Torok T, Matyus
NEUROCHEMISTRY INTERNATIONAL **55:**(7) *pp. 447-453.* (2009)
IF: 3.541

Budget: 3,000,000.- Ft

ROLE OF CENTRAL RECEPTORS AND THEIR ENDOGENOUS AND EXOGENOUS LIGANDS IN GASTROPROTECTION

Gyires Klára[1], Fürst Zsuzsanna[1], Mátyus Péter[2], Zádori Zoltán[1], Al-Khrasani Mahmoud[1] Shujaa-Aldeen Nashwan[1]
[1]Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Faculty of Medicine, Semmelweis University,
[2]Department of Organic Chemistry, SemmelweisUniversity

The gastrointestinal functions (gastric acid secretion, motility, mucosal defense) may be regulated both by peripheral and central mechanisms.Our experiments have been focused on central regulation of mucosal protection, though additional mechanisms have also been analysed.

1. Role of opiod system in regulation of gastric mucosal defence.

It has been shown previously that opioid receptor antagonists inhibited the centrally initiated gastroprotective effect of α_2-adrenoceptor agonists, cannabinoids, nocicepetin, nocistatin and substance P (SP). The question was raised: which endogenous opioid(s) may be involved in the action and which peripheral mechanism may mediate the mucosal protective effect. It was found that i./ Intracisternal (ic.) injection of endomorphin-2 anti-serum inhibited the gastroprotective effect of the α_2-adrenoceptor agonists, clonidine (470 pmol), the non-selective cannabinoid receptor agonist, anandamide (11.5 nmol), the cannabinoid CB_1-receptor selective ACEA (arachidonyl-2-chloroethylamide) (1.3 nmol) and SP (18 pmol) given intracerebroventricularly (icv.). ii./ Endomorphin-2 in the dose range of 0.1-20 pmol exerted gastroprotective effect given icv. iii./ Inhibition of the degradation of endomorphin-2 by diprotin A (1 μmol icv.; inhibitor of dipeptidyl-aminopeptidase IV) also induced mucosal protective effect and it was reversed by endomorphin-2 anti-serum. iiii./The reduced level of CGRP (1.22 ±0.06 vs. 0.62±0.05 fmol/mg) and somatostatin (15.1±0.5 vs. 0.89±0.1 fmol/mg) following ethanol administration was reversed by icv. injection of endomorphin-2 (0.1 pmol) (1.05±0.028 and 14.6±0.047 fmol/mg for CGRP and somatostatin, respectively). It can be concluded that endomorphin-2 is likely to have a prominent role in central regulation of gastric mucosal defense.

2. Analysis of the role of α_2-adrenoceptor subtypes in gastroprotection and gastric motility.

α_2-adrenoceptors are known to mediate gastroprotective effect in both acid-dependent and acid-independent ulcer models. The aim of the present study was to determine, which of the three α_2-adrenoceptor subtypes (α_{2A}, α_{2B} or α_{2C}) is responsible for this protection. Various α_2-adrenoceptor agonists and antagonists were administered icv. to C57BL/6 mice with deletion of genes encoding the different subtypes. The gastric mucosal damage was induced by orally injected acidified ethanol. Both the non-selective α_2-adrenoceptor agonist clonidine (0.3 - 2.8 nmol) and the $\alpha_{2B/C}$-adrenoceptor subtype preferring agonist ST-91 (0.5 - 11.5 nmol) induced dose-dependent gastroprotective effect in wild type, α_{2A}-, α_{2B}- and α_{2C}-KO mice. In contrast, the α_{2A}-adrenoceptor subtype agonist oxymetazoline (0.7 - 84 nmol icv.) failed to influence the development of ethanol-induced ulcers. The effect of clonidine was antagonized by the non-selective antagonist yohimbine (12.5 nmol) and the $\alpha_{2B/C}$-adrenoceptor antagonist ARC 239 (10.4 nmol), but not by the α_{2A}-adrenoceptor antagonist BRL 44408 (7.5 nmol). ARC 239 also reversed the effect of clonidine in α_{2B}- and α_{2C}-KO mice, while the selective α_{2C}-adrenoceptor antagonist JP 1302 (52 nmol) antagonized that only in α_{2B}-KO, but not in α_{2C}-KO mice. These results suggest that α_{2B}- and α_{2C}-adrenoceptor subtypes can equally contribute to the mediation of gastroprotective effect induced by α_2-adrenoceptor agonists in mice.

The role of α_2-adrenoceptors in regulation of gastric motility has been well documented. However, only few data are available on the adrenoceptor subtype that mediates this effect. Therefore it was aimed to identify the α_2-adrenoceptor subtype(s) responsible for the inhibition of gastric motor activity in isolated fundus strip of the mouse. It was shown that i./ the electrically evoked

contraction of the gastric fundus strip of the mouse was inhibited by the non-selective α_2-adrenoceptor stimulant clonidine (EC_{50}: 0.019 ± 0.001 μM), the α_{2A}-adrenoceptor subtype selective agonist oxymetazoline (EC_{50}: 0.004 ± 0.001 μM) and the α_{2B}-adrenoceptor subtype prefering ST-91 (EC_{50}: 0.029 ± 0.004 μM), ii./ the inhibitory effect of clonidine (1 μM), oxymetazoline (0.1 μM) and ST-91 (1 μM) on the contractions of gastric fundus strip was reversed by the non-selective α_2-adrenoceptor antagonist idazoxane and α_{2A}-adrenoceptor antagonist BRL 44408, but not by the $\alpha_{2B/2C}$-adrenoceptor antagonist ARC-239. iii./ Clonidine and ST-91 inhibited the electrically induced gastric contractions in C57BL/6 wild type mice as well as in α_{2B}- and α_{2C}- adrenoceptor deficient mice. However, neither of them was effective in α_{2A}-deficient animals. As a conclusion, it was first demonstrated that the inhibitory effect of α_2-adrenoceptor agonists on the gastric motor activity of isolated stomach strip of the mouse is mediated purely by α_{2A}-adrenoceptors.

3. Analysis of the gastoptrotective effect of cannabinoids

The gastroprotective effect of cannabinoids has been described after peripheral administration. Therefore it was aimed to study if gastric mucosal defense can be elicited also by central administration of cannabinoids. It was found that anandamide, methanandamide and WIN55,212-2 reduced ethanol-induced mucosal lesions after both peripheral (0.28-5.6 μmol/kg, 0.7-5.6 μmol/kg and 0.05-0.2 μmol/kg iv., respectively) and central (2.9-115 nmol/rat, 0.27-70 nmol/rat and 1.9-38 nmol/rat icv., respectively) administration. Inhibition of the degradation of anandamide by URB 597 (2.9 nmol icv.) resulted in gastroprotection as well. The gastroprotective effect of anandamide and methanandamide given icv. or iv. was reversed by the CB_1 receptor antagonist SR141716A (2.16 nmol icv.). Naloxone (27.5 nmol icv.) also antagonized the effect of icv. or iv. injected anandamide and WIN55,212-2, but less affected that of methanandamide. The gastroprotective effect of anandamide was diminished also by endomorphin-2 anti-serum. In conclusion, it was first demonstrated that activation of central CB_1 receptors results in gastro-protective effect.The effect is mediated at least partly by endogenous opioids (see also point 1.)

References:

Zadori ZS, Shujaa N, Brancati SB, Hein L, Gyires K
Both alpha(2B)- and alpha(2C)-adrenoceptor subtypes are involved in the mediation of centrally induced gastroprotection in mice.
EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY **669:**(1-3) *pp. 115-120.* (2011)
IF: 2.737

Shujaa N, Al-Khrasani M, Zadori ZS, Rossi M, Matyus P, Nemeth J, Hein L, Gyires K
alpha(2)-Adrenoceptor agonist-induced inhibition of gastric motor activity is mediated by alpha(2A)-adrenoceptor subtype in the mouse.
NEUROCHEMISTRY INTERNATIONAL **58:**(6) *pp. 708-713.* (2011)
IF: 3.601

Shujaa N, Zadori ZS, Ronai AZ, Barna I, Mergl Z, Mozes MM, Gyires K
Analysis of the effect of neuropeptides and cannabinoids in gastric mucosal defense initiated centrally in the rat.
JOURNAL OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY **60 Suppl 7:***pp. 93-100.* (2009)
IF: 1.489

Gyires K, Zadori ZS, Shujaa N, Al-Khrasani M, Pap B, Mozes MM, Matyus P
Pharmacological analysis of alpha(2)-adrenoceptor subtypes mediating analgesic, anti-inflammatory and gastroprotective actions.
INFLAMMOPHARMACOLOGY **17:**(3) *pp. 171-179.* (2009)

Gyires K, Zadori ZS, Torok T, Matyus P
alpha(2)-Adrenoceptor subtypes-mediated physiological, pharmacological actions.
NEUROCHEMISTRY INTERNATIONAL **55:**(7) *pp. 447-453.* (2009)
IF: 3.541

Teljes támogatás: 3.000.000,- Ft

MINIMÁLIS RT-PCR ALAPÚ GÉNLISTA AZONOSÍTÁSA AZ ÖSZTROGÉN RECEPTOR POZITÍV, NYIROKCSOMÓ NEGATÍV EMLŐRÁKOS BETEGEK PROGNÓZISÁNAK ELŐREJELZÉSÉRE

Győrffy Balázs[1], Szász A Marcell[2], Munkácsy Gyöngyi[1], Tőkés Annamária[2], Kulka Janina[2]
[1]Semmelweis Egyetem, I. Gyermekklinika; [2]Semmelweis Egyetem, II. Patológiai Intézet

Az emlőrák Magyarországon a nők leggyakoribb rosszindulatú daganata. Az esetek több mint felét adó ösztrogén-receptor pozitív, nyirokcsomó negatív betegek szisztémás kezelése során alkalmazott kemoterápia egyeseknél növeli a várható túlélést, azonban a többieknél teljesen felesleges. A túlélés növekedése a rossz prognózisú betegekben lesz a legjelentősebb, azonban a mellékhatások valamennyi betegben jelentkeznek.

Kulcsfontosságú lenne azonosítani egy minimális, pontosan és reprodukálhatóan mérhető génlistát, amellyel az időigényes és rendkívül drága array-alapú mérések nélkül lehetne a prognózist előre jelezni. Az irodalomban eddig több olyan génexpresszió mérésén alapuló tesztet írtak le, amelyekkel a betegek prognózisa (és ezáltal a kemoterápia szükségessége) előre jelezhető lenne. Ezen génlisták jellemzően rendkívül tág határok között mozognak (21-200 gént tartalmaznak) és ezért mérésük nagyon drága.

Kutatásaink során először az irodalomban elérhető microarray adatbázisokat kombináltuk, hogy egy olyan meta-analízist tudjunk végezni, amelyikkel új biomarkereket tudunk egyrészt azonosítani, illetve tőlünk független mintákon tesztelni *(az adatbázis felépítésének leírását részletesen lásd Fekete és mtsai, Int J Cancer, 2011)*. Eközben klinikai mintagyűjtést is folytattunk, amelynek eredményeképpen RT-PCR segítségével tudtuk az egyes gének expresszióját betegmintákon is mérni. A kutatás során négy olyan új biomarkert azonosítottunk, amelyek az emlőtumor prognózisát előre jelezhetik.

A proteaszoma egy multikatalitikus proteináz komplex, amely a fehérjék lebontásában vesz részt. Sejtkultúrás kísérletek alapján a proteaszoma gátlószerek tumorellenes aktivitással rendelkeznek, serkentik a programozott sejthalált és szabályozzák a sejtciklust. A proteaszoma egyik alegysége a PSMB7 gén, amelyet eddig nem vizsgáltak emlőtumorban. Kutatásaink során azt találtuk, hogy a magas PSMB7 expresszió önmagában is egy rossz prognosztikai marker, amely az emlőtumor kezelésében alkalmazott doxorubicinnal szembeni rezisztenciát előre jelezheti. Az összefüggést 1592 betegmintán teszteltük, és a magas expresszió rossz prognózissal való összefüggése szignifikáns volt ($p<0,0001$, kockázati arány 2,1, konfidencia tartomány: 1,8-2,5). *(A PSMB7 emlőtumorban betöltött szerepének részletes bemutatását lásd Munkácsy és mtsai, Brit J Cancer, 2010).*

Az E-cadherin (CDH-1) egy transzmembrán fehérje, amely az epithelsejtek közötti kapcsolatban vesz részt. A sejtmembránt kapcsolja össze a sejtvázzal az alfa- és a béta-kateninekkel történő kapcsolaton keresztül. Az E-cadherin expressziója lobuláris karcinómák 80%-ában elvész. A klaudinok (CLDN) szintén sejtkapcsoló fehérjék, amelyek expressziója megnő bazális emlőtumorokban. Vizsgálataink során az *in silico* tesztelésbe 1809 beteget vontunk be, majd pedig 387 saját betegen teszteltük az E-cadherin és több claudin fehérje expresszióját. A claudin-4 és az E-cadherin expressziója alapján létrehoztunk egy általunk "curio"-nak elnevezett pontrendszert, amely multivariáns analízisiben is szignifikánsan előre tudta jelezni az áttétmentes túlélést ($p=0,04$).

(Az E-cadherin és a claudin-4 emlőtumorban betöltött szerepének részletes bemutatását lásd Szász és mtsai, Cancer Sci, 2011).

Az ABC transzporterek kemoterápiás szerekkel szembeni rezisztenciában betöltött szerepét régóta vizsgálják. Az ebbe a családba tartozó 48 gén egyike az ABCC2, amelyet eddig a májban, a vesében az epehólyagban, a tüdőben és a belekben mutattak ki. Vizsgálataink során 1809 emlőtumoros betegben néztük az expressziót *in silico,* amelyet 70 saját betegben is igazoltunk. Az emelkedett ABCC2 expresszió rövidebb áttétmentes túléléssel társult (p=0,018, kockázati arány 1,6, konfidencia tartomány 1,1-2,4). *(Az ABCC2 emlőtumorban betöltött szerepének részletes bemutatását lásd Maciejczyk és mtsai, Pathol Oncol Res, 2011).*

Kutatási eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy összesen négy gént (PSMB7, CDH-1, CLDN és az ABCC2) azonosítottunk, amelyek expressziója összefügg az emlőtumor prognózisával. A géneket egy általunk létrehozott nagy mintaszámú *in silico* adatbázisban, valamint saját betegeken is teszteltük. Ezen gének mérése a jövőben segítséget adhat arra, hogy a kemoterápiára reagáló rossz prognózisú betegeket a jó prognózisú betegektől elkülönítsük.

KÖZLEMÉNYEK:

1. Munkácsy G, Abdul-Ghani R, Mihály Z, Tegze B, Tchernitsa O, Surowiak P, Schäfer R, Győrffy B: PSMB7 is associated with anthracycline resistance and is a prognostic biomarker in breast cancer, BRITISH JOURNAL OF CANCER 102(2): pp 361-8 (2010) IF=4,90
2. Szász AM, Németh Z, Győrffy B, Micsinai M, KrenácsT, Baranyai Z, Harsányi L, Kiss A, Schaff Z, Tőkés AM, Kulka J: Identification of a claudin-4/E-cadherin score (CURIO) to predict prognosis in breast cancer. CANCER SCIENCE 102(12): pp 2248-2254 (2011) IF=3,85
3. Maciejczyk A, Jagoda E, Wysocka T, Matkowski R, Győrffy B, Lage H, Surowiak P: ABCC2 (MRP2, cMOAT) Localized in the Nuclear Envelope of Breast Carcinoma Cells Correlates with Poor Clinical Outcome. PATHOLOGY ONCOLOGY RESEARCH közlésre elfogadva (2011) IF=1,48
4. Fekete T, Rásó E, Pete I, Tegze B, Liko I, Munkácsy G, Sipos N, Rigó J, Győrffy B: Meta-analysis of gene expression profiles associated with histological classification and survival in 829 ovarian cancer samples. INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER közlésre elfogadva (2011) IF=4,93

Budget: 3,000,000.- HUF

ESTABLISHING A MINIMAL SET OF GENES CAPABLE TO PREDICT PROGNOSIS IN ESTROGEN RECEPTOR POSITIVE NODE NEGATIVE BREAST CANCER USING RT-PCR

Győrffy Balázs[1], Szász A Marcell[2], Munkácsy Gyöngyi[1], Tőkés Annamária[2], Kulka Janina[2]
[1] Semmelweis University Budapest, 1st Dept of Pediatrics; [2] Semmelweis University Budapest, 2nd Departmnet of Pathology

Breast cancer is the most common cancer in women in Hungary, more than half of all cases are estrogen receptor positive, lymph node negative. In these patients, chemotherapy improves survival only in a fraction of the cases. However, the chemotherapy side effects will affect all patients. Generally, chemotherapy will deliver the most significant benefits for those with a poor prognosis.

An imperative task is the identification of a minimal, highly reproducible gene list predicting prognosis which could substitute the time- and cost-intensive array-based measurements. Publications in the literature already described several gene expression based tests capable to predict prognosis and thereby the necessity of chemotherapy. However, these gene lists include a large number of markers (between 21 and 200 genes) which makes their assessment not only complex but also highly expensive.

In our research project we first collected publicly available microarray datasets by searching microarray depositories like GEO and TCGA. By this, we were able to perform a meta-analysis to identify new biomarkers and to perform independent validation for new markers *(for a detailed description of the buildup of the database please see Fekete et al, Int J Cancer, 2011)*. At the same time, clinical sample collection was executed. Then, the expression of selected genes was measured in the samples by RT-PCR. As a result of the research project we identified four new genes as potential biomarkers capable to predict breast cancer prognosis.

The proteasome is a multicatalytic proteinase complex involved in the non-lysosomal cleave of damaged and needles proteins. Proteasome inhibitors have an antitumor activity in cell culture, and induce apoptosis by disturbing regulation of cell cycle proteins. The PSMB7 gene is a proteasome subunit not yet investigated in breast cancer. In our study we have uncovered a correlation between high PSMB expression and poor breast cancer prognosis. Furthermore, the expression of PSMB7 was able to predict resistance against doxorubicin, an agent frequently used in breast cancer chemotherapy. The correlations were tested in 1592 patient samples and the correlation with prognosis reached a high significance ($p<0.0001$, hazard ratio 2.1, confidence interval: 1,8-2,5). *(For a detailed description of the role of PSMB7 in breast cancer please see Munkácsy et al, Brit J Cancer, 2010).*

E-cadherin (CDH-1) is a transmembrane protein that functions in epithelial cell–cell interactions as part of adherent junctions, linking the membrane to the cytoskeletal matrix through inter-actions with a- and b-catenin. Expression of E-cadherin is lost in approximately 80% of lobular carcinomas. Claudins (CLDN) are tight junction molecules expressed in basal breast tumors. We investigated the expression of CDH-1 and various claudins *in silico* in 1809 previously published patients and in 387 patients collected in our group. Using the expression of claudin-4 and E-cadherin we established a new score termed "curio". Curio was capable to predict relapse-free

survival significantly in multivariate analysis (p=0,04). *(The role of E-cadherin and claudin-4 are described in detail in Szász et al, Cancer Sci, 2011).*

The role of ABC transporters in chemotherapy resistance was extensively investigated. ABCC2 is one of the 48 genes in the family expressed in liver, kidneys, gall bladder, lung and colon. We evaluated the expression of ABCC2 in 1809 breast cancer patients *in silico* and in a set of 70 own patients. The elevated ABCC2 expression war related to shorter relapse free survival (p=0.018, hazard ratio 1.6, confidence interval 1.1-2.4). *(For a detailed description of the role of ABCC2 in breast cancer please see Maciejczyk et al, Pathol Oncol Res, 2011).*

In summary, we have identified four new genes (PSMB7, CDH-1, CLDN and ABCC2) capable to predict survival in breast cancer. The genes were tested in a large *in silico* database and in patient samples. These genes could help to discriminate patients with good and poor prognosis to identify those who will gain most benefit from chemotherapy.

PUBLICATIONS

1. Munkácsy G, Abdul-Ghani R, Mihály Z, Tegze B, Tchernitsa O, Surowiak P, Schäfer R, Györffy B: PSMB7 is associated with anthracycline resistance and is a prognostic biomarker in breast cancer, BRITISH JOURNAL OF CANCER 102(2): pp 361-8 (2010) IF=4,90
2. Fekete T, Rásó E, Pete I, Tegze B, Liko I, Munkácsy G, Sipos N, Rigó J, Győrffy B: Meta-analysis of gene expression profiles associated with histological classification and survival in 829 ovarian cancer samples. INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER in press (2011) IF=4,93
3. Szász AM, Németh Z, Győrffy B, Micsinai M, KrenácsT, Baranyai Z, Harsányi L, Kiss A, Schaff Z, Tőkés AM, Kulka J: Identification of a claudin-4/E-cadherin score (CURIO) to predict prognosis in breast cancer. CANCER SCIENCE 102(12): pp 2248-2254 (2011) IF=3,85
4. Maciejczyk A, Jagoda E, Wysocka T, Matkowski R, Győrffy B, Lage H, Surowiak P: ABCC2 (MRP2, cMOAT) Localized in the Nuclear Envelope of Breast Carcinoma Cells Correlates with Poor Clinical Outcome. PATHOLOGY ONCOLOGY RESEARCH in press (2011) IF=1,48

Teljes támogatás: 4. 500.000.- Ft

A TÁPLÁLÉKFELVÉTEL SZABÁLYOZÁSÁBAN FONTOS SZEREPET JÁTSZÓ NUCLEUS VENTROMEDIALIS ÉS TUBERALIS LATERALIS HYPOTHALAMUS GLUTAMATERG INNERVÁCIÓJA

Halász Béla[1], Kiss József[1], Csáki Ágnes[2], Bodnár Ibolya[1]
[1]MTA-SE Neuromorfológiai és Neuroendokrin Kutatócsoport, [2]Semmelweis Egyetem Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézet

Napjainkban általánosan elfogadott, hogy a glutamát a központi idegrendszerben az egyik legjelentősebb excitatorikus ingerületátvivő anyag. Feltérképeztük a hypothalamikus nucleus ventromedialis glutamaterg innervációját és vizsgáltuk, hogy hypothalamikus glutamaterg neuronokban van-e kolokalizációban leptin receptor, ösztrogén receptor, vagy androgen receptor.

A hypothalamikus nucleus ventromedialis glutamaterg innervációjának feltérképezése

A nucleus ventromedialis a hypothalamusnak egy prominens sejtcsoportja, mely szerepet játszik különböző funkciók (táplálkozás, szexuális magatartás, kardiovaszkuláris funkciók, stb.) szabályozásában. A sejtcsoportot évtizedek óta „jóllakottsági" központnak tekintik: a mag sértése patkányban súlyos elhízáshoz vezet. A nucleus ventromedialisban jelentős számú glutamaterg idegrost fordul elő. Ezek eredetét nemzetközi viszonylatban elsőként térképeztük fel H^3D-aszpartát retrográd autoradiográfiával. Autoradiográfiásan jelölt sejteket mutattunk ki a lateralis septumban, a bed nucleusban, az amygdalában és számos diencephalikus regióban (medialis preopticus area, nucleus paraventricularis, nucleus periventricularis, area hypothalamica anterior, nucleus premamillaris ventralis, thalamusban nucleus paraventricularisban, nucleus parataenialisban és magában az azonos és ellenoldali hypothalamikus nucleus ventromedialisban. Megfigyeléseink arra utalnak, hogy a vizsgált sejtcsoport glutamaterg kapcsolatrendszere nagyon összetett, melyben szerepet játszanak intranucleáris glutamaterg sejtek is.

Leptin-receptor hypothalamikus glutamaterg neuronokban

A zsírsejtek által termelt leptin receptorához kötődve gátolja a táplálékfelvételt. Leptin-receptor emlősökben expresszálódik az agyban. A hypothalamusban a nucleus paraventricularis, a nucleus ventromedialis dorsomedialis szubdiviziója és a lateralis hypothalamus igen gazdag glutamaterg neuronokban és leptin-receptort tartalmazó idegsejtekben. Ezért megvizsgáltuk, hogy a két anyag kolokalizációja ezen struktúrákban előfordul-e. Kimutattuk, hogy a nucleus paraventricularisban és a nucleus ventromedialis dorsomedialis szubdiviziójában a glutamatergnek tekinthető sejtek kb. 15 %-a leptin-receptort is tartalmazott. Ezzel szemben a lateralis hypothalamusban a két anyag kolokalizációját nem figyeltük meg. Észleleteinkkel elsőként demonstráljuk leptin-receptor jelenlétét glutamaterg neuronokban. Megfigyelésünk arra enged következtetni, hogy hypothalamikus glutamaterg neuronok szerepet játszanak a leptin hypothalamikus hatásának közvetítésében.

Ösztrogén-receptor glutamaterg neuronokban.

Jól ismert, hogy az ösztrogén receptorához kötődve számos hatást fejt ki a központi idegrendszerre (hat a neuronendokrin rendszerre, a sexuális magatartásra, a kognitív funkciókra, stb.). Kettős immunhisztokémiai jelöléssel kimutattuk, hogy a medialis preopticus areában, a hypothalamikus nucleus ventromedialisban és a medialis amygdala magban eltérő százalékban (legnagyobb százalékban a nucleus ventromedialisban 40%) van ösztrogén-receptor α glutamaterg idegsejtben.

Megfigyeléseink arra engednek következtetni, hogy ezen glutamaterg neuronok részt vesznek az ösztrogén hatás közvetítésében.

Androgen- receptorok glutamaterg neuronokban

Megfigyeltük, hogy a hypothalamusbsn a nucleus ventromedialisban, nucleus arcuatusban és a mamillaris magokban vannak olyan glutamaterg neuronok, melyekben kolokalizációban androgen-receptor van, ami arra utal, hogy ezek a glutamaterg neuronok feltehetően részt vesznek az androgen idegrendszeri hatásainak közvetítésében.

Közlemény:
J Kiss, Á Csáki, B Halász: Location of glutamatergic/aspartatergic neurons projecting to the hypothalamic ventromedial nucleus studied by autoradiography of retrogradely transported [^{3}H]D-aspartate. NEUROSCIENCE 176: pp. 210-224 (2011) IF: 3,215

Jelenleg dolgozunk két kézirat megírásán, melyekben elsőként írjuk le az ösztrogén-receptor α és az androgen-receptor glutamaterg neuronokban való jelenlétét hypothalamusban.

Budget: 4.500.000.- HUF

GLUTAMATERGIC INNERVATION OF TWO STRUCTURES INVOLVED IN THE CONTROL OF FEEDING: HYPOTHALAMIC VENTROMEDIAL NUCLEUS AND TUBERAL LATERAL HYPOTHALAMUS

Halász Béla[1], Kiss József[1], Csáki Ágnes[2], Bodnár Ibolya[1]
[1]Neuromorphological and Neuroendocrine Research Group, Hungarian Academy of Sciences and Semmelweis University
[2] Department of Human Morphology and Developmental Biology, Semmelweis University

It is generally accepted that glutmate is a very important excitatory neurotransmitter of the central nervous system. We studied the glutamatergic innervation of the hypothalamic ventromedial nucleus and the presence of leptin-receptor, oestrogen-receptor and of androgen-receptor in hypothalamic neurons.

Glutamatergic innervation of the hypothalamic ventromedial nucleus

The ventromedial nucleus is a prominent cell group of the hypothalamus being involved in the control of various functions (feeding, sexual behaviour, cardiovascular functions, etc.). The cellgroup is considered to be a satiety centre, lesion of the nucleus leads to obesity in rats. The nucleus contains numerous glutamatergic fibres. By means of H^3D-aszpartate retrograde autoradiography we provided data about the origin of these fibres. We detected autoradiographically labelled neurons in the lateral septum, bed nucleus, amygdala and in numerous diencephalic regions (medial preoptic area, hypothalamic paraventricular nucleus, periventricular nucleus, anterior hypothalamic area, ventral premamillary nucleus, thalamic paraventricular nucleus and in the ventromedial nucleus itself on the side of injection and on the contralateral side. Our observations are the first data on the location of glutamatergic neurons terminating in the hypothalamic ventromedial nucleus. The findings indicate that glutamatergic innervation of the cellgroup is very complex, intranuclear glutamatergic neurons are also participating in it..

Leptin-receptor in hypothalamic glutamatergic neurons

Leptin produced by fat cells, being bound to its receptors, it inhibits food intake. Leptin-receptors are expressed in the brain of mammals. In the hypothalamus the paraventricular nucleus, the dorsomedial subdivision of the ventromedial nucleus and the lateral hypothalamus are rich in glutamatergic neurons and in nerve cells containing leptin-receptor. Therefore, we studied these structures for the presence of leptin-receptors in glutamatergic neurons. We found that about 15 % of the glutamatergic nerve cells in the paraventricular nucleus and in the dorsomedial subdivision of the ventromedial nucleus contained leptin-receptor. In contrast, we did not detect colocalization of the two components in the lateral hypothalamus. Our findings indicate the presence of leptin-receptor in some glutamatergic nerve cells and suggest that such hypothalamic glutamatergic neurons may participate in the mediation of the hypothalamic action of leptin.

Estrogen-receptor in glutamatergic neurons

It is well known that estrogen bound to its receptors exerts numerous actions on the central nervous system (acts on the neuroendocrine system, sexual behaviour, cognitive functions, etc.). Using double immunohistochemival labelling, we demonstrated the presence of estrogen-receptor α in glutamatergic neurons of the medial preoptic area, hypothalamic ventromedial nucleus and in the medial amygdala (various percentages, most, about 40 per cent of double labelled neurons were detected in the ventromedial nucleus). The findings suggest that glutamatergic neurons containing

estrogen-receptor presumably may participate in the mediation of the estrogen actions on brain functions.

Androgen-receptor in glutamatergic neurons

We detected androgen-receptor in glutamatergic nerve cells of the hypothalamic ventromedial nucleus, the arcuate nucleus and the mamillary complex. The observations suggest that these neurons may be involved in the mediation of the action of androgen on the nervous system.

Publication:
J Kiss, Á Csáki, B Halász: Location of glutamatergic/aspartatergic neurons projecting to the hypothalamic ventromedial nucleus studied by autoradiography of retrogradely transported [^{3}H]D-aspartate. NEUROSCIENCE 176: pp. 210-224 (2011) IF: 3,215

We are presently working on two manuscripts in which we demonstrate for the first time the presence of estrogen-receptor α protein and androgen-receptor in glutamatergic neurons of the hypothalamus.

Teljes támogatás: 3000.000,- Ft

MIKRO RNS HÁLÓZATOK SZABÁLYOZÓ SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA AKUT VESEELÉGTELENSÉGBEN

Dr. Hamar Péter, egyetemi docens, MTA Doktora
Semmelweis Egyetem, Kórélettani Intézet

Tekintettel arra, hogy a keret 2009-ben év végén nyílt meg, a kutatási program 2010 januártól indult, a reagensek beszerzésével és metodikák beállításával. 2010-ben az ETT projekten dolgozó PhD hallgatók: Dr Kaucsár Tamás és Révész Csaba megtanulták és beállították a vese ischema-reperfúziójának egérmodelljét C57Bl6 egereken és a szükséges in-vitro metodikákat. Behatóan tanulmányoztuk a rendelkezésre álló irodalmi adatokat, annak felderítésére, hogy mely mikro RNSek (miR) játszhatnak szerepet a vese ischemia-reperfúziós károsodásában, melyről összefoglaló közleményünk jelent meg az „Advanced Drug Delivery Reviews" c. folyóiratban. Az irodalmi adatok alapján kiválasztott miR-ek közül 21-et luminex platformon vizsgálva 3 miR expressziójában találtunk jelentősebb eltérést. A Luminex platrofmon azonosított eltérő expressziót mutató mikro RNS-ek (miR-ek) expresszióját real time PCR metodikával validáltuk. Az ischemiás károsodás funkcionális mérőjeként beállítottuk a neutrofil gelatináz asszociálta lipokalin (NGAL) mérését vese-szövet homogeizátumból (mRNS) PCR, valamint vér-plazmából és vizeletből (fehérje) ELISA módszerrel. Az ischemiát követő reperfúziós károsodás jól követhető NGAL és szövettani vizsgálattal. A reperfúzió során megváltozott miRNS expresszió időbeli kinetikáját feltérképeztük. Az I.sz Patológiai Intézet (Krenács Tibor) együttműködésével szöveti mikro-array technika segítségével jelenleg a talált mikro RNS-ek által szabályozott apoptózis- és sejtproliferáció- szabályozó fehérje utakat vizsgáljuk. Eredményeinket 2012-ben fogjuk 2 közlemény formájában publikálni, melyek a projektben résztvevő PhD hallgatók: Kaucsár Tamás és Révész Csaba PhD fokozatának alapját képezik.

1. Hamar P, Wang M, Godo M, Kokeny G, Rosivall L, Ouyang N, Heemann U: Lupus nephritis reoccurs following transplantation in the lupus prone mouse. LUPUS 19:(2) pp. 175-181. (2010) IF: 2.600
2. Kokeny G, Nemeth Z, Godo M, Hamar P: The Rowett rat strain is resistant to renal fibrosis. NEPHROLOGY DIALYSIS TRANSPLANTATION 25:(5) pp. 1458-1462. (2010) IF: 3.564
3. Racz Z, Nagy E, Rosivall L, Szebeni J, Hamar P: Sugar-free, glycine-stabilized intravenous immunoglobulin prevents skin but not renal disease in the MRL/lpr mouse model of systemic lupus. LUPUS 19:(5) pp. 599-612. (2010) IF: 2.600
4. Buday A, Orsy P, Godo M, Mozes M, Kokeny G, Lacza Z, Koller A, Ungvari Z, Gross ML, Benyo Z, Hamar P: Elevated systemic TGF-beta impairs aortic vasomotor function through activation of NADPH oxidase-driven superoxide production and leads to hypertension, myocardial remodeling, and increased plaque formation in apoE(-/-) mice. AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-HEART AND CIRCULATORY PHYSIOLOGY 299:(2) pp. H386-H395. (2010) IF: 3.880
5. Kaucsar T, Racz Z, Hamar P: Post-transcriptional gene-expression regulation by mikro RNA (miRNA) network in renal disease. ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS 62:(14) pp. 1390-1401. (2010) IF: 13.577
6. Stokman G, Qin Y, Racz Z, Hamar P, Price LS: Application of siRNA in targeting protein expression in kidney disease. ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS 62:(14) pp. 1378-1389. (2010) IF: 13.577
7. Racz Z, Godo M, Hamar P: Immune activation and target organ damage are consequences of hydrodynamic treatment but not delivery of naked siRNAs in mice. NUCLEIC ACID THER. 21:(3) pp. 215-224. (2011) IF: 2.986
8. Fugmann T, Borgia B, Révész C, Godó M, Forsblom C, Hamar P, Holthöfer H, Neri D, Roesli C: Proteomic identification of vanin-1 as a marker of kidney damage in a rat model of type 1 diabetic nephropathy.: 80(3):272-81. KIDNEY INTERNATIONAL 80:(3) pp. 272-281. p. 9 (2011) IF: 6.105
9. Sara L, Antal P, Masszi G, Buday A, Horvath EM, Hamar P, Monos E, Nadasy GyL, Varbiro Sz: Arteriolar Insulin Resistance in a Rat Model of Polycystic Ovary Syndrome. Accepted. in FERTILITY AND STERILITY (2011) Dec 10. [Epub ahead of print] IF: 3.122

Teljes támogatás: 3000.000,- Ft

10. Révész Cs, Hamar P: Delivery methods to target RNAs in the kidney In: Gene Therapy Application. 2011 263-278 INTECH EDUCATION &PUBLISHING (ISBN:978-953-307-541-9)
11. Rácz Zs, Kaucsár T, Hamar P: The huge world of small RNAs: regulating networks of microRNAs Acta Physiologica Hungarica 98: pp. 243-254 (2011) IF: 1.226
12. Baintner K, Kocsis B, Kovács K, Péterfi Z, Kökény G, Hamar P: Interaction of concanavalin A with bacterial lipopolysaccharides in agarose gel. ACTA MICROBIOL. IMMUNOL. HUNG. 58: pp. 201-9 (2011) IF: 0.625

Konferencia előadás kivonatok:

1. Kaucsár T, Révész Cs, Godó M, Tarszabó R, Rácz Zs, Hamar P: MicroRNA expression pattern in renal ischemia-reperfusion injury RNAi & miRNA Europe 2011 poster 8-9 September 2011, Munich
2. Révész Cs, Kaucsár T, Rácz Zs, Godó M, Hamar P: Silencing oxidases with RNAi does not prevent renal ischemia/reperfusion injury in mice RNAi & miRNA Europe 2011 poster 8-9 September 2011, Munich

Budget: 3000,000.- HUF

INVESTIGATING THE REGULATORY ROLES OF MICRO RNA NETWORKS IN ACUTE RENAL FAILURE

Peter Hamar, MD, PhD, Dsc, associate professor
Semmelweis University, Institute of Pathophysiology

The project started in 2010 because the support has been initiated end of 2009. First we acquired reagents and set up methods. In 2010 two PhD students: Dr Tamás Kaucsár and Csaba Révész learned and established the rat model of renal ischemia-reperfusion in C57Bl6 mice, and the necessary in-vitro methods. We have investigated available literature to map micro RNAs (miRs) which are possibly involved in renal ischemia-reperfusion injury. We have published a review paper on this in the journal: Advanced Drug Delivery Reviews (IF: 12). 21 miRs identified by literature search were investigated on a luminex multiplex microbead platform, and 3 miRs demonstrated differential expression between ischemia-reperfusion and sham operated mice kidneys. As a functional measure of ischemia-reperfusion damage we established neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) determination from renal tissue homogenate (mRNA) with PCR and from blood-plasma and urine samples at the protein level with ELISA. Severity of ischemia-reperfusion damage was followed by NGAL and hitomorphologic investigations. We have mapped time-kinetics of the identified miRNAs during reperfusion. In collaboration with the 1st Department of Pathology (Dr Tibor Krenács) we currently investigate the apoptotic and cell-proliferation pathways controlled by the identified micro RNAs on tissue micro array (TMA). We have published our results at the RNAi and miRNA conference in Munich in 2011 and presently writing 2 manuscripts, planned to be published in 2012, which are the basis of the PhD thesis of Tamás Kaucsár and Csaba Révész.

1. Hamar P, Wang M, Godo M, Kokeny G, Rosivall L, Ouyang N, Heemann U: Lupus nephritis reoccurs following transplantation in the lupus prone mouse. LUPUS 19:(2) pp. 175-181. (2010) IF: 2.600
2. Kokeny G, Nemeth Z, Godo M, Hamar P: The Rowett rat strain is resistant to renal fibrosis. NEPHROLOGY DIALYSIS TRANSPLANTATION 25:(5) pp. 1458-1462. (2010) IF: 3.564
3. Racz Z, Nagy E, Rosivall L, Szebeni J, Hamar P: Sugar-free, glycine-stabilized intravenous immunoglobulin prevents skin but not renal disease in the MRL/lpr mouse model of systemic lupus. LUPUS 19:(5) pp. 599-612. (2010) IF: 2.600
4. Buday A, Orsy P, Godo M, Mozes M, Kokeny G, Lacza Z, Koller A, Ungvari Z, Gross ML, Benyo Z, Hamar P: Elevated systemic TGF-beta impairs aortic vasomotor function through activation of NADPH oxidase-driven superoxide production and leads to hypertension, myocardial remodeling, and increased plaque formation in apoE(-/-) mice. AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY-HEART AND CIRCULATORY PHYSIOLOGY 299:(2) pp. H386-H395. (2010) IF: 3.880
5. Kaucsar T, Racz Z, Hamar P: Post-transcriptional gene-expression regulation by mikro RNA (miRNA) network in renal disease. ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS 62:(14) pp. 1390-1401. (2010) IF: 13.577
6. Stokman G, Qin Y, Racz Z, Hamar P, Price LS: Application of siRNA in targeting protein expression in kidney disease. ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS 62:(14) pp. 1378-1389. (2010) IF: 13.577
7. Racz Z, Godo M, Hamar P: Immune activation and target organ damage are consequences of hydrodynamic treatment but not delivery of naked siRNAs in mice. NUCLEIC ACID THER. 21:(3) pp. 215-224. (2011) IF: 2.986
8. Fugmann T, Borgia B, Révész C, Godó M, Forsblom C, Hamar P, Holthöfer H, Neri D, Roesli C: Proteomic identification of vanin-1 as a marker of kidney damage in a rat model of type 1 diabetic nephropathy.: 80(3):272-81. KIDNEY INTERNATIONAL 80:(3) pp. 272-281. p. 9 (2011) IF: 6.105
9. Sara L, Antal P, Masszi G, Buday A, Horvath EM, Hamar P, Monos E, Nadasy GyL, Varbiro Sz: Arteriolar Insulin Resistance in a Rat Model of Polycystic Ovary Syndrome. Accepted. in FERTILITY AND STERILITY (2011) Dec 10. [Epub ahead of print] IF: 3,122
10. Révész Cs, Hamar P: Delivery methods to target RNAs in the kidney In: Gene Therapy Application. 2011 263-278 INTECH EDUCATION &PUBLISHING (ISBN:978-953-307-541-9)

11. Rácz Zs, Kaucsár T, Hamar P: The huge world of small RNAs: regulating networks of microRNAs Acta Physiologica Hungarica 98: pp. 243-254 (2011) IF: 1.226
12. Baintner K, Kocsis B, Kovács K, Péterfi Z, Kökény G, Hamar P: Interaction of concanavalin A with bacterial lipopolysaccharides in agarose gel. ACTA MICROBIOL. IMMUNOL. HUNG. 58: pp. 201-9 (2011) IF: 0.625

Congress abstracts:

1. Kaucsár T, Révész Cs, Godó M, Tarszabó R, Rácz Zs, Hamar P: MicroRNA expression pattern in renal ischemia-reperfusion injury RNAi & miRNA Europe 2011 poster 8-9 September 2011, Munich
2. Révész Cs, Kaucsár T, Rácz Zs, Godó M, Hamar P: Silencing oxidases with RNAi does not prevent renal ischemia/reperfusion injury in mice RNAi & miRNA Europe 2011 poster 8-9 September 2011, Munich

melléklet 475-06/2009 ETT beszámoló 7. pontjához Budget: 3 900 000.- HUF

MÓDSZEREK A VON WILLEBRAND FAKTOR ÉS HASÍTÓ ENZIME VASZKULÁRIS PATOGENETIKAI SZEREPÉNEK FELTÁRÁSÁRA TROMBOTIKUS TÖRTÉNÉSEKKEL IS JÁRÓ BETEGSÉGEKBEN

Hársfalvi Jolán[1], Papp Mária[2], Udvardy Miklós László[1], Nagy Előd[3], Szekeres Csiki Katalin[1], Batta Zoltán[1], Mendelboum Raviv, Shlomit[1]
[1]Klinikai Kutató Központ, [2]II. Belgyógyászati Klinika, Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum [3]Marosvásárhelyi Orvos és Gyógyszerészeti Egyetem, Románia

Sérüléskor a trombocita adhézió és aggregáció a sérült érfalhoz kötötten, jól szabályozott módon zajlik. Ekkor igen thrombogén, ultra nagy molekulatömegű von Willebrand faktor (VWF) áramlik ki az aktiválodott endotél sejtekből, amelyet az ADAMTS-13 enzim hasít. Ha ez a folyamat rosszul szabályozott, akkor lokálisan trombocita dús trombus mikrothrombusok képződnek, amelyek a keringésbe is juthatnak. A gyulladásos folyamatokban esetleg érintett artériák, arteriolák vagy a kapillárisok falán mikrotrombus képződhet amelynek szerepe lehet gyulladással is járó betegség patogenézisben és a progressziójában.
Nagy számú beteganyag feldolgozása folyamán gyulladásos markerek vizsgálata és a betegség stadiumával való öszevetése és karakterizálása történt. A haptoglobin fenotípus szerinti polimorfizmusa, lipopoliszacharid kötő fehérje, CD-14, mannóz kötő lektin mint a betegségek patomechanizmusáról adatokat szolgáltató új vizsgálatok kerültek alkalmazásra máj cirrhosis hepatis (n=352), Crohn betegség (n=645), colitis ulcerosa esetén (n=493). A VWF és az ADAMTS-13 szintjét és aktivitását is mértük ezeknek a betegeknek a plazmáiból, az általunk beállított és magas magas VWF szintek esetén is jól mérő módszerekkel [1-3]. Mivel a fenti betegségekben, különösen a cirrhosis esetén igen magas a plazma VWF antigén szintje és aktivitása, szükségessé vált ezekre a módszerekre a minőségi követelmények kiterjesztése is. A VWF paraméterek változása, az ADAMTS-13 és a gyulladással is járó betegségek klinikai megjelenése, lefolyása és a kezelése közötti összefüggés elemezése, a betegségek aktivitásával történő összevetése folyamatban van.
Mivel a plazma szintek nem feltétlenül jellemzik a lokális folyamatokat, ezért a haptoglobint és a VWF-t biopsziás mintákból is meghatároztuk, mRNS analízissel egyidejűleg. Az eredményeket humán köldökvénából származó endotél sejtek szintjeihez hasonlítottuk. SDS-akrilamid gél és immunoblott valamint denzitometria alkalmazásával a protein meghatározás jól detektálta a haptoglobin jelenlétét, a VWF-t azonban alig vagy nem jelezte. Egyezett ezzel az mRNS vizsgálatok eredménye is. Ezen vizsgálatokat kiterjesztettük műtéti anyagból származó mintákra, amelyeknek az analízise szintén folyamatban van.
Összefoglalva, a pályázatban vállalt módszerek kidolgozása, validálása és azok folyamatos minőségellenőrzési módszerének kidolgozása is megtörtént.

1. Udvardy, M.L., K. Szekeres-Csiki, and J. Harsfalvi, *Novel evaluation method for densitometric curves of von Willebrand factor multimers and a new parameter (M(MW)) to describe the degree of multimersation.* Thromb Haemost, 2009. **102**(2): p. 412-7. IF: 4,451
2. Szanto, T., K. Vanhoorelbeke, G. Toth, A. Vandenbulcke, J. Toth, W. Noppe, H. Deckmyn, and J. Harsfalvi, *Identification of a VWF peptide antagonist that blocks platelet adhesion under high shear conditions by selectively inhibiting the VWF-collagen interaction.* J Thromb Haemost, 2009. **7**(10): p. 1680-7. IF: 6,069
3. Mendelboum Raviv, S., K. Szekeres-Csiki, A. Jenei, J. Nagy, B. Shenkman, N. Savion, and J. Harsfalvi, *Coating conditions matter to collagen matrix formation regarding von Willebrand factor and platelet binding.* Thromb Res, 2011. IF: 2,372

melléklet 475-06/2009 ETT beszámoló 7. pontjához Budget: 3 900 000.- HUF

METHODS TO EXPLORE THE POSSIBLE ROLE OF VON WILLEBRAND FACTOR AND ITS CLEAVING PROTEASE IN THE VASCULAR PATHOGENESIS OF DISEASES WITH THROMBOTIC EPISODES

Jolán Hársfalvi[1], Mária Papp[2], Miklós László Udvardy[1], Előd Nagy[3], Katalin Szekeres Csiki[1], Zoltán Batta[1], Shlomit Mendelboum Raviv[1]
[1]Clinical Research Center, [2]Second Department of Internal Medicine, University of Debrecen Medical and Health Science Centre; [3]University of Medicine and Pharmacy of Targu Mures

Platelet adhesion and aggregation on injured vessel walls remain mural and limited, or evolve into an occlusive thrombus after endothelial cell denudation, depending on local conditions. An inflammatory process might result in endothelial damage. The disruption of the constant balance between the release of ultra-large forms of the von Willebrand factor (VWF) from the activated endothelial cells and its processing by the cleaving protease, ADAMTS-13, result in platelet rich thrombi. Microthrombi formation at the level of arterial or capillary circulation are known features of inflammatory diseases and thought to be involved in disease pathogenesis and progression, too.
We have measured markers of inflammation and correlated them with the disease state in the case of a large number of patients. Phenotypic polymorphism of haptoglobin, lipopolysaccharide-binding protein, CD-14, mannose-binding lectin were applied as markers providing new information about the patomechanism and activity of the disease state in liver cirrhosis (n=352), Crohn's disease (n=645), Ulcerative colitis (n=493).
Quantity (antigen levels), activity and multimer distribution of VWF and ADAMTS-13 was measured from plasma of the patients too. We evaluated these methods and modified them for high level of VWF [1-3]. The level and activity of VWF is high in the diseases listed above, especially in case of liver cirrhosis. Quality requirements were extended by the preparation of high VWF control material and alternative calibration by using master curves constructed from data of pooled control plasma.
The analysis of the correlation between parameters of VWF, ADAMTS-13 and the clinical presentation of the disease and response to treatment, disease activity is in progress.
Plasma levels may not represent the local conditions, so we developed methods including messenger RNA to quantitate haptoglobin and VWF in biopsy samples. Results were compared to the levels in endothelial cells of human umbilical vein. SDS-acrylamide gel electrophoresis, immunoblot and densitometry detected well the haptoglobin, but hardly detected any VWF in the mucosal biopsy samples. The mRNA results correlated with this finding. Biopsy specimens collected from surgical resection were analysed too. Results are under confirmation.
In summary, methods were developed in this project, as planned and validation of the methods was completed along with proper quality control implementation.

1. Udvardy, M.L., K. Szekeres-Csiki, and J. Harsfalvi, *Novel evaluation method for densitometric curves of von Willebrand factor multimers and a new parameter (M(MW)) to describe the degree of multimersation.* Thromb Haemost, 2009. **102**(2): p. 412-7. IF: 4,451
2. Szanto, T., K. Vanhoorelbeke, G. Toth, A. Vandenbulcke, J. Toth, W. Noppe, H. Deckmyn, and J. Harsfalvi, *Identification of a VWF peptide antagonist that blocks platelet adhesion under high shear conditions by selectively inhibiting the VWF-collagen interaction.* J Thromb Haemost, 2009. **7**(10): p. 1680-7. IF: 6,069
3. Mendelboum Raviv, S., K. Szekeres-Csiki, A. Jenei, J. Nagy, B. Shenkman, N. Savion, and J. Harsfalvi, *Coating conditions matter to collagen matrix formation regarding von Willebrand factor and platelet binding.* Thromb Res, 2011. IF: 2,372

Támogatás 4 500 000 Ft

A GLICIN TRANSZPORTER-1 GÁTLÓK LEHETSÉGES ALKALMAZÁSA A RETINA NEURODEGENERATIV KÓRKÉPEINEK KEZELÉSÉBEN

Hársing László Gábor
Semmelweis Egyetem, Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet

Kisérleteinkben csirke és patkány látóhártyát tartalmazó hátsó szemserleget használtunk hipoxiás és energia-hiányos állapot hatásának vizsgálatára a retina ingerületátviteli folyamataiban. Ezen kisérleti körülmény modellként szolgál a retina különböző neurodegenerativ megbetegedéseihez, mint amilyen a glaucoma, a retina artériás keringési rendellenességei, a nervus opticus neuropathiája illetve a macula degeneráció. Ezek a kórképek népbetegség jelleggel, magas gyakorisággal fordulnak elő időskori szemészeti megbetegedésekben és a látás csökkenéséhez illetve elvesztéséhez vezethetnek. Ezen kórfolyamatokban az N-metil-D-aszpartát (NMDA) tipusú glutamát receptorok aktiválódása elsődleges, amelyet a kórképekre jellemző fokozott glutamát felszabadulás vált ki. Az NMDA receptorok aktiválódásához a koagonista glicin jelenléte is szükséges, amelynek felszabadulása a retinában a glicinerg amakrin sejtekből illetve a Müller-féle glia sejtekből történhet. A glicin felszabadulását elsődlegesen a glicin transzporter-1 (GlyT-1) működése szabályozza normál és hipoxiás körülmények között. Kérdésfelvetésünk az volt, hogy kémiai ágensekkel kiváltott GlyT-1 forditott irányú működésgátlásra bekövetkező glicin felszabadulás csökkenés neuroprotektiv hatást eredményez-e a retinában.

Csirke és patkány retina készitményt [3H]glicin vagy [3H]glutamát jelenlétében inkubáltunk, amely során a radioaktiv aminosav neurotranszmitterek a szövet által felvételre kerülnek. Ezt követően a szöveteket szuperfúziós szervedénybe helyeztük, szuperfundáltuk és meghatároztuk a [3H]glicin vagy [3H]glutamát felszabadulás mértékét. Hipoxiás és energia hiányos állapotot a szuperfuzios pufferből történő oxigén és glukóz elhagyással hoztunk létre vizsgált anyagok jelenlétében és hiányában. Megállapitottuk, hogy

1. A glicin felszabadulás történik csirke és patkány retinából elektromos ingerlésre illetve glicinnel illetve szarkozinnal kiváltott homo- és heteroexchange mechanizmusokkal.
2. Hipoxia és energia deficiens állapot glicin és glutamát felszabadulást vált ki izolált retina készitményben. A két neurotranszmitter egyidejű felszabadulása az NMDA receptorok hiperaktiválódását eredményezi. Ez fokozott Ca2+ beáramláshoz vezet a sejtekbe és a fellépő patológiás enzimfoszforilációs folyamatok apoptozis megindításához és sejthalálhoz vezethetnek.
3. A GlyT-1 gátlók csökkentették a hipoxia/energia deficiens állapot által kiváltott glicin felszabadulás mértékét. Az NMDA receptor koagonista glicin felszabadulásának gátlása a hipoxiás állapotokat jellemző hiperaktiv glutamáterg neurokémiai transzmisszió csökkenéséhez vezet. Ezen folyamat a retina neuronhálozatának védelmét jelentheti hipoxiás/energia deficiens állapotokban. Az általunk megfigyelt jelenség klinikai jelentőségét a retina potenciális neuroprotekcióját és a látóhártyában a degenerativ folyamatok felfüggesztését illetve lassulását eredményezheti.
4. A neuroprotektiv hatásnak tekintett, hipoxiával kiváltott glicin felszabadulás gátlást nem-transzportálódó, szarkozint tartalmazó (Org-24461, Brown és mtsai., 2001 és NFPS, Herdon és mtsai., 2001) és szarkozint nem-tartalmazó (Merck 13-h, Lindsley és mtsai., 2006)

GlyT-1 gátlókkal egyaránt kimutattuk, a hipoxiával kiváltott glicin felszabadulás gátló hatás korrelált a GlyT-1 gátló hatással.

5. Kémiai szintézissel megváltoztattuk a referens GlyT-1 gátló NFPS vegyület szerkezetét és új tipusú, szabadalmaztatható vegyületeket állitottunk elő. Ezek a vegyületek kémiai és biológiai sajátságaiknál fogva alkalmasak lehetnek a retina hipoxia/energia deficiens állapotainak befolyásolására.

Megfigyeléseinket két irányba kivánjuk folytatni:

1. tovább vizsgáljuk a hipoxia hatását a retina neuronhálózatának működésére;
2. olyan új tipusú, szabadalmaztatható GlyT-1 gátlókat kivánunk kifejleszteni, amelyek potenciálisan klinikai alkalmazhatóságot tesznek lehetővé a retina neurodegenerativ kórképeiben. Ide tartozhatnak az általunk felismert, piridazinon gyűrűt tartalmazó GlyT-1 gátló vegyületek.

Irodalom

(1) Nagy K, Marko B, Zsilla G, Matyus P, Pallagi K, Szabo G, Juranyi Z, Barkoczi J, Harsing LG Jr: Alterations in brain extracellular dopamine and glycine levels following combined administration of the glycine transporter type-1 inhibitor Org-24461 and risperidone. NEUROCHEMICAL RESEARCH 35: pp. 2096-2106 (2010) IF: 2,608

(2) Harsing LG Jr, Albert M, Matyus P, Szenasi ' G: Inhibition of hypoxia-induced [^{3}H]glycine release from chicken retina by the glycine transporter type-1 (GlyT-1) inhibitors NFPS and Org-24461. EXPERIMENTAL EYE RESEARCH 94: pp. 6-12 (2012) IF: 3,037

(3) Harsing LG Jr, Zsilla G, Matyus P, Nagy KM, Marko B, Gyarmati Zs, Timar J: Interactions between glycine transporter type 1 (GlyT-1) and some inhibitor molecules. ACTA PHYSIOLOGICA HUNGARICA 99: pp. 1-17 (2012) IF: 0,75

(4) Harsing LG Jr, Szabo G, Barkoczy J, Matyus P: A new series of sarcosine-containing glycine transporter-1 (GlyT1) inhibitors. SFN, San Diego, Abstr. 547.6 (2010)

(5) Harsing LG Jr, Hanuska A, Matyus P: Reversal of hypoxia-induced [3H]glycine release from isolated retina by glycine transporeter type-1 (GlyT-1) inhibitors. SFN, Washington, D. C., Abstr. 62.10 (2011)

Budget 4 500 000 HUF

THE POTENTIAL USE OF GLYCINE TRANSPORTER TYPE-1 INHIBITORS IN THE TREATMENT OF THE NEURODEGENERATIVE DISORDERS OF THE RETINA

Laszlo G. Harsing, Jr.
Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Semmelweis University

We have used isolated retinas prepared from chicken and rat eyes to investigate the effect of hypoxia and energy deficiency on retinal neurochemical transmission. This experimental condition serves as a useful model of various neurodegenerative disorders of the retina such as glaucoma, insufficient arterial circulation of the eye, neuropathy of the optic nerve or degeneration of the macula. These disorders frequently occur in the elderly resulting in decreased sight ability or even blindness. Pathological activation of the ionotropic N-methyl-D-aspartate (NMDA) glutamate receptors is characteristic for these illnesses, which is due to an excessive increase in the release of the excitatory neurotransmitter glutamate. The presence of the allosteric modulator glycine, which is released from glycinergic amacrine cells or Muller glia cells of the retina, is also necessary for activation of NMDA receptors. The release of glycine in the retina is primarily regulated by the glycine transporter type-1 (GlyT-1) in physiological and pathological conditions. The aim of our study was to determine whether inhibition of the reverse mode operation of GlyT-1, which leads to decrease in glycine synaptic efflux, possesses neuroprotective effect in the neuronal circuitry of the retina.

We have prepared retinal tissues from chicken or rat eyes and incubated in the presence of [3H]glycine or [3H]glutamate then the tissues were transferred into superfusion chambers and superfused. The release of radioactive glycine or glutamate from isolated retinas was determined. Hypoxic and energy deprivation state was induced by omission of oxygen and glucose from the superfusion buffer in the presence and absence of various GlyT-1 inhibitors. Our findings are the following:

1. Glycine can be released from isolated chicken retina by electrical stimulation or by homo- and heteroexchange mechanisms induced by glycine and sarcosine, respectively.
2. Hypoxia induces glycine release from isolated chicken retina and this effect can be inhibited by the GlyT-1 inhibitors. This effect was observed when either the sarcosine-containing Org-24461 ((Brown et al., 2001)) and NFPS (Herdon et al., 2001) or the non-sarcosine based Merck13-h (Lindsley et al., 2006) transporter inhibitors were used in both chicken and rat retinas. The rate of hypoxia-induced glycine release inhibition correlated with the GlyT-1 inhibitory potency of the compounds.
3. Inhibition by GlyT-1 blockers of glycine release in hypoxia decreases the coagonist glycine concentrations at NMDA receptors, which then may reduce overactive glutamatergic transmission in ischemia.
4. A novel series of GlyT-1 inhibitors were synthesized by alteration of the chemical structures of the sarcosine-based NFPS and the nonsarcosine-based Merck 13-h. These compounds may have therapeutic values in treatment of the various neurodegenerative disorders of the retina.

We intend to continue our investigations in two directions:

(i) the neurodegenerative mechanism of hypoxia on neuronal circuitry of the retina,

(ii) development of novel, patentable compounds for inhibition of retinal GlyT-1. Our newly synthesized molecules containing pyridazinone ring may have a choice for this purpose.

References

(1) Nagy K, Marko B, Zsilla G, Matyus P, Pallagi K, Szabo G, Juranyi Z, Barkoczi J, Harsing LG Jr: Alterations in brain extracellular dopamine and glycine levels following combined administration of the glycine transporter type-1 inhibitor Org-24461 and risperidone. NEUROCHEMICAL RESEARCH 35: pp. 2096-2106 (2010) IF: 2,608

(2) Harsing LG Jr, Albert M, Matyus P, Szenasi ' G: Inhibition of hypoxia-induced [^{3}H]glycine release from chicken retina by the glycine transporter type-1 (GlyT-1) inhibitors NFPS and Org-24461. EXPERIMENTAL EYE RESEARCH 94: pp. 6-12 (2012) IF: 3,037

(3) Harsing LG Jr, Zsilla G, Matyus P, Nagy KM, Marko B, Gyarmati Zs, Timar J: Interactions between glycine transporter type 1 (GlyT-1) and some inhibitor molecules. ACTA PHYSIOLOGICA HUNGARICA 99: pp. 1-17 (2012) IF: 0,75

(4) Harsing LG Jr, Szabo G, Barkoczy J, Matyus P: A new series of sarcosine-containing glycine transporter-1 (GlyT1) inhibitors. SFN, San Diego, Abstr. 547.6 (2010)

(5) Harsing LG Jr, Hanuska A, Matyus P: Reversal of hypoxia-induced [3H]glycine release from isolated retina by glycine transporeter type-1 (GlyT-1) inhibitors. SFN, Washington, D. C., Abstr. 62.10 (2011)

A GDF-15 ÉS A TGF-β CSALÁD TAGJAINAK JELENTŐSÉGE A SUGÁRVÁLASZBAN ÉS A DAGANAT TERÁPIÁBAN

Hegyesi Hargita[1], Sándor Nikolett[1], Schilling Tóth Boglárka[1], Sáfrány Géza[1], Kahán Zsuzsanna[2], Varga Zoltán[2]
[1]OSSKI, Molekuláris Sugárbiológia és Biodozimetria Osztály, [2]SZTE, Onkoterápiás Klinika

Ahhoz, hogy további betekintést nyerhessünk a besugárzás okozta megváltozott növekedési faktorok expressziója és a késői sugárkárosodások között, a jelenlegi kutatás azt tűzte ki célul, hogy megvizsgáljuk a sugárzás indukált TGF-β és az ebbe a szupercsaládba tartozó GDF-15 szint változás kapcsolatát a késői fibrótikus mellékhatások kialakulásával emlő tumorban. Korábbi tanulmányokban már kimutatták, hogy a prosztaglandin szintézis nő besugárzás hatására a daganatokban, és ennek gátlása nem szteroid gyulladáscsökkentők (NSAIDs) alkalmazásával fokozza sugárzás daganatellenes hatását. Eredetileg Baek munkacsoportja fedezte fel, hogy a GDF-15 (NAG-1, NSAID-aktivált gén), ciklooxigenáz (COX) gátlók és más kemopreventív szerek által szabályozott gén. Ez adta a logikai kapcsolatot a kutatás kiterjesztéséhez, hogy megvizsgáljuk a sugárzás indukált GDF-15 szerepét, diclofenakkal kombinált kezelésben is. Ezért, mértük a diclofenac és a besugárzás hatását a tumor növekedésre, és követtük a tumor szövetben valamint a szérumban a GDF-15 és TGF-β1 expressziót egér emlő tumor modellben.
Korábban már kimutattuk, hogy a besugárzás dózisfüggően növeli a GDF-15 és az urokináz plasminogén aktivátor (uPA) expresszióját in-vitro. A sugárzás indukált GDF-15 emelkedésével arányosan a TGF-β1-downregulációját figyeltük meg.
A jelenlegi eredményeink szerint, a GDF-15 expresszió emelkedése fokozza a sugárrezisztenciát. Egér modellben azt mutattuk ki, hogy az RNS interferenciával gátolt, GDF-15 hiányos daganatsejtek sugárérzékenyebbek. Szintén kimutattuk, hogy a GDF-15-nek citoprotektív szerepe van és ellenállóbbá teszi a sejteket a sugárkezelésre a fokozott GDF-15- termelésre képes (teljes cDNS-t expresszáló) tumor sejtekben.
A besugárzás hatására a GDF-15 expresszió emelkedésével arányosan csökkent a TGF-β1-é. Diclofenac és kombinált kezelés hatására viszont expressziója emelkedett. A tumorméret növekedés gátlása a kombinált kezelést kapott csoportban volt a legeredményesebb. Eredményeink sugallják azt a mechanizmust, miszerint a diclofenak sugárérzékenyítő hatása a GDF-15 által gátolt TGF-β1 felszabadításán keresztül is megvalósulhat.
A kezelt állatok szérum mintáiból 24 citokin/kemokin mennyiségét mértünk. Az IL-10 expresszió jelentősen nőtt mind a diklofenak kezelt, mind a besugárzott csoportban, míg ezekben, a CXCL-12 csökkent. A kombinált kezelést kapott csoportban az IL-1-α és –β, a MIP-1α, TNF-α, és az IL-6 szintje nőtt meg.
A klinikai vizsgálatban korai stádiumban lévő emlő tumoros betegekben követtük a GDF-15 és TGF-β2 szérumszint változását. 23 páciensből mértük a szolúbilis TGF-β2 és GDF-15 mennyiséget a besugárzás előtt, a besugárzás után három héttel, hét héttel és négy hónappal később. A besugárzást követően 21 nappal később a betegek felében a GDF-15 expresszió 40%-al nőtt, míg a betegek 25%-ában a szint 80%-kal emelkedett. A GDF-15 mennyisége négy hónappal később a legtöbb betegben visszaállt az eredeti mértékre. A TGF-β2 szint emelkedését csak 7 héttel a besugárzás után tapasztaltuk a betegek 20%-ában. A klinikai paraméterek kiértékelése és a fibrózis kapcsolata a molekuláris markerekkel, még folyamatban van.
Eredményeink szerint ennek a két citokinnek nagy jelentősége lehet a szöveti átrendeződés folyamatában, melynek legismertebb jelensége a fibrózis és a kardiomiocita átalakulás.

Boglárka S T, Nikolett S, Enikő K, Munira K, Géza S, Hargita H: **Analysis of the common deletions in the mitochondrial DNA is a sensitive biomarker detecting direct and non-targeted cellular effects of low dose ionizing radiation.** MUTATION RESEARCH 716: pp.33-39 (2011) IF:3,204

SIGNIFICANCE OF GDF-15 AND THE MEMBERS OF TGF-B FAMILY ON RADIORESPONSE AND TUMOR THERAPY

Hargita Hegyesi[1], Nikolett Sándor[1], Boglárka Schilling Tóth[1], Géza Sáfrány[1], Zsuzsanna Kahán[2], Zoltán Varga[2]
[1]NRIRR Division of Molecular Radiobiology and Biodosimetry, [2]SZTE, Dept of Oncotherapy

To obtain further insight into alterations of growth factors associated with side effect and irradiation, the aim of the present study was to investigate the long-term effects of radiation-induced alterations of TGF-β and the superfamily members GDF-15 with respect to the therapeutic response and the development of late fibrotic damage in the irradiated breast tumor. Also, in earlier findings was shown that prostaglandin synthesis is increased in cancer tissues following irradiation and inhibiting prostaglandin synthesis with NSAIDs can potentiate the antitumor effects of irradiation. Originally discovered by Baek's group, GDF-15 (NAG-1; NSAID-activated gene) is an important gene regulated by a number of cyclooxygenase (COX) inhibitors and chemopreventive chemicals. These provides the rationale for conducting studies to investigate the role of irradiation induced GDF-15 in tumor responses and the potential benefit of combining a COX inhibitor diclofenac with radiation. Therefore we studied of the influence of diclofenac and irradiation on the expression of GDF-15 and TGF-β and we followed the tumor growth in a mouse breast cancer model.
Previously we demonstrated that the irradiation increase dose dependently the expression of GDF-15, and urokinase plasminogene activator (uPA) in in-vitro. Elevation of irradiation induced expression of GDF-15 is associated with down regulation of TGF-β1. In the present study, we obtained that GDF-15 increases radioresistance in-vitro. In mouse model we demonstrated that down regulated GDF-15 by RNA interference improves the radiosensitivity of the tumor. Also, overexpression of GDF-15 (with full length GDF-15 cDNA vector) has been shown to supply important cytoprotective roles and resistance to radiation treatments. Irradiation alone resulted increase in GDF-15 production associated with inhibition of TGF-β1 in tumor tissue. Expression of TGF-β1 increased markedly after treatment with diclofenac alone or in combination with irradiation. Compared to mice treated with diclofenac and radiation, mean tumor volume decreased significantly in mice treated with diclofenac alone. We propose a potential mechanism by which enhancement of radioresponse with diclofenac in tumors occurs through inhibition of GDF-15 mediated silencing of TGF-β1 production. Relative level of 24 cytokine from the blood sample was measured by cytokine array. Expression of IL-10 significantly elevated in the irradiated and the diclofenac treated group, while the level of CXC-12 decreased in both group compared to those in the control. Level of IL-1α and-β, MIP-1α, TNF-α and IL-6 was highly elevated in the serum sample obtained from treated animal with irradiation and diclofenac together.
In the clinical study, we examined the circulating levels of TGF-β2 and soluble GDF-15 in pre and post-radiotherapy serum samples from early-stage breast cancer patients. Twenty-three patients were included in the study and circulating levels of the GDF-15 and TGF-β2 were measured before the treatment, three weeks after radiation treatment (RT) at seven weeks and four months after radiotherapy. At 21 days post-irradiation, GDF-15 was increased by approximately 40% in half of the patient and by 80% in the 25% of patient. Level of GDF-15, was returned to the background at four month after RT. The level of TGF-β2 increased gradually 20% of the patient from seven weeks after RT. The evaluation of the clinical parameters and its association with these two molecular markers with the late fibrotic damage is still in progress. These two mediators might, thus, play a role in tissue remodelling process given their known effects on fibrosis and cardiomyocyte remodeling.

Schilling-Tóth B, Sándor N, Kis E, Kadhim M, Sáfrány G, Hegyesi H: **Analysis of the common deletions in the mitochondrial DNA is a sensitive biomarker detecting direct and non-targeted cellular effects of low dose ionizing radiation.** MUTATION RESEARCH 716: pp.33-39 (2011) IF:3,204

Teljes támogatás: 4.800.000,- Ft

A TRANZIENS RECEPTOR POTENCIÁL VANILLOID 1 (TRPV1) IONCSATORNA, SZENZOROS NEUROPEPTIDEK ÉS RECEPTORAIK SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA KRÓNIKUS BRONCHITISZBEN ÉS ARTRITISZBEN

Helyes Zsuzsanna[1], Szolcsányi János[1], Pintér Erika[1], Molnár F. Tamás[2], Szántó Zalán[2], László Terézia[3], Varecza Zoltán[4], Elekes Krisztián[1], Sütő Balázs[5]
PTE, ÁOK, [1]Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet, [2]Sebészeti Klinika, [3]Patológiai Intézet, [4]Immunológiai és Biotechnológiai Intézet, [5]Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Intézet

1. Tüdő- és ízületi műtétek során, valamint szeptikus betegekben a plazma szomatosztatin koncentrációjának szignifikáns emelkedését mutattuk ki *(Peptides 31:1208-12, 2010).* Endotoxinnal kiváltott légúti gyulladás egérmodelljében bizonyítottuk, hogy a tüdő kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződéseiből felszabaduló **szomatosztatin** a 4-es receptoron (**sst_4**) keresztül gátolja a gyulladást és a következményes hiperreaktivitást (*Proc. Nat. Acad. Sci. 106:13088-93. 2009*). Az sst_4 jelenlétét molekuláris biológiai (qRT-PCR), western blot és immunhisztokémiai módszerekkel bizonyítottuk egér- és emberi tüdőben a hörgők hámsejtjein, az erek és a hörgők simaizomsejtjein, a kötőszöveti és gyulladásos sejteken. Akut és krónikus légúti gyulladás modellekben egérben, valamint dohányzáshoz kapcsolt krónikus gyulladásban emberben jelentős expresszió-fokozódást tapasztaltunk (*J. Histochem. Cytochem. 57:1127-37, 2009).* Eredményeink alapján az sst_4 receptor gyógyszerfejlesztési szempontból is ígéretes gyulladáscsökkentő célmolekula lehet *(Curr. Top. Med. Chem. 11:253-63, 2011).*

2. A szomatosztatinnal rokon szerkezetű kortisztatin a neurogén gyulladásos mechanizmusokat a szomatosztatinhoz hasonlóan, azonban a sejtes komponenseket hatékonyabban gátolja, amely eltérő receptoriális hatásokra utal (*J. Mol. Neurosci.* DOI 10.1007/s12031-011-9577-4, 2011).

3. Bizonyítottuk, hogy az endotoxinnal kiváltott tüdőgyulladás és hiperreaktivitás prepro**tachykinin** A (TAC1) génhiányos egerekben (P-anyag és neurokinin A hiányában) szignifikánsan csökken. Ezzel szemben neurokinin 1 (NK1) receptor hiánya nem befolyásolja a szövettani elváltozásokat, a mieloperoxidáz-aktivitást és a válaszkészség-fokozódást, azonban a gyulladásos citokinek tüdőbeli koncentrációja emelkedik *(Neuropeptides 44:399-406, 2010).*

4. Bizonyítottuk a Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid 1 (**TRPV1**) ioncsatornák jelentőségét a térdízületi proteáz-aktivált receptor 2 (PAR2) stimulációval kiváltott mechanikai fájdalomküszöb-csökkenésben, valamint a spontán fájdalom kialakulásában (*Eur. J. Pain 14:351-8. 2010).* Ezzel szemben a TRPV1 tónusos stimulációja protektív hatással rendelkezik egér bélgyulladás modellben *(J. Mol. Neurosci. 42:80-8. 2010).* Elsőként igazoltuk, hogy a különböző agonisták okozta TRPV1 aktivációban eltérő szerepe van a plazmamembránok lipid raftjainak és hatásuk a receptorok mikrokörnyezetétől is függ *(Eur. J. Pharmacol. 628:67-74, 2010).* A lutein valószínűleg a membránba épülve, a lipid raftok módosításán keresztül gátolja a szenzoros neuropeptidek TRP-aktivációval kiváltott felszabadulását az idegvégződésekből, és a következményes neurogén gyulladásos folyamatokat *(J. Mol. Neurosci. DOI:10.1007/s12031-011-9525-3, 2011).*

5. A hipofízis adenilát cikláz-aktiváló polipeptid (PACAP) fájdalom-transzmisszióra kifejtett perifériás hatásai a mechanizmustól és a hatás célsejtjeitől függően eltérőek: az ízületben fokozza, a talpban csökkenti a fájdalomérző idegvégződések aktivációját *(Pain 141:143-150, 2009).* PACAP génhiányos egerekben jelentősen csökkent fájdalomelhárító reakciót és mechanikai hiperalgéziát tapasztaltunk számos fájdalom-modellben, azonban a termális hiperalgézia fokozódott. Eredményeink e neuropeptid centrális fájdalomkeltő, azonban perifériás analgetikus hatásait bizonyítják *(Neuropeptides 44:363-71, 2010).* A PACAP gátló szerepét légúti gyulladásban *(Peptides 32:1439-46, 2011),* a migrénben szerepet játszó trigeminovaszkuláris aktivációban *(Neurobiol. Dis. 45:633-44. 2012; Peptides in press),* valamint allergiás kontakt dermatitisz *(J. Mol. Neurosci. 42:443-9, 2010)* modellekben is bizonyítottuk. Elsőként mutattuk ki a PACAP-38 jelenlétét tömegspektrometriával emberi és állati plazmában, valamint anyatejben, a peptid koncentrációját radioimmunassay módszerrel mértük. A tejben a plazmakoncentráció többszörösét detektáltuk *(Eur. J. Endocrinol. 160:561-5, 2009; Gen. Comp. Endocrinol. 172:115-9, 2011).*

Budget: 4.800.000.- HUF

INVESTIGATING THE ROLE OF THE TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL VANILLOID 1 (TRPV1) ION CHANNEL, SENSORY NEUROPEPTIDES, AND THEIR RECEPTORS IN CHRONIC BRONCHITIS AND ARTHRITIS

Zsuzsanna Helyes[1], János Szolcsányi[1], Erika Pintér[1], Tamás F. Molnár[2], Zalán Szántó[2], Terézia László[3], Zoltán Varecza[4], Krisztián Elekes[1], Balázs Sütő[5]
University of Pécs, Faculty of Medicine, Departments of [1]Pharmacology and Pharmacotherapy, [2]Surgery, [3]Pathology, [4]Immunology and Biotechnology, [5]Anesthesiology and Intensive Care

1. We showed that plasma concentrations of somatostatin significantly increase during lung and joint operations, as well as under severe systemic inflammatory condition in patients with sepsis *(Peptides 31:1208-12, 2010).* We proved that somatostatin released from the capsaicin-sensitive sensory nerve endings in the lung inhibits inflammation and hyperreactivity through somatostatin receptor subtype 4 (sst_4) in the endotoxin-induced mouse pneumonia model (*Proc. Nat. Acad. Sci. 106:13088-93. 2009*). The presence of sst_4 was detected by molecular biological (qRT-PCR), Western blot and immunhistological methods on bronchial epithelial cells, vascular and bronchial smooth muscle cells, inflammatory and connective tissue cells in both human and mouse lungs. Highly increased sst_4 expression was detected in the acutely and chronically inflamed airways of mice, as well as in the human lung obtained from smoking-induced chronic bronchitis patients (*J. Histochem. Cytochem. 57:1127-37, 2009).* According our results, sst_4 might be a promising target molecule for developing novel anti-inflammatory drugs *(Curr. Top. Med. Chem. 11:253-63, 2011).*
2. Cortistatin, a somatostatin-related peptide, inhibits neurogenic inflammation similarly to somatostatin, but its inhibitory effect on the cellular inflammatory components is greater. These data might be explained by different receptor-activating mechanisms, as well as actions at presently not identified receptors (*J. Mol. Neurosci.* DOI 10.1007/s12031-011-9577-4, 2011).
3. We demostrated that endotoxin-induced pneumonia and hyperreactivity was decreased in preprotachykinin A (TAC1) gene-deficient mice (abscence of substance P and neurokinin A). In contrast, the absence of the neurokinin 1 receptor (NK1) does not influence the histopathological alterations, myeloperoxidase activity and responsiveness, but increases the concentration of inflammatory cytokines *(Neuropeptides 44:399-406, 2010).*
4. We proved the involvement of the Transient Receptor Potencial Vanilloid 1 (TRPV1) ion channels in protease-activated receptor 2 (PAR2) stimulation-induced mechanical hyperalgesia and spontaneous pain of the knee joint (*Eur. J. Pain 14:351-8. 2010).* Moreover, tonic stimulation of TRPV1 results in protective effects in an inflammatory bowel disease model of mice *(J. Mol. Neurosci. 42:80-8. 2010).* We were the first to show that lipid rafts (microdomains) of the plasma membrane play different roles in the activation of TRPV1 caused by distinct agonists, and the activation of the ion channels depend on the surrounding microenviroment *(Eur. J. Pharmacol. 628:67-74, 2010).* Lutein inhibits the release of sensory neuropeptides from activated sensory nerve endings and consequent neurogenic inflammatory processes, presumably by modifying the lipid rafts around the TRP channels *(J. Mol. Neurosci. DOI:10.1007/s12031-011-9525-3, 2011).*
5. The peripheral effects of Pituitary Adenylate-Cyclase Activating Polypeptide (PACAP) on pain transmission depend on the mechanisms and the type of the target cells: it sensitizes the nociceptive nerve endings in the joint, but inhibits their activation in the paw *(Pain 141:143-150, 2009).* We proved central pronociceptive and peripheral analgesic affects of this neuropeptide in several pain models. We also described a potent inhibitory role of PACAP in airway inflammation *(Peptides 32:1439-46, 2011),* in trigeminovascular activation involved in migraine *(Neurobiol. Dis. 45:633-44. 2012; Peptides in press),* as well as in the allergic contact dermatitis model of the mouse *(J. Mol. Neurosci. 42:443-9, 2010).* We showed the presence of PACAP-38 in the plasma and milk of humans and several animal species milk with mass spectrometry, and measured its concentration with specific radioimmunassay. PACAP concentration is much higher in the milk compared to the plasma, but its functional significance needs further investigations *(Eur. J. Endocrinol. 160:561-5, 2009; Gen. Comp. Endocrinol. 172:115-9, 2011).*

Melléklet

A pályázat témájában folyóiratban megjelent eredeti közlemények:

1. Sándor K., Bölcskei K., McDougall J ., Schuelert N ., Reglődi D., Elekes K., Pethő G., Pintér E., Szolcsányi J., Helyes Zs.: Divergent peripheral effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-38 on nociception in rats and mice. *Pain* 141:143-150, 2009. (IF: 6.03)

2. Helyes Zs., Pintér E., Sándor K., Elekes K., Bánvölgyi Á., Keszthelyi D., Szőke É., Tóth D.M., Sándor Z., Kereskai L., Pozsgai G., J.P. Allen, P.C. Emson, Markovics A., Szolcsányi J.: Impaired defense mechanism against inflammation, hyperalgesia and airway hyperreactivity in somatostatin 4 receptor gene-deleted mice. *Proc. Nat. Acad. Sci*. 106:13088-93, 2009. (IF: 9.432)

3. Helyes Zs., Sándor K., Borbély É., Tékus V., Pintér E., Elekes K., Tóth D.M., Szolcsányi J., McDougall J.J.: Involvement of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 receptors in Protease-Activated Receptor 2-induced joint inflammation and nociception. *Eur. J. Pain* 14:351-358, 2010. (IF: 3.819)

4. Varecza Z**.,** Elekes K**.,** László T**.,** Perkecz A**.,** Pintér E**.,** Sándor Z**.,** Szolcsányi J**.,** Keszthelyi D**.,** Szabó A**.,** Sándor K**.,** Molnár T.F**.,** Szántó Z**.,** Pongrácz J.E**.,** Helyes Zs.: Expression of the Somatostatin Receptor Subtype 4 in Intact and Inflamed Pulmonary Tissues. *J. Histochem. Cytochem*. 57:1127-37, 2009. (IF: 2.372)

5. Sándor K., Helyes Zs., Elekes K., Szolcsányi J.: Involvement of the capsaicin-sensitive afferents and the Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Receptor in xylene-induced nocifensive behaviour and inflammation in the mouse. *Neurosci. Lett*. 451:204-207, 2009. (IF: 1.925)

6. Börzsei R., Márk L., Tamás A., Bagoly T., Bay Cs., Csanaky K., Bánki E., Kiss P., Váczy A., Horváth G., Németh J., Szauer E., Helyes Zs., Reglődi D.: Presence of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38 (PACAP-38) in human plasma and milk. *Eur. J. Endocrinol.* 160: 561-65, 2009. (IF: 3.539)

7. Szőke E, Börzsei R., Tóth D.M., Lengl O., Helyes Zs., Sándor Z., Szolcsányi J.: Effect of lipid raft disruption on TRPV1 receptor activation of trigeminal sensory neurons and transfected cell line.
Eur. J. Pharmacol. 628:67-74. 2010. (IF: 2.787)

8. Sütő B, Bagoly T, Börzsei R, Lengl O, Szolcsányi J, Németh T, Loibl C, Bardonicsek Z, Pintér E, Helyes Zs. Surgery and sepsis increase somatostatin-like immunoreactivity in the human plasma. *Peptides* 31:1208-12, 2010. (IF: 2.565)

9. Szitter I, Pozsgai G, Sándor K, Elekes K, Kemény A, Perkecz A, Szolcsányi J, Helyes Zs, Pintér E. The role of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 TRPV1) receptors in dextran sulfate-induced colitis in mice. *J. Mol. Neurosci.* 42:80-48. 2010. (IF: 2.061)

10. Kemény A, Cseharovszky R, Reglődi D, Shintani N, Hashimoto H, Baba A, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Zs. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide deficiency enhances oxazolone-induced allergic contact dermatitis in mice. *J. Mol. Neurosci.* 42(3):443-449.2010. (IF: 2.061)

11. Sándor K, Kormos V, Botz B, Imreh A, Bölcskei K, Gaszner B, Markovics A, Szolcsányi J, Shintani N, Hashimoto H, Baba A, Reglodi D, Helyes Zs. Impaired nocifensive behaviours and mechanical hyperalgesia, but enhanced thermal allodynia in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide deficient mice. *Neuropeptides* 44:363-71, 2010. (IF: 2.438)

12. Helyes Zs, Elekes K, Sándor K, Szitter I, Kereskai L, Pintér E, Kemény A, Szolcsányi J, McLaughlin L, Vasiliou S, Kipar A, Zimmer A, Hunt SP, Stewart JP, Quinn JP. Involvement of preprotachykinin A gene-encoded peptides and the neurokinin 1 receptor in endotoxin-induced murine airway inflammation. *Neuropeptides* 44:399-406, 2010. (IF: 2.438)

13. Markovics A, Szőke E, Sándor K, Börzsei R, Bagoly T, Kemény A, Elekes K, Pintér E, Szolcsányi J, Helyes Zs. Comparison of the Anti-inflammatory and Anti-nociceptive Effects of Cortistatin-14 and Somatostatin-14 in Distinct In Vitro and In Vivo Model Systems. *J. Mol. Neurosci.* DOI 10.1007/s12031-011-9577-4, 2011. (IF: 2.922)

14. Szolcsányi J, Pintér E, Helyes Zs, Pethő G. Inhibition of the function of TRPV1-expressing nociceptive sensory neurons by somatostatin 4 receptor agonism: mechanism and therapeutical implications. *Curr. Top. Med. Chem.* 11:253-63, 2011. (IF: 4.112)

15. Elekes K, Sandor K, Moricz A, Kereskai L, Kemeny A, Szoke E, Perkecz A, Reglodi D, Hashimoto H, Pinter E, Szolcsanyi J, Helyes Zs. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide plays an anti-inflammatory role in endotoxin-induced airway inflammation: in vivo study with gene-deleted mice. *Peptides* 32:1439-46, 2011. (IF: 2.654)

16. Horváth G, Szőke E, Kemény A, Bagoly T, Deli J, Szente L, Pál S, Sándor K, Szolcsányi J, Helyes Zs. Lutein Inhibits the Function of the Transient Receptor Potential A1 Ion Channel in Different In Vitro and In Vivo Models. *J. Mol. Neurosci.* DOI:10.1007/s12031-011-9525-3, 2011. (IF: 2.922)

17. Czeglédi L, Tamás A, Börzsei R, Bagoly T, Kiss P, Horváth G, Brubel R, Németh J, Szalontai B, Szabadfi K, Jávor A, Reglődi D, Helyes Zs. Presence of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the plasma and milk of ruminant animals. *Gen. Comp. Endocrinol.* 172:115-9, 2011. (IF: 3.108)

18. Markovics A, Kormos V, Gaszner B, Lashgarara A, Szoke E, Sandor K, Szabadfi K, Tuka B, Tajti J, Szolcsanyi J, Pinter E, Hashimoto H, Kun J, Reglodi D, Helyes Zs. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide plays a key role in nitroglycerol-induced trigeminovascular activation in mice. *Neurobiol. Dis.* 45:633-44. 2012. (IF: 5.12)

19. Tuka B, Helyes Zs, Markovics A, Bagoly T, Németh J, Márk L, Brubel R, Reglődi D, Párdutz Á, Szolcsányi J, Vécsei L, Tajti J. Peripheral and central alterations of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-like immunoreactivity in the rat in response to activation of the trigeminovascular system. *Peptides* in press (IF: 2.654)

Könyvfejezet:

Helyes Zs, Hajna Zs. Endotoxin-induced airway inflammation and asthma models. In TRP Channels in Drug Discovery (Methods in Pharmacology and Toxicology), eds. Szállási A, Bíró T. in press

Szabadalmi beadvány:

Horvath A, Keri Gy, Mandl J, Pinter E, Helyes Zs, Szolcsanyi J, Kessler H. Multiple N-methylated cyclic hexapeptides for the treatment of neurogenic inflammation. Lajstromszám: EP2177533 (appl. No: EP20080166259 20081009), 2010.

A pályázat témájában megjelent konferencia-prezentációk:

1. Sándor K., Kormos V., Botz B., Imreh A., Bölcskei K., Reglődi D., Gaszner B., Szolcsányi J., Shintani N., Hashimoto H., Baba A., Helyes Zs.: Decreased nocifensive behaviours and mechanical hyperalgesia in PACAP deficient mice. Joint Meeting of the European Neuropeptide Club and Summer Neuropeptide Conference, Salzburg, Austria, 2009 - absztrakt: Neuropeptides 43(5), p.439., 2009. (IF:2.438)
2. Helyes Zs., Sándor K., Tékus V., Pintér E., Elekes K., Tóth D.M., Szolcsányi J., J.J. McDougall: Involvement of TRPV1 receptors in protease-activated receptor 2-induced joint inflammation and nociception. Joint Meeting of the European Neuropeptide Club and Summer Neuropeptide Conference, Salzburg, Austria, 2009 - absztrakt: Neuropeptides 43(5), p.451., 2009. (IF:2.438)
3. Helyes Zs., Varecza Z., Elekes K., László T., Perkecz A., Pintér E., Sándor K., Molnár F.T., Szántó Z., P.C. Emson, J.P. Allen, Szolcsányi J.: Expression of the somatostatin receptor subtype 4 in mouse and human lungs and its protective role in airway inflammation. Joint Meeting of the European Neuropeptide Club and Summer Neuropeptide Conference, Salzburg, Austria, 2009 - absztrakt: Neuropeptides 43(5), p.416., 2009. (IF:2.438)
4. Sándor K., Kormos V., Botz B., Imreh A., Bölcskei K., Szolcsányi J., Reglődi D., Gaszner B., Hashimoto H., Baba A., Helyes Zs.: Impaired nocifensive behaviours and mechanical hyperalgesia, but enhanced thermal hyperalgesia in PACAP knockout mice. 9th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides, Kagoshima, Japan, 2009
5. Helyes Zs., Varecza Z., Elekes K., László T., Kereskai L., Perkecz A., Pintér E., Sándor K., Molnár F.T., Szántó Z., Emson P.C., Allen J.P., Szolcsányi J.: Somatostatin receptor subtype 4 (sst_4) is a potential novel target for the inhibition of airway inflammation and hyperresponsiveness. International Workshop: Influence of degeneration and repair in the CNS and periphery, Budapest, Hungary, 2009
6. Sándor K., Kormos V., Imreh A., Botz B., Bölcskei K., Gaszner B., Reglődi D., Szolcsányi J., Shintani N., Hashimoto H., Baba A., Helyes Zs.: Role of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide in nociceptive processes: behavioural and immunohistochemical studies. IBRO International Workshop, Pécs, Hungary, 2010 - absztrakt: Frontiers in Neuroscience 2010.
7. Markovics A., Sándor K., Szőke É., Kormos V., Gaszner B., Reglődi D., Baba A., Tajti J., Vécsei L., Tuka B., Párdutz Á., Fejes A., Bahár Zs., Szolcsányi J., Helyes Zs.: Role of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide in the nitroglycerin-induced migraine model of the mouse. IBRO International Workshop, Pécs, Hungary, 2010 - absztrakt: Frontiers in Neuroscience 2010.
8. Elekes K., Sándor K., Szőke É., Tóth D.M., Molnár F.T., Szolcsányi J., Markovics A., Jakab L., Mester M., Szitter I., Helyes Zs.: Effects of marijuana smoke on the mouse lung. IBRO International Workshop, Pécs, Hungary, 2010 - absztrakt: Frontiers in Neuroscience 2010.

9. Elekes K., Sándor K., Móricz A., Kereskai L., Kemény Á., Szőke É., Pintér E., Perkecz A., Szolcsányi J., Reglődi D., Hashimoto H., Helyes Zs.: Role of pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide (PACAP) in endotoxin-induced airway inflammation in mice. The 7th Joint Meeting of the European Neuropeptide Club & Summer Neuropeptide Conference, Pécs, Hungary, 2010 - absztrakt: Neuropeptides 44, p. 540., 2010 (IF:2.438)

10. Markovics A., Lashgarara A., Szőke É., Sándor K., Tuka B., Kormos V., Tajti J., Szolcsányi J., Gaszner B., Reglődi D., Hashimoto H., Helyes Zs.: Role of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide in nitroglycerolinduced trigeminovascular activation in mice. The 7th Joint Meeting of the European Neuropeptide Club & Summer Neuropeptide Conference, Pécs, Hungary, 2010 - absztrakt: Neuropeptides 44, p. 543., 2010 (IF:2.438)

11. Markovics A., Sándor K., Kemény Á., Börzsei R., Bagoly T., Pintér E., Szolcsányi J., Helyes Zs.: Cortistatin and somatostatin: comparing their effects on inflammation *in vitro* and *in vivo*. The 7th Joint Meeting of the European Neuropeptide Club & Summer Neuropeptide Conference, Pécs, Hungary, 2010 - absztrakt: Neuropeptides 44, p. 542., 2010 (IF:2.438)

13. Nagy P., Markovics A., Perkecz A., Sándor K., Pintér E., Szolcsányi J., Helyes Zs.: Role of capsaicin-sensitive sensory nerves and TRPV1 receptors in iodoacetate-induced osteoarthritis in mice. The 7th Joint Meeting of the European Neuropeptide Club & Summer Neuropeptide Conference, Pécs, Hungary, 2010 - absztrakt: Neuropeptides 44, p. 534., 2010 (IF:2.438)

14. Sándor K., Kormos V., Botz B., Imreh A., Bölcskei K., Gaszner B., Reglodi D., Szolcsányi J., Shintani N., Hashimoto H., Baba A., Helyes Zs.: Role of Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide in nocifensive behaviours, inflammatory and neuropathic hyeralgesia. The 16th World Congress of Pharmacology, Copenhagen, Denmark, 2010 - absztrakt: Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology 107 (suppl 1), p. 559., 2010 (IF:2.308)

15. Markovics A., Sándor K., Szőke É., Kormos V., Botz B., Gaszner B., Reglődi D., Baba A., Tajti J., Szolcsányi J., Helyes Zs.: Role of Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide in the nitroglycerin-induced migraine model of the mouse. The 16th World Congress of Pharmacology, Copenhagen, Denmark, 2010 - absztrakt: Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology 107 (suppl 1), p. 438-439., 2010 (IF:2.308)

16. Elekes K., Sándor K., Szőke É., Tóth D.M., Markovics A., Jakab L., Szakács B., Kereskai L., Szolcsányi J., Molnár F.T., Helyes Zs.: Peripheral effects of the marijuana smoke in the lung of mice. The 16th World Congress of Pharmacology, Copenhagen, Denmark, 2010 - absztrakt: Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology 107 (suppl 1), p. 267., 2010 (IF:2.308)

17. Pintér E., Helyes Zs., Szűts T., Kéri Gy., Kemény Á., Sándor K., Elekes K., Szőke É., Bagoly T., Hegedűs Z., Szolcsányi J.: Investigation of anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of a non-peptide somatostatin 4 receptor agonist TEZ-321. The 16th World Congress of Pharmacology, Koppenhága, Dánia, 2010 - absztrakt: Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology 107 (suppl 1), p. 527., 2010 (IF:2.308)

18. Helyes Zs., Elekes K., Sándor K., Kemény Á., Markovics A., Szőke É., Pintér E., Mester M.Gy., Kereskai L., J.P. Quinn, P.C. Emson, Szolcsányi J.: Role of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) receptor and sensory neuropeptides in airway inflammation and hiperresponsiveness. The 16th World Congress of Pharmacology, Copenhagen, Denmark, 2010 - absztrakt: Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology 107 (suppl 1), p. 96., 2010 (IF:2.308)

19. Helyes Zs., Elekes K., Börzsei R., Sándor K., Kereskai L., Pintér E., Szolcsányi J.: A kapszaicin-érzékeny afferensekből felszabaduló szomatosztatin szerepe légúti gyulladásmodellben. Erdélyi Múzeum-Egyesület Orvos- és Gyógyszerésztudományi Szakosztály, XIX. Tudományos ülésszak, Marosvásárhely, 2009

20. Sándor K., Kormos V., Botz B., Imreh A., Bölcskei K., Reglődi D., Szolcsányi J., Shintani N., Hashimoto H., Baba A., Helyes Zs.: A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid fájdalom-transzmisszióban betöltött szerepe. Magyar Élettani Társaság LXXIII. Vándorgyűlése és a Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság I. Közös Tudományos Konferenciája, Budapest, 2009- absztrakt: Acta Physiologica Hungarica 97(1), p. 132, 2010 (IF:0.75)

21. Helyes Zs., Varecza Z., Elekes K., László T., Perkecz A., Pintér E., Sándor K., Molnár F.T., Szántó Z., Szolcsányi J.: A szomatosztatin sst_4 receptor expressziója a tüdőben és protektív szerepe gyulladásos folyamatokban. Magyar Élettani Társaság LXXIII. Vándorgyűlése és a Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság I. Közös Tudományos Konferenciája, Budapest, 2009 - absztrakt: Acta Physiologica Hungarica 97(1), p. 106-107, 2010 (IF:0.75)

22. Szitter I., Pintér E., Sándor K., Bánvölgyi Á., Elekes K., Szolcsányi J.: A TRPV1 kapszaicin receptor és a tachykininek szerepének vizsgálata dextrán-szulfáttal kiváltott bélgyulladás modellben. Magyar Élettani Társaság LXXIII. Vándorgyűlése és a Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság I. Közös Tudományos Konferenciája, Budapest, 2009 - absztrakt: Acta Physiologica Hungarica 97(1), p. 139-140, 2010 (IF:0.75)

23. Horváth Gy., Molnár P., Deli J., Szente L., Bozó T., Pál Sz., Dévay A., Simonyi M., Kemény Á., Sándor K., Szolcsányi J., Helyes Zs.: Karotinoidok hatásának vizsgálata neurogén gyulladásos folyamatokra in vivo egérmodellben. XIV. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus, Budapest, 2009

24. Markovics A., Szőke É., Sándor K., Tuka B., Kormos V., Tajti J., Szolcsányi J., Gaszner B., Reglődi D., HA hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid szerepe a trigeminovaszkuláris rendszerben. Magyar Élettani Társaság LXXIV. Vándorgyűlése és a Magyar Kísérletes és Klinikai Farmakológiai Társaság II. Közös Tudományos Konferenciája, Szeged, 2010 - absztrakt: Acta Physiologica Hungarica in press

25. Markovics A., Lashgarara A, Szőke É., Sándor K., Tuka B., Kormos V., Tajti J., Szolcsányi J., Gaszner B., Reglődi D., Hashimoto H., Helyes Zs.: Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide plays an important role in nitroglycerol-induced trigeminovascular activation in mice. Magyar Idegtudományi Társaság XIII. Konferenciája, Budapest, 2011 – absztrakt: Frontiers in Neuroscience in press

26. Borbély É., Sandor K., Markovics A., Pinter E., Szolcsanyi J., Quinn, J.P., McDougall J.J., Helyes Zs. Kapszaicin-érzékeny érzőideg-végződések, TRPV1 receptorok és tachykininek szerepének vizsgálata hízósejt-triptáz indukált akut ízületi gyulladás modellben. Magyar Farmakológiai, Anatómus, Mikrocirkulációs és Élettani Társaságok Közös Tudományos Konferenciája, Pécs, 2011.

27. Hajna Zsófia, Moricz Andras, Elekes Krisztian, Kemeny Agnes, Kereskai Laszlo, Berger, Alexandra, Paige, Christopher J., Szolcsanyi Janos, Pinter Erika, Helyes Zsuzsanna: A hemokinin-1 szerepének vizsgálata akut légúti gyulladás modellben. Magyar Farmakológiai, Anatómus, Mikrocirkulációs és Élettani Társaságok Közös Tudományos Konferenciája, Pécs, 2011.

28. Helyes Zs., Markovics A., Sandor K., Kormos V., Gaszner B., Szőke E., Botz B., Imreh A., Pinter E., Szolcsanyi J., Hashimoto H., Reglődi D.: A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid szerepének vizsgálata egér fájdalom-modellekben. Magyar Farmakológiai, Anatómus, Mikrocirkulációs és Élettani Társaságok Közös Tudományos Konferenciája, Pécs, 2011. (meghívott előadás)

29. Kemény Ágnes, Boros Melinda, Borbely Eva, Hajna Zsofia, ifj. Setalo Gyorgy, Pinter Erika, Szolcsanyi Janos, Helyes Zsuzsanna: Citokin-profil meghatározás egér gyulladásmodellekben. Magyar Farmakológiai, Anatómus, Mikrocirkulációs és Élettani Társaságok Közös Tudományos Konferenciája, Pécs, 2011.

30. Markovics A., Borbely E., Nagy P., Sandor K., Toth I., Kereskai L., Perkecz A., Berger A., Paige C., Pinter E., Zimmer A. Szolcsanyi J., Quinn J.P., Helyes Zs. Tachykininek szerepének vizsgálata krónikus gyulaldásos és degeneratív ízületi betegségek modelljeiben. Magyar Farmakológiai, Anatómus, Mikrocirkulációs és Élettani Társaságok Közös Tudományos Konferenciája, Pécs, 2011.

31. Helyes Zs., Elekes K., Sándor K., Kemény Á., Kereskai L., Perkecz A., Pintér E., Szolcsányi J. Protective role of somatostatin and sst_4 receptors in the airway inflammation models. Summer Neuropeptide Conference és a European Neuropeptide Club (ENC) közös szakmai fórumja, Boston, 2011.

32. Kemény Á., Boros M., Borbély É., Hajna Zs., Sétáló Gy., Pintér E., Szolcsányi J., Helyes Zs. Cytokine profiling of inflamed mouse tissues obtained from different *in vivo* models. Summer Neuropeptide Conference és a European Neuropeptide Club (ENC) közös szakmai fórumja, Boston, 2011.

33. Markovics A., Borbély É., Nagy P., Sándor K., Tóth I., Kereskai L., Perkecz A., Berger A., Paige C., Pintér E., Zimmer A., Szolcsányi J., Quinn, J. P., Helyes Zs.: Role of tachykinins in mouse of chronic inflammatory and degenerative joint diseases. Summer Neuropeptide Conference és a European Neuropeptide Club (ENC) közös szakmai fórumja, Boston, 2011.

34. Helyes Zs., Borbély É., Sándor K., Markovics A., Pintér E., Szolcsányi J., Quinn J.P., McDougall J.J. Capsaicin-sensitive sensory nerves, TRPV1 receptors and tachykinins play important roles in mast cell tryptase-induced arthritis and hyperalgesia. Osztrák és Magyar Farmakológus Társaságok Közös Konferenciája, Innsbruck, 2011. (meghívott előadás)

Teljes támogatás: 3.000.000,- Ft

ENDO- ÉS XENOBIOTIKUS SZTEROLOK ABC SZTEROL-TRANSZPORTEREKKEL TÖRTÉNŐ KÖLCSÖNHATÁSÁNAK VIZSGÁLATA

Homolya László[1], Hegyi Zoltán[1], Kasza Ildikó[1], Sarkadi Balázs[1,2]
[1] MTA-SE Membránbiológia Kutatócsoport, [2] Országos Vérellátó Szolgálat

A sejtek és a szervezet toxikus anyagokkal szembeni védekezésében különleges feladatot lát el számos ABC (ATP-Binding Cassette) transzporter. Kutatási projektünk a lipid-anyagcserében résztvevő humán ABC fehérjék biokémiai és sejtbiológiai vizsgálatára irányult. Vizsgálatainkkal elsősorban arra keresünk választ, hogy ezek a transzporterek hogyan járulnak hozzá a lipid metabolizmus és a detoxifikálás folyamatához. Kutatásaink során konkrétan vizsgáltuk az ABCA1 és ABCB11 lipid-transzporterek sejtfelszíni megjelenését; az ABCG1 és ABCG4 féltranszporterek dimerizációs tulajdonságait, apoptotikus hatását és szterolokkal való kölcsönhatásait; az ABCG2 multidrog-transzporter működési mechanizmusát illetve, hogy ezek a transzporter-fehérjék milyen feladatot képesek betölteni az őssejtekben.

A lipid szekréció és a detoxifikálás tekintetében elengedhetetlenül fontos az ABC lipid-transzportereknek a megfelelő plazmamembrán kompartmentbe való elhelyezkedése és a dinamikus viselkedése. A projekt folyamán előállítottuk az ABCA1 transzporternek egy olyan hemagglutinin (HA) epitóppal jelölt változatát, amely alkalmas a transzporter sejtfelszíni expressziójának követésére. Igazoltuk, hogy a HA-ABCA1 vad típusú fehérjével megegyező tulajdonságokkal bír az expressziós szint, a celluláris elhelyezkedés és a funkció tekintetében. A HA-ABCA1-et stabilan expresszáló modellsejtekben vizsgáltuk számos koleszterinanyagcserét befolyásoló gyógyszer hatását. Többek között azt találtuk, hogy az Ezetimib funkció-függő módón befolyásolja az ABCA1 sejtfelszíni expresszióját (Kasza et al. 2009). Egy nemzetközi együttműködés keretében (Dr. Irwin M. Arias, NIH, Bethesda, USA) az ABCB11 lipid-transzporter sejten belüli mozgását is tanulmányoztuk. Sikerült igazolnunk, hogy ennek az ABC transzporternek a sejtfelszíni megjelenését az energia metabolizmust szabályozó enzimek (LKB1/AMPK) is regulálják.

Korábbi munkáinkban kimutattuk, hogy az ABCG1 szterol-transzporter apoptózist indukál számos sejttípusban. A jelen projekt során igazoltuk, hogy az ABCG1 fehérjével szoros rokonságot mutató ABCG4 funkcionális expressziója is apoptózist okoz. Mind fizikai módszerrel (ko-immuno-precipitációval), mind funkcionálisan (az apoptotikus hatás gátlása révén) sikerült megmutatnunk, hogy a két féltranszporter funkcionális dimert képez (előkészületben lévő kézirat: Hegyi Z, Sarkadi B, Homolya L.: ABCG4 induces apoptosis and functions in both homo- and heterodimeric forms). Ezen felül az ABCG1 fehérje ATPáz aktivitását mérve számos olyan szterolt sikerült azonosítanunk, amelyeknek az ABCG1-gyel való kölcsönhatása korábban nem volt ismeretes. Ezeknek az eredményeknek a publikálása szintén folyamatban van.

Teljes támogatás: 3.000.000,- Ft

Egy másik nemzetközi együttműködés keretében az ABCG2 féltranszporter dimerképzését funkcionális szempontól elemeztük. Ebben a munkában sikerült megmutatnunk a két fehérjerész közötti szoros kooperációt az ATP kötés és hasítás tekintetében, amely következésképpen a transzportaktivitásra is hatást gyakorol (Hou et al. 2009.) A projekttel összefügésben egy átfogó közleményben áttekintést adtunk az ABCG2 funkcionális vizsgálati módszereiről (Hegedűs et al. 2009.) Az ABCG2 fehérje további vizsgálata során egy újszerű megközelítéssel megmutattuk, hogy ez az igen széles szubsztrát-felismerő képességgel rendelkező transzporter promiszkuitása hátterében az állhat, hogy szubsztrátját közvetlenül a membránból pumpálja ki (Homolya et al. 2011.) Vizsgálataink kiterjedtek továbbá az ABCG2 és a kalcium-transzporterek a pluripotens őssejtek homeosztázisában betöltött kulcsszerepének elemzésére (Sarkadi et al. 2010, Apáti et al. 2011 EPub).

Munkánkkal rávilágítunk az ABCG alcsalád tagjainak funkcionális sajátosságaira és dimerképzésük mikéntjére, valamint részletekkel szolgáltunk fontos lipidtranszporterek (ABCA1 és ABCB11) sejtfelszíni megjelenésének szabályozását illetően.

Kasza I, Hegyi Z, Szabó K, Andrikovics H, Német K, Váradi A, Sarkadi B, Homolya L: Model system for the analysis of cell surface expression of human ABCA1. BMC CELL BIOL 10: pp. 93 (2009) IF: 2,654

Hou Y, Li C, Palaniyandi K, Magtibay PM, Homolya L, Sarkadi B, Chang X: Effects of putative catalytic base mutation E211Q on ABCG2-mediated methotrexate transport. BIOCHEMISTRY, 48(38): pp. 9122-9131 (2009) IF: 3,226

Hegedűs C, Szakács G, Homolya L., Orbán TI, Telbisz Á, Jani M, Sarkadi B: Ins and outs of the ABCG2 multidrug transporter: an update on in vitro functional assays. ADV DRUG DELIV REV 61(1): pp. 47-56 (2009) IF: 11,957

Homolya L, Orbán TI, Csanády L, Sarkadi B: Mitoxantrone is expelled by the ABCG2 multidrug transporter directly from the plasma membrane. BIOCHIM BIOPHYS ACT 1808(1): pp. 154-63 (2011) IF: 3,998

Sarkadi B, Orbán TI, Szakács G, Várady G, Schamberger A, Erdei Z, Szebényi K, Homolya L, Apáti A: Evaluation of ABCG2 expression in human embryonic stem cells: crossing the same river twice? STEM CELLS, 28(1): pp. 174-6 (2010) IF: 7,747

Apáti A, Pászty K, Erdei Z, Szebényi K, Homolya L, Sarkadi B. Calcium signaling in pluripotent stem cells. MOL CELL ENDOCRINOL 2011 Sep 14. [Epub ahead of print] IF: 4,119

Budget: 3.000,000.- HUF

INTERACTIONS OF ENDO- AND XENOBIOTIC STEROLS WITH ABC STEROL-TRANSPORTERS

László Homolya[1], Zoltán Hegyi[1], Ildikó Kasza[1], Balázs Sarkadi[1,2]
[1] Membrane Biology Research Group, Hungarian Academy of Sciences, Semmelweis University
[2] National Blood Center

Several ABC (ATP-Binding Cassette) transporters play pivotal role in defense against toxic compounds. Our research has focused on the biochemical and cell biology analysis of human ABC lipid transporters. Our studies primarily addressed the questions how these transporters contribute to the complex process of detoxification and lipid metabolism. Particularly, we studied the cell surface expression of the lipid transporters, ABCA1 and ABCB11; the dimerization properties and apoptotic effect of ABCG1 and ABCG4 half-transporters, as well as their interactions with various sterol compounds. We also studied the transport mechanism of the multidrug transporter, ABCG2, and the potential role of these membrane transporters in stem cells.

The localization in the proper membrane compartment and the dynamic behavior of the ABC lipid transporters are crucial for the lipid secretion and detoxification. During the course of the project we have generated a variant of ABCA1 tagged with a haemagglutinin (HA) epitope, which construct makes the sensitive monitoring of the cell surface expression of this transporter possible. The identical main characteristics of the HA-tagged and wild type variants have been verified in terms of expression level, cellular localization, and function. We studied the effect of a variety of cholesterol level-lowering drugs on the cell surface expression of ABCA1. Among others, an interesting finding was that Ezetimib lowers the level of ABCA1 in the plasma membrane in a function-dependent manner (Kasza et al. 2009). In an international collaboration with Dr. Irwin M. Arias (NIH, Bethesda, USA), we studied the trafficking of the lipid transporter ABCB11, and found that the cell surface expression of this transporter is controlled by LKB1/AMPK, key enzymes regulating energy metabolism.

Previously, we have demonstrated that the sterol transporter, ABCG1 induces apoptosis in several cell types. In this project, we have shown apoptotic effect of the function expression of ABCG4, a closely related protein to ABCG1. Functional dimer formation between these two half transporters has been demonstrated by both physical and functional approaches, such as co-immunoprecipitation and inhibition of ABCGs' apoptotic effect, respectively (manuscript in preparation Z. Hegyi, B. Sarkadi, L. Homolya: ABCG4 induces apoptosis and functions in both homo- and heterodimeric forms). By measuring the ATPase activity of ABCG1, we have identified numerous sterol compounds interacting with this transporter, which interactions were previously unknown. Publication of these results is also in progress.

In an additional international collaboration, we analyzed the dimer formation of the half transporter ABCG2 using a functional approach. We demonstrated the close cooperation between the two dimer halves in terms of ATP binding and hydrolysis, consequently in transport function (Hou et al. 2009). In conjunction with this project we published a review article summarizing the in vitro methods for functional assessment of the transporter ABCG2 (Hegedűs et al. 2009). Using an inventive approach, we demonstrated that ABCG2, a transporter with unusual broad substrate recognition, directly transports its substrates from the plasma membrane, providing a possible mechanism for the promiscuous nature of this transporter (Homolya et al. 2011). Our research also included the analysis of the pivotal role of ABCG2 and calcium transporters in the homeostasis of pluripotent stem cells (Sarkadi et al. 2010, Apáti et al. 2011 EPub).

Our work elucidates some special features of the ABCG subfamily members in terms of transport function and dimerization, as well as provides new insights into the regulation of the cell surface expression of relevant lipid transporters, the ABCA1 and ABCB11.

Kasza I, Hegyi Z, Szabó K, Andrikovics H, Német K, Váradi A, Sarkadi B, Homolya L: Model system for the analysis of cell surface expression of human ABCA1. BMC CELL BIOL 10: pp. 93 (2009) IF: 2,654

Hou Y, Li C, Palaniyandi K, Magtibay PM, Homolya L, Sarkadi B, Chang X: Effects of putative catalytic base mutation E211Q on ABCG2-mediated methotrexate transport. BIOCHEMISTRY, 48(38): pp. 9122-9131 (2009) IF: 3,226

Hegedűs C, Szakács G, Homolya L., Orbán TI, Telbisz Á, Jani M, Sarkadi B: Ins and outs of the ABCG2 multidrug transporter: an update on in vitro functional assays. ADV DRUG DELIV REV 61(1): pp. 47-56 (2009) IF: 11,957

Homolya L, Orbán TI, Csanády L, Sarkadi B: Mitoxantrone is expelled by the ABCG2 multidrug transporter directly from the plasma membrane. BIOCHIM BIOPHYS ACT 1808(1): pp. 154-63 (2011) IF: 3,998

Sarkadi B, Orbán TI, Szakács G, Várady G, Schamberger A, Erdei Z, Szebényi K, Homolya L, Apáti A: Evaluation of ABCG2 expression in human embryonic stem cells: crossing the same river twice? STEM CELLS, 28(1): pp. 174-6 (2010) IF: 7,747

Apáti A, Pászty K, Erdei Z, Szebényi K, Homolya L, Sarkadi B. Calcium signaling in pluripotent stem cells. MOL CELL ENDOCRINOL 2011 Sep 14. [Epub ahead of print] IF: 4,119

Teljes támogatás: 4 millió Ft

Speciális szempontok a gastroesophagealis reflux betegség és szövődményeinek sebészi kezelésében

Dr. Horváth Örs Péter, Dr. Cseke László, Dr. Kalmár Katalin, Dr. Papp András, Dr. Varga Gábor, Dr. Vereczkei András
PTE KK Sebészeti Klinika

Jelen vizsgálat célja a GERD és szövődményeinek sebészi kezeléssel kapcsolatos kutatásai voltak. A gastroesophagealis refluxbetegség (GERD) ma már népegészségügyi probléma, mert a lakosság több mint 15%-át érinti. A GERD jelentősége az, hogy a betegek néhány százalékában precancerosus állapotnak tekinthető Barrett oesophagus alakul ki, melyből az esetek 1-5%-ában adenocarcinoma fejlődhet ki, és ez a daganat az elmúlt 30 évben a leggyorsabb incidencia növekedést mutatató tumor. Új lehetőségnek számít biopsziával nyert anyagokban vizsgálni bizonyos biomarkereket (AG-2, Hsp 90, sHsp 16,2) , melyek már a Barrett oesophagus kialakulása előtt jelezhetik a megnövekedett daganatos kockázatot és célzott ellenőrzésre lenne lehetőség illetve befolyásolná a kezelést. A biomarkerek vizsgálatával kapcsolatos metodika és az első 20 nyelőcsőrákos betegnél végzett vizsgálat eredményeiről több kongresszuson is beszámoltunk és közleményünk jelent meg az Anticancer Research folyóiratban. A metodika beállítása után a vizsgálati anyag gyűjtése megkezdődött reflux oesophagitises, Barrett oesophagusos, nyelőcső és cardia adenocarcinómás esetekben a betegek részletes tájékoztatását követően. Vizsgálataink során Hsp fehérjék (Hsp 90, Hsp 16.2) expresszió változását monitoroztuk a különböző betegcsoportoknál, melyek változása elgondolásunk szerint előre jelezheti a betegség progresszióját. Egyenlőre az adatok gyűjtése zajlik , statisztikailag értéklehető esetszámot követően eredményeinket szintén publikálni fogjuk.
Az irodalomból ismert és saját beteganyagon is észlelt megfigyelés, hogy nyelőcsőpótlás után a maradék nyelőcsőben Barrett oesophagus és anasztomózis striktura alakulhat ki. Ennek hátterében epés reflux állhat, ami lehet a pylorus plasztika következménye. Operált beteganyag utánvizsgálatával és prospektív, randomizált vizsgálatokkal próbáltuk feltárni az összefüggést a pylorus plasztika és az anasztomózis szűkület valamint a Barrett oesophagus kialakulása között.. Refluxgátló oesophago-gastrostomia epés refluxot csökkentő hatását vizsgáltuk Bilitec és pH-metria segítségével. A süllyesztett mellkasi anasztomózissal rendelkező betegek után vizsgálata megkezdődött, a betegek endoscopos, pH-metriás és Bilitec vizsgálattal történő kontrollja folyamatosan zajlik, és bár még csak részeredményekkel rendelkezünk az új anasztomózis típus bevezetése úgy tűnik képes megakadályozni az epés refluxot.
Nagy hiatus herniák műtéte után magas a recidíva arány és a háló beültetés komoly kockázatokkal jár. Vizsgáltuk, hogy az a világon először általunk bevezetett autológ fascia lataval megerősített hiatus rekonstrukció milyen eredménnyel jár. A műtét előnye, hogy lényegesen olcsóbb és az háló elvándorlásából származó életveszélyes szövődmények szintén elkerülhetők. A fascia lata használatával elvégzett laparoscopos hiatus reconstrukcióról az MST kongresszusán és a 2011-es CECS kongresszuson is beszámoltunk. A nagy hiatus herniák hálóval történő sebészi kezeléséről jelent meg cikkünk a Magyar Sebészetben, illetve a fascia lata megerősítésről szintén cikkünk jelent meg a Disease of the Esophagusban, a későbbiekben a két módszer összehasonlítása a tervünk.

Budget: 4 million HUF

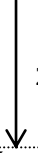
Special considerations of the surgical treatment and complications of gastreoesophageal reflux disease

Örs Péter Horváth MD,PhD, Dsci, László Cseke MD, Katalin Kalmár MD, PhD, András Papp MD, PhD, Gábor Varga MD, PhD, András Vereczkei MD, PhD

The aim of this study was the investigation the surgical treatment of GERD and its complications. Gastroesophageal reflux disease (GERD) represents a public health problem, as more than 15 % of the population is involved. Further significance is attached to GERD, as in a few percent of patients a precancerous lesion, Barrett's dysplasia develops. This can result in 1-2 % in esophageal adenocarcinoma, which has the most rapidly rising incidence in the last 30 years. A new method to investigate the increased risk of cancer formation before Barrett's esophagus develops, is to measure special biomarkers like AG-2, Hsp 90, sHsp 16,2 in biopsy samples. Based on this, therapeutical modifications and targeted controls might be implemented. We presented our experience with the methodics, and the human trial on the first 20 patients on more conferences, and also published a paper in Anticancer Research. After installing the methodics, the gathering of samples of patients with esophagitis, Barrett's esophagus, esophageal and cardia cancer was initiated, with informed consent. We analyzed the expression changes of Hsp 90 and Hsp 16.2 proteins in different patient pools, which in our concept may predict disease progression. For the present, collection of data is running, reaching statistically relevant case numbers, these data will be also published.

It is well known from the literature and from our own experience that after esophageal replacement anastomotic stricture and Barrett's metaplasia can develop in the esophageal remnant. Biliary reflux may stand in the background, which can be the result of the pyloroplasty on the gastric tube. With the retrospective analysis of resected patients and conducting prospective studies we tried to clarify the connection between pyloroplasty and Barrett's metaplasia or anastomotic stricture. We studied the effect of a new antireflux esophago-gastric anastomosis using Bilitec and pH monitoring. The follow up of patients with special sunken thoracal antireflux anastomosis has been started, the endoscopic, pH-metric and Bilitec evaluations are currently running. Although only preliminary results exist, the new anastomosis seems to prevent biliary reflux.

After the reconstruction of large sized hiatal hernias, the recurrence rate is high, and the complications of mesh implants used for reinforcement can be serious. We studied the effect of our new reinforcement method using autologous fascia lata patch, on hiatal reconstruction. The advantage of this technique is that it is cheap, and the complications of artificial mesh implantation can be avoided. We reported on our experience with the laparoscopic hiatal reconstruction using fascia lata patch on the 2011 Congress of Hungarian Surgical Society. We also published our data on the treatment of large sized hiatal hernias using artificial meshes in Hungarian Surgery, and on our experiences with the fascia lata reinforcement in Diseases of the Esophagus. Recently we plan to compare the two methods with each other.



Teljes támogatás: 2400.000,- Ft

ÚJSZÜLÖTTKORI BISPHENOL A EXPOZÍCIÓ HATÁSA SZEXUÁLISAN DIMORF HIPOTALAMIKUS NEUROPEPTID RENDSZEREK DIFFERENCIÁCIÓJÁRA

Hrabovszky Erik, Molnár Csilla
Magyar Tudományos Akadémia, Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet

A pályázat nemi különbségeket mutató peptiderg rendszerek azonosítása és szexuál szteroid függő szabályozása terén hozott számos új eredményt.

- A gonadotropin-releasing hormon (GnRH) neuroszekretoros rendszer afferens szabályozását végző peptiderg rendszerek közül jellemeztük a kisspeptint termelő idegsejtek anatómiai viszonyait emberi hipotalamikus mintákon. Megállapítottuk, hogy a rendszer jelentős nemi dimorfizmust mutat, és a női agyszövetmintákban mind perikaryonok, mind idegrostok szignifikánsan nagyobb számban fordulnak elő, mint a férfiakból származó mintákban (1, 6, 12, 13).
- A kisspeptin idegsejtek infundibularis idegmagon belüli csoportja egy reprodukció szempontjából kitüntetett jelentőségű másik neuropeptidet, a neurokinin B-t is tartalmazta (1, 6, 12, 13).
- Megfigyeltük, hogy a kisspeptin idegrostok egyaránt beidegzik az emberi hypothalamus GnRH idegsejtjeinek sejttestjeit, dendritjeit és axonjait. (1, 6, 12, 13).
- Az RF-amide related peptide (RFRP) neuronrendszer a GnRH idegsejtek gátló szabályozását végzi. Az egér dorsomedialis magjában található sejttestek RFRP mRNS expressziójának esetleges ösztrogén függését egy in situ hibridizációs tanulmányunk vizsgálta. Az eredmények megmutatták, hogy az RFRP expresszió magas szérum ösztradiol szint mellett csökken. Az RFRP idegsejtek többségében ugyanakkor ösztrogén receptort nem sikerült kimutatni, mely felveti a szabályozás indirekt jellegének lehetőségét (3, 7).
- Vizsgáltuk és leírtuk az RFRP immunreaktivitás anatómiai megoszlását emberi hipotalamusz mintákon is (8, 10, 11).
- Megállapítottuk, hogy az emberi hipotalamusz kisspeptin és neurokinin B tartamú idegsejtjei az életkor előrehaladtával növekvő immunjelölődést mutatnak. Méretük megnő, és idős életkorban a GnRH idegsejteket számára bővebb beidegzést adnak (7, 12, 13).

Közlemények:

1. Hrabovszky E, Ciofi P, Vida B, Horvath MC, Keller É, Caraty A, Bloom SR, Ghatei MA, Dhillo WS, Liposits Z, Kallo I: The kisspeptin system of the human hypothalamus. Sexual dimorphism and relationship with gonadotropin-releasing hormone and neurokinin B neurons. EUROPEAN JOURNAL OF NEUROSCIENCE 31: pp. 1984-1998 (2010) IF: 3,658
2. Farkas I, Kallo I, Deli L, Vida B, Hrabovszky E, Fekete C, Moenter SM, Watanabe M, Liposits Z: Retrograde endocannabinoid signaling reduces GABA-ergic synaptic transmission to gonadotropin-releasing hormone neurons. ENDOCRINOLOGY 151(12): pp. 5818-5829 (2010) IF: 4,993
3. Molnar CS, Kallo I, Liposits Z, Hrabovszky E: Estrogenic regulation of RF-amide related peptide expression in the mouse hypothalamus. ENDOCRINOLOGY 152(4): pp. 1684-1690 (2011) IF: 4,993
4. Csercsik D, Farkas I, Hrabovszky E, Liposits Z: A simple integrative electrophysiological model of bursting GnRH neurons. JOURNAL OF COMPUTATIONAL NEUROSCIENCE 1-18 (2011) IF: 2,325
5. Hrabovszky E, Wittmann G, Kalló I, Füzesi T, Fekete C, Liposits Z: Distribution of type 1 cannabinoid receptor expressing neurons in the mouse hypothalamus. Colocalization with GABAergic and glutamatergic markers. JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY: doi: 10.1002/cne.22766 (2012) IF: 3,774
6. Hrabovszky E, Molnár CS, Sipos MT, Vida B, Ciofi P, Borsay BA, Sarkadi L, Herczeg L, Bloom SR, Ghatei MA, Dhillo WS, Kalló I, Liposits Z: Sexual dimorphism of kisspeptin and neurokinin B immunoreactive neurons in the infundibular nucleus of aged men and women. FRONTIERS IN GENOMIC ENDOCRINOLOGY: 2011:80 (2011) (IF: -)

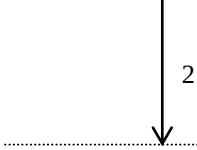
7. Hrabovszky E, Molnár CS, Kalló I, Liposits Z: Estrogenic down-regulation of RF-amide related peptide expression in the mouse hypothalamus. 7TH FORUM OF EUROPEAN NEUROSCIENCE, AMSTERDAM, THE NETHERLANDS (2010)

Kongresszusi poszterek:

8. Hrabovszky E, Molnár CS, Keller É, Kalló I, Palkovits M, Liposits Z: Distribution of the gonadotropin-inhibiting hormone RF-amide related peptide-1 in the human hypothalamus. Connections to the portal vasculature and to gonadotropin-releasing hormone neurons. 7TH INTERNATIONAL CONGRESS OF NEUROENDOCRINOLOGY, ROUEN, FRANCE (2010)
9. Molnár CS, Kalló I, Liposits Z, Hrabovszky E: A hipotalamikus RF-amide related peptide (RFRP) expresszió ösztrogén általi szabályozása egérben. MEAT XXIII. KONGRESSZUSA, VISEGRÁD (2010)
10. Molnár CS, Keller É, Kalló I, Palkovits M, Liposits Z, Hrabovszky E: RFRP termelő idegsejtek megoszlása és afferens kapcsolata GnRH idegsejtekkel humán hipotalamuszban. MEAT XXIII. KONGRESSZUSA, VISEGRÁD (2010)
11. Molnár CS, Liposits Z, Keller E, Kalló I, Palkovits M, Hrabovszky E: Immunocytochemical detection of the gonadotropin-inhibiting hormone RF-amide related peptide (RFRP) in the human hypothalamus. Distribution and efferent connections to gonadotropin-releasing hormone neurons. IBRO INTERNATIONAL WORKSHOP, PÉCS, HUNGARY (2010)
12. Molnár CS, Vida B, Sipos M, Kalló I, Ciofi P, Borsay B, Sarkadi L, Herczeg L, Bloom SR, Ghatei MA, Dhillo WS, Liposits Z, Hrabovszky E: Aging-coincides with morphological alterations of kisspeptin and neurokinin B neurons in the infundibular nucleus of the human male. SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, 41ST ANNUAL MEETING, WASHINGTON, DC, USA (2011)
13. Hrabovszky E, Vida B, Molnár CS, Sipos M, Ciofi P, Borsay B, Sarkadi L, Herczeg L, Bloom SR, Ghatei MA, Dhillo WS, Kalló I, Liposits Z: Kisspeptin input to gonadotropin-releasing hormone neurons exhibits sexual dimorphism in the human. SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, 41ST ANNUAL MEETING, WASHINGTON, DC, USA (2011)

2 cm

2 cm



Budget: 2400,000.- HUF

EFFECTS OF NEONATAL BISPHENOL A EXPOSITION ON THE DIFFERENTIATION OF SEXUALLY DIMORPHIC HYPOTHALAMIC NEUROPEPTIDE SYSTEMS.

Erik Hrabovszky, Csilla Molnár
Institute of Experimental Medicine, Hungarian Academy of Sciences

Research resulting from this grant lead to new information regarding the identification and regulation of several sexually dimorphic neuropeptide systems.

- Out of the neuropeptides that regulate gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurosecretory neurons via afferents channels, we have carried out the neuroanatomical characterization of the human hypothalamic kisspeptin neuronal system. We have established its significant sexual dimorphism. We have demonstrated that the number of kisspeptin cell bodies as well as fibers is significantly higher in human females than in human males (1, 6, 12, 13).
- A group of kisspeptin neurons in the infundibular nucleus synthesize neurokinin B, another neuropeptide of high reproductive significance (1, 6, 12, 13).
- We have provided evidence that kisspeptin fibers innervate the cell bodies, dendrites and axons of human GnRH neurons (1, 6, 12, 13).
- Neurons synthesizing RF-amide related peptide (RFRP) provides an inhibitory regulation to GnRH neurons. We used in situ hybridization to analyze the estrogenic regulation of RFRP mRNA expression in the dorsomedial nucleus of mice. Quantitative results established that high levels of estradiol suppress RFRP mRNA expression. Most of the RFRP neurons did not contain estrogen receptors, indicating that their estrogenic regulation may be mediated indirectly by estrogen receptive interneurons (3, 7).
- We have mapped the distribution of RFRP immunoreactive neurons in the human hypothalamus (8, 10, 11).
- We have established that the immunostaining of human hypothalamic kisspeptin and neurokinin B neurons increases with age. They exhibit enhanced perikaryon size and they provide increased input to GnRH neurons in aged human individuals (7, 12, 13).

Articles:

1. Hrabovszky E, Ciofi P, Vida B, Horvath MC, Keller É, Caraty A, Bloom SR, Ghatei MA, Dhillo WS, Liposits Z, Kallo I: The kisspeptin system of the human hypothalamus. Sexual dimorphism and relationship with gonadotropin-releasing hormone and neurokinin B neurons. EUROPEAN JOURNAL OF NEUROSCIENCE 31: pp. 1984-1998 (2010) IF: 3,658
2. Farkas I, Kallo I, Deli L, Vida B, Hrabovszky E, Fekete C, Moenter SM, Watanabe M, Liposits Z: Retrograde endocannabinoid signaling reduces GABA-ergic synaptic transmission to gonadotropin-releasing hormone neurons. ENDOCRINOLOGY 151(12): pp. 5818-5829 (2010) IF: 4,993
3. Molnar CS, Kallo I, Liposits Z, Hrabovszky E: Estrogenic regulation of RF-amide related peptide expression in the mouse hypothalamus. ENDOCRINOLOGY 152(4): pp. 1684-1690 (2011) IF: 4,993
4. Csercsik D, Farkas I, Hrabovszky E, Liposits Z: A simple integrative electrophysiological model of bursting GnRH neurons. JOURNAL OF COMPUTATIONAL NEUROSCIENCE 1-18 (2011) IF: 2,325
5. Hrabovszky E, Wittmann G, Kalló I, Füzesi T, Fekete C, Liposits Z: Distribution of type 1 cannabinoid receptor expressing neurons in the mouse hypothalamus. Colocalization with GABAergic and glutamatergic markers. JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY: doi: 10.1002/cne.22766 (2012) IF: 3,774
6. Hrabovszky E, Molnár CS, Sipos MT, Vida B, Ciofi P, Borsay BA, Sarkadi L, Herczeg L, Bloom SR, Ghatei MA, Dhillo WS, Kalló I, Liposits Z: Sexual dimorphism of kisspeptin and neurokinin B immunoreactive neurons in the infundibular nucleus of aged men and women. FRONTIERS IN GENOMIC ENDOCRINOLOGY: 2011:80 (2011) (IF: -)

7. Hrabovszky E, Molnár CS, Kalló I, Liposits Z: Estrogenic down-regulation of RF-amide related peptide expression in the mouse hypothalamus. 7TH FORUM OF EUROPEAN NEUROSCIENCE, AMSTERDAM, THE NETHERLANDS (2010)

Congress poster abstracts:

8. Hrabovszky E, Molnár CS, Keller É, Kalló I, Palkovits M, Liposits Z: Distribution of the gonadotropin-inhibiting hormone RF-amide related peptide-1 in the human hypothalamus. Connections to the portal vasculature and to gonadotropin-releasing hormone neurons. 7TH INTERNATIONAL CONGRESS OF NEUROENDOCRINOLOGY, ROUEN, FRANCE (2010)
9. Molnár CS, Kalló I, Liposits Z, Hrabovszky E: A hipotalamikus RF-amide related peptide (RFRP) expresszió ösztrogén általi szabályozása egérben. MEAT XXIII. KONGRESSZUSA, VISEGRÁD (2010)
10. Molnár CS, Keller É, Kalló I, Palkovits M, Liposits Z, Hrabovszky E: RFRP termelő idegsejtek megoszlása és afferens kapcsolata GnRH idegsejtekkel humán hipotalamuszban. MEAT XXIII. KONGRESSZUSA, VISEGRÁD (2010)
11. Molnár CS, Liposits Z, Keller E, Kalló I, Palkovits M, Hrabovszky E: Immunocytochemical detection of the gonadotropin-inhibiting hormone RF-amide related peptide (RFRP) in the human hypothalamus. Distribution and efferent connections to gonadotropin-releasing hormone neurons. IBRO INTERNATIONAL WORKSHOP, PÉCS, HUNGARY (2010)
12. Molnár CS, Vida B, Sipos M, Kalló I, Ciofi P, Borsay B, Sarkadi L, Herczeg L, Bloom SR, Ghatei MA, Dhillo WS, Liposits Z, Hrabovszky E: Aging-coincides with morphological alterations of kisspeptin and neurokinin B neurons in the infundibular nucleus of the human male. SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, 41ST ANNUAL MEETING, WASHINGTON, DC, USA (2011)
13. Hrabovszky E, Vida B, Molnár CS, Sipos M, Ciofi P, Borsay B, Sarkadi L, Herczeg L, Bloom SR, Ghatei MA, Dhillo WS, Kalló I, Liposits Z: Kisspeptin input to gonadotropin-releasing hormone neurons exhibits sexual dimorphism in the human. SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, 41ST ANNUAL MEETING, WASHINGTON, DC, USA (2011)

2 cm

Budget: 3.000,000.- HUF

CÉLBAJUTTATÁS TUMORSEJTEKBE PEPTID-KONJUGÁTUMOKKAL

Hudecz Ferenc[1], Orbán Erika[1], Bánóczi Zoltán[1], Szabó Rita[1], Miklán Zsanett[1], Gaál Dezső[2], Csik Gabriella[3]
[1]MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport, Budapest; [2]Országos Onkológiai Intézet, Budapest; [3]Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest

A kutatás során új, tumorellenes hatóanyagot tartalmazó peptid konjugátumokat állítottunk elő és jellemeztünk. A peptid komponens rövid, "*de novo*" tervezett penetráló oligoarginin (Arg_x, ahol x = 4, 5 vagy 6) és/vagy természetes eredetű, az Erb2 receptorhoz kötődő oligopeptid, míg a tumorgátló szer a klinikai gyakorlatban ismert vegyületet (antraciklin, folsav antagonista [pemetrexed, Pem], vagy vinblasztin származék) volt. A konjugátumokat, stabilitásukat kromatográfiás módszerekkel (gélszűrés, HPLC), szerkezetüket aminosavanalizissel, UV, fluoreszcencia spektroszkópiával és tömegspektrometriával jellemeztük. A konjugátumok tumorsejtekre gyakorolt *in vitro* hatását humán tumorsejtvonalakon (szenzitív és rezisztens HL-60, valamint HepG2, NCI-H358, MCF-7, SK-BR-3), sejtbejutásukat FACS analizissel és esetenként a sejtek proteinexpressziós profiljára gyakorolt hatását tanulmányoztuk. Megállapítottuk, hogy a hat vagy nyolc Arg egységet tartalmazó oligopeptid daunomicin (Dau) konjugátum bejutása a sejtbe és *in vitro* tumorellenes hatása függ a sejt mineműségétől (HL-60 > HepG2) (1). Az Arg_8 és Erb2 receptor ligand tartalmú „hibrid" oligopeptid Pem konjugátuma hatékonyabb volt, mint a két komponenshez külön-külön kapcsolt szer, e hatás sejtvonal függő volt (HL-60 > NCI-H358) (2,3). Az Arg_x tartalmú vinblasztin-peptid konjugátumok hatásosnak bizonyultak szenzitív és – MRP1/MDR1 proteinfüggő módon - rezisztens HL-60 sejteken (4). Az Erb2 receptor-ligandum tartalmú peptid-Dau konjugátummal kezelt sejtek IC_{50} értéke alapján (HL-60 > HepG2 > MCF-7 > SK-BR-3) kiválasztott HL-60 sejteket vizsgálva kimutattuk, hogy az oligopeptid kovalens kapcsolása jelentősen megváltoztatja a vegyület sejtbejutásának mértékét és módját, valamint a protein expressziós mintázatot, mind a kezeletlen, mind a szabad Dau-val kezelt kontrol mintákhoz képest. A proteomikai kísérletekhez (optimalizált sejtkezelési stratégia kikísérletezése után) három olyan fehérjét azonosítottunk, amelyeknek kifejeződése jelentős (emelkedett vagy csökkent) mértékben eltér a kétféle kezelés után HL-60 sejtekben (5). Eredményeink szerint a tumorellenes szerek *in vitro* citotoxikus/citosztatikus tulajdonságait, sejtbejutásuk mértékét és módját, valamint a protein expresszióra jellemző paramétereket jelentősen befolyásolja a konjugátumok oligopeptid komponense.

Irodalomjegyzék:

1. Miklán, Zs., Orbán, E., Csík, G., Schlosser, G., Magyar, A., Hudecz, F.: New daunomycin–oligoarginine conjugates: synthesis, characterization, and effect on human leukemia and human hepatoma cells. *Biopolymers (Peptide Science),* 92: 489-501 (2009)
2. **Orbán, E., Miklán, Zs., Bánóczi, Z., Hudecz, F.: Synthesis, characterization and cytostatic effect of new pemetrexed-peptide conjugates. *J. Peptide Science* 16(S1): 143 (2010)
3. Miklán Zs^+., Orbán E^+., Bánóczi Z., Hudecz F.: New pemetrexed-peptide conjugates: synthesis, characterization and in vitro cytostatic effect on non-small cell lung carcinoma (NCI-H358) and human leukemia (HL-60) cells. *J. Peptide Science* 17, 805–811 (2011)
4. Bánóczi, Z., Gorka-Kereskényi, Á., Reményi, J., Orbán, E., Hazai, L., Tıkési, N., Oláh, J., Ovádi, J., Béni, Z., Háda, V., Szántay Jr., Cs., Hudecz, F., Kalaus, Gy., Szántay, Cs.: Synthesis and in vitro antitumor effect of vinblastine derivative-oligoarginine conjugates. *Bioconjugate Chemistry* 21: 1948-1955 (2010)
5. Orbán E., Manea M., Marquadt A., Bánóczi Z., Csík G., Fellinger E., Bősze Sz., Hudecz F.: A new daunomycin-peptide conjugate: synthesis, characterization and the effect on the protein expression profile of HL-60 cells in vitro. *Bioconjugate Chemistry* 22, 2154-2165 (2011)

**Referált folyóiratban megjelent konferencia előadás kivonata, $^+$ azonos hozzájárulás a cikkben leirtakhoz

2 cm

Budget: 3.000,000.- HUF

TARGETING OF TUMOUR CELLS BY PEPTIDE CONJUGATES

Ferenc Hudecz[1], Erika Orbán[1], Zoltán Bánóczi[1], Rita Szabó[1], Zsanett Miklán[1], Dezső Gaál[2], Gabriella Csik[3]

[1]Research Group of Peptide Chemistry at Eötvös L. University, Budapest; [2]National Institute of Oncology, Budapest; [3]Institute of Biophysics and Radiation Biology, Semmelweis University, Budapest

New conjugates of antitumour compounds with oligopeptides were prepared and characterized. The peptide component of the conjugates was a short either "*de novo*" designed cell penetrating oligoarginine (Arg_x, where x = 4, 5 or 6) and/or Erb2 receptor binding peptide ligand of natural origin. The partner component in the conjugates was an antitumour drug in clinical use (anthracycline, folic acid antagonist [pemetrexed, Pem]), or a vinblastine derivative. The conjugates, their stability were investigated by chromatography, their structure was studied by amino acid analysis, UV-, and fluorescence spectroscopy as well as by mass spectrometry. The effect of the conjugates on tumour cells *in vitro* was investigated on various human cell lines (sensitive and resistant HL-60, and also on HepG2, NCI-H358, MCF-7, and SK-BR-3), their cellular uptake was analysed by FACS in some cases the influence of the compounds on the protein expression profile were monitored too. It has been discovered that the cellular uptake and *in vitro* antitumour effect of oligoarginine conjugates with 6 or 8 residues conjugated with daunomicin (Dau) are dependent on the cell type (HL-60 > HepG2) (1). The „hybrid" conjugate of Pem with Arg_8 plus Erb2 receptor ligand oligopeptide was more efficient than Pem conjugate either with Arg_8 or with Erb2 receptor ligand peptide. The effect was also very much dependent on the cell line used (HL-60 > NCI-H358) (2,3). The conjugates of Arg_x with a vinblastine derivative were active on both sensitive and – in a MRP1/MDR1 dependent manner - resistant HL-60 cells (4). Dau conjugated with the Erb2 receptor-ligand peptide exhibited *in vitro* cytotoxic effect on cells in the following order: HL-60 > HepG2 > MCF-7 > SK-BR-3. Using the most sensitive HL60 cells, we have demonstrated that coupling of oligopeptide by covalent linkage with Dau influence strongly the *in vitro* cytotoxicity, the uptake properties as well as the protein expression profile of the free drug as compared with the Dau- or untreated control. By proteomic studies we have identified three proteins whose expression are markedly changed after the conjugate treatment in HL-60 cells (5). Our results suggest that the conjugation of antitumour drugs with oligopeptide could influence strongly their relevant biological properties and protein expression.

References:

1. Miklán, Zs., Orbán, E., Csík, G., Schlosser, G., Magyar, A., Hudecz, F.: New daunomycin–oligoarginine conjugates: synthesis, characterization, and effect on human leukemia and human hepatoma cells. *Biopolymers (Peptide Science)*, 92: 489-501 (2009)

2. **Orbán, E., Miklán, Zs., Bánóczi, Z., Hudecz, F.: Synthesis, characterization and cytostatic effect of new pemetrexed-peptide conjugates. *J. Peptide Science* 16(S1): 143 (2010)

3. Miklán Zs[+]., Orbán E[+]., Bánóczi Z., Hudecz F.: New pemetrexed-peptide conjugates: synthesis, characterization and in vitro cytostatic effect on non-small cell lung carcinoma (NCI-H358) and human leukemia (HL-60) cells. *J. Peptide Science* 17, 805–811 (2011)

4. Bánóczi, Z., Gorka-Kereskényi, Á., Reményi, J., Orbán, E., Hazai, L., Tıkési, N., Oláh, J., Ovádi, J., Béni, Z., Háda, V., Szántay Jr., Cs., Hudecz, F., Kalaus, Gy., Szántay, Cs.: Synthesis and in vitro antitumor effect of vinblastine derivative-oligoarginine conjugates. *Bioconjugate Chemistry* 21: 1948-1955 (2010)

5. Orbán E., Manea M., Marquadt A., Bánóczi Z., Csík G., Fellinger E., Bősze Sz., Hudecz F.: A new daunomycin-peptide conjugate: synthesis, characterization and the effect on the protein expression profile of HL-60 cells in vitro. *Bioconjugate Chemistry* 22, 2154-2165 (2011)

**Abstract in reviewed journal, [+] Authors contributed equivalently to the work reported

Teljes támogatás: 6.000.000,- Ft

DIMERIZÁCIÓ SZEREPE AZ ANGIOTENZINRECEPTOR MŰKÖDÉSÉBEN

Hunyady László, Gyombolai Pál, Szalai Bence, Szekeres Mária, Turu Gábor
Semmelweis Egyetem, Élettani Intézet

A G fehérjéhez kapcsolt receptorok dimerizációja alapvetően befolyásolja azok működését, mert a dimert alkotó receptorok közti allosztérikus interakciók befolyásolhatják a ligandkötést, a receptor konformációját, illetve kapcsolatát különféle effektor fehérjékkel. Az angiotenzin II (AngII) a renin-angiotenzin rendszer fő effektor hormonja, mely fontos szerepet játszik a vérkeringés és a só-vízháztartás szabályozásában. Az AngII célszöveteiben számos hatást hoz létre az 1-es típusú angiotenzin receptorok (AT1R) aktiválásával, például fokozza a sejtek növekedését és proliferációját, a mellékvesekéreg aldoszterontermelését, valamint az érfal-simaizomsejtek tónusát. Munkánk során CHO sejtekben tranziensen expresszált AT1R homodimeren belüli allosztérikus interakciókat vizsgáltuk egy antagonista rezisztens receptor mutáns felhasználásával. A dimer egyik tagját szelektíven stimuláltuk, míg a másik tag β-arreszin2 kötését és konformációs változásait biolumineszcencia rezonancia energiatranszfer (BRET) módszeren alapuló mérésekkel követtük. AngII hatására interakciót detektáltunk sárga fluoreszcens fehérjével (YFP) jelölt nem stimulált alegység és a Renilla luciferázzal (Rluc) jelölt β-arreszin2 között. Ez az interakció nem függött a stimulált alegység β-arreszin2 kötő képességétől, azonban megszűnt, ha a G fehérje aktiválásra nem képes DRY/AAY mutáns AT1R-t expresszáltuk aktivált alegységként. A receptor konformáció közvetlen vizsgálatára létrehoztunk egy BRET alapú intramolekuláris AT1R bioszenzort, mely a hármas intracelluláris hurokban YFP molekulát tartalmazott, míg a C terminális farok régióhoz RLuc-t kapcsoltunk. E szenzort az antagonista rezisztens receptorral együtt expresszálva vizsgálhatóvá vált a nem stimulált alegység konformáció változása, mely eltért a közvetlenül serketett alegység vizsgálatakor detektált BRET jeltől. Ez a jel sem jött létre, ha a stimulált alegység hordozta a DRY/AAY mutációt. Radioligand disszociációs kísérletekkel vizsgáltuk az AT1R homodimerek ligandkötését. ^{125}I-vel jelölt AngII disszociációja felgyorsult szaturáló koncentrációjú jelöletlen AngII jelenlétében, ami arra utal, hogy a homodimer receptorok ligandkötése negatív kooperativitást mutat. Ez a hatás szintén a dimeren belüli allosztérikus interakciók ismert következménye. Ez az interakció sem jelentkezett, ha kísérleteinket DRY/AAY mutáns receptorral végeztük. Összefoglalva kísérleteinkben a dimer egyik tagját stimulálva, a másik tag fokozott ligand disszociációját, megváltozott konformációját és β-arreszin2 kötését észleltük. A DRY/AAY mutánssal kapott eredményeink alapján a dimeren belüli allosztérikus interakciókhoz szükséges a stimulált alegység teljesen aktív konformációja és/vagy G-fehérje kötése, mely által eredményeink az allosztérikus hatás molekuláris mechanizmusáról is információt adnak.

Az AT1R növekedési hatásainak közvetítésében központi szerepet játszik, hogy aktiválódása fokozza a Ras kis G-fehérjék aktivitását. E mechanizmust BRET módszerrel vizsgáltuk élő sejtekben. Ras fehérjéhez kapcsolt energiaakceptorból, illetve a Raf-1 fehérje Ras kötő doménjéhez kapcsolt energiadonorból álló szondákat készítettünk, melyekhez a Ras aktiválódás sejten belüli lokalizációjának feltérképezésére irányító szekvenciákat kapcsoltunk. Ezek segítségével a szondákat különböző sejtkompartmentekbe irányítottuk. HEK293 sejtekben expresszált, a plazmamembránba irányított szondák EGF, illetve AngII stimulusra Ras aktiválódást jelző BRET-jelnövekedést mutattak. A sejtek belsejébe irányított szondák esetében a transz-Golgi-hoz, illetve az endoplazmatikus retikulumhoz eljutatott szonda egyértelmű Ras aktiválódást jelzett. Különböző AT1R konstruktok felhasználásával (vad típus és mutánsok) megállapítottuk, hogy a Golgiban és az endoplazmatikus retikulumban létrejövő Ras aktiválódás G-fehérjék aktiválódásának következménye. Az EGF-receptor kináz aktivitását gátló inhibitor alkalmazásával kimutattuk, hogy az AngII hatására bekövetkező Ras aktiválódás az intracelluláris kompartmentekben nem a plazmamembránban is végbemenő EGF-receptor transzaktiváció következménye. Az AT1R aktiválódás másik fontos következménye, hogy a jelátviteli folyamat során keletkező diacilglicerinből DAG-lipáz hatására endokannabinoid hatású 2-archidonoilglicerin keletkezik. Bagdy György munkacsoportjával (Semmelweis Egyetem, GYTK, Gyógyszerhatástani

Intézet) együttműködésben leírtuk, hogy a hypothalamus paraventricularis magjába adott AngII centrális vérnyomásemelő hatását CB1 kannabinoid receptor blokkolóval gátolni lehet, mely eredmény arra utal, hogy az AT1R aktiválódás hatására kialakuló endokannabinoid képződés szerepet játszik ebben a folyamatban.

AngII mellékvesekéreg sejtekre gyakorolt génszintű hatásainak megismerésére humán adrenokortikális sejtvonalon (H295R) az AngII-indukált gének expresszióját microarray analízissel vizsgáltuk. Az egyik legnagyobb mértékben indukált gén a neurotrofinok családjába tartozó agyi eredetű növekedési faktor (BDNF) volt. A BDNF élettani szerepe fontos az idegrendszer fejlődésében, de megjelenhet számos extraneurális szövetben is. Az Ang II-indukált BDNF expressziót real-time PCR-rel igazoltuk H295R és patkány glomerulosa sejtekben egyaránt. Immunfestéssel kimutattuk, hogy AngII szignifikánsan fokozza a BDNF fehérje citoplazmatikus mennyiségét H295R- és patkány glomerulosa sejtekben egyaránt. Eredményeink alapján a H295R és patkány glomerulosa sejtekben Ang II hatására fokozódik a BDNF mRNS és fehérje mennyisége.

Közlemények:

Balla A, Erdélyi LS, Soltész-Katona E, Balla T, Várnai P, Hunyady L: Demonstration of angiotensin II-induced Ras activation in the trans-Golgi network and the endoplasmic reticulum using BRET-based biosensors. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 286: 5319-5327 (2011) IF: 5,328

Balogh K, Patócs A, Hunyady L, Rácz K: Menin dynamics and functional insight: Take your partners. MOLECULAR AND CELLULAR ENDOCRINOLOGY 326: 80-84 (2010) IF: 4,119

Gyombolai, P, Bagdy Gy, Catt K, Turu G, Hunyady L: Regulation of endocannabinoid release by G proteins: a paracrine mechanism of G protein-coupled receptor action. MOLECULAR AND CELLULAR ENDOCRINOLOGY (közlésre elfogadva) IF: 4,119

Ligeti E, Csépányi-Kömi R, Hunyady L: Physiological mechanisms of signal termination in biological systems. ACTA PHYSIOLOGICA (OXF) (közlésre elfogadva) IF: 3,138

Szekeres,M, Nádasy, G.L, Turu, G, Süpeki, K, Szidonya, L, Buday, L, Chaplin, T; Clark, A.J.L, Hunyady, L.: Angiotensin II-induced expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in human and rat adrenocortical cells. ENDOCRINOLOGY 151:1695-703 (2010). IF: 4,993

Budget: 6,000,000.- HUF

THE ROLE OF DIMERIZATION IN ANGIOTENSIN RECEPTOR FUNCTION

László Hunyady, Pál Gyombolai, Bence Szalai, Mária Szekeres, Gábor Turu
Department of Physiology, Semmelweis University

Dimerization of G protein-coupled receptors has important functional consequences, because allosteric communication between the protomers of dimerized receptors can alter their ligand binding, conformation and interactions with different effector proteins. Angiotensin II (AngII) is the main effector hormone of the renin-angiotensin system, which plays important roles in blood pressure and salt-water regulation. AngII exerts numerous effects in its target tissues via the type 1 angiotensin receptor (AT1R), including stimulation of cell growth and proliferation, hormone production of adrenal glomerulosa cells and vascular tone. In our studies we investigated the allosteric interactions between AT1R homodimers transiently expressed in CHO cells using an antagonist resistant receptor. We have selectively stimulated one protomer of the dimer, and the β-arrestin2 binding and conformation alteration of the other protomer was followed using bioluminescence resonance energy transfer- (BRET-)based methods. We detected interaction between the yellow fluorescent protein (YFP) labeled non-stimulated protomer (AT1R-YFP) and Renilla luciferase (RLuc) labeled β-arrestin2 following angiotensin II stimulus. This interaction was independent of β-arrestin2 binding of the stimulated protomer, but was absent, when DRY-AAY mutant AT1R, which is unable to active G proteins, was used as the activated protomer. To measure the conformational alterations in the non-stimulated protomer directly, we also used a BRET-based intramolecular biosensor of AT1R activation, which had YFP in the 3rd intracellular loop and RLuc fused to its C-terminal tail. Co-expression of this sensor with the antagonist resistant AT1R allowed us to detect, in the presence of an AT1R blocker, the conformational changes of the non-stimulated protomer. Our data show that AngII induced changes in the BRET signal of the non-stimulated protomer, which was different from the response of the directly activated protomer. The conformation alteration of the non-stimulated protomer was absent, when the activated protomer contained the DRY/AAY mutation. We also detected negative cooperative ligand binding in the AT1R homodimer, which is also a characteristic hallmark of intradimeric allosteric interactions. Dissociation of ^{125}I-labeled Ang II was increased significantly in the presence of saturating concentration of non-labeled Ang II, and this response was also eliminated, when the DRY/AAY mutant AT1R was used. Our results show that activation of one protomer of the AT1R homodimer is followed by increased ligand dissociation, altered conformation and β-arrestin2 binding of the other protomer. Our results with the DRY/AAY mutant AT1R suggest that the allosteric effects in AT1R homodimers require the fully active conformation and/or the G protein activation of the stimulated protomer, which highlights the molecular mechanism behind these allosteric interactions.

Activation of the Ras family of small G proteins plays a key role in the growth-promoting actions of AT1R activation. We have studied the effect of AngII on the activation of Ras small G proteins in live cells using BRET-based biosensors. We have created sensors which contained the Ras protein fused with the energy acceptor and the Ras-binding domain of the Raf kinase fused with the energy donor. In order to study the Ras activation in intracellular compartments, we have targeted our sensors to different intracellular compartments using targeting sequences. The sensors targeted to the plasma membrane were able to detect EGF- and AngII-induced Ras activation. The biosensors targeted to the trans-Golgi network and the endoplasmic reticulum also responded to stimulation suggesting that Ras was activated in these compartments. We were able to show using wild-type and mutant AT1Rs that the Ras activation in the trans-Golgi network and the endoplasmic reticulum requires G protein activation. However, the Ras activation in intracellular membranes was not inhibited by inhibitors of EGF receptor kinase suggesting that it is independent of EGF receptor transactivation, which plays a role in AngII-induced Ras activation in the plasma membrane. Another important consequence of AT1R activation is the formation of 2-arachidonoylglycerol from diacylglycerol, which is generated during the signal transduction process. In a collaboration with the research group of György Bagdy (Department of Pharmacodynamics, Semmelweis

University), we have reported that in rats the hypertensive effect of AngII administered to the paraventricular nucleus of the hypothalamus can be inhibited by a CB1 receptor antagonist. These data suggest that AngII-induced endocannabinoid formation has a role in the central hypertensive effect of AT1R activation.

We have also studied the AngII-induced gene expression response in H295R adrencortical tumor cells using microarray analysis. We have observed that AngII markedly stimulated the expression of brain-derived neurotropic factor (BDNF), an important neurotrophin, which has key roles in the development of the nervous system. However, BDNF is also present in extraneural tissues. We have validated the effect of AngII on BDNF expression in H295R cells and in rat adrenal glomerulosa cells using real-time PCR. In these cells we have also detected the effect of AngII on BDNF protein expression by immunostaining. These data suggest that AngII stimulates the expression and protein level of BDNF in H295R cells and rat adrenal glomerulosa cells.

Publications:

Balogh K, Patócs A, Hunyady L, Rácz K: Menin dynamics and functional insight: Take your partners. MOL. CELL. ENDOCRINOL. 326:80-84 (2010) IF: 3,503

Szekeres,M, Nádasy, G.L, Turu, G, Süpeki, K, Szidonya, L, Buday, L, Chaplin, T; Clark, A.J.L, Hunyady, L.: Angiotensin II-induced expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in human and rat adrenocortical cells. ENDOCRINOLOGY 151:1695-703 (2010). IF: 4,75

Balla A, Erdelyi LS, Soltesz-Katona E, Balla T, Varnai P, Hunyady L: Demonstration of angiotensin II-induced Ras activation in the trans-Golgi network and the endoplasmic reticulum using BRET-based biosensors. J BIOL CHEM 286: 5319-5327 (2011) IF:5.328

Gyombolai, P, Bagdy Gy, Catt K, Turu G, Hunyady L: Regulation of endocannabinoid release by G proteins: a paracrine mechanism of G protein-coupled receptor action. MOL. CELL. ENDOCRINOLOGY (in press) IF:4.119

Ligeti E, Csépányi-Kömi R, Hunyady L: Physiological mechanisms of signal termination in biological systems. ACTA PHYSIOLOGICA (OXF) (in press) IF:3,138

Budget: 2 400,000.- HUF

INTERIM 18FDG-PET/CT VIZSGÁLATA HODGKIN-ÉS AGRESSZÍV NEM-HODGKIN-LYMPHOMÁS BETEGEK KORAI KEZELÉSI VÁLASZÁNAK LEMÉRÉSÉBEN, PROGNÓZISÁBAN ÉS TÚLÉLÉSÉBEN.

Illés Árpád[1], Udvardy Miklós[2], Gergely Lajos[1,] Miltényi Zsófia[1], Simon Zsófia[1], Váróczy László[1], Nagy Zsolt[3], Garai Ildikó[4]
[1]DEOEC III. Belgyógyászati Klinika, [2]DEOEC II. Belgyógyászati Klinika, [3]Semmelweis Kórház, II. Belgyógyászat, MISEK Kft., [4]ScanoMed Orvosi, Diagnosztikai, Kutató és Oktató Kft.

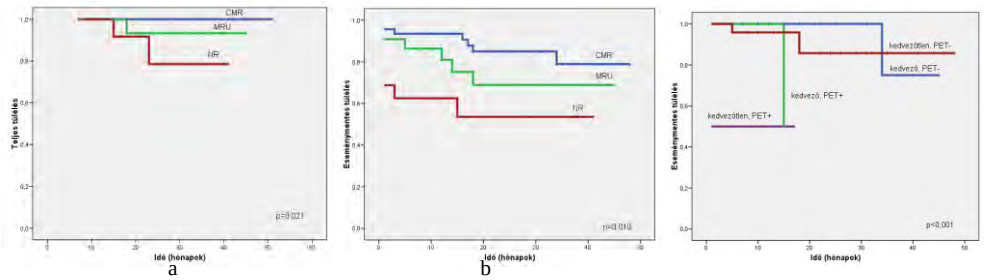
A lymphomák a malignus betegségek csak mintegy 5%-át teszik ki, orvosi és társadalmi jelentőségük ezen mégis túlnő. Jelentős részük ma már gyógyítható, de eredményeink további javítása szükséges, különösen az elsődleges terápiára kevésbé reagáló, vagy terápiarezisztens betegség esetén. A ^{18}FDG-PET/CT nemcsak kezelési után restaging során, hanem alatta is, korán jelzi (korai kezelési válasz - interim vizsgálat) azokat a dinamikus, metabolikus változásokat, mely a lymphoma kezelhetőségét, kemoszenzitivitását mutatja.

A CHEAP (chemotherapy effectiveness assessed by PET) vizsgálatunkban lymphomákban vizsgáltuk a PET/CT, különösen az interim vizsgálatok jelentőségét. 2011 májusáig (2. interim analízis) vizsgálataink a következőek:

	Primer staging	Interim	Restaging
HL	104	89	73
DLBCL	84	59	50
MCL	12	8	6
T	18	15	8
FL	28	23	22
MZL	10	6	2

HL: Hodgkin lymphoma, DLBCL: diffúz nagy B sejtes lymphoma, MCL: Köpenysejtes lymphoma,
T: T sejtes lymphoma, FL: Follicularis lymphoma, MZL: marginális zóna lymphoma

Kutatásunk során kiemelten foglalkoztunk a Hodgkin- és DLBCL-es betegek elsődleges kezelése során végzett interim PET/CT vizsgálatokkal. Összesen 113 HL-es betegnél történt staging PET/CT vizsgálat 2011.08.31-ig, 103 beteg interim vizsgálatainak az eredménye áll rendelkezésre, és 98 betegnek történt restaging vizsgálata. Az adatok feldolgozása folyamatban van, a végleges eredményekről – további túlélések tükrében - közlemény megírását 2012-ben tervezzük. A Pécsett az MHTT XXIII. Kongresszusán 2011. májusban beszámoltunk addigi eredményeinkről. Megerősítettük, hogy az interim PET pozitivitás rossz prognózissal jár és többségében terápiaváltás indokolt, míg annak negativitása esetén még kérdéses a tervezett kezelés redukálása és hasznossága a kezelési eredmények szempontjából.



a b

HL-es betegek teljes- (a), eseménymentes (b)túlélése az interim PET/CT alapján

Eseménymentes túlélés korai stádiumú HL-es betegeknél a prognosztikai csoportok és az interim PET/CT alapján

Budget: 2 400,000.- HUF

DLBCL-ben vizsgáltuk a SUVmax (standardized uptake value) változásának összefüggését a progresszió-, eseménymentes- és teljes túléléssel, mivel a SUVmax változásának a mértéke, mely összefüggést mutat(hat) a DLBCL-es betegek túlélésével még nem ismert/nem validált. Ötven DLBCL-es betegnél történt interim PET/CT vizsgálat 4 ciklus R-CHOP kezelés után. Az eseménymentes túlélés akkor különbözött szignifikánsan, ha 80%-os SUVmax változás alapján különítettük el a betegeket.

A ritka T/NK-sejtes lymphomák jellemzői jelentősen eltérnek a B-sejtesektől, gyakoribb az előrehaladott stádiumban felismert betegség, prognózisuk is rosszabb. Vizsgálatunk során 22 T-sejtes betegnél történt PET/CT, 15-nél már interim és restaging vizsgálat is. Mind a 22 esetben ^{18}FDG felvételt észleltünk, ugyanazon szövettani típusú lymphomában is széles határok között változott a (SUV)max érték, és az agresszív klinikai viselkedés ellenére is észleltünk kisebb értéket. Az interim PET/CT vizsgálatkor komplett metabolikus remisszióban (CMR) lévő betegek diagnóziskori átl. SUVmax értéke 16.71 (5.2-33.6) volt, míg a CMR-t el nem érő betegek átlagos SUVmax értéke a diagnóziskor 9.27 (5.02-19.7) volt. A teljes túlélés jobb volt azoknál a betegeknél, akik KMR-be kerültek, illetve akiknél nagyobb SUVmax értéket észleltünk. A T-sejtes lymphomákban vizsgálataink alapján van létjogosultsága a PET/CT-nek főleg a staging és restaging során. Az interim vizsgálatok szerepe még kérdéses, további adatgyűjtés szükséges.

Foglalkoztunk a ^{18}F-FDG PET/CT vizsgálat értékelési nehézségeivel is. 2007. május 1. és 2010. október 31. között 1862 18F-FDG PET/CT-vizsgálat történt lymphomás betegekben a debreceni PET/CT-központban. A lymphomás betegek rutin metabolikus PET/CT-vizsgálatával szerzett tapasztalataink alapján elemeztük a betegség jellegéből adódó értékelési nehézségeket. A PET/CT értékelése során az azonos típusú lymphoma eltérő mértékű FDG-felvétele nehézséget jelenthet, ami megerősíti, hogy a terápiát követő vizsgálatok pontos mérési eredményéhez, a megbízható összehasonlításhoz az alapvizsgálat elvégzése fontos. A betegek közel 40%-ában észleltünk extranodális lokalizációt, szervenként eltérő gyakorisággal. Az extranodális megjelenés sokszínű, legtöbbször nem jellemző magára a betegségre és szervenként eltérő megjelenést mutat. A lymphomák más betegséggel való együttes megjelenése további nehézséget jelent az értékelésben.

1. Miltényi Zs, Barna S, Magyari F, Tóth Z, Garai I, Illés Á: Segít-e a ^{18}FDG-PET/CT vizsgálat a T/NK-sejtes lymphomák ellátásában? MBA, 64; 160-166 (2011)
2. Magyari F, Páyer E, Barna S, Simon Zs, Miltényi Zs, Udvardy M, Váróczy L, Illés Á : Első tapasztalatok rituximab-bendamustin kezeléssel Hodgkin-lymphoma autológ perifériás őssejt-transzplantációt követő progressziójában. MBA, 64; 167-169 (2011)
3. Garai I, Borbély K, Barna S, Szűcs B, Hascsi Zs, Tóth Z, Illés Á:^{18}FDG PET/CT lymphomákban: a betegség jellegéből adódó értékelési nehézségek és összevetés az irodalmi adatokkal. Magyar Onkológia, 55 (3), 178-186 (2011)
4. Magyari F, Simon Z, Barna S, Udvardy M, Váróczy L, Illés A.: Successful administration of rituximab-bendamustine regimen in the relapse of Hodgkin lymphoma after autologous hemopoietic stem cell transplantation. Hematol Oncol. 2011 Oct 28. doi: 10.1002/hon.1004. [Epub ahead of print]

2 cm 2 cm

Budget: 2 400,000.- HUF

THE ROLE OF INTERIM 18FDG PET/CT IN THE EVALUATION OF THERAPEATIC RESPONSE, PROGNOSIS AND SURVIVAL IN AGRESSIVE NON-HODGKIN1S AND HODGKIN1S LYMPHOMA PATIENTS

Illés Árpád[1], Udvardy Miklós[2], Gergely Lajos[1], Miltényi Zsófia[1], Simon Zsófia[1], Váróczy László[1], Nagy Zsolt[3], Garai Ildikó[4]

[1]DEOEC III. Dept. of Internal Medicine, [2]DEOEC II. Dept. of Internal Medicine, [3]Semmelweis Hospital, II. Dept. of Internal Medicine, MISEK Kft., [4]ScanoMed Orvosi, Diagnosztikai, Kutató és Oktató Kft.

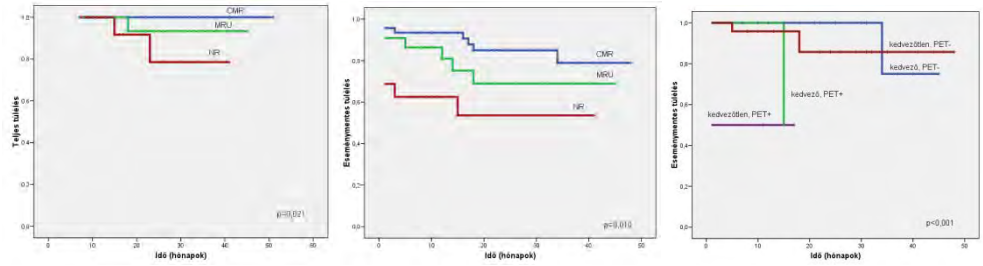
Malignant lymphomas are accounting for only 5% of malignant diseases however their medical and social impact is much greater. The majority of them are curable, but the results are still to be improved, especially in patients failing or not completely responding to first line therapy. The use of 18FDG PET/CT after the therapy is useful for restaging, but its use is important during therapy as well. It can detect early responses (interim staging), separately providing data on early metabolic and morphologic changes induced by chemotherapy, thus providing valuable information on the chemosensitivity of the disease.

In the CHEAP (chemotherapy effectiveness assessed by PET) study we assessed the role of PET/CT in lymphomas with special attention on its role as an interim staging tool. Up to May 2011, our results after 2. interim analysis are as follows:

	Primer staging	Interim	Restaging
HL	104	89	73
DLBCL	84	59	50
MCL	12	8	6
T	18	15	8
FL	28	23	22
MZL	10	6	2

HL: Hodgkin lymphoma, DLBCL: Diffuse Large B-cell Lymphoma, MCL: Mantle cell lymphoma, T: T-cell lymphoma, FL: Follicular lymphoma, MZL: marginal zone lymphoma

Our main goal was to investigate the role of interim PET/CT during the first line treatment of Hodgkin's and DLBCL patients. All together 113 patients with Hodgkin's disease underwent primary staging PET/CT, and interim results are available from 103 patients up to 31.Aug., 2011. Among these 98 patients already had the restaging PET/CT performed as well. Final data analysis is till in progress, aour final results –in regard of overall survivals- we will publish a paper in 2012. In 2011 at the annual congress of MHTT (Hungarian Society of Hematology and Transfusiology) at Pécs, we presented our results. We confirmed that positivity during interim PET/CT corresponds with inferior prognosis, and a change in therapy is often indicated. Howeber a negative interim PET/CT may indicated good responders, and a reduction in planned chemotherapy cycles can be performed.



a

Overall (a) and event free (b) survival of Hodgkin's patients according to interim PET/CT results

b

Event free survival in early stage Hodgkin's patients in regard of prognostic subgroups and interim PET/CT results.

We examined the role of SUVmax (standardized uptake value) and its prognostic role in progression free, event free and overall survival in DLBCL patients.. This association of SUVmax change is not yet clearly understood nor validated. Interim PET/CT was performed in 50 DLBCL patients after 4 cycles of R-CHOP therapy. A significant difference was found in event free survival in the case of at least 80% change in the SUVmax value.

The rare T/NK cell lymphomas are very much different from B cell lymphomas. The often present at an advanced stage, and their prognosis is inferior.We examined 22 T-cell lymphoma patients, and an interim na dre-staging PET/ CT was performed in 15 of them. All 22 cases were accumulating ^{18}FDG in the tumor tissue, but with great variation in SUVmax values. Some cases with aggressive clinical characteristics were having only low SUVmax values. Patients at complete remission (CR) at interim PET/CT had a pretreatments average SUVmax of 16.71 (5.2-33.6), whereas patients not reaching CR at interi m PET/CT had a pretreatment SUVmax of 9.27 (5.02-19.7). The overall survival was better in patients reaching remission at interim staging, and in patients with higher pretreatment SUVmax values. based on our results PET/CT has a role in T cell lymphomas, especially during staging and restaging. The role of PET/CT as an interim exam still has to be further confirmed with higher number of patients.

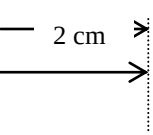
We analyzed the pitfalls of ^{18}FDG PET/CT analysis. Between May 1, 2007 and October 31, 2010 all together 1862 ^{18}FDG PET/CT scans were performed in lymphoma patients at our center in Debrecen. Routine metabolic PET/CT scans were performed and data was analyzed according to the characteristics of the different lymphoma types. During the analysis of PET/CT scans we realized that the same lymphoma types are having very different PET/CT values. This is very important to properly standardize the reporting criteria, making therapeutic responses in individual patients valid and clinically usable. This can only be done with a proper baseline PET/CT scan before any therapy. We detected extranodal involvement in 40% of our patients, with different organs involved. This extranodal involvement is very variable, not characteristic to the lymphoma type. Co-existence of other than lymphomatic disease is also a challenge to be dealt with in these patients.

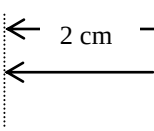
1. Miltényi Zs, Barna S, Magyari F, Tóth Z, Garai I, Illés Á: Segít-e a ^{18}FDG-PET/CT vizsgálat a T/NK-sejtes lymphomák ellátásában? MBA, 64; 160-166 (2011)

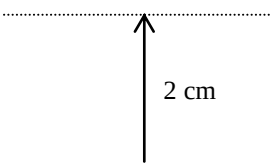
2. Magyari F, Páyer E, Barna S, Simon Zs, Miltényi Zs, Udvardy M, Váróczy L, Illés Á : Első tapasztalatok rituximab-bendamustin kezeléssel Hodgkin-lymphoma autológ perifériás őssejt-transzplantációt követő progressziójában. MBA, 64; 167-169 (2011)

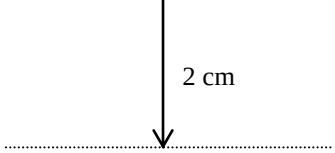
3. Garai I, Borbély K, Barna S, Szűcs B, Hascsi Zs, Tóth Z, Illés Á:^{18}FDG PET/CT lymphomákban: a betegség jellegéből adódó értékelési nehézségek és összevetés az irodalmi adatokkal. Magyar Onkológia, 55 (3), 178-186 (2011)

4. Magyari F, Simon Z, Barna S, Udvardy M, Váróczy L, Illés A.: Successful administration of rituximab-bendamustine regimen in the relapse of Hodgkin lymphoma after autologous hemopoietic stem cell transplantation. Hematol Oncol. 2011 Oct 28. doi: 10.1002/hon.1004. [Epub ahead of print]









Teljes támogatás: 4.800.000,- Ft

ER – stressz kialakulásának vizsgálata metabolikus szindrómában

Jakab Ferenc[1], Baranyai Zs.,[1], Mersich Tamás[1], Láng István[1], Zaránd Attila[1], Besznyák István[1], Dede Kristóf[1], , Mandl, József[2] Jemnicz Katalin[3]
[1]Uzsoki utcai Kórház Sebészeti – Érsebészeti Osztály, [2]Semmelweis Egyetem, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Pathobiokémiai Intézet, MTA-SE Patobiokémiai Kutatócsoport [3]MTA Kémiai Kutatóközpont, Farmabiokémiai Osztály

A megfelelő minőségű és mennyiségű primer hepatocita izolálása a mai napig nem megoldott. Eddig főleg donorokból származó egész szervből nyerték a sejteket. Ebben a munkában kidolgoztunk egy módszert, amely során tumoros májból reszekcióval eltávolított szövet egészséges részéből izoláltunk hepatocitákat. A humán májminták onkológiailag előkezelt, kolorektális rák májmetasztázisai miatt reszekált betegekből származtak. A hepatocitákat a hisztológiailag egészséges májszövet perfúziójával izoláltuk három lépésben. Először a májdarabot a vágott felületen talált kapillárison keresztül perfundáltuk Earle's balanced salt solution (EBSS), pH 7,4 oldattal. A májdarabot először Ca^{2+} mentes, EGTA-val kiegészített EBSS oldattal mostuk, majd kelátor nélküli EBSS pufferrel, végül Ca^{2+}-ot és IV típusú kollagént tartalmazó oldattal fejeztük be a perfúziót. Az izolálást Bayliss és Skett (1996) módszere alapján, 37^0 C-on, pH 7.4 oldatokkal végeztük. A sejtek életképességét (>90%) tripán-kék kizárásos módszerrel határoztuk meg. Ezután a sejtelek 24-well plate-ekre ültettük, amelyeket előzőleg patkány farokból nyert kollagénnel fedtünk. A sejteket Williams Medium E oldatban tartottuk, amelyet kiegészítettünk 5 % FCS, 100 nM inzulin, 0.1 mg/ml gentamicin, 30 nM Na_2SeO_3, és 0.1 μM dexametazon oldatokkal. A sejteket a sejtfunkciók vizsgálatáig 37 ^{0}C –on, 100 % páratartalmú, 95 % levegő-5 % CO_2 légkörű termosztátban tartottuk. A hepatobiliáris transzporterek mennyiségét és működését hagyományos monolayer vagy szendvics hepatocita kultúrában vizsgáltuk. A transzporter proteinek mennyiségének változását a sejtkultúra idejének függvényében Western blot analízissel követtük. Az egyes uptake transzporterek működését a rájuk jellemző szelektív szubsztrátok felhasználásával, monolayer kultúrában mértük. Eredményeink azt mutatják, hogy a humán hepatociták sokkal kevésbé érzékenyek a sejtek környezetének változására, mint a rágcsálókból izoláltak. A sejtek kultúrában tartása során kissé ugyan csökkent valamennyi általunk vizsgált modell szubsztrát felvétele a sejtekbe, ennek ellenére sejtbejutó anyagmennyiség viszonylag nagy maradt. Az efflux transzporterek aktivitását hepatocita szenvics kultúrában mértük. Szendvics konfigurációban a sejtek visszanyerik az *in vivo*-hoz hasonló morfológiájukat, és azt a képességüket, hogy a vegyületek vektoriálisan, szinuszoidális, vagy kanalikuláris irányba eliminálják. Ebben a modellben mértük az egyes transzporterek specifikus szubsztrátjainak vektoriális transzportját és a sejten belüli akkumulációját. Néhány olyan gyógyszer, amely a klinikai felhasználása során koleszt̀azist okozott (ciklosporin A, rifampicin, bozentan) erősen eltolta a modell szubsztrátok eliminálásának irányát a szinuszoidális transzport felé, ugyanakkor a sejtekben maradó anyagmennyiség is megnőtt. Ez az eredmény azt mutatja, hogy olyan erősen citotoxikus endogén vegyületek, mint pl. a bilirubin, epesavak, ha az epébe történő kiürülésüket valamilyen gyógyszer legátolja, a hepatocitákban megemelkedő koncentrációjuk miatt májkárosodást okozhatnak. További kísérleteinkben eddig a GLUT10 szubcelluláris lokalizációját vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy a fehérje expressziója jóval kifejezettebb az aszkorbinsav szintézisére képtelen fajok (ember, tengerimalac) májában, mint rágcsálókban (egér, patkány). A GLUT10 legnagyobb mennyiségben a máj mikroszómális frakciójában volt jelen, mely az endoplazmás retikulumnak felel meg. Humán fibroblasztok és HepG2 sejtek immunocitokémiai vizsgálatával kimutattuk, hogy a GLUT10 nem kolokalizálódik a mitokondriális marker MitoTrackerrel. A várható eredmények tisztázhatják az ATS (Arterial Tortuosity Syndroma) patomechanizmusát.

Informatikai rendszer kifejlesztése és a dokumentálás: A klinikai adatok tárolására, a betegek követésére külön adatbázist hoztunk létre, mely a beteg személyes adatait, kórelőzményét, a májból történő mintavétel körülményeit, az eltávolított májdaganatos szövet patológiai

tulajdonságait, a szövetminta nyerése közben végzett májműtét klinikai adatait, és korábbi gyógyszerelést valamint a követési adatokat tartalmazza, anonim módon.
Betegek követése: 20 betegünk, akiknél mintavétel történt a májból a hazai protokoll alapján követtük kétféle formában.
- speciális ambuláns rendelés formájában, melyhez esetenként vérvizsgálat tartozik, és a klinikai adatokat az általunk kifejlesztett informatikai regiszterben rögzítjük.
- A kórházi informatikai rendszer segítségével, a hagyományos onkológiai betegutat követve gyűjtünk adatokat a beteg sorsáról a májműtétet követően. A nyomonkövetés klinikai adatai és a tumorgenetikai vizsgálatok valamint a májsejt transzport mechanizmusra vonatkozó eredmények összevetése jelenleg folyamatban van.

6./a sz. melléklet (közlemények)

1. Jakab F., Mersich T.: Ismételt májresectio, a modern daganatsebészet egyik kihívása, MAGYAR SEBÉSZET 1; pp. 3-8. (2010)
2. Jakab F.: Colorectális májáttétek sebészeti kezelési stratégiájának megválasztása a neoadjuváns kemo- és célzott terápiára adott klinikai és patológiai válasz függvényében ORVOSI HETILAP 47; pp. 1956-1960. (2010)
3. Baranyai Zs., Mersich T., Dede K. és mtsai: Projektalapú mintagyűjtéstől a biobankig. ORVOSI HETILAP 15; pp. 606-609. (2011)
4. Jakab F., Bajtai A., Dede K.: Műtét előtti kemoterápia – targetkezelés és a kolorektális májáttétek reszekciója ONKOLÓGIA, 4; pp. 249 – 254 (2011)
5. Katalin Jemnitz, Zsuzsa Veres, Monika Szabo, és mtsai: Differential inhibitory effect of cyclosporin A and bosentan on taurocholate uptake in human and rat hepatocytes as a function of culturing time TOXICOLOGY IN VITRO: 26; pp. 174-181 (2012) IF: 2,546
6. F. Jakab, D. Teknos, Zs. Baranyai, és mtsai: Transverse hepatectomy: a 14-years experience HEPATOGASTROENTEROLOGY (2012) IF:0,677 megjelenés alatt, elfogadva

6./c sz. melléklet (kongresszusi előadások)

1., F. Jakab: New view to R0 resection for colorectal metastasis. 2nd Central European Congress of Surgery, Katowice, 2009. 04. 23-25.
2., Ferenc Jakab: Surgical Strategy for CLM in Clinical and Pathological Response to Neoadjuvant Chemo – and Targeted Therapy. 3nd Central European Congress of Surgery Dubrovnik, 2010. 04.28-05.01.
3., Jakab F.: Mersich T., Teknős D. és mtsai: Colorectális májáttétek sebészeti kezelési stratégiájának megválasztása a neoadjuváns chemo- és célzott terápiára adott klinikai és patológiai válasz függvényében. MST 60. Kongresszus, Siófok, 2010. szeptember 8-11.
4. F. Jakab: Surgical strategy for CRC liver metastases in the lime-light of pathological response rate 4nd Central European Congress of Surgery Budapest, 2011. 04.28-30.
5., Dede K., Baranyai Zs., Zaránd A., és mtsai: Lehetséges biomarkerek kutatása bevacizumab kezelés prognosztizálására MST Kísérletes Sebész Szekció, 2011. évi XXIII. Kísérletes Sebész Kongresszus 2011.06.02-04.
6., Baranyai Zs., Mersich T., Dede K., és mtsai: Projekt alapú mintagyűjtéstől a biobankig MST Kísérletes Sebész Szekció, 2011. évi XXIII. Kísérletes Sebész Kongresszus 2011.06.02-04.
7. Margittai Éva, Marcolongo Paola, Bánhegyi Gábor, Benedetti Angiolo, Mandl József, Jakab Ferenc: A kanyargós artéria szindróma és a GLUT10. MST Kísérletes Sebész Szekció, 2011. évi XXIII. Kísérletes Sebész Kongresszus 2011.06.02-04.

2 cm

2 cm

Budget: 4.800.000.- HUF

Experimental and clinical study of the development of ER stress in metabolic syndrome

Ferenc Jakab[1], Zsolt Baranyai,[1], Tamás Mersich,[1] István Láng[1], Attila Zaránd[1], István Besznyák[1], Kristóf Dede[1], József Mandl[2], Katalin Jemnicz[3]
[1]Uzsoki Teaching Hospital Surgery and Vascular Surgery, [2]Semmelweis University, Medical Chemistry, Molecular Biology and Pathobiochemistry, Hungarian Academy of Sciences – Semmelweis University Pathobiochemistry Research Group, [3]Institute of Biomolecular Chemistry, chemical Research Center, Hungarian Academy of Sciences,

Successful and consistent isolation of primary human hepatocytes remains a challenge for both cell-based therapeutics/transplantation and laboratory research. Previously authors have suggested protocols for successful human hepatocyte isolation from organ donors. In this study we elaborated a method for the isolation of hepatocytes from non-diseased tissue removed at surgical resection for liver tumors. The human liver specimens were taken from the patients with preoperative treated colorectal cancer, resected for liver metastases. Hepatocytes were prepared by a three-step perfusion of histologically normal liver fragments. The liver wedge was perfused through the exposed, cut, vessels with Earle's balanced salt solution (EBSS), pH 7.4. The liver fragments were first flushed with Ca^{2+} free EBSS containing EGTA, then with the same buffer without chelating agent and finally with EBSS containing Ca^{2+} and type IV collagenase. Perfusions were carried out at 37^0 C, pH 7.4 as described by Bayliss and Skett (1996). Cell viability (> 90%) was determined by trypan blue exclusion. The hepatocytes were then plated on 24-well plates precoated with rat tail collagen in Williams Medium E containing 5 % of fetal calf serum, 100 nM insulin, 0.1 mg/ml gentamicin, 30 nM Na_2SeO_3, and 0.1 μM dexamethasone. Cells were maintained at 37 ^{0}C in a humidified atmosphere of 95 % air-5 % CO_2 until functional analysis of them. Hepatobiliary transporter expression and function were measured using conventional monolayer and sandwich culture of hepatocytes. The expression of the transporter proteins were monitored as a function of culture time by Western blot analysis. The activity of uptake transporters were studied in monolayer cultures using probe substrates for the selected uptake transporters. Drug interaction studies were performed in the presence of drugs known to inhibit the uptake process. Our results revealed that the human hepatocytes are less sensitive to changes of the physiological environment compared to rodent cells. However the overall uptake of all substrate measured decreased, it still remained relatively high in primary human hepatocytes during culturing. Neither the rate, nor the active/passive proportion of the uptake was influenced by the configuration of culturing supporting that the expression of the uptake transporters was stabile. The activity and expression of efflux transporters were carried out in sandwich cultures of hepatocytes. In sandwich configuration the hepatocytes regain their *in vivo* like morphology and the ability of vectorial transport. In this system the vectorial transport and intracellular accumulation of probe substrates were measured. The presence of cholestatic drugs (rifampicin, cyclosporine A, bosentan) highly shifted the elimination of probe substrates toward the sinusoidal efflux, together the increase of intracellular accumulation. These findings affirm that the inhibition of biliary efflux of some endogenous compounds, such as bilirubin and bile salts may lead to hepatic injury by the elevation of these citotoxic compounds in the hepatocytes. In our further experiment the subcellular localization of GLUT 10 has been examined. It has bean demonstrated that the expression of protein was significantly higher in the liver of species unable for the synthesis of ascorbinic and (human,- guinea pig) compared to rodents (rat, mouse) The GLUT10 has been present in highest level in the microsomal fraction of the liver which is equivalent to endoplasmatic reticulem. It has been demonstrated in the experiment with human fibroblasts and HepG2 cells by immunocytochemistry the GLUT10 has not been colocalired with Mito Tracker, the marker of mitochondria.

IT system improvement and documentation: MS Acces program was improved to store clinical data collecting by follow-up. This program contains patient's personal-, anamnestic-, tissue sampling data, standard pathological property of tumor, clinical data of former medical history, on anonym way.

Follow- up: 20 patients follow-up is being considered by Hungarian protocol. There were two different ways to collect patients data by follow-up: Control at our outpatient unit, where blood sample may be taken, according to protocol and patients data are registered in our program. The other option is as follows: Data are being collected from our digital database hospital register from patients during the postoperative oncological care. Patients at follow-up are reached by phone or by mail. Follow-up is considered only with written consent. Median follow up is about 14 months. The comparison of the clinical data of follow-up, and the molecular genetic studies of the liver specimens from patients with colorectal cancer liver metastases and the results depending on the transport mechanismus in liver cells is being done continuously.

6/a. annex (publications)

1. F. Jakab, T. Mersich: repeat resection of the liver – a challenge in modern oncologic surgery MAGYAR SEBÉSZET 1; pp. 3-8. (2010)
2., F. Jakab: Choice of surgical strategy for colorectal liver metastases depending on clinical and pathological response to neoadjuvant chemo- and targeted therapy ORVOSI HETILAP 47; pp. 1956-1960. (2010)
3. Zs. Baranyai, T. Mersich, K. Dede, et al.: From project based sample collection to biobank ORVOSI HETILAP 15; pp. 606-609. (2011)
4. F. Jakab, A Bajtai, K. Dede: Preoperative chemo- and target therapy and resection liver metastases of colorectal cancer ONKOLÓGIA, 4; pp. 249 – 254 (2011)
5. Katalin Jemnitz, Zsuzsa Veres, Monika Szabo, et al.: Differential inhibitory effect of cyclosporin A and bosentan on taurocholate uptake in human and rat hepatocytes as a function of culturing time TOXICOLOGY IN VITRO: 26; pp. 174-181 (2012) IF: 2,546
6. F. Jakab, D. Teknos, Zs. Baranyai, et al: Transverse hepatectomy: a 14-years experience HEPATOGASTROENTEROLOGY (2012) IF: 0,677 Accepted for publication, in Hepatogastroenterology 115 2012. May – June.

6./c annex (congress lectures)

1., F. Jakab: New view to R0 resection for colorectal metastasis. 2nd Central European Congress of Surgery, Katowice, 2009. 04. 23-25.
2., F. Jakab: Surgical Strategy for CLM in Clinical and Pathological Response to Neoadjuvant Chemo – and Targeted Therapy. 3nd Central European Congress of Surgery Dubrovnik, 2010. 04.28-05.01.
3., F. Jakab, T. Mersich, D. Teknős, et al.: The options for surgery of colorectal liver metastases depending on clinical and pathological response to neoadjuvant chemo-and target therapy Hungarian Surgical Society, 60th Congress, Siófok, 2010. 09. 8-11.
4. F. Jakab: Surgical strategy for CRC liver metastases in the lime-light of pathological response rate 4nd Central European Congress of Surgery Budapest, 2011. 04. 28-30.
5., K. Dede, Zs. Baranyai, A. Zaránd, et al.: Study of potential biomarkers for the prognosis of bevacizumab treatment Hungarian Surgical Society, Experimental Surgical Section 23rd Congress of Experimental Surgery 2011.06.02-04.
6., Zs. Baranyai., T. Mersich, K. Dede, et al: From the sample collection to biobank. Hungarian Surgical Society, Experimental Surgical Section 23rd Congress of Experimental Surgery 2011.06.02-04.
7. Éva Margittai, Marcolongo Paola, G. Bánhegyi, Benedetti Angiolo, J. Mandl F. Jakab: Arterial Tortuose Syndrome and GLUT10 Hungarian Surgical Society, Experimental Surgical Section 23rd Congress of Experimental Surgery 2011.06.02-04.

.....

2 cm

Teljes támogatás: 4.200.000, - Ft.

MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI ÉS NEUROKOGNITÍV VIZSGÁLATOK MENTÁLIS NÉPBETEGSÉGEKBEN

Janka Zoltán, Kálmán János, Juhász Anna, Fehér Ágnes, Álmos Péter, Szendi István, Pákáski Magdolna, Nagyné Eördegh Gabriella
Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ, Pszichiátriai Klinika

A neurodegeneratív betegségek csoportjába tartozó Alzheimer-kór (AK) patológiai jellemzői az extracellulárisan megjelenő szenilis plakkok, melyekben amiloid béta peptid halmozódik fel, valamint a neurofibrilláris kötegek, melyek hiperfoszforilált tau proteint tartalmaznak. A késői kezdetű AK kialakulásában a patofiziológiai folyamatokban több gén is szerepet játszik. A genetikai vizsgálatok eredményei alapján e pillanatban egyetlen gén, az apolipoprotein E (APOE) gén E4 alléljának jelenléte tekinthető egyértelműen rizikó faktornak az AK kialakulásában.

Irodalmi adatok szerint a kálcium homeosztázis modulátor 1 gén (CALHM1) is rizikó faktor lehet az AK kialakulásában, mivel befolyásolja az intracelluláris kálcium szintet, hat az amiloid prekurzor protein metabolizmusára és ezáltal a béta amiloid szintre. Eredményeink alapján a CALHM1 Pro86Leu (257C/T) polimorfizmus nem társítható AK-ral, bár gyenge korrelációt ki tudtunk mutatni a CALHM1 T allél és az AK között.

A gyulladásos folyamatok kitüntetett szerepet játszanak az AK-hoz vezető patológiai folyamatokban. A gyulladásos faktorok közül az interferon-γ (IFN-γ) T874A, a citoplazmatikus foszfolipáz A2 (cPLA2) *Ban*I, a ciklooxigenáz-2 (COX-2) G-765C génpolimorfizmust vizsgáltuk AK-ban. Eredményeink alapján a COX-2 G/G genotípus statisztikailag szignifikánsan gyakrabban fordult elő AK-ban, mint a kontroll csoportban. Ugyanakkor nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget az IFN-γ és a cPLA2 génpolimorfizmusok esetében sem a genotípusok, sem pedig az allélok megoszlásában az AK és a kontroll csoport között. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a COX-2 G/G genotípus társítható az AK-ral és szerepet játszik az AK etiológiájában.

A mikrotubulus asszociált protein tau (MAPT) haplotípusok szerepével kapcsolatban ellentétes eredmények jelentek meg az irodalomban arra vonatkozóan, hogy milyen szerepet töltenek be a neurodegeneratív betegségekben. Munkánk során egy lehetséges szinergizmust vizsgáltunk az AK-ban szenvedő betegek és az egészséges kontroll személyek MAPT haplotípusai és APOE státusza között. A MAPT H1 allél megoszlását tekintve nem találtunk statisztikailag szignifikáns különbséget az AK-ban szenvedő és a kontroll populáció között. Az APOE E4 és a MAPT H1 allélok együttes előfordulása viszont társítható volt az AK-ral, de genetikai interakció nem volt bizonyítható. Eredményeink alátámasztják, hogy az APOE E4 allél szerepet játszik az AK patológiájában, viszont a MAPT H1 allél nem társítható sem önmagában, sem az APOE E4-es alléllal interakcióban az AK-ra való fogékonysággal.

Az ATP binding casette subfamily G member 2 (ABCG2) gén egy, a vér-agy gáton történő transzport folyamokban fontos szerepet játszó transzporter fehérjét kódol. Ez a fehérje emelkedett expressziós szintet mutat AK-os betegek agyában. Irodalmi adatok szerint az ABCG2 C421A génpolimorfizmus alacsonyabb protein expresszióval és kevésbé hatékony transzporttal társul. Eredményeink szerint az ABCG2 C/C genotípus társítható AK-ral, míg az A allél jelenléte védő hatású lehet.

A monoamin oxidáz A (MAOA) egy fontos katabolikus enzim, ami a monoamin neurotranszmitter szintet szabályozza a központi idegrendszerben. A MAOA gén aktivitása és expressziója emelkedett AK-os betegek bizonyos agyterületein (a kortikális területeken és a hippocampusban). Eredményeink alapján a MAOA-VNTR polimorfizmus nem társítható az AK-ral és nem találtunk genetikai interakciót a MAOA és az APOE polimorfizmusok között sem AK-ban.

Teljes támogatás: 4.200.000, - Ft.

Fehér Á, Juhász A, Rimanóczy Á, Kálmán J, Janka Z: Association study of interferon-γ, cytosolic phospholipase A2 and cyclooxygenase-2 gene polymorphisms in Alzheimer's disease. AMERICAN JOURNAL OF GERIATRIC PSYCHIATRY 18: pp. 983-987 (2010) IF: 3,566

Álmos ZP, Horváth S, Czibula Á, Raskó I, Domján N, Juhász A, Janka Z, Kálmán J: Tau haplotypes and ApoE4 do not act in synergy on Alzheimer's disease. PSYCHIATRY RESEARCH 186(2-3): pp. 448-450 (2011) IF: 2,803

Fehér Á, Juhász A, Rimanóczy Á, Pákáski M, Kálmán J, Janka Z: No association between CALHM1 polymorphism and Alzheimer's disease risk in a Hungarian population. PSYCHIATRIC GENETICS 21(5): pp. 249-252 (2011) IF: 2,061

Teljes támogatás: 4.200.000, - Ft.

MOLECULAR BIOLOGICAL AND NEUROCOGNITIVE INVESTIGATIONS IN COMMON MENTAL DISORDERS

Zoltán Janka, János Kálmán, Anna Juhász, Ágnes Fehér, Péter Álmos, István Szendi, Magdolna Pákáski, Gabriella Nagyné Eördegh
Department of Psychiatry, Albert Szent-Györgyi Clinical Center, Faculty of Medicine, University of Szeged

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by the presence of extracellular senile plaques composed of amyloid β (Aβ) peptides and intracellular neurofibrillary tangles containing hyperphosphorylated tau protein. The complex genetic model of AD suggests that several heterogeneous susceptibility sets of genes may converge on the pathophysiological processes that underlie the disease. However, so far only the E4 variant of the apolipoprotein E (APOE) gene has been definitely associated with the risk for AD.

Calcium homeostasis modulator 1 (CALHM1), a promising candidate gene for AD risk seems to modulate intracellular calcium levels that were reported to affect the metabolism of amyloid precursor protein and thereby the levels of Aβ. We failed to detect an association between the CALHM1 Pro86Leu polymorphism and the risk for AD, nor did we find an effect on age at onset. However, there was a weak correlation between the presence of the T allele and AD.

A lot of evidence support a major contribution of inflammatory processes in accelerating pathological changes in AD. We investigated the possible role of interferon-γ (IFN-γ) T874A, cytoplasmic phospholipase A2 (cPLA2) BanI, and cyclooxigenase-2 (COX-2) G-765C gene polymorphisms in AD. The COX2 G/G genotype was significantly more frequent in the AD, than in the healthy control group. There was no significant correlation between the IFN-γ and cPLA2 genotypes and AD. These findings indicate that the COX2 G/G genotype is associated with AD and support the involvement of COX2 in AD etiology.

There are conflicting results regarding the role of microtubule associated protein tau (MAPT) haplotypes in neurodegenerative disorders. Possible synergism was investigated between MAPT haplotype and APOE status in AD cases and healthy control individuals. There was no statistical significant difference between the AD and control groups in the MAPT H1 allele distribution. A specific combination of APOE E4 and MAPT H1 alleles were found to be associated with AD, but genetic interaction could not be inferred. These findings support the notion that while APOE E4 might be involved in AD pathology, the MAPT H1 allele neither associates nor interacts through an epistasis with APOE 4 in the development of the disease.

The blood-brain barrier drug efflux transporter, ATP binding cassette subfamily G member 2 (ABCG2), was found to be significantly up-regulated in AD brain. The C421A non-synonymous polymorphism of ABCG2 gene is reportedly associated with lower levels of protein expression and impaired transport. It was found that ABCG2 C/C genotype is associated with the risk for AD or conversely, the A allele can have a protective effect against AD.

Monoamine oxidase A (MAOA) is an important catabolic enzyme that regulates monoamine transmitter levels in the central nervous system. MAOA gene activity and gene expression have been shown to be increased in different brain areas of AD, including the cortical areas and hippocampus. The results support that MAOA-VNTR polymorphism is not associated with late onset AD. We failed to detect a genetic interaction between MAOA and APOE polymorphisms in the development of AD.

Fehér Á, Juhász A, Rimanóczy Á, Kálmán J, Janka Z: Association study of interferon-γ, cytosolic phospholipase A2 and cyclooxygenase-2 gene polymorphisms in Alzheimer's disease. AMERICAN JOURNAL OF GERIATRIC PSYCHIATRY 18: pp. 983-987 (2010) IF: 3,566

Teljes támogatás: 4.200.000, - Ft.

Álmos ZP, Horváth S, Czibula Á, Raskó I, Domján N, Juhász A, Janka Z, Kálmán J: Tau haplotypes and ApoE4 do not act in synergy on Alzheimer's disease. PSYCHIATRY RESEARCH 186(2-3): pp. 448-450 (2011) IF: 2,803

Fehér Á, Juhász A, Rimanóczy Á, Pákáski M, Kálmán J, Janka Z: No association between CALHM1 polymorphism and Alzheimer’s disease risk in a Hungarian population. PSYCHIATRIC GENETICS 21(5): pp. 249-252 (2011) IF: 2,061

ETT Nyilvántartási szám: 272/2009; Teljes támogatás: 2,7 Millió Ft

2009-2011. ZÁRÓJELENTÉS

Önsorrontó szenvedélybetegség vagy neuroprotekció? - élvezeti szerek hatása az agy szerkezetére: MR volumetria vizsgálatok

Dr. Janszky József, MTA doktora, tanszékvezető egyetemi tanár

Pécsi Tudományegyetem, Neurológiai Klinika, Klinikai Neurofiziológiai és Epileptológiai Tanszék

1. A koffein/kávé fogyasztás kapcsolata az agy szerkezetével.

Bár a koffein a leggyakrabban használt központi idegrendszerre ható szer a világon, a kávéfogyasztás az emberi agyszerkezetre gyakorolt hatását nem ismerjük. A koffein fő hatását az adenozin receptorokon fejti ki, ennek megfelelően a kávénak elsősorban kardiális és központi idegrendszeri hatásai vannak. Állatkísérletes adatok alapján koffeinbevitel javítja a memóriafolyamatokat, amit magyarázhat a koffein okozta masszív neuroplaszticitás-változás a hippocampusban. Jelen vizsgálatunk célkitűzése, hogy vizsgáljuk a kávéfogyasztás és az emberi agy szerkezete közötti összefüggést. Mind a kávét nem fogyasztók, mind a kávét nagy mennyiségben fogyasztók körében a hippocampus tömege nagyobb volt az átlagos kávéfogyasztókénál. Mindez felveti, hogy a koffein magas dózisban – az állatkísérleteknek megfelelően – emberben is neuroplaszticitást indukálhat, és nem károsítja az agyat. A vizsgálatot leközöltük (1), eredményeinket kongresszuson előadtuk (12).

2. Túlzott táplálékbevitel/elhízás kapcsolata az agy szerkezetével.

Ebben a vizsgálatba egészséges egyetemi hallgatók testtömegindexét (BMI) hasonlítottuk össze az agy struktúrájával, különös tekintettel a jutalmazó rendszerben szerepet játszó agyi régiók tömegével (hippocampus, amygdala, accumbens, caudatum, putamen, orbitofrontalis cortex). A vizsgálatban 92 egészséges fiatalt votunk be (átlagos BMI: 22.3±3.4 kg/m^2, átlagéletkor: 23.2±2.7 év). Eredményeink alapján a jobb amygdala tömege pozitívan korrelált a BMI-vel. Mindezt azonban kizárólag csak férfiak esetében tudtuk kimutatni, és elsősorban a túlsúlyos populációban. Az, hogy a test tömege és az agy szerkezet között összefüggést tudtunk kimutatni, az tovább erősíti az agyi jutalmazó rendszer szerepét a fokozott táplálékfelvételben ill. az elhízásban. További vizsgálatok szükségesek, hogy a jobb amygdala megnagyobbodása vajon biomarkere lehet-e különböző elhízás típsuknak illetve megjósolhatja-e a fogyókúra sikerét. Eredményeinket több hazai kongresszuson előadtuk (13, 14), nemzetközi közlemény formájában ismertettük (2).

A talált nemi különbségeket párhuzamosan vizsgáltuk epilepsziás rohamok alatt megjelenő affektív jelenségek tanulmányozása során. Véleményünk szerint az agyi jutalmazó rendszer nemi különbségei feltehetőleg az affekció agyi reprezentációjának agyi különbségére vezethető vissza. A vizsgálatból készült tanulmány megjelent (3)

3. Jelenleg futó további vizsgálatok.

Előzetes eredményeink alapján a dohányzók körében a corpus callosum elülső része megvékonyodott. A bal oldali accumbens régió és a kétoldali accumbens régió össztömege kisebb volt azoknál, akik krónikus/visszatérő fájdalomról ill. fájdalomcsillapítószedésről számoltak be. Mindkét vizsgálat jelenleg is tart. Megkezdtük a D-vitamin és koleszterin-szint összefüggésének vizsgálatát az agy szerkezetére vonatkozólag.

4. A pályázat tágabb vett témájával kapcsolatos eredmények

A pályázat témakörében három kísérletes tanulmány is készült (4-6), valamennyi a neuroprotekció-agyszerkezet összefüggésének témakörében. Az MR volumetria – mint módszer - klinikai-

tudományos jelentőségét egy meta-analízisben és egy összefoglaló tanulmányban jelentettük meg (7,8). A projekt keretében három felkért előadást tartottunk nemzetközi konferencián (15-17). A táplálékfelvétel és az agyi funkcióváltozást funkcionális MRI módszerrel is folytattuk ízérzés-vizsgálatokkal, a tanulmány közlésre került (9). Mind a koffein, mind az obesitas agyszerkezeti változásokkal járt, amit részben neuroplaszticitással tudtunk magyarázni. Így vizsgáltuk a humán neuroplaszticitást epilepsziában és Parkinson kórban, melyből két közlemény született (10,11)

1. Orsi G, Perlaki G, Kovacs N, Aradi M, Papp Z, Karadi K, Szalay C, Karadi Z, Lenard L, Tenyi T, Plozer E, Gabriel R, Nagy F, Doczi T, Komoly S, Jokeit H, Schwarcz A, **Janszky J**. Body weight and the reward system: the volume of the right amygdala may be associated with body mass index in young overweight men. Brain Imaging Behav. 5:149-57.(2011)

2. Perlaki G, Orsi G, Kovacs N, Schwarcz A, Pap Z, Kalmar Z, Plozer E, Csatho A, Gabriel R, Komoly S, Janszky I, **Janszky J**. Coffee consumption may influence hippocampal volume in young women. Brain Imaging Behav. 5:274-84. (2011)

3. Toth V, Fogarasi A, Karadi K, Kovács N, Ebner A, **Janszky J**. Ictal affective symptoms in temporal lobe epilepsy are related to gender and age. Epilepsia,;51:1126-1132. (2010)

4. Seress L, Ábrahám H, Horvath Z, Doczi T, **Janszky J**, Klemm Z, Birne R, Bakay R. A proportion of mossy cells of the hippocampal dentate gyrus survives decades of seizures in human mesial temporal lobe epilepsy. Is there more than one type of mossy cell? *J Neurosurgery,* 111:1237-1247 (2009)

5. Aradi M, Steier R, Bukovics P, Szalay C, Perlaki G, Orsi G, Pal J, **Janszky J**, Doczi T, Schwarcz A. Quantitative proton MRI and MRS of the rat brain with a 3T clinical MR scanner. J Neuroradiology, in press. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20334917 (2011)

6. Abrahám H, Richter Z, Gyimesi C, Horváth Z, **Janszky J**, Dóczi T, Seress L. Degree and pattern of calbindin immunoreactivity in granule cells of the dentate gyrus differ in mesial temporal sclerosis, cortical malformation- and tumor-related epilepsies. Brain Res. 1399:66-78 (2011)

7. **Janszky J**, Kovacs N, Gyimesi Cs, Fogarasi A, Doczi T, Wiebe S: Epilepsy Surgery, Anti-epileptic Drug Trials and the Role of Evidence**.** Epilepsia, in press.(2010)

8. **Janszky J**, Gyimesi C. Az epilepszia gyógyszeres és műtéti kezelése. Gyogyszerész Továbbképzes 3:56-59.(2009)

9. Vereczkei A, Szalay C, Aradi M, Schwarcz A, Orsi G, Perlaki G, Karádi Z, Németh L, Hanna S, Takács G, Szabó I, Bajnok L, Mohos E, Lénárd L, Dóczi T, **Janszky J**, Komoly S, Horváth OP. [Functional MRI investigation of brain activity triggered by taste stimulation]. Magy Seb. 64:289-93. (2011)

10. Kalmar Z, Kovacs N, Perlaki G, Nagy F, Aschermann Z, Kerekes Z, Kaszas B, Balas I, Orsi G, Komoly S, Schwarcz A, **Janszky J**. Reorganization of motor system in Parkinson's disease. Eur Neurol 66:220-6 (2011)

11. Labudda K, Mertens M, **Janszky J**, Bien CG, Woermann FG. Atypical language lateralisation associated with right fronto-temporal grey matter increases—a combined fMRI and VBM study in left-sided mesial temporal lobe epilepsy patients. Neuroimage 59:728-37 (2012)

12. Orsi Gergely, Papp Zília, Plózer Enikő, Perlaki Gábor, Schwarcz Attila, Kovács Norbert, Karádi Kázmér, **Janszky József**. Koffein krónikus hatása a humán idegrendszer szerkezetére. A Magyar Pszichológiai Társaság XIX. Országos Tudományos Nagygyűlése PÉCS 2010. május 27-29.

13. Orsi Gergely, Plózer Enikő, Kalmár Zsuzsanna, Sellyei Eszter, Schwarcz Attila, Perlaki Gábor, Karádi Kázmér, **Janszky József**. Elhízás, testtömeg-szabályozás és a központi idegrendszer: volumetriás MR vizsgálatok. Magyar Pszichológiai Társaság 19. Országos Nagygyűlése PÉCS 2010. május 27-29.

14. Orsi Gergely, Plozer Enikő, Kalmar Zsuzsanna, Sellyei Eszter, Schwarcz Attila, Perlaki Gabor, Karadi Kazmer, **Janszky Jozsef.** Elhízás, testtömeg-szabályozás és a központi idegrendszer: volumetriás MR vizsgálatok. X. Magatartástudományi Napok, PÉCS 2010. május 25-26.

15. **Janszky J**. Clinical seizure semiology and differential diagnosis**.** 41st International Danube Symposium for Neurological Sciences and Continuing Education Linz, Austria 14-17 October, 2009

16. **Janszky J**. Reorganization and atypical organization of brain functions. IBRO International Workshop. Pécs, Hungary, January 22, 2010

17. **Janszky J**. Epilepsy surgery and antipileptic drug trials. 1st Brno-Pécs International Epilepsy and Parkinson Symposium Pécs, Hungary, February 19, 2010.

Budget: 2.7 M HUF

Self-destruction addiction or neuroprotection? – Effect of psychoactive drugs on brain structure: MR volumetry studies

József Janszky,
University of Pecs, Neurology Clinic, Department of Clinical Neurophysiology and Epileptology

1. Caffeine/coffee consumption and human brain structure

Although coffee is the most often used psycho-addictive drug, we do not know the effect of caffeine consumption on the human brain. The main effect of caffeine associated with adenosine receptors, thus, coffee has mainly cardiac and brain effects. Animal experiment data suggest that caffeine intake improves memory functions, which may be explained by the fact that caffeine induces massive neuroplasticity changes in the hippocampus. Our aim was to investigate the relationship between coffee consumption and human brain structure. We found that both people with coffee abstinence and with high-dose coffee intake have a larger hippocampus than those who have average coffee intake. This may suggest that high-dose caffeine intake – as proposed in animal experiments – can induce neuroplasticity in human without any harmful effect on the brain. This study was published (1) and was orally presented on conferences (12).

2. High-dose energy intake/obesity and human brain stucture.

In this study we contrasted body mass index (BMI) of 92 young healthy university students (mean BMI: 22.3±3.4 kg/m^2, mean age: 23.2±2.7) with their brain structure, focusing on brain reward-system (hippocampus, amygdala, accumbens, caudatum, putamen, orbitofrontal cortex). We found that the right-sided amygdala showed a positive correlation with the BMI in the overweighed population. However, this was only true for males. Our results may strengthen the hypothesis that reward system of the brain plays a key role in excessive energy intake and obesity. We are planning more investigations to find out whether enlarged right-sided amygdala is a biomarker for obesity or associated with different types of obesity or can predict results of a diet therapy. Our results were presented (13, 14) and published (2).

We found a strong gender difference in the above-mentioned study. Parallel to that study, we investigated gender differences in affective symptoms of epileptic seizures and concluded that gender differences in brain reward system may be related to the gender differences in brain structures playing a role in affection. This study was also published (3).

3. Ongoing investigations

According to our pilot study results, in smokers the anterior part of corpus callosum is thinner. In another pilot study, we found that the left-sided accumbens region is smaller in those young people who suffer from chronic pain and regularly take pain killers. Both studies are ongoing and we are recruiting more people to prove our pilot study results. We have also started to investigate the association between vitamin D, cholesterol, and the human brain structure.

4. Other results

Three experimental studies were published in association with the present project investigating neuroprotection and brain structure (4-6). The clinical-scientific role of MR volumetry was published and presented in a meta-analysis and a review (7,8), as well as in international conferences (15-17). We also investigated taste stimuli in obesity (excessive energy intake) by functional MRI. The results have been published (9). Because we suppose that caffeine and obesity may induce neuroplastic changes, we continued investigations on human neuroplasticity in epilepsy and Parkinson disorder. These results were also published (10,11)

1. Orsi G, Perlaki G, Kovacs N, Aradi M, Papp Z, Karadi K, Szalay C, Karadi Z, Lenard L, Tenyi T, Plozer E, Gabriel R, Nagy F, Doczi T, Komoly S, Jokeit H, Schwarcz A, **Janszky J**. Body weight and the reward system: the volume of the right amygdala may be associated with body mass index in young overweight men. Brain Imaging Behav. 5:149-57.(2011)

2. Perlaki G, Orsi G, Kovacs N, Schwarcz A, Pap Z, Kalmar Z, Plozer E, Csatho A, Gabriel R, Komoly S, Janszky I, **Janszky J**. Coffee consumption may influence hippocampal volume in young women. Brain Imaging Behav. 5:274-84. (2011)

3. Toth V, Fogarasi A, Karadi K, Kovács N, Ebner A, **Janszky J**. Ictal affective symptoms in temporal lobe epilepsy are related to gender and age. Epilepsia,;51:1126-1132. (2010)

4. Seress L, Ábrahám H, Horvath Z, Doczi T, **Janszky J**, Klemm Z, Birne R, Bakay R. A proportion of mossy cells of the hippocampal dentate gyrus survives decades of seizures in human mesial temporal lobe epilepsy. Is there more than one type of mossy cell? *J Neurosurgery,* 111:1237-1247 (2009)

5. Aradi M, Steier R, Bukovics P, Szalay C, Perlaki G, Orsi G, Pal J, **Janszky J**, Doczi T, Schwarcz A. Quantitative proton MRI and MRS of the rat brain with a 3T clinical MR scanner. J Neuroradiology, in press. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20334917 (2011)

6. Abrahám H, Richter Z, Gyimesi C, Horváth Z, **Janszky J**, Dóczi T, Seress L. Degree and pattern of calbindin immunoreactivity in granule cells of the dentate gyrus differ in mesial temporal sclerosis, cortical malformation- and tumor-related epilepsies. Brain Res. 1399:66-78 (2011)

7. **Janszky J**, Kovacs N, Gyimesi Cs, Fogarasi A, Doczi T, Wiebe S: Epilepsy Surgery, Anti-epileptic Drug Trials and the Role of Evidence**.** Epilepsia, in press.(2010)

8. **Janszky J**, Gyimesi C. Az epilepszia gyógyszeres és műtéti kezelése. Gyogyszerész Továbbképzes 3:56-59.(2009)

9. Vereczkei A, Szalay C, Aradi M, Schwarcz A, Orsi G, Perlaki G, Karádi Z, Németh L, Hanna S, Takács G, Szabó I, Bajnok L, Mohos E, Lénárd L, Dóczi T, **Janszky J**, Komoly S, Horváth OP. [Functional MRI investigation of brain activity triggered by taste stimulation]. Magy Seb. 64:289-93. (2011)

10. Kalmar Z, Kovacs N, Perlaki G, Nagy F, Aschermann Z, Kerekes Z, Kaszas B, Balas I, Orsi G, Komoly S, Schwarcz A, **Janszky J**. Reorganization of motor system in Parkinson's disease. Eur Neurol. 66:220-6 (2011)

11. Labudda K, Mertens M, **Janszky J**, Bien CG, Woermann FG. Atypical language lateralisation associated with right fronto-temporal grey matter increases—a combined fMRI and VBM study in left-sided mesial temporal lobe epilepsy patients. Neuroimage 59:728-37 (2012)

12. Orsi Gergely, Papp Zília, Plózer Enikő, Perlaki Gábor, Schwarcz Attila, Kovács Norbert, Karádi Kázmér, **Janszky József**. Koffein krónikus hatása a humán idegrendszer szerkezetére. A Magyar Pszichológiai Társaság XIX. Országos Tudományos Nagygyűlése PÉCS 2010. május 27-29.

13. Orsi Gergely, Plózer Enikő, Kalmár Zsuzsanna, Sellyei Eszter, Schwarcz Attila, Perlaki Gábor, Karádi Kázmér, **Janszky József**. Elhízás, testtömeg-szabályozás és a központi idegrendszer: volumetriás MR vizsgálatok. A Magyar Pszichológiai Társaság XIX. Országos Tudományos Nagygyűlése PÉCS 2010. május 27-29.

14. Orsi Gergely, Plozer Enikő, Kalmar Zsuzsanna, Sellyei Eszter, Schwarcz Attila, Perlaki Gabor, Karadi Kazmer, **Janszky Jozsef.** Elhízás, testtömeg-szabályozás és a központi idegrendszer: volumetriás MR vizsgálatok. X. Magatartástudományi Napok. Pécsi Akadémiai Bizottság Tudományos Rendezvénye, PÉCS 2010. május 25-26.

15. **Janszky J**. Clinical seizure semiology and differential diagnosis**.** 41st International Danube Symposium for Neurological Sciences and Continuing Education Linz, Austria 14-17 October, 2009

16. **Janszky J**. Reorganization and atypical organization of brain functions. IBRO International Workshop. Pécs, Hungary, January 22, 2010

17. **Janszky J**. Epilepsy surgery and antipileptic drug trials. 1st Brno-Pécs International Epilepsy and Parkinson Symposium Pécs, Hungary, February 19, 2010.

MELLÉKLET: A jelentésben ismertetett eredményekkel kapcsolatos közlemények

I. Tudományos folyóiratban megjelent eredeti és összefoglaló közlemények

1. Orsi G, Perlaki G, Kovacs N, Aradi M, Papp Z, Karadi K, Szalay C, Karadi Z, Lenard L, Tenyi T, Plozer E, Gabriel R, Nagy F, Doczi T, Komoly S, Jokeit H, Schwarcz A, **Janszky J**. Body weight and the reward system: the volume of the right amygdala may be associated with body mass index in young overweight men. Brain Imaging Behav. 5:149-57.(2011) **IF:** 0,86

2. Perlaki G, Orsi G, Kovacs N, Schwarcz A, Pap Z, Kalmar Z, Plozer E, Csatho A, Gabriel R, Komoly S, Janszky I, **Janszky J**. Coffee consumption may influence hippocampal volume in young women. Brain Imaging Behav. 5:274-84. (2011) **IF:** 0,86

3. Toth V, Fogarasi A, Karadi K, Kovács N, Ebner A, **Janszky J**. Ictal affective symptoms in temporal lobe epilepsy are related to gender and age. Epilepsia,;51:1126-1132. (2010) **IF**: 3,9

4. Seress L, Ábrahám H, Horvath Z, Doczi T, **Janszky J**, Klemm Z, Birne R, Bakay R. A proportion of mossy cells of the hippocampal dentate gyrus survives decades of seizures in human mesial temporal lobe epilepsy. Is there more than one type of mossy cell? *J Neurosurgery*, 111:1237-1247 (2009) **IF**: 2,594

5. Aradi M, Steier R, Bukovics P, Szalay C, Perlaki G, Orsi G, Pal J, **Janszky J**, Doczi T, Schwarcz A. Quantitative proton MRI and MRS of the rat brain with a 3T clinical MR scanner. J Neuroradiology, in press. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20334917 (2011) **IF**: 1,203

6. Abrahám H, Richter Z, Gyimesi C, Horváth Z, **Janszky J**, Dóczi T, Seress L. Degree and pattern of calbindin immunoreactivity in granule cells of the dentate gyrus differ in mesial temporal sclerosis, cortical malformation- and tumor-related epilepsies. Brain Res. 1399:66-78 (2011) **IF**: 2,623

7. **Janszky J**, Kovacs N, Gyimesi Cs, Fogarasi A, Doczi T, Wiebe S: Epilepsy Surgery, Anti-epileptic Drug Trials and the Role of Evidence**.** Epilepsia, in press.(2010) **IF**: 3,9

8. **Janszky J**, Gyimesi C. Az epilepszia gyógyszeres és műtéti kezelése. Gyogyszerész Továbbképzes 3:56-59.(2009) **IF**:-

9. Vereczkei A, Szalay C, Aradi M, Schwarcz A, Orsi G, Perlaki G, Karádi Z, Németh L, Hanna S, Takács G, Szabó I, Bajnok L, Mohos E, Lénárd L, Dóczi T, **Janszky J**, Komoly S, Horváth OP. [Functional MRI investigation of brain activity triggered by taste stimulation]. Magy Seb. 64:289-93. (2011) **IF**:-

10. Kalmar Z, Kovacs N, Perlaki G, Nagy F, Aschermann Z, Kerekes Z, Kaszas B, Balas I, Orsi G, Komoly S, Schwarcz A, **Janszky J**. Reorganization of motor system in Parkinson's disease. Eur Neurol. 66:220-6 (2011) **IF**:1,49

11. Labudda K, Mertens M, **Janszky J**, Bien CG, Woermann FG. Atypical language lateralisation associated with right fronto-temporal grey matter increases—a combined fMRI and VBM study in left-sided mesial temporal lobe epilepsy patients. Neuroimage 59:728-37 (2012) **IF**:5,93

II. Kongresszusi előadások

12. Orsi Gergely, Papp Zília, Plózer Enikő, Perlaki Gábor, Schwarcz Attila, Kovács Norbert, Karádi Kázmér, **Janszky József**. Koffein krónikus hatása a humán idegrendszer szerkezetére. A Magyar Pszichológiai Társaság XIX. Országos Tudományos Nagygyűlése **PÉCS 2010. május 27-29.**

13. Orsi Gergely, Plózer Enikő, Kalmár Zsuzsanna, Sellyei Eszter, Schwarcz Attila, Perlaki Gábor, Karádi Kázmér, **Janszky József**. Elhízás, testtömeg-szabályozás és a központi idegrendszer: volumetriás MR vizsgálatok. A Magyar Pszichológiai Társaság XIX. Országos Tudományos Nagygyűlése PÉCS 2010. május 27-29.

14. Orsi Gergely, Plozer Enikő, Kalmar Zsuzsanna, Sellyei Eszter, Schwarcz Attila, Perlaki Gabor, Karadi Kazmer, **Janszky Jozsef.** Elhízás, testtömeg-szabályozás és a központi idegrendszer: volumetriás MR vizsgálatok. X. Magatartástudományi Napok. Pécsi Akadémiai Bizottság Tudományos Rendezvénye, PÉCS 2010. május 25-26.

15. **Janszky J**. Clinical seizure semiology and differential diagnosis**.** 41st International Danube Symposium for Neurological Sciences and Continuing Education Linz, Austria 14-17 October, 2009

16. **Janszky J**. Reorganization and atypical organization of Brain functions. IBRO International Workshop. Pécs, Hungary, January 22, 2010

17. **Janszky J**. Epilepsy surgery and antipileptic drug trials. 1st Brno-Pécs International Epilepsy and Parkinson Symposium Pécs, Hungary, February 19, 2010.

Teljes támogatás: 2.400.000,- Ft

HEPATOBILIÁRIS TRANSZPORTEREK SZEREPE A GYÓGYSZER-INDUKÁLT KOLESZTÁZIS KIALAKULÁSÁBAN

Jemnitz Katalin, Veres Zsuzsa és Vereczkey László
MTA Természettudományi Kutatóközpont, Molekuláris Farmakológiai Intézet

A hepatobiliáris rendszert érintő káros gyógyszer mellékhatások nagy kihívást jelentenek a gyógyszerterápiában és a gyógyszeriparban egyaránt. A hepatociták szinuszoidális és kanalikuláris membránjában található, szerves vegyületek transzportját végző transzport proteinek megfelelő működése elengedhetetlen a máj kiválasztó funkciójához és az epeképzéshez. A gyógyszer-mellékhatásoknak az egyik első tünete az epeszekréció zavara, amely súlyos májkárosodáshoz vezet függetlenül attól, hogy azt gyógyszerek okozzák vagy a transzporterek más eredetű hibás működésének következménye. Az ABCB11 (BSEP: bile salt export pump) az egyik legfontosabb kanalikuláris transzporter, amely az epesók eliminációját végzi. A kolesztázis kialakulásának egyik ismert mechanizmusa, amikor a BSEP működésének gátlása következtében megnövekszik a májban az epesó koncentráció, és ez a toxikus hatás közvetlen oka. A BSEP szerepének jelentőségét támasztja alá, hogy „a progressive familiar cholestasis, type 2", letális kórkép hátterében ennek a transzporternek a mutációja áll. A mai napig nincs olyan megbízható módszer, amely alapján a kolesztázis kockázatát előre jelezni lehetne emberben. Sok olyan emberben kolesztázist okozó gyógyszert azonosítottak, amelyek patkányban nem idéznek elő toxikus tüneteket annak ellenére, hogy a legtöbbjük hasonlóan gátolja a patkány Bsep transzportert, mint a humánt, és a szérum epesó koncentrációt is megemelik.
A gyógyszerek mellékhatásaként kialakuló kolesztázis mechanizmusában szerepet játszó transzporter proteinek felderítéséhez sok *in vitro* technikát alkalmaztak már. Nehézséget jelent azonban ezeken a modelleken kapott eredmények extrapolálása az *in vivo* körülményekre, valamint a fajok közötti eltérések értelmezése. Etikai és mennyiségi korlátok miatt az *in vivo* kísérletek csak ritkán vehetők számításba. A máj funkciói és a kolesztázis kialakulásának molekuláris alapja *in vitro* primer hepatocitákkal végzett kísérletekben tanulmányozhatóak legjobban. Ez lehetőséget nyújt a fajok közötti különbségek direkt tanulmányozására is. A hagyományos monolayer kultúrában tartott hepatocitákkal szemben a szendvics kultúrában tartott sejtek jobban megőrzik metabolizáló és transzport funkcióikat. Szendvics konfigurációban a hepatociták bazolaterális és kanalikuláris transzporterei a nekik megfelelő membránfelszínre jutnak. Néhány nap alatt a szomszédos sejtek között funkcionális epe-kapillárisok képződnek, a sejtek visszanyerik képességüket vegyületek vektoriális transzportjához, és ezáltal mérhető a bazolaterális és kanalikuláris transzporterek mennyiségének és aktivitásának változása
Ennek a modellnek a segítségével sikerült kimutatnunk, hogy a taurokolát (TC) eliminációja nagyon eltér humán és patkány hepatocitákban. A TC egy epesó, amelyet gyakran használnak a BSEP aktivitásának méréséhez próba szubsztrátként. Míg humán sejtekben a basolaterális és kanalikuláris transzporterek közel azonos mértékben járulnak hozzá a TC eltávolításához, patkány sejtekben a bazolaterális transzport dominál. A teljes transzport 75 %-a ebben az irányban zajlik. Toxikológiai szempontból még fontosabb különbség, hogy 10 perc efflux idő után patkány sejtekben a felvett TC mennyiség 7, míg humán sejtekben 30 %-a maradt. Ebből egyértelműen az következik, hogy pl. ha gyógyszer-interakció következtében a BSEP funkció gátolt és a TC akkumulációja megnövekszik, ez humán sejtek esetében sokkal nagyobb intracelluláris epesó koncentrációt eredményez mint patkány sejtekben. Ez sokkal jobban növeli egy esetleges hepatotoxicitás kockázatát humán, mint patkány hepatocitákban.
Ismert, hogy a TC kanalikuláris transzportját elsősorban a BSEP, bazolaterális transzportját a „multidrug resistance associated protein 3 és 4" (MRP3/4) végzi. A TC kiürülését és sejten belüli felhalmozódását alapvetően meghatározó kanilikuláris és bazolaterális transzport arányának méréséhez ismert BSEP és MRP gátló gyógyszereket választottunk. A troglitazon, glibenklamid és ciklosporin A

Teljes támogatás: 2.400.000,- Ft

BSEP gátló hatásuk miatt patkány és humán sejtekben is lecsökkentették a TC kanalikuláris transzportját, következésképpen a sejtben maradó TC mennyisége nagymértékben növekedett. Troglitazon hatására a kontroll sejtekben mért tizenötszörös TC koncentráció különbség a kétféle sejttípus között huszonötszörösre nőtt. Ez összhangban van azzal a toxicitásbeli különbséggel, amelyet a fajok között, BSEP gátló gyógyszerek hatására in vivo tapasztalunk. Troglitazon jelenlétében a patkány sejtekben is nőtt a TC mennyisége, de ez nem volt számottevő. A humán sejtekben a glibenklamid és ketokonazol is hasonló eredményekhez vezetett. Patkány hepatociták esetében azok a gyógyszerek emelték meg legjobban a sejtben maradó TC mennyiségét, amelyek minkét irányban gátolták a transzportot, ilyen volt a glibenklamid és ciklosporin A. A troglitazon és a ketokonazol csak a kanalikuláris eliminációt csökkentette, így a TC kisebb mértékben akkumulálódott a sejtekben.
A bazolaterális TC transzportnak nagyobb a jelentősége patkány, mint humán sejtek esetében. Az MRP3 expressziója egészséges májban alacsony. Koleszt̀azisban az MRP3 és MRP4 szintje nagymértékben nő, és aktivitásuk megakadályozza a toxikus endogén vegyületek, amilyenek az epesavak is, sejten belüli túlzott felhalmozódását, és az ezzel járó májkárosodást. Szignifikáns különbséget tapasztaltunk a humán és patkány MRP3 epesó transzportáló aktivitása között. Miután az MRP3 fontos szerepet játszik a koleszt̀azis esetén fellépő májkárosodás megelőzésében, ez a különbség magyarázza a fajok eltérő érzékenységét kolesztatikus gyógyszerekkel szemben. Ismert MRP3/4 gátlószerek (MK571, indometacin) felhasználásával igazoltuk, hogy a bazolaterális transzport valóban fontos védelmi szerepet játszik a toxikus vegyületek sejten belüli felhalmozódásával szemben.
Igazoltuk, hogy ezek a vegyületek nem befolyásolták a BSEP működését. Mindkét anyag jelentősen gátolta a TC bazolaterális eliminációját, és megemelte a sejtben maradó TC szintet. Patkányban a legmagasabb TC koncentrációt a sejtekben a ciklosporin A és a glibenklamid jelenlétében mértük, mindkét gyógyszer mindkét irányú transzportot gátolta. Az akkumuláció mértékét a bazolaterális transzport csökkenése sokkal érzékenyebben befolyásolta, mint a BSEP gátlása. A koleszt̀azis nem az egyetlen olyan patológiás állapot, amely a bazolaterális transzporterek expressziójának növekedével jár, csökkentve ezzel a hepatociták károsodását kémiai ingerek hatására.
Igazoltuk, hogy a kolesztatikus gyógyszerek, a ciklosporin A, troglitazon, bosentan nem csak az effluxot, hanem a TC sejtbe való bejutását is gátolják. Az epesók sejtbe való bejutásának és eliminációjának megváltozott aránya a két folyamat gátlásának következtében fontos oka lehet a fajok között tapasztalt gyógyszerhatásbeli különbségnek. Kísérleti módszerünk alkalmas a vegyületek felvételének és eliminációjának egymástól független tanulmányozására, amellett, hogy az elimináció irányát is követni tudjuk. Ez lehetővé teszi a gyógyszerek hatásának mérését az egyes transzport folyamatokra külön-külön. Meghatároztuk néhány BSEP gátló vegyület (bozentan, ciklosporin A, brómszulfalein (BSP), ketokonazol, troglitazon, glibenklamid) hatását a TC uptake folyamatára is. Valamennyi vizsgált vegyület gátolta a TC felvételét, ami azt mutatja, hogy ezek a gyógyszerek a hepatobiliáris transzport influx és efflux oldalát is befolyásolva bontják meg az epesó egyensúlyt a májban. Ennek jelentőségét támasztja alá, hogy néhány betegnél - a BSP kivételével, amely nem gyógyszer - valamennyi gyógyszer okozott koleszt̀azist klinikai felhasználása során.

Közlemények:

Jemnitz K, Heredi-Szabo K, Janossy J, Ioja E, Vereczkey L, Krajcsi P. ABCC2/Abcc2: a multispecific transporter with dominant excretory functions. DRUG METABOLISM REVIEWS. 42: pp.402-36. (2010) IF: 6,263

Jemnitz K, Veres Z, Vereczkey L: Contribution of high basolateral bile salt efflux to the lack of hepatotoxicity in rat in response to drugs inducing cholestasis in human. TOXICOLOGICAL SCIENCES 115: pp.80-88. (2010) IF: 5,093

Teljes támogatás: 2.400.000,- Ft

THE ROLE OF HEPATOBILIARY TRANSSPORTERS IN DRUG-INDUCED CHOLESTASIS

Katalin Jemnitz, Zsuzsa Veres, László Vereczkey
Institute of Molecular Pharmacology, Research Centre of Natural Sciences, HAS

Hepatobiliary drug side effects are a pressing issue for patient safety and for the pharmaceutical industry. Bile formation and hepatic secretory function are dependent on proper function of transport proteins that mediate the flux of organic solutes across the sinusoidal and canalicular membrane of hepatocytes. Impaired bile formation, or cholestasis originated in either malfunction of transport proteins or adverse drug effects, leads to liver injury. ABCB11 (BSEP: bile salt export pump) is the major physiologically important canalicular bile transporter. Inhibition of BSEP by cholestatic drugs has been suggested as one of the mechanisms initiating liver injury in human, probably due to high intracellular bile salt concentration. It has been shown that BSEP mutations resulted in progressive familiar cholestasis, type 2. Presently, there is no means for accurate prediction of risk of cholestasis in human. Several cholestatic drugs do not induce hepatotoxicity in rats, although many of them have been reported to inhibit rat Bsep and cause elevated serum bile acid concentration.

Numerous in vitro techniques have been used to identify transporters involved in drug induced cholestasis; however, there are pitfalls in extrapolating in vitro findings to in vivo situation, not to say extrapolation from rat to human. Due to ethical and financial limitations of in vivo studies, experiments using primary hepatocytes provide the nearest approach to in vivo for getting an insight into the molecular bases of drug induced cholestasis, and also to compare cholestatic potential of drugs in different species. Sandwich cultured hepatocytes preserve metabolizing and transport capacities better than hepatocytes maintained in traditional monolayer configuration. In sandwich cultured hepatocytes the membrane components are localized to their respective basolateral and canalicular domains. Within a few days, a functional biliary network is formed between the adjacent cells. Hepatocytes regain their vectorial transport ability, and thus this in vitro model is suitable to study the expression and function of basolateral and canalicular transporters even in human cells.

On this model we have demonstrated that the elimination pattern of taurocholate (TC), a bile salt, which is a commonly used probe substrate for BSEP activity measurements, highly differs in human and rat hepatocytes. Our results clearly show that the canalicular transport is equal to the basolateral transport in TC elimination in human sandwich culture of hepatocytes, while basolateral efflux corresponds to 75 % of total TC elimination in the rat. From toxicological point of view an even more important difference was that after 10 min of efflux only 7 % of TC remained in rat hepatocytes, compared to 30 % of that in human. It follows that the same fold increase of TC accumulation by drug interactions results in significantly higher intracellular bile salt concentration, accompanied with higher risk of hepatotoxicity, in human than in rats.

Previous studies confirmed that BSEP and multidrug associated protein 3/4 (MRP3/4) are the major transporters involved in TC transport across the canalicular and basolateral surface, respectively. Several drugs, known inhibitors for BSEP and MRPs were chosen to assess the contribution to TC elimination of canalicular and basolateral transporters, which determine the intracellular accumulation of TC in human and rat hepatocytes. Troglitazone, glibenclamide, cyclosporine A were found to interfere with the biliary elimination of TC by inhibition of BSEP in rat and also in man resulting in a significant increase in TC accumulation. The 15-fold difference between human and rat intracellular TC accumulation measured in control hepatocytes increased to 25-fold by troglitazone treatment. Accordingly, negligible amount of intracellular TC was observed in rat hepatocytes even in the presence of troglitazone compared to human. Similar results were obtained with glibenclamide and ketoconazole in human cells. In rat hepatocytes glibenclamide and cylsosporine A inhibited the efflux of TC in both directions resulting in much pronounced increase of TC accumulation than that was

observed in the presence of troglitazone and ketoconazole, which interfered with the canalicular transport only.
The basolateral transport of TC is much more important in the rat than in the human hepatocytes. The normally low MRP3 expression highly increases in cholestasis together with MRP4 and serves as an overflow for toxic endogenous compounds such as bile salts to prevent liver injury. Our results propose that this major difference in the bile salt transport capacity of the human and the rat MRP3, which highly contributes to the defense against liver injury in cholestasis, might be a reason for the species differences in susceptibility to cholestatic drugs. In order to support that the high rate of basolateral bile acid transport in the rat has major part in the protection against a high intracellular accumulation of these toxic compounds, we studied the effect of MK571 and indomethacin, known MRP3/4 inhibitors. Our results demonstrate that these drugs did not interfere with Bsep. Both compounds significantly decreased the share of basolateral transport in TC elimination, which led to elevated intracellular TC level. In rat hepatocytes the highest intracellular TC levels were obtained by simultaneous inhibition of basolateral and canalicular TC transport as it was observed with cyclosporine A and glibenclamide. Intracellular TC accumulation was more sensitive to the decrease of the basolateral transport than to the inhibition of Bsep. Cholestasis is not the only pathological state,when upregulation of basolateral Mrp3/4 may serve to limit the chemical burden of hepatocytes.
We demonstrated that cyclosporin A, troglitazone and bosentan inhibit both the uptake and biliary excretion of TC. The balance between inhibition of uptake and efflux of bile acids could be very important and might be a reason for interspecies differences. Our experimental setup, which uncouples the uptake and efflux pathways, gives rise to study the vectorial (basolateral and canalicular) transport of a compound and also to assess the effect of drugs interfering with any of these processes.
Finally, we measured the interaction potential of some drugs (bosentan, cyclosporin A, sulfobromophthalein (BSP) ketoconazole, troglitazone, glibenclamid), which are known to affect the bile salt homeostasis, on the TC uptake in human andrat hepatocyte cultures. All of these drugs but BSP are reported to cause cholestasis in some cases probably by BSEP inhibition. Here we show that all of them inhibited the uptake of TC as well, suggesting that these compounds alter the bile salt equilibrium both on the efflux and influx side of hepatobiliary transport.

Publications:
Jemnitz K, Heredi-Szabo K, Janossy J, Ioja E, Vereczkey L, Krajcsi P. ABCC2/Abcc2: a multispecific transporter with dominant excretory functions. DRUG METABOLISM REVIEWS. 42: pp.402-36. (2010) IF: 6,263

Jemnitz K, Veres Z, Vereczkey L: Contribution of high basolateral bile salt efflux to the lack of hepatotoxicity in rat in response to drugs inducing cholestasis in human. TOXICOLOGICAL SCIENCES 115: pp.80-88. (2010) IF: 5,093

Teljes támogatás: 3.000.000,- Ft

PITVARFIBRILLÁCIÓ KEZELÉSÉRE ALKALMAS ÚJ ANTIARITMIÁS HATÁSOK VIZSGÁLATA HUMÁN ÉS ÁLLAT SZÍVEKBŐL SZÁRMAZÓ PITVARI PREPARÁTUMOKON ÉS TRANSZGENIKUS RENDSZEREKBEN

Jost Norbert László[1,3], Bitay Miklós[2], Kovács Péter Pál[3], Kohajda Zsófia[1]
[1]MTA-SZTE Keringésfarmakológiai Kutatócsoport, [2]SZTE, ÁOK, Szívsebészeti Önálló Osztály, és [3]Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet.

A projekt célja az volt, hogy új a pitvarfibrilláció kezelésére alkalmas gyógyszertámadási pontokat azonosítsunk be, illetve olyan lehetséges gyógyszerjelölteket vizsgáljunk, amelyek ezek befolyásolása révén fejtik ki hatásukat. Ennek megfelelően a projekt célkitűzése a pitvari akciós potenciált meghatározó transzmembrán ionáramok vizsgálata volt emberben és néhány a preklinikai gyógyszerfejlesztésben széleskörűen alkalmazott állatmodellben (kutya és kecske). Megvizsgáltuk, hogy PF-ben miképpen változnak meg a pitvarspecifikus repolarizáló káliumáramok (I_{K1}, I_{Kur}, $I_{K,ACh}$, I_{to}). Sikerült egy megbízható tachypacelt pitvarfibrillációs kutyamodellt kidolgoznunk, aminek segítségével megállapítottuk, hogy $I_{K,ACh}$ áram szelektív gátlása jelentős antiaritmiás hatással rendelkezik. Több konferencia absztrakt, dolgozat és könyvfejezet, *ill.* egy a hazai orvostársadalom számára új a pitvarfibrillációt ismertető (a szívizomsejttől a betegágyig szintű) monográfia készült a munkából (2,3). Megvizsgáltuk, hogy a korai repolarizációért felelős tranziens kifelé haladó káliumáram (I_{to}) hogyan befolyásolja a késői repolarizációt is kamrai és pitvari miocitákban. Megállapítottuk, hogy bár az I_{to} lassú fázisának amplitúdója és kinetikája az akciós potenciál plató fázisa alatt jelentékeny nagyságú I_{to} áramra utal, az áram gátlása kamrai szívizomsejtekkel ellentétesen, nem eredményezi az akciós potenciál megnyúlását kutya pitvari szívizomban (4). Megvizsgáltuk számos befelé és kifelé haladó áramok gátlása miképpen változtatja meg a szívizomsejtek (kamrai és pitvari miociták) akciós potenciál alakját, időtartamát (APD), ill. a repolarizációt és a repolarizációs tartalékot. Megállapítottuk, hogy a befelé haladó áramok aktiválása, és a repolarizáló áramok gátlása egyaránt fordított frekvenciafüggő módon nyújtja meg az APD-t. A kísérletes eredmények alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a „*reverz use dependens"* hatás a szívizomsejtek egy saját intrinszik tulajdonsága, és ezáltal szerepet játszhatnak a szív aritmogenézisében. A hipotézisünket számítógépes szimulációval *in silico modellen* is teszteltük és igazoltuk (1,5). A ranolazin és ivabradin új, antianginás kezelési indikációval forgalomba került szerek. Az irodalomban kiemelik a szerek Na-csatorna gátló tulajdonságaikat, ezért az Antzelevitch-hipotézis alapján meghatározott pitvarszelektív nátriumcsatorna hatást feltételezve, felmerült mindkét szernek a használata a pitvarfibrilláció terápiájában is. *In vitro* elektrofiziológiai technikák segítségével kutya szívpreparátumokon (papilláris és Purkinje rostok) és mesterségesen pitvarfibrilláló kutya pitvari sejteken, illetve pitvarfibrilláló humán pitvari nyesedékeken megvizsgáltuk a ranolazin és ivabradin elektrofiziológiai hatásait. Megállapítottuk, hogy mindkét szer komplex kedvező „*multichannel"* blokkoló antiaritmiás hatással rendelkezik (6,7).

1. Bárándi L, Virág L, **Jost N**, Horváth Z, Koncz I, Papp R, Harmati G, Horváth B, Szentandrássy N, Bányász T, Magyar J, Zaza A, Varró A, Nánási PP. *Bas Res Cardiol*, 105(3):315-23, 2010.
2. Pitvarfibrilláció. A szívizomsejttől a betegágyig (szerk. Fazekas T, Bogáts G, Csanádi Z, **Jost N**, Lőrincz I), 556 oldal, Medicina Kiadó, 2010, ISBN: 978-963-226-303-8.
3. **N Jost**, Zs. Kohajda, A. Kristóf, P. P. Kovács, Z. Husti, V. Juhász, L. Kiss, A. Varró, L. Virág, I. Baczkó: *Curr Med Chem*, 18, 3675-3694, 2011.
4. L. Virág, **N Jost**, R Papp, I Koncz, A Kristóf, Zs Kohajda, G Harmati, B Carbonell-Pascual, J M Ferrero (Jr), J Gy Papp, P P Nánási, *Br. J Pharmacol*, 164, 93–105, 2011.
5. E. Pueyo, A. Corrias, L. Virág, **N. Jost**, T. Szél, A. Varró, N. Szentandrássy, P.P.Nánási, K. Burrage, B. Rodríguez. *Biophys J*, 101, 1-11, 2011.
6. T Szél, I Koncz, **N Jost,** I Baczkó, Z Husti, L Virág, A Bussek, E Wettwer, U Ravens, J Gy Papp, A Varró. *Eur J Pharmacol*, 668, 419–426, 2011.
7. I. Koncz, T. Szél, M. Bitay, E. Cerbai, K. Jaeger, F. Fülöp, **N. Jost**, L. Virág, P. Orvos, L. Tálosi, A. Kristóf, I. Baczkó, J Gy. Papp, A. Varró. *Eur J Pharmacol*, 668, 419-426, 2011.

Budget: 3,000,000.- HUF

PRECLINICAL INVESTIGATION OF NOVEL ANTIARRHYTHMIC MECHANISMS OF ACTION FOR THE TREATMENT OF ATRIAL FIBRILLATION IN HUMAN AND ANIMAL ATRIAL PREPARATIONS AND TRANSGENIC EXPRESSION SYSTEMS

Norbert L. Jost[1,3], Miklós Bitay[2], Péter P. Kovács[3], Zsófia Kohajda[1]
[1]Division of Cardiovascular Pharmacology, Hungarian Academy of Sciences, [2]Department of Cardiac Surgery, [3]Department of Pharmacology & Pharmacotherapy, Faculty of Medicine University of Szeged.

The aim of the project was identify new potential drug targets and drugs (that modulate these target points) for treating atrial fibrillation. Therefore, we have investigated several transmembrane currents that affect atrial action potential in humans and commonly used animal experimental models (dogs and goats). We have investigated the remodelling of several atrial currents (I_{K1}, I_{Kur}, $I_{K,ACh}$, I_{to}) in atrial fibrillation (AF), and we have concluded that selective $I_{K,ACh}$ blockade has marked antiarrhythmic effects in AF. We have developed a reliable atrial tachypacing induced atrial fibrillation dog model. With the help of this model we have concluded that selective $I_{K,ACh}$ blockade has marked antiarrhythmic effects in AF. We have presented the results of these investigations at several conferences, and we have written and extensive "AF from cell to bedside type" monograph for Hungarian physicians (2,3). We have investigated the properties of the transient outward current (I_{to}, current known to determine the early repolarization) how modulates the late repolarization in atrial and ventricular action potential. We have concluded that due to the amplitude and kinetics of the slow phase of the current inactivation, the I_{to} channel carries a substantial I_{to} current during plateau phase of the atrial action potential, but the I_{to} current blockade did not lengthen the action potential in atrial muscle (4). We have investigated how the modulation of several inward and outward currents would change the action potential shape, duration (APD) of repolarization and repolarization reserve in cardiac cells (atrial and ventricular myocytes as well). We have observed that activation of the inward and block of outward currents lengthened APD in a reverse rate dependent manner and we have concluded that this reverse frequency dependent effect is an intrinsic property of the cardiomyocytes, which contributed also to the arrhythmogenesis of the heart. We have tested and proved this hypothesis by applying computer simulations (*in silico* model) (1,5). The ranolazine and ivabradine are two novel antianginal drugs in the clinical practice. Since from the literature there is known their Na-channel blocking effect (Antzelevitch's hypothesis), we have tested whether they can be applied in the therapy of suppressing atrial fibrillation. Therefore, we have investigated the electrophysiological effects of ivabradine and ranolazine by applying several *in vitro* electrophysiological techniques in fibrillating human and atrial tachycardia remodelled dog cardiac preparations (papillary muscle and Purkinje fibre). We have concluded that both drugs posses strong antiarrhythmic effect based on their complex multichannel blocker properties (6,7).

1. Bárándi L, Virág L, **Jost N**, Horváth Z, Koncz I, Papp R, Harmati G, Horváth B, Szentandrássy N, Bányász T, Magyar J, Zaza A, Varró A, Nánási PP. *Bas Res Cardiol*, 105(3):315-23, 2010.
2. Pitvarfibrilláció. A szívizomsejttől a betegágyig (szerk. Fazekas T, Bogáts G, Csanádi Z, **Jost N**, Lőrincz I), 556 oldal, Medicina Kiadó, 2010, ISBN: 978-963-226-303-8.
3. **N Jost**, Zs. Kohajda, A. Kristóf, P. P. Kovács, Z. Husti, V. Juhász, L. Kiss, A. Varró, L. Virág, I. Baczkó: *Curr Med Chem*, 18, 3675-3694, 2011.
4. L. Virág, **N Jost**, R Papp, I Koncz, A Kristóf, Zs Kohajda, G Harmati, B Carbonell-Pascual, J M Ferrero (Jr), J Gy Papp, P P Nánási, *Br. J Pharmacol*, 164, 93–105, 2011.
5. E. Pueyo, A. Corrias, L. Virág, **N. Jost**, T. Szél, A. Varró, N. Szentandrássy, P.P.Nánási, K. Burrage, B. Rodríguez. *Biophys J*, 101, 1-11, 2011.
6. T Szél, I Koncz, **N Jost,** I Baczkó, Z Husti, L Virág, A Bussek, E Wettwer, U Ravens, J Gy Papp, A Varró. *Eur J Pharmacol*, 668, 419–426, 2011.
7. I. Koncz, T. Szél, M. Bitay, E. Cerbai, K. Jaeger, F. Fülöp, **N. Jost**, L. Virág, P. Orvos, L. Tálosi, A. Kristóf, I. Baczkó, J Gy. Papp, A. Varró. *Eur J Pharmacol*, 668, 419-426, 2011.

Pályázai támogatás összege: 2400 M HUF

AGYDAGANATOK KÉPFÚZIÓ VEZÉRELT BRACHYTERÁPIÁS ÉS SUGÁRSEBÉSZETI KEZELÉSE.

Julow J [1], Kolumbán Zs [1, 6], Major T [2], Bálint K [4,6], Viola Á [1], Szeifert Gy [4], Emri M [3], Bajzik G [5], Bajcsay A [2], Hável J [1], Székely Gy[1]

Szent János Kórház Osztály Idegsebészeti Osztály[1], Országos Onkológiai Intézet Sugárterápiás Osztály[2], PET Laboratórium a Debreceni Orvostudományi Egyetem [3], Országos Idegtudományi Intézet [4], Pannon Egyetem MRI Laboratórium Kaposvár [5], Semmelweis Orvostudományi Egyetem Budapest [6].

Szent János Kórház Idegsebészeti Osztályán 1999 óta 280 különböző típusú agydaganat képfúzióval irányított stereotaxiás brachyterápiás beavatkozást végeztünk. 130 esetben Ittrium-90 kolloid oldattal recidív cisztás craniopharyngeomákat és 120 esetben jód-125 seedekkel gliomákat sugaraztunk be. 70 stereotaxiás LINAC pontbesugárzást is végeztünk. Az irradiációt követően betegeinket évekig követtük és dokumentáltuk.

A „pixel to pixel" képfúzió módszerével 3D-s CT-CT, CT-MR, CT-MR-PET vizsgálatokat- a brachyterápiás beavatkozás előtt, a művelet alatt és a beavatkozás után alkalmaztuk. Vizsgálataink az azonos beteg daganatának eltérő alakjára, helyére, térfogatára, az izodózis görbék összehasonlítására, a besugárzás utáni volumetriás elemzésekre, ill. a tumor nekrózis, reaktív zóna és az ödéma nagyságára szorítkoztak.

Eredményeink a következők: A hagyományos idegsebészeti beavatkozást. követően évek mulva kialakult craniopharyngeomás cisztákat kezeltünk. A betegek 80%-ánál az ittrium-90 besugárzást követően fél- egy év után a ciszta térfogata 80%-kal zsugorodott. Átlag 7 évvel tovább éltek a besugárzás nélküli esetekkel összehasonlítva.

A gliomák ill. pinealomák, agytörzsi daganatok, visszatérő meningeomák jód-125 a szövetközi besugárzását követően a besugárzott terület körül un. "hármas gyűrű"reaktív elváltozás alakul ki, ennek volumetrai változásait vizsgáltuk: matematikai modellek segítségével.

Az egyes betegekhez tartozó -a referenciadózis által kijelölt- referencia-térfogattal normalizált térfogatértékeket kiszámítottuk és az időtartományban ábrázoltuk. Az így normalizált adatokból meghatároztuk az egyes hónapokhoz tartozó átlagokat, végül az átlagértékekre polinomot illesztettünk. Számításaink hitelességét statisztikai úton igazoltuk.
Következtetések: Az új „polinom illesztésen alapuló prognózisgörbe", mely képfúziót felhasználva írja le a tumor nekrózis, reaktív zóna illetve ödéma térfogat paraméterek időbeli változását, hasznos információt nyújthat (i) az ideális betegkezelés kialakításánál, (ii) a betegkövetésnél és (iii) egy esetlegesen szükséges reoperáció tervezésénél.

Julow Jenő: Az agyi brachytherápia legújabb eredményei. Orvosképzés. LXXXIV. 440-443. 2009
Julow J: Image fusion guided brachytherapy of brain tumors. Clinical Neuroscience 63. 5-6. 164-9. 2010
Kolumbán Zs, Bálint K, Julow J. Cisztás craniopharyngeomák zsugorodásának dinamikája 90 Ittrium brachytherapia után. Ideggy. Sz 2011; 64(1–2): 36–40.
Kolumbán Zs. Major T. Julow J. Gliomák 125I-brachytherápiáját leíró polinomiális analízis kiterjesztése 48 hónapos időtartamra. Ideggy Sz. 2011 64 (7-8):235-238
Bálint K, Julow J: A KÖZPONTI IDEGRENDSZER DAGANATAINAK PATHOLOGIÁJA Melánia Kft. 2010 ,1-164 o.

Pályázai támogatás összege: 2400 M HUF

IMAGE FUSION GUIDED BRACHYTHERAPY AND RADIOSURGERY OF BRAIN TUMORS.

J Julow [1], Zs Kolumbán [1,6], T Major [2,] K Bálint [4,6,] A Viola [1,6], G Szeifert [4], M Emri [3],G Bajzik [5] A Bajcsay [2], J Hável [1], G Székely [1]

St. John's Hospital Department of Neurosurgery1, Department of Radiotherapy of National Institute of Oncology2, PET Laboratory of Debrecen Medical School 3, National Institute of Neurosurgery4, MRI Laboratory of Pannon University Kaposvár 5, Semmelweis University Budapest 6.

We have performed stereotactic brachytherapy on 280 brain tumors at the Department of Neurosurgery of the Szent János Hospital since 1999 using the method of image fusion (" image guided brachytherapy") applied during the time period preceding the placement of the radiation source, during the operation and in the post operation stage.

We have been the first to introduce this procedure internationally. (Image fusion is the process of image superposition using different image types: stereotactic (ST-CT), anatomic (CT, MRI) and functional (PET). Given two data sets registered in three orthogonal axes, comparative slices can be created through any arbitrary point and at any orientation that ensure more precise surgical and radiation interventions.)

Our results are the following:The analysis of the long-term Results and Late Complications following the Intracavitary Yttrium-90 colloid Irradiation of recurrent Cystic Craniopharyngiomas. The mathematical formula for cyst regression. The analysis of the results of the interstitial 125I irradiation of pinealomas, brainstem tumors, recurrent meningeomas and gliomas.

Relative volumes normalized with respect to the volume of reference dose were calculated and plotted in the time domain. First the mean values of volumes were determined from the patients' measured data, then polynomials were fitted to the mean values using the polynomial curve fitting method. The accuracy of our results was verified by correlating the predicted data with the measured ones.
The dynamics of triple ring given by our new "polynomial prediction approach" shows the volumetrical change of the morphological changes occurring due to I-125 brachytherapy as a function of time for 48 months after irradiation. The derived polynomials and the multivarial analyses carried out afterwords can help (i) to adjust the anti-edema drug therapies to the development of edema (ii) to choose the best time for taking control pictures and (iii) by a potential reirradiation if neccesary.

J Julow: Newest results of cerebral brachytherapy. Orvosképzés. LXXXIV.440-443. 2009

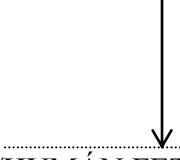
J. Julow: Image fusion guided brachytherapy of brain tumors. Clinical Neuroscience 63.5-6.164-9. 2010

Zs Kolumbán, K Bálint, J Julow: Dinamics of Craniopharyngiomas Reduction after Yttrium-90 Colloid Brachytherapy. Clin. Sci. Ideggy Sz 2011; 64(1–2): 36–40.

Zs Kolumbán. T Major. J Julow. Extension of Polynomial Analysis of Interstitial I-125 Brachytherapy for 48 Month. Clin. Sci. Ideggy Sz. 2011 64 (7-8):235-238

K Bálint, J Julow: PATHOLOGY OF BRAIN TUMORS OF CENTRAL SYSTEM. Melánia Kft. 2010 ,1-164 o.

2 cm



Teljes támogatás: 3.200.000,- Ft

AZ ALFA2HS-GLIKOPROTEIN/HUMÁN FETUIN A (AHSG) SZEREPE AZ INZULINREZISZTENCIA ÉS AZ ATHEROSCLEROSIS KIALAKULÁSÁBAN

Kalabay László[1], Vörös Krisztián[1], Gráf László ifj[2]., Gráf László[3], Cseh Károly[4], Prohászka Zoltán[5]
[1]Semmelweis Egyetem, Családorvosi Tanszék, [2]Semmelweis Egyetem, III. sz. Belgyógyászati Klinika, [3]Eötvös Lóránd Tudományegyetem Természettudományi Kar, Biológiai Intézet, Biokémiai Tanszék, [4]Semmelweis Egyetem, Népegészségügyi Tanszék és Főv. Károlyi Kórház és Rendelőintézet I. sz. Belgyógyászati Osztály, [5]Semmelweis Egyetem - Magyar Tudományos Akadémia Anyagcsere és Atherosclerosis Kutatócsoport

Az atherosclerosis kialakulásában metabolikus tényezők (kóros zsírsejt-működés, elhízás, az inzulirezisztencia, cukorbetegség) és a szubklinikus gyulladásos folyamat egyaránt szerepet játszik. Az érelmeszesedés ismert kockázati tényezői számos, veszélyeztett beteget nem azonosítanak.

Az alfa2HS-glikoprotein/humán fetuin A (AHSG) a máj parenchyma sejtjei által termelt multifunkcionális glikoprotein, mely negatív akut fázis fehérje, gátolja az extraosszeális kalcifikációt, valamint állatkísérletek eredménye szerint szerepe van az inzulinrezisztencia kialakulásában. Jelen pályázatban a humán inzulinrezisztencia, az obezitás, a 2-es típusú cukorbetegség , az adipokinek és a gyulladásos citokinek és az AHSG közötti összefüggést vizsgáltuk olyan betegekben, akikben az atherosclerosis és szövődményei (coronaria- és perifériás érbetegség) voltak észlelhetők.

Keresztmetszeti tanulmányban 171 ST elevációval járó miokardiális infarktuson átesett, ép veseműködésű beteg és 81 életkorban megegyező referens személy szérumának AHSG koncentrációját összehasonlítva a betegeké emelkedett volt (673 ± 103 vs. 619 ± 96 mg/l, p <0,001). Az obez és diabeteses betegek értékei magasabbak voltak, mint a nem obeseké és a nem diabeteseseké, de ez utóbbi két csoport értékei még mindig a kontroll felett voltak. (667 ± 101 mg/l, n = 88, p = 0,002, a kontrollhoz viszonyítva). A szérum AHSG negatívan korrelált az adiponectin koncentrációval (r = 0,236, p = 0,006), még a BMI-re történt igazítás után is (r = 0,177, p = 0,043). Az AHSG és az adiponectin közötti korreláció független volt az életkortól, a BMI-től és egyéb adipokinektől (p = 0,014). Szérum AHSG nem korrelált szignifikánsan a CRP, rezisztin és TNF-α szintekkel. A TNF-α szintet a BMI és a rezisztin, de nem az AHSG koncentráció határozta meg. A szérum AHSG emelkedett infarktuson átesett személyek szérumában. Az adipokinekkel talált kapcsolat amellett szól, hogy ezekben a betegekben az atherosclerosis folyamatában az AHSG inkább a metabolikus (inzulinrezisztencia, obezitás, adipocyta diszfunkció), mint a gyulladásos úton vesz részt.

A fenti beteg- és kontrollcsoportban a betegek alacsonyabb szérum ghrelin koncentrációja volt, mint a kontrolloknak (241 ± 59 vs. 338 ± 31 pg/ml), még az obez és diabeteszes betegek kizárása után is (241 ± 54 vs. 338 ± 31 pg/ml, p<0,001). A BMI-re és nemre történő igazítás után a ghrelin szint korrelált az inzulinéval (r = -0,270, p<0,001) és az adiponectinéval (r = 0,280, p <0,001). Többváltozós analízissel az inzulin (β = -0,327, p <0,001) és az adiponectin (β = 0,301, p <0,001) a ghrelin szint meghatározójának bizonyult (R^2 = 0,199, p <0,001). A ghrelin és a TNF-α között nem volt kapcsolat. A ghrelint, adiponectint, leptint, AHSG-t, rezisztint és TNF-α-t magában foglaló diszkrimináns analízis során a ghrelin és a TNF-α határozta meg leginkább, hogy ki tartozik a beteg és a kontroll csoportba (0,760 és -0,569). Csak ezt a két paramétert használva is az esetek 89,7%-át tudtuk helyesen besorolni. A magas TNF-α/ghrelin arányt mutató betegeknek 11,25-szörös esélyük volt arra, hogy a betegcsoportba tartozzanak (95% CI: 5,80-21,80, p <0,001). Az eredmények arra utalnak, hogy ebben a betegcsoportban a szérum ghrelin szint csökkenése a testsúlytól és a 2-es típusú cukorbetegségtől független. A ghrelin szintet az emelkedett inzulin csökkent adiponectin határozza meg. A szérum ghrelin önmagában vagy a TNF-α-val együtt a coronaria atherosclerosis új indikátora lehet.

Teljes támogatás: 3.200.000,- Ft

Kilencvenhárom atherosclerosisos, alsó végtagi érszűkületes betegen végzett keresztmetszeti vizsgálatban a szérum AHSG koncentráció negatívan korrelált az ultrahang kalcifikációs ($r = 0,257$, $p = 0,018$) és a Bollinger angiographiás score-ral ($r = -0,347$, $p = 0,035$), de nem korrelált az intima-média vastagsággal, sem a Fontaine klasszifikációval. Ezekben a betegekben szignifikáns kapcsolatot mutattunk ki a szérum AHSG és az albumin ($r = 0,287$, $p = 0,006$), a transzferrin ($r = 0,305$, $p = 0,003$) és a haemoglobin A1c értékekkel ($r = 0,219$, $p = 0,038$). Logisztikus regressziós analízissel az AHSG és a kalcifikációs score közötti kapcsolat a hagyományos kockázati tényezőktől függetlennek bizonyult (OR: 3,03, 95% CI: 1,05-8,7, $p = 0,039$). A szérum AHSG értékek az atherosclerosis súlyosságával fordítottan korrelált az alsó végtagi érszűkületes, de nem veseelégtelen betegekben. Az eredmények az AHSG artériás kalcifikációtól védő szerepe mellett szólnak.

Egy másik, 105 érbeteget (30 atheroscleroticus aneurysma, 15 Marfan szindróma, 30 perifériás érbetegség, 30 egészséges kontroll) felölelő keresztmetszeti vizsgálatban a szérum AHSG koncentráció szignifikánsan alacsonyabb volt az atheroscleroticus aneurysmás betegekben (708 [612-780] mg/l, medián [interkvartilis tartomány]) a Marfan szindróma okozta aorta aneurysmás betegekhez (756 [708-816] mg/l) képest ($p = 0,043$). A kontrollcsoport AHSG szintje 754 [713-777], az egészségeseké 654 [600-756] mg/l volt. Az atheroscleroticus aneurysmás csoportban az átlagos intima-média távolság (IMT) (0,75 [0,70-0,87] vs. 0,55 [0,48-0,60] mm, $p < 0,0001$), a maximális IMT (0,9 [0,8-1,2] vs. 0,6 [0,5-0,6] mm, $p < 0,0001$), az artériás kalcifikációs score (5 [3-6] vs. 0 [0-1], $p < 0,0001$) és a homocisztein értéke (17,15 [1,40 -21,0] vs. 12,1 [11,4-15,0] μmol/l, $p = 0,0034$) szignifikánsan emelkedett volt. A szérum lipid értékek és az akut fázis paraméterek nem különböztek a két aneurysmás csoport között. Az atheroscleroticus aneurysmában mért szignifikánsan alacsonyabb szérum AHSG koncentráció a glikoprotein védő szerepére utal az artériák kalcifikációjával szemben.

1. Szeberin Z, Fehérvári M, Krepuska M, Apor A, Rimely E, Sarkadi H, Bíró G, Sótonyi P, Széplaki Z, Szabolcs Z, Prohászka Z, Kalabay L, Acsády Gy: Fetuin-A serum levels in patients with aortic aneurysms of Marfan syndrome and atherosclerosis. EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION 41: pp. 176-182 (2011) IF-2010: 2,736
2. Szeberin Z, Fehérvári M, Krepuska M, Apor A, Rimely E, Sarkadi H, Széplaki G, Prohászka Z, Kalabay L, Acsády Gy: Serum Fetuin-A levels inversely correlate with the severity of arterial calcification in patients with chronic lower extremity atherosclerosis without renal disease. INTERNATIONAL ANGIOLOGY 30: pp. 474-480 (2011) IF-2010: 0,993
3. Vörös K, Gráf L Jr, Prohászka Z, Gráf L, Szenthe P, Kaszás E, Böröcz Z, Cseh K, Kalabay L: Serum fetuin-A in metabolic and inflammatory pathways in patients with myocardial infarction. EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION 41: pp. 703-709 (2011) IF-2010: 2,736

2 cm

2 cm

2 cm

2 cm

Budget: 3.200,000.- HUF

THE ROLE OF ALPHA2HS-GLYCOPROTEIN/HUMAN FETUIN A (AHSG) IN THE DEVELOPMENT OF INSULIN RESISTANCE AND ATHEROSCLEROSIS

Kalabay László[1], Vörös Krisztián[1], Gráf László Jr.[2], Gráf László[3], Cseh Károly[4], Prohászka Zoltán[5]
[1]Department of Family Medicine, Semmelweis University, [2]3rd Department of Internal Medicine, Semmelweis University, [3]Eötvös Lóránd University, Faculty of Scinence, Institute of Biology, Department of Biochemistry, [4]Department of Public Health, Semmelweis University, Károly Sándor Municipality Hospital, 1st Department of Internal Medicine, [5]Semmelweis University - Hungarian Academy of Sciences Metabolism and Atherosclerosis Research Laboratory

Metabolic processes (adipocyte dysfunction, obesity, insulin resistance, diabetes) and subclinical inflammatory processes are both involved in the development of atherosclerosis. Major risk factors help identify many but not all patients with high cardiovascular morbidity and mortality.

Alpha2HS-glycoprotein/human fetuin A (AHSG) is a multifunctional glycoprotein produced by the liver parenchyma cells. AHSG is a negative acute phase reactant, inhibits the extraosseal calcification, and is involved in the development of insulin resistance in animal models. In the present grant we investigated the association between AHSG and human insulin resistance, obesity, type 2 diabetes, adipokines and proinflammatory cytokines in patients with atherosclerosis and it complications (coronary and peripheral artery disease).

In a cross-sectional study serum AHSG concentration was determined in 171 patients with previous myocardial STEMI infarction and normal renal function and 81age-matched healthy controls. Patients had increased AHSG levels (673 ± 103 vs. 619 ± 96 mg/l, $p < 0.001$) compared to controls. Obese and diabetic patients had higher AHSG concentration than those with normal BMI or without diabetes but even the latter group had elevated AHSG levels (667 ± 101 mg/l, n = 88) compared to controls ($p = 0.002$). Serum AHSG correlated negatively with adiponectin ($r = 0.236$, $p = 0.006$) even after adjusting for BMI ($r = 0.177$, $p = 0.043$). AHSG determined adiponectin levels independently from BMI, age and other adipocytokines ($p = 0.014$). Serum AHSG did not correlate significantly with CRP, resistin and TNF-α concentration. TNF-α levels were determined by BMI and resistin but not AHSG. AHSG is elevated in sera of patients with previous myocardial infarction. Association with adipokines favours the concept that AHSG is involved in atherosclerosis more likely through metabolic pathways (insulin resistance, obesity and adipocyte dysfunction) than by inflammation in patients with post-myocardial infarction.

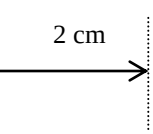
In the same patient and control groups patients had significantly lower ghrelin levels compared to referent subjects (241 ± 59 vs. 338 ± 31 pg/ml), even after excluding diabetic and obese patients (241 ± 54 vs. 338 ± 31, $p < 0.001$). After adjusting for BMI and gender ghrelin correlated with insulin ($r = -0.270$, $p < 0.001$) and adiponectin ($r = 0.280$, $p < 0.001$) levels. In multivariate analysis insulin ($\beta = -0.327$, $p < 0.001$) and adiponectin ($\beta = 0.301$, $p < 0.001$) determined ghrelin level ($R^2 = 0.199$, $p < 0.001$). There was no association between ghrelin and TNF-α. In discriminant analysis using ghrelin, adiponectin, leptin, fetuin-A, resistin and TNF-α the structure matrix revealed ghrelin and TNF-α as strongest predictors for belonging to the patient group (0.760 and -0.569, respectively). Using only these two parameters 89.7% of cases were correctly classified. Subjects with high TNF-α/ghrelin ratio had 11.25 times higher chance for belonging to the patient group (95% CI 5.80-21.80, $p < 0.001$). Ghrelin levels are decreased in patients with coronary atherosclerosis, independently of body weight and the presence of type 2 diabetes mellitus. Ghrelin level is determined by elevated insulin and decreased adiponectin levels. Ghrelin alone or in combination with TNF-α may prove to be a novel indicator of coronary atherosclerosis.

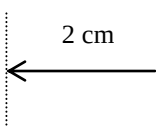
In a cross-sectional study among 93 chronic atherosclerotic patients with lower extremity vascular disease, systemic atherosclerosis and calcification was assessed by ultrasound (carotid intima-media

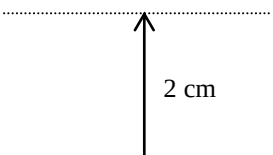
thickness, IMT), calcification at the abdominal aorta, carotid and femoral bifurcations, aortic and mitral valves) and angiography (Bollinger score). Serum AHSG level showed significant negative correlation with ultrasound calcification score ($p = 0.018$, $r = -0.257$) and Bollinger angiographic score ($p = 0.035$, $r = -0.347$) but did not correlate with IMT or Fontaine classification. Serum AHSG showed significant correlation with albumin ($r = 0{,}287$, $p = 0{,}006$), transferrin ($r = 0{,}305$, $p = 0{,}003$) and hemoglobin Alc ($r = 0.219$, $p = 0.038$). Logistic regression analysis confirmed the association between AHSG and calcification score (OR: 3.03, 95% CI: 1.05-8.7, $p = 0.039$) independent of traditional risk factors. Serum AHSG levels inversely correlate with the severity of atherosclerosis in nonuremic patients with symptomatic chronic lower limb ischemia. These data support a putative protective role for fetuin-A in the development of arterial calcification.

In a single centre cross-sectional observational study, 105 patients (30 with atherosclerotic aortic aneurysm, 15 with Marfan syndrome, 30 with peripheral arterial disease and 30 healthy controls) were examined. Serum AHSG levels (median and IQR) were significantly lower in the atherosclerotic aneurysm cohort (708 [612–780] mg/l) than in patients with Marfan syndrome (756 [708–816] mg/l, $p = 0.0423$). mg/l. Serum AHSG levels were 754 [713–777] in the control group and 654 [600–756] in patients with peripheral arterial disease. Mean IMT (0.75 [0.70-0.87] vs. 0.55 [0.48-0.60] mm, $p < 0.0001$), maximum IMT (0.9 [0.8-1.2] vs. 0.6 [0.5-0.6] mm, $p < 0.0001$), arterial calcification score values (5 [3-6] vs. 0 [0-1],.$p < 0.0001$) and homocysteine levels (17.15 [1.40-21.0] vs. 12.1 [11.4-15.0] μmol/l, $p = 0{,}0034$)were significantly higher in patients with atherosclerosis. There was no significant difference between aneurysm groups analysing the results of lipid profile and acute-phase markers. The significantly lower serum level of fetuin-A in the atherosclerotic aneurysm group supports the protective role of fetuin-A in the evolution of arterial calcification.

1. Szeberin Z, Fehérvári M, Krepuska M, Apor A, Rimely E, Sarkadi H, Bíró G, Sótonyi P, Széplaki Z, Szabolcs Z, Prohászka Z, Kalabay L, Acsády Gy: Fetuin-A serum levels in patients with aortic aneurysms of Marfan syndrome and atherosclerosis. EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION 41: pp. 176-182 (2011) IF-2010: 2,736
2. Szeberin Z, Fehérvári M, Krepuska M, Apor A, Rimely E, Sarkadi H, Széplaki G, Prohászka Z, Kalabay L, Acsády Gy: Serum Fetuin-A levels inversely correlate with the severity of arterial calcification in patients with chronic lower extremity atherosclerosis without renal disease. INTERNATIONAL ANGIOLOGY 30: pp. 474-480 (2011) IF-2010: 0,993
3. Vörös K, Gráf L Jr, Prohászka Z, Gráf L, Szenthe P, Kaszás E, Böröcz Z, Cseh K, Kalabay L: Serum fetuin-A in metabolic and inflammatory pathways in patients with myocardial infarction. EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION 41: pp. 703-709 (2011) IF-2010: 2,736







Teljes támogatás: 4 200 000,- Ft

A CIRKADIÁN ÓRA HATÁSA AZ IMMUNVÁLASZRA: FAGOCITA SEJTEK MŰKÖDÉSÉNEK CIRKADIÁN SZABÁLYOZÁSA, A MOLEKULÁRIS SZABÁLYOZÁS ALAPVETŐ FAKTORAI

Káldi Krisztina[1], Gyöngyösi Norbert[1], Ella Krisztina[1]
[1]SE Élettani Intézet

A kutatás tudományos háttere

Környezeti körülményeink többsége (pl. fényintenzitás, hőmérséklet, szociális tényezők) a nap folyamán periódikusan változik. Az élettani folyamatok ritmusa e környezeti változások napszaki oszcillációjához igazodott. Ez az alkalmazkodási folyamat, a cirkadián ritmus, bizonyítottan előnyt jelent az élőlény számára, hiszen előre felkészülten fogadja a környezet történéseit, ezáltal azokra gyorsabban, hatékonyabban reagál. Ma már jól ismert, hogy a cirkadián ritmus zavara rizikótényező, az érintett populációban számos gyakori betegség (pl. diabetes mellitus, magas vérnyomás, rosszindulatú daganatok) halmozottan fordul elő.

A cirkadián ritmus generálása sejtszinten történik, létrehozásáért ún. molekuláris óraművek felelősek. Munkacsoportunk elsősorban az óraműködésért felelős molekuláris mechanizmusok vizsgálatával foglalkozik. A pályázattal kapcsolatos munka célja a fehérvérsejtek csoportjába tartozó fagocita sejtek cirkadián jellegű funkcióinak vizsgálata volt. Ugyanakkor ezzel párhuzamosan tovább folytattuk korábban megkezdett vizsgálatainkat, amelyek során a cirkadián óra működésében szerepet játszó alapvető molekuláris történéseket egy modellorganizmusban, *Neurospora crassa*-ban tanulmányozzuk. Tekintve, hogy a cirkadián óra működésében szerepet játszó molekuláris mechanizmusok igen konzerváltak, e modellorganizmusban leírt adatok folyamatosan alapját képezik a magasabb rendű organizmusokban folytatott molekuláris vizsgálatoknak. E modellorganizmusban végzett vizsgálataink a beszámolási időszak kezdetén új, az óraműködés megismerése szempontjából igen fontos fordulatot vettek, és rendkívül érdekes eredményeket hoztak. Ennek folytán egyrészt befejeztük ezeket a vizsgálatokat, másrészt, ezzel párhuzamosan, megkezdtük a fagociták cirkadián működésének vizsgálatát. A továbbiakban e két témakörben elért eredményeinket két külön alpontban ismertetem.

A cirkadián óra működését stabilizáló molekuláris mechanizmus vizsgálata

Természetes környezetében az élőlények többsége fény-sötétség ciklusoknak van kitéve. A természetes sötétfázis azonban nem jelent folyamatos, teljes fényhiányt, ezalatt is érheti a fényre érzékeny receptorokat gyenge intenzitású fénybehatás. Ilyen, változó erősségű éjszakai megvilágításként jelentkezik például a holdfény. A cirkadián óra csak akkor működhet stabilan, ha képes a sötét fázisban előforduló zavaró fényingereket kiszűrni, illetve olyan fontos fényhatásoktól elkülöníteni, amik a nappal elérkeztét jelzik, és esetleg egy időeltolódás esetén akár a korábbitól nagymértékben eltérő fázisban is jelentkezhetnek. Ebben a folyamatban merült föl a VIVID (VVD) nevű fényreceptor szerepe. Vizsgálatainkat a Heidelbergi Egyetem Biokémiai Centrumának, Michael Brunner által vezetett munkacsoportjával együttműködésben végeztük. Alábbiakban azokat az eredményeket foglalom össze, amelyek a VVD-re vonatkozóan a mi laboratóriumunkban születtek:

a. A VVD sejtbeni mennyisége igen széles tartományban a környezeti fényintenzitás indikátora, szintje a fényerősséggel arányosan növekszik. Ennek megfelelően az elsődleges fényreceptorra, a White Collar Complex(WCC)-re kifejtett gátló hatása is fényerősségtől függően differenciált lehet.

b. Szubcelluláris frakcionálást végezve, illetve a VVD-GFP lokalizációjának mikroszkópos követésével kimutattuk, hogy a VVD szignifikáns mennyiségben előfordul a magban. Megfigyeléseink tehát, szemben a korábbi feltevéssel, arra utalnak, hogy a VVD az aktív WCC-szel azonos kompartmentben megtalálható.

c. A VVD a WCC-szel molekuláris kölcsönhatásba lép. A interakcióhoz mindkét fehérje intakt fényérzékelő doménjére (LOV-domén) van szükség, és az csak világosban mutatható ki.

d. A VVD gátolja a WCC fény hatásra bekövetkező hiperfoszforilációját és bomlását. Ezzel párhuzamosan gátolja a komplex aktivitását is, így elősegíti egy stabil, inaktív WCC frakció felhalmozódását.

e. Természetes fotociklusok során kis intenzitású zavaró fényjelek kiszűrése, és ezáltal az óra működésének zavartalansága VVD jelenlétéhez kötött: a *Δvvd* törzs erős holdfény mellett elveszíti spóraképzési ritmusát.

Eredményeink szerint a VVD a korábbi környezeti fényintenzitásra vonatkozó molekuláris memóriaként működve, a WCC-szel kölcsönhatásba lépve gátolja annak fényfüggő aktiválódását, és ezáltal természetes fényperiódusok mellett is stabillá teszi a cirkadián óra működését. A felsorolt adatokat egy megosztott elsőszerzős közleményben a német munkacsoporttal közösen közöltük a Cell című folyóiratban 2010-ben ([1]).

A cirkadián óra működésének vizsgálata makrofág sejtmodellen

Vizsgálataink célja egy olyan makrofág modellrendszer létrehozása volt, amelyben tanulmányozható, hogy e sejtek saját órája, a hypothalamusban található ún. központi óra hatásától függetlenül, mennyiben képes a mikrobák elleni védekezésben alapvető sejtválaszokat befolyásolni. Főbb eredményeink:

a. Négy makrofág sejtvonalon (Mono Mac 6, U937, THP-1 és egér RAW 264.7) kíséreltük meg a sejtkultúrán belül az egyes sejtek cirkadián óráit szinkronizálni. A szinkronizáláshoz először három, az irodalomban elterjedt eljárást alkalmaztunk: dexamethasonnal történő kezelés, a szérumkoncentráció hirtelen emelése, illetve szérum sokk alkalmazása. A szinkronizáció létrejöttének követésére az óragének expressziójának ritmicitását vizsgáltuk az egyes RNS szintek real-time PCR technikával történő mérésével. Dexamethason alkalmazása és a szérum koncentráció emelése ugyan két sejtvonal esetében is eredményezett bizonyos mértékű szinkronizációt, de annak amplitudója kismértékű volt.

b. A továbbiakban a szinkronizálás hatékonyságának növelése céljából egy teljesen új módszer bevezetésével próbálkoztunk: a sejteket, az irodalomból jól ismerten könnyen szinkronizálható fibroblasztokkal tenyésztettük közösen sejtvonal. Ez a megoldás a MonoMac 6 esetében sikeresnek bizonyult, a sejtek jól reprodukálható, ritmusos óragén expressziót mutattak.

c. Később sikerült létrehoznunk olyan sejtvonalakat is, amelyek óragén pomóter által vezérelve luciferázt fejeznek ki, és ezeken a sejtvonalakon is sikerült napokon keresztül fennmaradó ritmusos luciferáz aktivitást mérnünk.

d. A sejtek szinkronizálását követően különböző válaszreakciók alakulását követtük a szinkronizálástól eltelt idő függvényében. Vizsgáltuk opszonizált élesztő fagocitózisát, a szuperoxid termelést, és különböző sejtfelszini markerek megjelenését. A fagocitózis-készség jól reprodukálható időbeli változást mutatott, amely, ugyan lecsengő amplitudóval, de több napon át követhető volt. A PKC aktiválás útján kiváltott szuperoxidtermelés is ritmusos volt, és maximuma egybeesett a termeléséért felelős enzim membránkomponensének, a $gp91_{phox}$ fehérjének sejtfelszíni expressziós csúcsával.

e. Az óraműködés és a sejtválaszok összefüggésének további vizsgálatára egy központi óragént, a *bmal-1*-t csendesítettük siRNS transzfektálásával. A megfelelő transzfekciós protokol kidolgozását követően a BMAL-1 fehérje szintjét mintegy 20 %-ra sikerült csökkentenünk. Jelenleg vizsgáljuk ennek hatását a sejtek órafüggő immunválaszaira.

Eredményeink szerint egyes makrofág sejtvonalak cirkadián órái szinkronizálhatók, bár ez ezekben a sejtekben technikailag sokkal nehezebben érhető el, mint fibroblasztokban. Vizsgálataink először mutatnak be olyan sejtkultúra-rendszert, ahol sejt-sejt kontaktusra van szükség a cirkadián óra hatékony szinkronizálásához. Eredményeink arra utalnak, hogy bizonyos sejtspecifikus válaszreakciók, mint a fagocitózis és a szuperoxid termelés sejtszintű cirkadián kontrol alatt állnak.

[1]Malzahn E, Ciprianidis S, Káldi K, Schafmeier T, Brunner M: Photoadaptation in Neurospora by competitive interaction of activating and inhibitory LOV domains. CELL **142**:762-72, 2010 IF: 31,152

Teljes támogatás: 4 200 000,- Ft

CIRCADIAN ORGANIZATION OF IMMUNE RESPONSES: CLOCK CONTROLLED MICROBICIDAL REACTIONS OF PHAGOCYTES, BASIC FACTORS OF THE REGULATION

Krisztina Káldi[1], Norbert Gyöngyösi[1], Krisztina Ella[1]
[1]Semmelweis University, Department of Physiology

Introduction

Many environmental factors (light intensity, temperature, social effects) display periodic variations during the day. The rhythm of the physiological processes is adapted to these daily oscillations in the environment. This adaptation, called circadian rhythm, provides an important advantage to the organism, because it can be prepared for and thus more effectively response to environmental changes that usually occur every 24 hours. According to clinical and experimental data, disturbances of the circadian rhythm may cause significant health problems. In humans, higher incidence of common disorders (e.g. cardiovascular diseases, diabetes, obesity, breast cancer, depression) has been observed in populations with disturbed circadian rhythm.

The circadian rhythm is generated on the cellular level by the action of molecular clockworks. The basic molecular mechanisms responsible for the generation of the rhythm are in the focus of our research. The main aim of this work was the investigation of circadian responses of phagocytes. Parallely to this work, we continued our investigations on the molecular control of the circadian clock of the model organism *Neurospora crassa*. Many basic aspects of the molecular mechanisms of circadian regulation are well conserved in eukaryotes. Therefore, *Neurospora* is a useful experimental tool for studying the general properties of the system. Many molecular data described in this model serve as basis for the molecular investigations in higher organisms. At the beginning of the project period our investigations on this model led to important new findings. Therefore, we finished these investigations and parallely, started our new project on the phagocytes. Most important data of these projects are summarized below:

A molecular mechanism stabilizing the circadian rhythm

Most organisms live under light-dark cycles. In natural photoperiods, nights are not always entirely dark. Photoreceptors can be activated by law density light (e.g. moon light) even during the night period. On the other hand, prerequisite of a stable circadian rhythm is the discrimination between important and disturbing light information. We assumed the role of the photoreceptor VIVID (VVD) in this process. The research was performed in collaboration with the group of Michael Brunner (University Heidelberg, Biochemistry Center). Only data obtained in our laboratory are summarized below:

1. Steady state levels of VVD correlate with light intensity, thus VVD level may serve as indicator of light intensity. As a consequence, the inhibitory effect exerted by VVD on the primary photoreceptor White Collar Complex (WCC) is also dependent on the previous light history of the cell.
2. By performing subcellular fractionation, we showed that, in contrast to former data in the literature, a substantial fraction of VVD is in the nucleus where the active WCC is localized. In addition, we generated a strain expressing VVD-GFP and confirmed the nuclear localization of the fusion protein also by fluorescence microscopy.
3. We showed that VVD is in complex with the WCC. This interaction is dependent on the intact photosensitive domain (LOV domain) of both proteins and requires light.
4. VVD inhibites both the light dependent hyperphosphorylation and degradation of the WCC. Parallely, it inhibites the activity of the complex and thus allows the accumulation of a stable inactive pool of the WCC.
5. No rhythmic spore formation can be detected in the *Δvvd* strain when intensity of the moon light is increased. Thus, in natural photoperiods, filtering disturbing light signals during the night and thus discriminating between night and day is dependent on VVD.

Our results suggest that VVD serves as a molecular memory of the brightness of the preceding day and supresses responses of the primary light receptor to light cues of lower intensity. VVD is thus essential in stabilizing the circadian rhythm, even in naturally ambiguous photoperiods with moonlight. These data were published in the scientific journal Cell in 2010. The principal investigator was co-first author of this article ([1]).

Investigation of the circadian clock of macrophages in a cell line model

Aim of our investigations was to find a system to study the role and importance of the own cellular clock in the control of macrophage responses. Our most important results are summerized below:

1. We tested four macrophage lines (MonoMac 6, U937, THP-1 and RAW 264.7) for synchronisation of the cellular circadian clocks. We applied the following methods: treatment of the cells with dexamethason, increasing the serum concentration, serum shock. All these methods were well described in the literature and are often used to synchronize fibroblasts. To control the success of synchronization, time dependent expression of clock genes were followed by using real time PCR. Although treatment of the cells with dexamethason and the increased serum concentration resulted in oscillation of clock genes, this rhythm had low amplitude and was not stable for several days.
2. Since fibroblasts are relative easy to synchronize, to achieve a more effective and stable synchronization of the macrophage clocks we cocultured the cells with fibroblasts. This method revealed to be effective. In case of the MonoMac 6 cell line a well reproducible rhythm with higher amplitude was detected.
3. Later we generated a cell line expressing luciferase under the control of a clock gene promoter. Also on the level of luciferase activity the synchronization by coculturing was found to be very effective.
4. After establishing the method of synchronization different immune responses of macrophages were investigated. We measured the phagocytosis of opsonized zymosan, superoxide production and expression of cell surface markers at different time points after the synchronization. The phagocytosis displayed characteristic time dependent variations. The PKC activated superoxide production was also rhythmic, and its maximum matched the time point when the membrane component of the superoxide producing enzyme NADPH oxidase showed highest expression on the cell surface.
5. To further investigate the role of the circadian clock in the control of phagocyte functions we down-regulated the central clock component *bmal-1* by tranfecting the cells with siRNA. After testing different transfection protocols we could reduce the BMAL-1 expression to 20 %. In our ongoing experiments the cell specific responses are tested in the siRNA treated cells.

Our data show that synchronization of macrophage cell lines requires specific condition. These are the first data showing that cell-cell contact in the culture supports this process. Our results suggest that both phagocytosis and ROS production are controlled by the macrophage circadian clock.

[1]Erik Malzahn, Stilianos Ciprianidis, Krisztina Káldi, Tobias Schafmeier, Michael Brunner: Photoadaptation in Neurospora by competitive interaction of activating and inhibitory LOV domains. *Cell* **142**:762-72, 2010 IF: 31,152

Teljes Támogatás: 3 600,000.- HUF

PREVENCIÓS ÉS TERÁPIÁS LEHETŐSÉGEK A GASZTROINTESZTINÁLIS INTEGRITÁS VÉDELMÉBEN GYULLADÁSOS ÉS KERINGÉSI KÓRKÉPEKBEN

Kaszaki József, Boros Mihály, Varga Gabriella, Érces Dániel, Fazekas Borbála, Tőkés Tünde
SZTE ÁOK Sebészeti Műtéttani Intézet

A gasztrointesztinális (GI) traktus fiziológiai funkciói a *mikrokeringés, a nyálkahártya barrier* és az enterális idegrendszer által kontrollált *bélmotilitás*, morfológiai és funkcionális integritásának eredményeképpen valósulhatnak meg. A GI integritás károsodásának folyamata elsősorban a sejtmembránok szerkezeti és funkcionális sérülését eredményező reaktív oxigén és nitrogén (RON) intermedierek képződésére vezethető vissza. Ezért kísérleteinkben alkalmazott prevenciós-terápiás eljárások, amelyek különböző típusú és hatásmechanizmusú endogén anyagok exogén alkalmazására épültek, a RON intermedierek, elsősorban a peroxinitrit, képződésének gátlását vagy hatástalanítását célozták meg. Vizsgálatainkat klinikai jellegű beavatkozások modellezésével, súlyos keringési és gyulladásos kórképek állatkísérletes modelljein valósítottuk meg.

A pericardialis tamponád (PT) következményeként terápiával nehezen befolyásolható, fokozott reaktív oxigén gyök-termeléssel kapcsolatba hozható mikrokeringési szövődmények alakulhatnak ki a GI traktus területén. Megvizsgáltuk és összehasonlítottuk három eltérő célpontú, új típusú terápia, a komplement C5a antagonista kezelés (Anablock), a metán inhaláció, és a redox státusz enzimeinek kofaktoraként ismert szelén (Se) anti-inflammációs és mikrocirkulációs hatásait a PT megszüntetését követő periódusban. Igazoltuk, hogy a vizsgált, különböző célpontú terápiák antioxidáns és anti-inflammációs hatásuk alapján mérséklik a PT-t követő intesztinális mikrokeringési elégtelenséget (*Kaszaki et al., Acta Physiol 2011*).

Kísérleteinkben igazoltuk, hogy a membránalkotó foszfatidilkolin (PC) metabolitok, mint az exogén metán inhaláció, vagy iv adott L-α glicerilfoszforilkolin (a PC deacilált származéka), kedvezően befolyásolták az intesztinális ischaemia-reperfúzió által indukált mikrokeringési zavart és epithelialis permeábilitás károsodást, a RON intermedierek, a peroxinitrit és a leukocita aktiváció redukciójának köszönhetően (*Boros et al., Crit Care Med 2011; Tőkés et al., Acta Physiol 2011*). Az orálisan adott PC gátolta az LPS által indukált proinflammációt a TNF-α felszabaduláson keresztül *(Tőkés et al., Shock 2011*) és megőrizte a GI mucosa struktúráját (*Varga et al., Acta Physiol 2011*).

Az enterális idegrendszer gyulladással szembeni védelme azért speciális jelentőségű, mivel a neuronok védtelenek a környezeti hatások ellen. További jelentős eredményünk hogy, a glutamát által indukált neurotoxicitással szembeni neuroprotekció és az intakt GI motilitás, az NMDA receptorok blokádjával és a neuronális NO és szuperoxid produkció szinergisztikus gátlásával valósítható meg. Az NMDA receptor antagonista kinurénsav és szintetikus analógjai új irányt jelenthetnek az intesztinális hipermotilitás és gyulladás folyamatok szimultán befolyásolására (*Varga et al., Neurogastroenterol Motil 2010; Kaszaki et al., J Neural Transm 2011*).

1. Varga G, Érces D, Fazekas B, Fülöp M, Kovács T, Kaszaki J, Fülöp F, Vécsei L, Boros M: N-NEUROGASTROENTEROL MOTIL 22: pp. 217-226 (2010) IF: 3,349;
2. Kaszaki J, Szabó A, Boros M: ANESZTEZIOLÓGIA ÉS INTENZÍV TERÁPIA 40: pp. 154-162 (2010).
3. Kaszaki J, Érces D, Varga G, Szabó A, Vécsei L, Boros M: J NEURAL TRANSM (2011); DOI 10.1007/s00702-011-0658-x ; IF: 2,597;
4. Tőkés T, Erős G, Bebes A, Hartmann P, Várszegi S, Varga G, Kaszaki J, Gulya K, Ghyczy M, Boros M: SHOCK pp. 36:458-465 (2011) IF: 3,203;
5. Molnár G, Csonka E, Vass A, Boros M, Kaszaki J: ACTA PYSIOL HUNG 98: pp. 393-408 (2011) IF: 1,226;
6. Boros M, Ghyczy M, Érces D, Varga G, Tőkés T, Kupai K, Torday Cs, Kaszaki J: CRIT CARE MED 40: (2012) (megjelenés alatt) IF: 6,254;

Teljes Támogatás: 3 600,000.- HUF

PREVENTIVE AND THERAPEUTIC POSSIBILITIES FOR PROTECTION OF GASTROINTESTINAL INTEGRITY IN INFLAMMATORY AND CIRCULATORY DISORDERS

József Kaszaki, Mihály Boros, Gabriella Varga, Dániel Érces, Borbála Fazekas, Tünde Tőkés
Institute of Surgical Research, University of Szeged

The basic functions of the gastrointestinal (GI) tract can be effectuated in case the morphological and functional integrity of *microcirculation, mucosal barrier and intestinal motility* controlled by the enteric nervous system (ENS) is present. Production of the reactive oxygen and nitrogen (RON) species has a main role in the damage of GI integrity, leading to structural and functional injuries of cell membranes. Therefore the therapeutic and/or preventive methods applying in our experiments, which based on exogenous administration of different endogenous compounds with diverse mode of action, aimed at the neutralization of the aggressive and citotoxic RON radicals, mainly peroxynitrite. Our studies were performed on animal experiments modelling severe circulatory or inflammatory diseases with clinical compatible interventions.

Cardiac tamponade (CT) leads to is a severe clinical syndrome with unmanageable peripheral microcirculatory complications, GI hypoperfusion and mucosal barrier failure. We investigate the comparative anti-inflammatory effects of complement C5a antagonist (Anabloc) treatment, methane inhalation (which proved to be effective radical scavenger) and selenium (Se), a known cofactor of the enzymes of the redox balance, on the microcirculatory changes in CT model. The different treatments had nearly equal effectiveness, due to reduced free radical production and improved intestinal microperfusion (*Kaszaki et al., Acta Physiol 2011*).

In our experiments we established that metabolites of phosphatidylcholine (PC), as exogenous methane administration, or the iv treatment with L-α glycerylphosphorylcholine (a deacilated polar derivative of PC), beneficially affected the ischemia-reperfusion-induced mesenteric microcirculatory disturbances and epithelial barrier damage due to the scavenging of oxygen- and nitrogen-derived free radicals, peroxynitrite and the reduction of leukocyte activation (*Boros et al., Crit Care Med 2011; Tőkés et al., Acta Physiol 2011*). Orally administered PC pre-treatment inhibited the LPS-induced proinflammatory stimuli through TNF-α mediation (*Tőkés et al., Shock 2011*) and preserved the GI epithelial structure (*Varga et al., Acta Physiol 2011*).

Protection of the ENS against inflammatory signals is of special importance because the environment of these neurones is not guarded by barriers. Our current date suggests that neuroprotection and intact GI motility against glutamate-induced neurotoxicity could be mediated synergistically through the blockade of NMDA receptors, and inhibition of neuronal NO and superoxide production. Inhibition of the enteric NMDA receptors by kynurenic acid or its analogues may provide a novel option via which to influence intestinal hypermotility and inflammatory processes simultaneously (*Varga et al., Neurogastroenterol Motil 2010; Kaszaki et al., J Neural Transm 2011*).

1. Varga G, Érces D, Fazekas B, Fülöp M, Kovács T, Kaszaki J, Fülöp F, Vécsei L, Boros M: N-NEUROGASTROENTEROL MOTIL 22: pp. 217-226 (2010) IF: 3,349;
2. Kaszaki J, Szabó A, Boros M: ANESZTEZIOLÓGIA ÉS INTENZÍV TERÁPIA 40: pp. 154-162 (2010).
3. Kaszaki J, Érces D, Varga G, Szabó A, Vécsei L, Boros M: J NEURAL TRANSM (2011); DOI 10.1007/s00702-011-0658-x ; IF: 2,597;
4. Tőkés T, Erős G, Bebes A, Hartmann P, Várszegi S, Varga G, Kaszaki J, Gulya K, Ghyczy M, Boros M: SHOCK pp. 36:458-465 (2011) IF: 3,203;
5. Molnár G, Csonka E, Vass A, Boros M, Kaszaki J: ACTA PYSIOL HUNG 98: pp. 393-408 (2011) IF: 1,226;
6. Boros M, Ghyczy M, Érces D, Varga G, Tőkés T, Kupai K, Torday Cs, Kaszaki J: CRIT CARE MED 40: (2012) (megjelenés alatt) IF: 6,254;

Teljes támogatás: 4,500,000.- HUF

A HEROIN HASZNÁLAT NEUROPATOLÓGIÁJA

Dr. Keller Éva[1], Dr. Kovács Gábor Géza[2], Dr. Majtényi Katalin[2], Dr. Horváth Mónika[1], Dr. Egervári Gábor[1]
[1]Semmelweis Egyetem, ÁOK, Igazságügyi és Biztosítás-orvostani Intézet
[2]Semmelweis Egyetem Budapest, ÁOK, Neuropatológiai és Prionbetegség Referencia Központ

Az elmúlt időszakban véglegesített és karakterizált mintagyüjtemény (lásd elöző szakmai jelentés) további feldolgozását végeztük az utolsó félévben. 4-5 mikrométer vastag metszetek készültek paraffinba ágyazott, egyenként 2x 2,5 cm nagyságú területet magába foglaló, különböző anatómiai területekből (frontális, anterior cinguláris, inferior parietális, mediális temporális, occipitális kéreg, hippocampus, elülső és hátulsó magasságban a törzsdúcok, thalamus, amygdala, mesencephalon, pons, medulla oblongata, kisagy hemispherium és anterior vermis) származó mintákból. Összesen 28 heroin fogyasztó és 12 kontroll egyén mintáit válogattuk össze. Összesen 1200 immunfestéssel készült metszetet néztünk át. A következő antitesteket használtuk: foszforilált tau (AT8), beta-amyloid, ubiquitin, alpha-synuclein, foszforilált TDP-43.
A heroinfogyasztó egyének átlagéletkora: 27,0 $\pm$ 7.4, 27 férfi és 1 nő.
A kontrollcsoport átlagéletkora: 26,4 $\pm$ 9,4, 8 férfi, 4 nő.

Foszforilált tau immunhisztokémiai vizsgálat során a következő elváltozásokat észleltük:
1) Neuropil fonalak amelyek az idegsejtek nyúlványaiban felhalmozódó mindenképpen kóros foszforilált tau jelenlétére utal; 2) Az idegsejtek citoplazmájában szemcsés pozitivitás (ezt az irodalom "pre-Tangle" terminológiával is illeti, mert nem ugyanaz mint a végleges argyrophil és ubiquitin immunhisztokémiával kimutatható 3) neurofibrilláris kötegek ("neurofibrillary tangle"). Astroglia és oligodendrogliasejtekben nem észleltünk kóros tau immunreaktivitást.
Neuropil fonalakat mindkét vizsgálati csoportban találtunk, heroinfogyasztó egyénekben gyakrabban és fiatalabbakban. Anatómiailag a hippocampus és az agytörzsi (pontin) noradrenerg Locus coeruleus magban, illetve kevésbé a serotonerg raphe magokban volt észlelhető. A dopaminerg ventralis tegmentalis area régióban is megfigyeltük heroinfogyasztó egyénekben. Ezek az elváltozások mindig társultak diffúz citoplazma pozitivitás mutató neuronokkal, de neurofibrilláris kötegek csak elvétve, a hippocampus CA1 szubrégiójában voltak.
Béta-amyloid immunhisztokémiai vizsgálattal a következő elváltozásokat észleltük:
1) Diffúz plakkok a szürkeállományban: ezeknek nem volt Kongó festéssel kimutatható "amyloid" magjuk. Ezek szubpiálisan is megjelentek. 2) Típusos amyloid maggal rendelkező szenilis plakkok: ritkán került észlelésre; 3) Amyloid angiopáthiára jellemző immunreaktivitást nem figyeltünk meg. A diffúz plakk formájában megjelenő beta-amyloid immunpozitivitás nem mutatott különbséget az eddig vizsgált esetekben a kontrollok és heroinfogyasztók között azonban kontrollokban csak elvétve volt.
Alpha-synuclein immunhisztokémiai vizsgálattal elvétve a neuropilben szemcsés és fonalszerű immunreaktivitást észleltünk, azaz típusos Lewy-testet és Lewy-neuriteket nem figyeltünk meg. A jelentés elkészítésekor még 20 heroinfogyasztó beteg mintáit nem vizsgáltuk meg, ez folyamatban van. Eddigi vizsgálataink (12 kontroll és 8 heroinfogyasztó egyén) alapján a foszforilált TDP-43 (ami frontotemporális demenciákban egy fontos patológiai marker) nem mutatott intracelluláris zárványokat.

Összefoglalva: az esetek gondos kiválasztása, toxikológiai, patológiai és neuropatológiai karakterizálása megtörtént, a nagyszámú (és méretű) immunmetszetek készítését elkezdtük és a javarészét befejeztük és megvizsgáltuk. Előzetes eredményeink arra utalnak, hogy heroinfogyasztó egyénekben felgyorsult agyi öregedés (illetve "Alzheimer-szerű") elváltozásokat lehet észlelni. A neurodegeneráció teljes spektrumának feltérképezését még nem fejeztük be, de eddigi eredményeink a pályázatunkban szereplő tervünkkel harmóniában áll és tudományos publikáció alapjait képezi.

Budget: 4,500,000.- HUF

NEUROPATHOLOGICAL ALTERATION IN HEROIN ABUSE

Dr. Eva Keller[1], Dr. Gabor Kovacs[2], Dr. Katalin Majtenyi[2], Dr. Monika Horváth[1], Dr. Gabor Egervari[1]
[1]Semmelweis University, Faculty of Medicine, Igazságügyi és Biztosítás-orvostani Intézet
[2]Semmelweis University, Budapest, Faculty of Medicine, Neuropathology and Prion Disease Reference Center

During our project we selected 28 individuals with documented heroin abuse and 12 cntrols without any neuropsychiatric disease. The latter group comprised sudden death patients. We characterised the sample collection as follows. Using 4 micrometer thick sections prepared from 2x 2,5 cm formalin-fixed and paraffin-embedded blocks, we examined different anatomical regions (frontal, anterior cingular, inferior parietal, medial temporal, occipital, hippocampus, anterior and posterior levels of basal ganglia, thalamus, amygdala, mesencephalon, pons, medulla oblongata, cerebellar hemisphere and anterior vermis). We have prepared nearly 1200 immunostained sections and we have evaluated the majority of these. We used the following antibodies: anti-phospho-tau (AT8), beta-amyloid, ubiquitin, alpha-synuclein,phospho TDP-43.
Mean age (SD) of individuals with documented heroin abuse: 27,0 $\pm$ 7.4, 27 men, 1 woman.
Mean age (SD) of control individuals: 26,4 $\pm$ 9,4, 8 men, 4 women.

Immunostaining for anti-phospho-tau (AT8) revealed the following alterations: 1) Neuropil threads indicating pathological accumulation of tau in neuronal processes; 2) Granular immunoreactivity in the neuronal perikaryon (also termed as "pretangles"); 3) Neurofibrillary tangles. We did not observe tau pathology in astrocytes or oligodendrocytes. Neuropil threads were observed in both groups, however, these were occasional and scanty in controls. Anatomically the hippocampus, the noradrenergic Locus coeruleus and the serotonergic raphe nuclei exhibited these. We also observed threads in the dopaminergic ventral tegmental area in heroin abusers. These alterations were associated with diffuse cytoplasmic immunoreactivity in neurons. Neurofibrillary tangles were only occasionally seen, predominantly in the hippocampal CA1 subregion.

Immunostaining for anti-beta-amyloid revealed the following alterations:
1) Diffuse plaques in the cortex: these did not show a congophilic core and appeared also in the subpial region. 2) Typical cored senile plaques were only occasionally seen. 3) Amyloid angiopathy was not observed in our cohort. Morphology of beta-amyloid deposits did not differ between controls and heroin abuser, however they were very rare in controls.

Immunostaining for alpha-synuclein revealed occasional granular aggregates in the neuropil in heroin abusers in the amygdala, however, Lewy bodies and Lewy neurites were not observed. At the time of this report we have evaluated only 8 heroin abusers, thus this will be completed. Similarly, phosphorylated TDP-43 (a protein that is a marker of a subgroup of frontotemporal dementia) has been not investigated in all cases (until now only in 8 heroin abusers and 12 controls), but we did not see intracellular inclusions.

In summary, we have finished the selection, the detailed toxicological, pathological and neuropathological characterisation of cases, we started and completed the majority of the immunohistochemical studies we aimed. Our preliminary results indicate that in heroin abusers there are morphological signs of an accelerated ageing process ("Alzheimer`s disease-like"). We have not completed the total spectrum of neurodegenration-related proteins, however our results are in harmony with the aims of our projects and serves as a basis for a scientific publication.

Teljes támogatás: 3.000,000.- HUF

EX VIVO AMILOID FIBRILLUMOK SZERKEZETE ÉS NANOMECHANIKÁJA

Kellermayer Miklós
Semmelweis Egyetem, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet

Az amiloidózis súlyos, általában halálos kimenetelű klinikai állapot, amelyben odhatatlan filamentális aggregátumok, úgynevezett amiloid fibrillumok rakódnak le különböző szervek extracelluláris tereiben. Az amiloid fibrillumok önszerveződő, önasszociációra képes filamentális szerkezetek, amelyek változatos eredetű, hibásan gombolyodott fehérjéből vagy peptidből alakulhatnak ki. Bár a különböző eredetű amiloid fibrillumok rendkívül intenzíven vizsgált objektumok, pontos szerkezetüket, dinamikájukat, fibrillum-képződési mechanizmusaikat és celluláris hatásaikat továbbra sem ismerjük pontosan. Még kevésbé ismert, hogy az *in vivo* szöveti környezet hogyan idézi elő illetve szabályozza a fibrillumok kialakulását. A pályázatban ezért megvizsgáltuk az eredetileg *in vivo* körülmények között generálódott, majd onnan eltávolított és tisztított *"ex vivo"* amiloid fibrillumok szerkezeti és nanomechanikai tulajdonságait.
Az *ex vivo* amiloid fibrillumokat humán autopsziás szövetmintából izoláltuk. A rendelkezésre bocsátott szövetminták vese, lép és nyirokcsomó voltak. A szövetmintából a fibrillumokat homogenizálást követő repetetív mosási, precipitálási és disszolúciós lépésekben izoláltuk. A fibrillumokat alkotó fehérjék azonosítására SDS-PAGE módszert alkalmaztunk. A molekulatömeg alapján a fibrillumokat alkotó fehérjék többnyire immunglobulin könnyűláncok közé tartoztak. A fibrillumok jelenlétét thioflavinT (ThT)-vel történő jelölés után fluoresczencia mikroszkópia segítségével igazoltuk. Kísérleteinkben sikerrel mutattuk ki, hogy az izolált, tisztított preparátumban jelentős mennyiségű amiloid fibrillum található, amely alkalmas a további analízisre. A tisztított *ex vivo* amiloid fibrillumok topográfiai szerkezetét atomerőmikroszkóppal (AFM) non-kontakt üzemmódban, vizes pufferben vizsgáltuk. Egyidejű topográfiai szerkezet és fluoreszcencia mérésekhez saját fejlesztésű TIRF/AFM berendezésünket használtuk. TIRF/AFM alkalmazásával a fibrillum kötegek találati valószínűségét jelentősen meg tudtuk növelni. A fibrillumok AFM felvételein több mikron hosszú, néhány 100 nm vastag kötegeket láttunk. Nagyobb nagyításnál kivehető volt az egymásba csavarodott, helikális elrendeződésű struktura. Néha a fibrillum kötegekben elágazódások voltak megfigyelhetők. A fibrillumok környezetében 40 nm átmérőjű, gyűrű alakú fibrilláris szerkezeteket láttunk, amelyekről feltételezzük, hogy az *in vivo* fibrillogenezis intermedierjei. Hogy a gyűrű alakú intermedérek milyen mechanizmussal alakulnak át kötegekké, további vizsgálat tárgyát képezi. A nanomechanikai méréseket ugyancsak AFM-mel végeztük. A topográfiai kép alapján kitüntetett ponton manipuláltuk a vizsgált fibrillum felületét. A kiszemelt ponton az AFM tűvel megnyomtuk a fibrillum vagy köteg felületét, majd onnan az AFM rugólapkát konstans sebességgel (általában 500 nm/s) elhúztuk. A mechanikai manipuláció során mértük a rugólapka elmozdulását (nanométer, mikrométer tartomány) illetve a rugólapkában ébredő erő nagyságát (pikoNewton, nanoNewton tartomány). Mivel az AFM rugólapka a manipulált fibrillum-rendszerrel mechanikailag sorba kapcsolt rendszert alkot, a benne ébredő erő nagysága egyenlő a fibrillumban fellépő erő nagyságával. Az így kapott erőspektrumokban komplex kép tárult elénk. Két fő mechanikai válasz és ezek kombinációja dominált az erőspektrumokban: erő plató és erő fűrészfogak. Az erő platóra az jellemző, hogy elmozdulás függvényében az erő konstans maradt. Az erő fűrészfogak esetében egymást követő, fel- és leszálló ággal rendelkező csúcsok voltak láthatók az erőspektrumban. Az erő plató fellépése azzal magyarázható, hogy a fibrillum-kötegekből protofibrillumokat hántottunk, zippzároztunk le, amely konstans erő mellett végbemenő folyamat. Az erő fűrészfogakat azzal magyarázzuk, hogy erő hatására repetitív, egymással sorbakapcsolt, mechanikailag terhelt elemek olyan szerkezeti változásokon esnek át, amely azokat egy megnyúlt, meghosszabbodott konfigurációs állapotba billenti át. Feltételezésünk szerint ezek a szerkezeti változások az ex vivo amiloid fibrillumokat felépítő fehérje egységekben lépnek fel.

Teljes támogatás: 3.000,000.- HUF

STRUCTURE AND NANOMECHANICS OF *EX VIVO* AMYLOID FIBRILS

Miklós Kellermayer
Department of Biophysics and Radiation Biology, Semmelweis University

Amyloidosis is a severe, usually deadly clinical condition in which undissolvable filamentous aggregates, so called amyloid fibrils are deposited in the extracellular space of various organs and tissues. Amyloid fibrils are self-associating and self-organizing filamentous structures, which are formed from misfolded proteins or peptides of various origin. Although the different types of amyloids are very intensively investigated objects, their detailed structure and dynamics, the mechanisms of their assembly, and their cellular effects are still far from being understood. It is even less known whether and how the tissue microenvironment contributes to the initiation and regulation of amyloid fibrillogenesis. In the current proposal we therefore investigated the structure and nanomechanical behavior of the so called *"ex vivo"* amyloid fibrils which originally formed under *in vivo* conditions but were subsequently removed from the local tissue.
Ex vivo amyloid fibrils were prepared from human autopsy samples. The available tissue samples were kidney, spleen and lymph nodes. The fibrils were purified from the tissue *via* homogenization followed by successive steps of washing, precipitation and dissolution. The component proteins were analyzed and identified by using SDS-PAGE. According to the molecular weight of the proteins they fell into the class of immunoglobulin light chains. The presence of amyloid fibrils was detected by epifluorescence microscopy following staining with the amyloid-specific dye, thioflavinT (ThT). In our experiments we successfully demonstrated that the purified sample contained an abundance of fibrillar structures suitable for further analysis. The topographical structure of purified *ex vivo* amyloid fibrils was investigated with atomic force microscopy (AFM) under aqueous buffer conditions. For simultaneous and synchronized topographical and fluorescence microscopic analysis we employed our self-developed TIRF/AFM instrument. The use of the TIRF/AFM method significantly increased the probability of finding and identifying suitable amyloid fibrils. In the AFM images we were able to resolve fibrils with lengths of several micrometers and thicknesses of several 100 nm. Greater magnification revealed a helical, intertwined structure. Sometimes we observed branches in the fibril bundles. In the vicinity of the fibrils we sometimes observed annular oligomeres of 40 nm diameter, about which we hypothesize to represent structural intermediates of *in vivo* fibrillogenesis. The exact mechanisms of the formation of the annular oligomers is the subject of further investigation. The nanomechanical measurements were also carried out with AFM. The surface of a given fibril was manipulated at targeted locations identified on the topographical image. The targeted point was pressed with the AFM cantilever tip, then the vcantilever was pulled away from the fibril surface with constant velocity (usually 500 nm/s). During such mechanical interventions we recorded the cantilever displacement (nanometer, micrometer range) and force (picoNewton, nanoNewton range). Because the cantilever is in serial linkage with the fibril, its force is equal to the force generated within the fibril itself. The so recorded force spectra revealed a complex picture. Two main force-driven transitions could be identified: force plateau and force sawteeth. The force plateau is characterized by constant force as a function of cantilever displacement. By contrast, force sawteeth are characterized by repeated peaks in the force spectrum, in which each peak contains an ascending and a descending part. The appearance of the force plateau can be explained by the peeling or unzipping of individual protofilaments or fibrils from the surface of a fibril or bundle, respectively. The force sawteeth are explained by serially coupled force-driven structural changes which drive the molecular structure from a contracted towards an extended state. We currently hypothesize that the structural changes take place in the protein units that build up the *ex vivo* amyloid fibril.

ETT 252/2009 Teljes támogatás: 4 500 000 Ft

A TIGHT JUNCTION SZEREPE PRIMER ÉS METASZTATIKUS MÁJTUMOROK JELÁTVITELI MECHANIZMUSAIBAN ÉS DIFFERENCIÁCIÓJÁBAN

Kiss András[1], Zádori Gergely[2], Gelley Fanni[2], Lotz Gábor[1], Somorácz Áron[1], Korompay Anna[3], Gyöngyösi Benedek[1]

[1]Semmelweis Egyetem, 2. Pathologiai Intézet, [2]Semmelweis Egyetem, Transzplantációs és Sebészeti Klinika, [3]Semmelweis Egyetem, Radiológiai Klinika

1. A CLDN-1, mint a HCV vírus internalizálódás complexének egyik receptorának mRNS és fehérje expressziós karakterisztikáját hepatitis/cirrhosis miatt májtranszplantáción, majd a HCV kiújulás miatt interferon kezelésen átesett betegek kezelés előtti és utáni májbiopsziás mintáin elemeztük. A CLDN-1 mRNS expresszió szignifikánsan alacsonyabb volt, ha a betegek jól reagáltak (ETR) a terápiára, azokkal szemben, akik nem reagáltak. A CLDN-1 fehérje expresszió szignifikáns összefüggést mutatott a májfibrózissal. A HCV rekurrencia a normál májhoz képest emelkedett claudin-1 és -6 protein expresszióval járt, míg a CD-81 csökkent szintet mutatott. Az interferon-ribavirin terápia csak az SVR-t mutató betegekben járt szignifikánsan csökkent claudin-6 és occludin fehérje expresszióval, míg a claudin-1 és a CD-81 expresszió változatlan maradt.

2. A claudin-1, -2, -3, -4, -7 mellett vizsgáltuk a claudin-6 és claudin-10 expresszióját mind primer hepatocelluláris carcinoma mintákon, mind pedig colorectális és pancreas adenocarcinomák májmetasztázisaiban. A colorectalis carcinomák májmetasztázisai szignifikánsan nagyobb claudin-3, -4 és -7 fehérje expressziót mutatnak a primer HCC-khez viszonyítva. A pancreas adenocarcinomák májmetasztázisaiban szignifikánsan magasabb claudin-4 fehérje termelést detektáltunk, míg a HCC-kben a claudin-1 expresszió volt szignifikánsan magasabb a pancreas carcinoma áttétekhez képest. Megállapítható, hogy a HCC-hez képest a colorectalis és pancreas adenocarcinomák májmetasztázisai jellegzetes claudin expressziós mintázattal rendelkeznek, mely elkülöníti az egyes entitásokat.

3. A claudinok mellett a tricellulin expresszióját karakterizáltuk primer májdaganatokban, beleértve hepatocellularis carcinomát (HCC), a cholangiocellularis carcinomát (CCC) és a fibrolamellaris hepatocellularis carcinomát (FLC) is. A claudin-1 alacsonyabb, míg a claudin-2 magasabb expressziót mutatott FLC-ben, mint HCC-ben és CCC-ben. A claudin-3,-4 és -7 az FLC-ben a HCC-hez hasonlóan gyenge expressziót mutatott. A FLC tumorsejtjei 80 %-ban mutattak claudin-5 pozitivitást, melynek termelődése általában az endothel sejtekre jellemző. A normál májhoz képest a tricellulin a primer májdaganatokban szignifikánsan csökkent termelődést mutatott. Az FLC tight junction expressziós mintázata hasonló a HCC-hez és eltér a CCC-től. Az FLC azonban specifikus jellegzetességeket is mutat, melyek a többi primer májtumorra nem jellemzőek. A primer májtumorok csökkent tricellulin expresszióját elsőként mutattuk ki. Az exocrin ductalis adenocarcinomák és a normál pancreas ductusok is expresszálják a tricellulint, míg a Langerhans szigetek és az endocrin adenocarcinomák nem mutattak tricellulin expressziót. A ductalis adenocarcinomák differenciálatlansága a tricellulin expresszióval és a túléléssel fordítottan arányos összefüggést mutat.

4. Megerősítettük, hogy a claudin-1 (CLDN-1) cDNS bevitellel történő túltermelése a HepG2 sejtek proliferációját kis mértékben csökkenti. A fehérje expresszió elemzése azt mutatja, hogy a CLDN-1 túltermelődik, azonban a molekuláknak csak egy része transzportálódik a membránba, mely a sejtosztódást befolyásolhatja, azonban a CLDN-1 nagyobb hányada a citoplazmában volt kimutatható, de a magban nem. A CLDN-1 felvetett transzkripciós faktor szerepe az általunk vizsgált modellrendszerben nem volt kimutatható.

ETT 252/2009 Teljes támogatás: 4 500 000 Ft

THE ROLE OF TIGHT JUNCTION IN SIGNAL TRANSDUCTION AND DIFFERENTIATION OF PRIMARY AND METASTATIC LIVER CANCER.

András Kiss[1], Gergely Zádori[2], Fanni Gelley[2], Gábor Lotz[1], Áron Somorácz[1], Anna Korompay[3], Benedek Gyöngyösi[1]

[1]Semmelweis University, 2. Dept. of Pathology, [2]Semmelweis University, Dept. of Transplantation and Surgery, [3]Semmelweis University. Dept. of Radiology

1. mRNA and protein expression characteristics of claudin-1 (CLDN-1), as member of the receptor complex of HCV internalization were analyzed in liver biopsies of patients who underwent liver transplantation due to hepatitis/cirrhosis and treated with interferon/ribavirin for HCV recurrence. mRNA expression of CLDN-1 was significantly decreased when patients reacted to therapy well (ETR) in comparison to those who did not respond. HCV recurrence is associated with increased claudin-1 and -6 protein expressions while CD-81 is decreased in comparison to normal liver. Interferon-ribavirin therapy induced significantly decreased claudin-6 and occludin protein expression only in SVR patients while claudin-1 and CD-81 expressions remained unchanged.

2. Expression of claudins-1, -2, -3, -4, -7 as well as claudin-6 and claudin-10 was investigated in primary hepatocellular carcinoma and liver metastases of colorectal and pancreatic ductal adenocarcinomas. Liver metastasis of colorectalis adenocarcinomas showed significantly higher protein expression of claudins-3, -4 és -7 when compared with primary HCC. Significantly increased claudin-4 protein expression was detected in liver metastases of pancreatic ductal adenocarcinomas in comparison to HCCs, while HCCs showed significantly higher claudin-1 expression when compared with metastases to pancreatic adenocarcinoma. It can be concluded that liver metastases of colorectal and pancreatic ductal adenocarcinomas reveal specific expression pattern of claudins, which might help to differentiate these entities.

3. Beside claudins the expression of tricellulin was characterized in primary liver tumors including hepatocellular carcinoma (HCC), cholangiocellular carcinoma (CCC) and fibrolamellar hepatocellular carcinoma (FLC) as well. CLDN-1 showed decreased, while CLDN-2 increased expression in FLC in comparison to HCC and CCC. CLDNs-3, -4 and -7 revealed weak expression in FLC, similarly to HCC. Interestingly, in 80 % of FLC cases CLDN-5 positivity was detected in tumor cells which is typically found otherwise in endothelial cells. Tricellulin showed significantly decreased expression in primary liver tumors when compared with normal liver. Expression pattern of tight junction components of FLC was found to be similar to HCC and differed from CCC. FLC revealed specific characteristics which are not featured in other primary liver tumors. Our group was the first to detect decreased tricellulin expression in primary liver tumors. Exocrine ductal adenocarcinomas and normal pancreatic ducts expressed tricellulin as well, while tricellulin expression was not revealed in Langerhans islands and endocrine adenocarcinomas. Differentiation of adenocarcinomas showed inverse correlation with tricellulin expression and overall survival.

4. We confirmed that overexpression of CLDN-1 achieved by cDNA transfection decreases the proliferation rate of HepG2 cells in small scale. Analysis of protein expression revealed that CLDN-1 was overexpressed, however, only a small amount of the molecule is transported to the cell membrane, which might affect cell division. A major amount of the molecule, however, was detected in the cytoplasm but not in the nucleus. The suggested role of CLDN-1 as transcription factor could not be proved in our model.

Teljes támogatás: 3.900.000.- HUF

ROSSZINDULATÚ HEMATOLÓGIAI BETEGSÉGBEN SZENVEDŐ SERDÜLŐK ÉS FIATAL FELNŐTTEK (SFF) ÉSZAKKELET-MAGYARORSZÁGON. EGY ELHANYAGOLT KOROSZTÁLY GYÓGYULÁSI ESÉLYEI

Kiss Csongor[1], Udvardy Miklós[2], Nagy Kálmán[3], Radványi Gáspár[4], Oláh Éva[5]
Kappelmayer János[6], Bessenyei Beáta[5], Csáthy László[6], Hevessy Zsuzsa[6], Molnár Anna[1], Rejtő László[2], Szegedi István[1], Ujfalusi Anikó[5]

[1]Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum (DE OEC) Gyermekgyógyászati Intézet, Gyermekhematológia-Onkológia nem önálló Tanszék, [2]DE OEC Hematológia nem önálló Tanszék, Belgyógyászati Intézet, [3]Borsod-Abaúj-Zemplén Megyei Egyetemi Oktatókórház, Velkey László Gyermekegészségügyi Központ, Gyermekhematológiai és Csontvelőtranszplantációs Osztály, [4]Miskolci Semmelweis Ignác Egészségügyi Nonprofit Kft., Belgyógyászati Osztály, [5]DE OEC Gyermekgyógyászati Intézet, Klinikai Genetikai Központ [6]DE OEC Laboratóriumi Medicina Intézet,

Sem a gyermek-, sem a belgyógyászati protokollok nem összpontosítanak a rosszindulatú vérképzőszervi megbetegedésekben szenvedő serdülő és fiatal felnőtt (SFF) korosztály különleges igényeire, noha ezeknek a betegségeknek a biológiai tulajdonságai nem alkalmazkodnak a klinikai tanulmányokba történő beválasztás, sem a betegfelvétel mesterséges korhatáraihoz. Munkánk során retrospektívan tanulmányoztuk Észak- Kelet Magyarország gyermek- és belgyógyászati hematológiai központjaiban rosszindulatú vérképzőszervi betegség miatt kezelt gyermek-, serdülő- és fiatal felnőtt korú betegeket. 1990-2009 közt Észak- Kelet Magyarország 2 gyermek és 2 felnőtt hematológiai centrumában összesen 38 beteg adatait gyűjtöttük ki. Rögzítettük a betegek életkorát, nemét, diagnózisát, a diagnóziskori vérképet, a csontvelő státuszt, organomegáliát, a központi idegrendszer infiltrációját. Az immunfenotípust áramlási citometriával (FC), a genotípust karyogrammal, fluorescens in situ hibridizációval (FISH) és multicolor (M-FISH) vizsgálattal, molekuláris markerekkel, a korai terápiás választ az FC-minimális maradék betegség mértékével, kórlefolyást a remissziós és a re lapszus rátával és a korai halálozás adataival jellemeztük. Explodáltuk az örökletes és környezeti kockázati tényezőket, tanulmányoztuk a genetikai hajlamosító tényezők sajátosságait. Új prognosztikai tényezőket és terápiás célmolekulákat keresve peptidhormon receptorok és ligandumaik kifejeződését tanulmányoztuk leukaemia sejtvonalakban és primer beteg-mintákban. Korszerű, célzott terápiás lehetőségek alkalmazását vizsgáltuk in vivo. Sejtvonalak és primer betegminták felhasználásával in vitro és egérmodellben vizsgáltuk új, citosztatikus hatású vegyület antileukémiás hatását.

A retrospektív tanulmányba vont betegek között 20 fő 14-18 éves serdülő, 18 fő 19-29 év közötti fiatal felnőtt volt. A férfi-nő arány, 29:9 -nek adódott. A 19-29 éves korcsoport minden tagját felnőtt osztályon kezelték, a 14-18 éves korosztály tagjai közül kettő beteg kezelése felnőtt osztályon, 18 betegé gyermekosztályon történt. Az alkalmazott protokollok fiatal felnőttek esetén Hoelzer, Hyper CVAD, FLAG-IDA, Linker; a serdülők körében ALL BFM 95 és BFM ALLIC–2002 voltak. Az immunfenotípus eredmények azt mutatták, hogy a serdülőknél főleg CD10+BCP és T sejtes ALL-lel találkoztunk, fiatal felnőttek esetében nagyobb arányban fordult elő rosszabb prognosztikai faktorral bíró pre-

B sejtes és bifenotípusos leukémia. Citogenetikai elemzés során is a jó prognózisú hyperdiplod és *TEL/AML* génátrendeződéssel bíró leukémiás betegek a fiatalabb korosztályban, az *MLL* gén átrendeződése és a *BCR/ABL* (Ph kromoszóma) transzlokáció a fiatal felnőttek között halmozódott. Egy relabált ALL-es gyermekbetegben második malignitásként fatális kórlefolyású AML alakult ki. A hajlamosító tényező az *ATM* gén hemizygota mutációja volt. A heterozygota szülők esetében sem neurológiai, sem immunológiai, sem onkológiai eltérést nem explodáltunk. A protokollok szerinti rizikó besorolás alapján a betegek többsége a standard és a közepes rizikójú csoportba került. Kedvező prednisolon választ főleg serdülőknél találtunk. A prednisolon-válasz prognosztikai szerepét erősíti az a tény, hogy a gyógyszer eltérő sejt-metaboliás választ idéz elő malignus és nem malignus (ALL *vs.* ITP) hematológiai kórképekben. A prognosztikai tényezőknek megfelelően alakult a remissziós és re lapszus ráta, visszaesés az idősebb korosztályban gyakoribb volt. Őssejtátültetésre a serdülőknél nagyobb arányban került sor. A teljes túlélés aránya a fiatalabb, gyermekhematológiai osztályokon kezelt korcsoportban volt nagyobb. Ugyanakkor gyermekkorú ALL-esek között is találtunk olyan betegeket, akik kedvezőtlen kórlefolyását a kiemelten kedvezőtlen genetikai háttér (mutációval terhelt *BCL/ABR* átrendeződés, *ATM* gén mutáció) szabta meg, és amely esetekben a célzott biológiai terápia illetőleg a sejtterápiás kezelés együttes alkalmazása sem bizonyult kellően hatékonynak. Ugyanakkor járulékos genetikai tényezők módosítják kedvezőtlennek tartott genetikai eltérések kórjósló szerepét. Így magyarázzuk a kedvező kórlefolyást az 1 kromoszóma hosszú kar „jumping" transzlokációjával jellemzett Burkitt leukémiás betegben. Kutatómunkánk során igazoltuk, hogy LHRH, VIP-1 peptidhormonok és ligandumaik az eddig ismert kifejeződési helyek (központi idegrendszer, endokrin és nemiszervek szövetei) mellett hematopoetikus sejtekben és sejtvonalakban is kifejeződnek. A jelenség hozzájárulhat a leukémiás klón autonóm növekedéséhez és molekuláris terápiás célpontként szolgálhat.

Közelmúltban publikált retrospektív vizsgálatok szerint a gyermekhematológiai központokban, gyermekkori protokollok szerint kezelt SFF ALL-es betegek kórlefolyása kedvezőbb, mint a felnőtt centrumokban, felnőttkori protokollok szerint kezelt társaiké. Eddig hasonló hazai adatokkal nem rendelkeztünk. A kórlefolyást alapvetően befolyásolják az alapbetegség genetikai jellegzetességei. A korosztály igényeit gyermek- és felnőtt hematológusok közös részvételével alkotott egységes protokollok elégítenék ki, amelyek alapján klinikai tanulmányok keretében, kellően tapasztalt ellátó személyzettel rendelkező, nagy központokban látják el a betegeket rizikó-adaptált, a kiemelten kedvezőtlen alcsoportokban innovatív kezelési eljárások alkalmazásával.

English version:

Adolescents and young adults (AYA) with hematopoietic malignancies in North-East Hungary. Survival challenges of an orphan population

Csongor Kiss[1], Miklós Udvardy[2], Kálmán Nagy[3], Gáspár Radványi[4], Éva Oláh[5]
János Kappelmayer[6], Beáta Bessenyei[5], László Csáthy[6], Zsuzsa Hevessy[6], Anna Molnár[1], László Rejtő[2], István Szegedi[1], Anikó Ujfalusi[5]

[1]Department of Pediatric Hematology-Oncology, Institute of Pediatrics, Medical and Health Science Center, University of Debrecen (MHSCUD), [2]Department of Hematology, Institute of Internal Medicine, MHSCUD [3]Department of Pediatric Hematology and Bone Marrow Transplantation, "László Velkey" Children's Health Care Center, Borsod-Abaúj-Zemplén County University Teaching Hospital, [4]Department of Medicine, "Ignac Semmelweis" Non-profit Health Care Ltd., Miskolc, [5]Center of Clinical Genetics, Institute of Pediatrics, MHSCUD, [6]Department of Laboratory Medicine, MHSCUD

Neither pediatric, nor adult diagnostic and treatment protocols address the special requirements of adolescent and young adults (AYA) with hematopoietic malignancies, although the biology of these diseases does not respect arbitrary age limits set for admission in clinical trials and inpatient wards. In this project we retrospectively studied data of 38AYA patients with hematopoietic malignancies treated in two pediatric and adult centers in North-East Hungary. We evaluated patients' age, gender, diagnosis, initial clinical and laboratory parameters including complete blood count, bone marrow, organomegaly, CNS involvement, immunophenotype by flow cytometry (FC) and genotype (karyogram, fluorescens in situ hybridization (FISH), multicolor (M)-FISH, and established molecular markers). Early response to treatment was assessed by quantitating minimal residual disease by FC. Surrogate measures, such as remission, relapse and early death rates were used to characterize disease outcome. Possible inherited and environmental risk factors were explored. Studying new prognostic factors and therapeutic targets we have explored the expression of peptide hormone receptors and their ligands on leukemic cell lines and on primary patient samples. We have employed novel, targeted therapeutical interventions in special subsets of patients. Antileukemic effects of new compounds were investigated in vitro and in mouse-models, using cell lines and primary patient samples.

Twenty patients were in the adolescent group (14-18 year) and 18 of them were young adults (19-29), the male-to-female ratio was 29:9. All of the young adults and 2 adolescent patients were treated in adult hematology wards, 18 adolescents in pediatric units. Hoelzer, Hyper CVAD, FLAG-IDA, Linker protocols were used for treating young adults and ALL BFM 95, BFM ALLIC–2002 protocols were used for adolescent patients treated in pediatric units. Analyzing immunophenotype results most of the adolescents with ALL showed CD10+ BCP and T cell characteristics, worse immunologic prognostic factors, such as pre-B cell and biphenotypic phenotype were found among young adults. Similarly, most patients with good cytogenetic features (hyperdiploidity, TEL/AML

rearrange) belonged to the younger age group, whereas MLL gene rearrangement and *BCR/ABL* translocation (Ph chromosome) accumulated among young adults. In a case of a pediatric patient, relapsed ALL and a fatal AML, developed as a second malignancy was associated with the hemizygous mutation of the *ATM* gene, predisposing the patient for developing clonal hematopoietic disorders. Her heterozygous parents were non-apparent with respect of either neurologic, or immunologic, or oncologic deviations. Based on risk stratification definitions of the applied protocols, most patients belonged to standard and intermediate risk groups. Prednisolon good response accumulated among adolescent patients. Prognostic impact of prednisolon response was supported by the fact that the drug induced a different cellular metabolic response in malignant and non-malignant (ALL *vs.* ITP) hematopoietic disorders. Disease outcome measures correlated with risk stratification, relapse rate was higher among young adults than adolescents. A higher rate of adolescent patients than young adults received stem cell therapy. Overall survival was higher among adolescent patients treated in pediatric hematology units. At the same time, we identified some pediatric patients with poor outcome associated with unfavorable genetic risk factors (*BCL/ABR* translocation with mutation, biallelic mutation of the *ATM* gene) who failed to respond either to targeted biologic therapy or to stem cell therapy. In contrast, associated genetic alterations may balance the poor prognostic impact of certain risk factors. Despite the expected poor outcome in a pediatric patient with Burkitt ALL and the jumping translocation of chromosome 1q, the patient experienced a lasting event free survival. In a search for new prognostic factors and molecular therapeutic targets we studied the expression of peptide hormone receptors and their ligands. In addition to well known tissue localization (CNS, endocrine system, genital as), we identified a novel expression site of LHRH, and VIP-1 peptide hormone receptors and their ligands in hematopoietic cells and cell lines. The simultaneous expression of these receptor molecules and their ligands may contribute to the autonomous growth of the leukemic clone and these receptors may provide suitable molecular targets for the development of novel therapeutic interventions.

Recent retrospective studies demonstrated that adolescents with ALL treated in pediatric hematology centers using pediatric regimens had more favorable outcomes than patients of similar ages treated in adult centers according to adult protocols. Similar data from Hungary were missing. Observations made in course of the grant-supported study contribute to the reliable estimation of the problem and to the improvement of survival chances of this orphan population in North-East Hungary. Disease outcome has been shown to be strongly influenced by genetic factors. AYAs would benefit from joint protocols developed by pediatric and adult hematologists. These patients should be referred to large treatment centers with experience in the management of this age group and be treated within the frames of clinical trials, on a risk-tailored basis, implementing innovative treatment strategies for the very high risk subgroups.

Közlemények jegyzéke:

Tudományos folyóiratban megjelent, illetve elfogadott eredeti és összefoglaló közlemények:

1. Idézhető absztrakt:

Kiss C, Molnar A, Treszl A, Szegedi A, Klekner A, Bognár L, Dezso B, Halmos G: Expression of receptors for luteinizing hormone-releasing hormone in pediatric neurogenic tumors. PEDIATRIC BLOOD & CANCER 57: 783-783 (2011)

Kiss C, Molnár A, Szász R, Simon R, Kelemen Á, Szegedi I, Nagy Z, Radványi G, Nagy K, Udvardy M: Akut lymphoblastos leukaemia (ALL) serdülő és fiatal felnőtt korban. HEMATOLÓGIA - TRANSZFUZIOLÓGIA 44: 45-45 (2011)

Molnár A, Szegedi I, Rózsa B, Mile M, Halmos G, Kiss C: Peptidhormon-receptorok kifejeződése hymphoma és leukaemia sejtvonalakon, valamint gyermekkori lymphomás esetekben. HEMATOLÓGIA - TRANSZFUZIOLÓGIA 44: 43-43 (2011)

2. Citálható közlemények:

László R, Alpár D, Kajtár B, Lacza A, Ottóffy G, Kiss C, Bartyik K, Nagy K, Pajor L: Detection of early precursors of t(12;21) positive pediatric acute lymphoblastic leukemia during follow-up. PEDIATRIC BLOOD CANCER 54: 158-60 (2010) IF: 2.394

Kiss C: Lymphoid malignitások a gyermek- és adolescens korban. HEMATOLÓGIA-TRANSZUZIOLÓGIA 43: 67-72 (2010)

Bardi E, Dobos E, Kappelmayer J, Kiss C: Differential effect of corticosteroids on serum cystatin C in thrombocytopenic purpura and leukemia. PATHOL ONCOL RES 16: 453-456 (2010) IF: 1,260

Bessenyei B, Ujfalusi A, Balogh E, Olah E, Szegedi I, Kiss C: Jumping translocation of chromosome 1q associated with good clinical outcome in a case of Burkitt leukemia. CANCER GENET 13: 207-210 (2011) IF: 1,537

Berényi E, Benkő I, Vámosi Gy, Géresi K, Tárkányi I, Szegedi I, Lukács L, Juhász I, Kiss Cs, Fésüs L, Aradi J: In vitro and in vivo activity of 4-thio-uridylate against JY cells, a model for human acute lymphoid leukemia. BIOCHEM BIOPHYS RES COMM 410 682-687 (2011) IF: 2,548

Demuth I, Dutrannoy V, Marques W Jr, Neitzel H, Schindler D, Dimova PS, Chrzanowska KH, Bojinova V, Gregorek H, Graul-Neumann LM, von Moers A, Schulze I, Nicke M, Bora E, Cankaya T, Oláh É, Kiss C, Bessenyei B, Szakszon K, Gruber-Sedlmayr U, Kroisel PM, Sodia S, Goecke TO, Dörk T, Digweed M, Sperling K, de Sá J, Lourenco CM, Varon R: New mutations in the ATM gene and clinical data of 25 AT patients. NEUROGENETICS 12: 273-282 (2011) IF: 3,488

Könyvek, könyvfejezetek:

Kovács G, Csóka M, Kiss C: Gyermekkori akut leukémiák. In: Lehoczky D (szerk.): Hematológiai betegségek korszerű kezelése. Zafir Press pp. 563-571 (2011)

Kongresszusi előadások:

Csáthy L, Rajnai H, Kiss F, Bárdi E,Szalmás A- P, Nagy K, Kappelmayer J, Hevesy Z, Kiss C:Complex cytogenetec abnormalities and deletion of exon 7 in c-ABL confers poor response to first and second generation tyrosine kinase inhibitor treatment in a child with Ph+ ALL. Hungarian – Romanian Pediatric Oncoly Meeting Hódmezővásárhely 2010.október 15-16

Kiss C: Lymphoid malignitások a gyermek és adolescens korban. Malignus Lymphoma Konferencia Debrecen 2010.május 27-29.

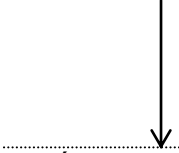
Kiss C: Akut limfoblasztos leukémia (ALL) serdülő és fiatal felnőtt korban. Magyar Hematológiai és Transzfuziológiai Társaság XXIII. Kongresszusa Pécs 2011.05.26-28.

Kiss C, Molnár A, Szegedi I, Szász R, Simon R, Kelemen Á, Nagy Z, Radványi G, Nagy K, Udvardy M: Adolescents and young adults with acute lymphoblastic leukemia treated in pediatric and adult hematology wards. A retrospective study of the Debrecen and Miskolc centers. XIV. Román-Magyar Gyermekonkológiai Találkozó és Első Közép és Kelet-Európai Regionális Gyermekhematológiai-Onkológiai Konferencia. Nagyvárad. 2011.szeptember 30-október 2.

Kongresszusi poszterek:

Molnár A, Szegedi I, Rózsa B, Mile M, Halmos G, Kiss C: Peptidhormon-receptorok kifejeződése lymphoma és leukaemaia sejtvonalakon, valamint gyermekkori lymphomás esetekben. Malignus Lymphoma Konferencia Debrecen 2010.május 27-29.

Kiss C, Molnar A, Treszl A, Szegedi I, Klekner A, Bognar L, Dezso, B, Halmos G: Expression of receptors for luteinizing hormone-releasing hormone in pediatric neurogenic tumors. SIOP 2011 10.26-30., Új-Zéland,



Teljes támogatás: 3000.000,- Ft

EGY ÚJ FAS-INDUKÁLT SEJTHALÁL FORMA JELLEMZÉSE, AZ APOPTOTIKUS ÉS NEM-APOPTOTIKUS JELÁTVITELI ÚTVONALAK EGYMÁSRAHATÁSA

Koncz Gábor[1], Hancz Anikó[2], Kerekes Krisztina[1]
[1]MTA ELTE Immunológia Tanszéki Kutatócsoport, [2]ELTE Immunológia Tanszék

A többsejtű élőlények bármely sejtje elpusztulhat apoptózissal, a tumorok egyik alapvető jellegzetessége éppen az apoptotikus sejthalál elkerülése. Az apoptózis hiánya egyaránt szerepet játszhat a tumorok képződésében, fejlődésében, valamint mivel a legtöbb tumorellenes terápia (kemo-, radio- és az immunterápiák egyes fajtái) az apoptózis indukálásán keresztül hat, a kezelések elleni rezisztencia kialakulásában. Az utóbbi években vált világossá, hogy nem az apoptózis az egyetlen szabályozott sejthalálforma. Munkánk legfőbb célja így olyan alternatív sejthalál útvonalak feltérképezése volt, melyek működőképesek az apoptózis-rezisztens tumorokban is, így potenciális tumorterápiás eszközök lehetnek. Ezen az alternatív sejthalál formák molekuláris karakterizálása csupán napjainkban vette kezdetét. Pályázati munkánk során egy új, eddig nem jellemzett, szekretált vezikulumok által közvetített sejthalál útvonalat azonosítottunk.
A tumornekrózisfaktor receptorcsaládba tartozó receptorok (például a Fas receptor) aktiválása megfelelő ligandjukkal a sejt apoptózisát indukálja. A Fas ligandja, a FasL megjelenhet a citotoxikus sejtek felszínén vagy mint szolubilis ligandum, valamint szekretált vezikulumok is hordozhatják. A citotoxikus és a target sejt közvetlen kontaktusán kívül, ezen szekretált vezikulák megjelenése is sejthalált okozhat. Munkánk során a szekretált vezikula által indukált sejthalált hasonlítottuk össze a már jól ismert klasszikus apoptotikus stimulusokkal.
Kimutattuk, hogy a FasL-ot hordozó szekretált vezikulák a Fas-függő sejthalál egy eddig nem ismert formáját aktiválják. Morfológia, funkcionális és genetikai módszerekkel egyaránt bizonyítottuk az általunk megfigyelt sejthalál egyediségét, a klasszikus apoptózistól való eltéréseit.
Természetes humán sejteket használva bizonyítottuk:

- A szekretált vezikulák által indukált sejthalál jelentősen eltér a sejt-sejt kapcsolat kialakulásakor megfigyelhető sejthaláltól.
- A szekretált vezikulák egy Fas függő és egy Fas független sejthalál útvonalat is aktiválnak.
- A csak a vezikulák által indukált Fas-független sejthalál nem apoptotikus sejthalál forma.
- A szekretált vezikulák által generált sejthalál apoptotikus része Fas-függőnek bizonyult. Az apoptotikus út gátlásakor, a nem-apoptotikus sejthalál kompenzálta az apoptózis hiányát.
- Különböző sejttípusok által termelt vezikulumok, részlegesen eltérő hatásokat váltottak ki.
- Különböző természetes sejtek, mint az előzetesen aktivált PBMC sejtek, csakúgy, mint a mandulából izolált limfociták érzékenyek voltak a vezikulák által kiváltott sejthalálra. (szemben a frissen kinyert PBMC sejtekkel)

Munkánk során mind az apoptotikus, mind a nem–apoptotikus sejthalál jellegzetességeit vizsgáltuk, különös tekintettel az egyes jelátviteli molekulák szerepére:

Nem-apoptotikus útvonal:

- A Fas-független, nem apoptotikus sejthalál folyamatokért felelős molekulát még nem sikerült azonosítanunk. A jelpálya Fas, FADD, kaszpáz-8, kaszpáz-9, és RIP hiányában is működőképes maradt.
- Enzimatikusan ezen sejthalál kaszpáz, katepszin B és katepszin D függetlennek bizonyult.
- Különböző gátlószerek, mint perforin inhibitor, RIP kináz inhibitor, JNK inhibitor, NOS inhibitor, poly(ADP-ribose) polymeráz inhibitor egyaránt hatástalannak bizonyultak.
- Morfológiai vizsgálataink alapján ezen sejthalál nem indukálja a sejtmag fragmentálódását.

Apoptotikus útvonal:

- A szekretált vezikulák által indukált apoptózis, bár Fas függőnek bizonyult, molekulárisan és enzimatikusan is eltér a sejtfelszíni FasL által kiváltott apoptózistól.
- Eltérően a klasszikus RIP független Fas-indukált apoptózistól, a vezikula-indukált jelpályák működéséhez nélkülözhetetlen a RIP, ám csak részlegesen gátolnak FADD hiányában.

- Enzimatikusan a vezikulum-indukált apoptózis a zVad kaszpáz inhibitor mellett, katepszin D inhibítorral is gátolhatónak találtuk.
- Morfológiai vizsgálataink alapján a vezikulumok Fas és RIP pozitív célsejtekben az apoptózisra jellemző módon a sejtmag fragmentálódását indukálják.
- Amennyiben a célsejtek nem tartalmaznak Fas vagy RIP molekulát, a vezikulumokkal történő kezelést követően nekrózisra jellemző morfológiát mutatnak.

Irodalmi adatok alapján emberi éretlen dendritikus sejtek (DC) közvetlenül képesek sejthalált indukálni. Sejthalálreceptor antagonisták képesek voltak gátolni, az így kiváltott sejthalált.

- TLR3 receptor stimulálását követően human monocitából differenciáltatott DC-k felülúszója citotoxikusnak bizonyult.
- Ezen felülúszó citotoxicitása gátolható volt TNF antagonistával.
- Meglepetésünkre szemben a klasszikus TNF-indukált sejthalállal, ahol a RIP molekula gátló funkciót tölt be, a DC-ek felülúszója RIP-függő sejthalált generált.

Ezen eredmények alapján feltételezzük, hogy a DC-k citotoxikus felülúszója hasonló mechanizmussal működik, mint a T-sejtek esetében megfigyelt ölő funkció. Mindkét sejttípus a klasszikustól eltérő, de sejthalál receptor által kiváltott sejthalált idéz elő.

A Fas közvetített programozott sejthalál kulcsszerepet játszik a B-sejt aktivitás, így az autoimmunitás szabályozásában. A B-sejt receptorok (BCR) aktivációja túlélőjelet jelent az antigénspecifikus B-sejtek számára, megmentve őket a Fas-indukált apoptózistól.

- Eredményeink szerint a BCR-indukált túlélőjelek hatástalannak bizonyultak a vezikulumok által kiváltott sejthalállal szemben.

Vizsgáltuk, hogy a nem antigénspecifikus B-sejt szignálok, mint a BAFF vagy a bakteriális CpG aktivációja hatással van-e a BCR-közvetített túlélő jelekre.

- A ligandjaik által aktivált BAFFR és TLR9 fokozta a BCR jelátvitel védő hatását a Fas-közvetített sejthalállal szemben. Ez a fokozás fehérje szintézis függetlennek bizonyult.
- Azonban a BAFF és CpG-közvetített túlélőjelek sem voltak képesek gátolni a vezikulumok citotoxikus hatását.

Ezen eredményeink szerint a vezikulum indukált sejthalál az autoimmunitás szabályozásában is kulcsszerepet játszhat.

Egyre jobban ismerté válik, hogy az immunrendszer egyedi, speciális sejthalál útvonalakat aktivál. A nekroptózis felfedezése, és inhibítorának, a nekrosztatinnak tumorterápiában való alkalmazhatósága az új, eddig még nem jellemzett sejthalál folyamatok fontosságára irányította a figyelmet a rák elleni küzdelemben. Eredményeink, miszerint a citotoxikus T-sejtek által szekretált vezikulumok egy eddig nem ismert Fas-közvetített apoptotikus útvonalat és egy szintén nem jellemzett nem-apoptotikus sejthalálpályát is aktiválnak, a szekretált vezikulumok által kiváltott sejthalál folyamatok intenzívebb kutatásának fontosságára hívják fel a figyelmet.

Hancz Anikó PhD disszertációja nagyrészt a fent ismertetett eredményeken alapszik (a védés várható időpontja 2012) Hancz Dóra 2012 januárjában védte meg a Fas-indukált sejthalál témakörében írt szakdolgozatát.
Az ETT pályázatnak köszönhetően intenzív kollaboráció alakult ki az ELTE Immunológia Tanszéke, a nizzai Death Receptors Signaling and Cancer Therapy laboratórium, (CNRS UMR 6543, France) illetve a DE OEC Immunológia tanszéke között.

Koncz G, Anikó Hancz, Chakrabandhu K, Gogolák P, Kerekes K, Rajnavölgyi É, Hueber AO: RIP-dependent apoptosis simultaneously with Fas-independent non-apoptotic cell death Journal of Immunology (under revision)
Hancz A,Koncz G,Szili D, Sarmay G: TLR9-mediated signals rescue B-cells from Fas-induced apoptosis via inactivation of caspases Immunology Letters (2012) **(in press)**

2 cm 2 cm 2 cm

2 cm

Budget: 3000,000.- HUF

CHARACTERIZATION OF A NEW FAS-INDUCED CELL DEATH FORM, CROSS-REGULATION OF APOPTOTIC AND NON-APOPTOTIC PATHWAYS

Koncz Gábor[1], Hancz Anikó[2], Kerekes Krisztina[1]
[1]Immunology research group of the Hungarian Academy of Sciences, University Eötvös Lorand,
[2]Immunology Department of University Eötvös Lorand

Every cell in a multicellular organism has the potential to die by apoptosis, but one of the hallmarks of human cancers is the intrinsic or acquired resistance to apoptosis. Evasion of apoptosis may contribute to carcinogenesis, tumor progression and also to treatment resistance, since most current anticancer therapies including chemotherapy, radio- and immunotherapy primarily act by activating apoptosis in cancer cells. However, it has become increasingly clear that apoptosis is not the only cellular mechanism that regulates cell death. The overall goal of our work was to study alternative cell death pathways which can be potential targets for drug therapies, restoring the cell death capacity of apoptosis resistant tumors and may also play crucial role in the regulation of immune response. The molecular mechanism of these non-apoptotic processes are just beginning to emerge.
Ligation of death receptors of the tumor necrosis factor receptor superfamily such as Fas by their cognate ligands results in apoptosis. Similar to other members of the TNF family, FasL is expressed in both membrane-bound and soluble forms and can be released as a membrane component of microvesicles. Besides direct cell-to-cell contact-induced killing, secreted vesicles can also transduce cytotoxic signals for target cells. The aim of the present work was to characterize the secreted vesicle (Vsec)-induced cell death pathway and to compare it with the classical route.
Using the FasL containing secreted vesicles we discovered a still non-described Fas-mediated cell death pathway. We have found -using morphological, functional and genetic approaches- that vesicle-bound stimulus induces non-classical cell death pathways.
Using primary human cells we provide evidences that,

- Vsec are able to induce cell death through mechanisms that are substantially different from that of induced by the cell-to-cell contact-induced death process.
- Secreted vesicles are able to mediate both Fas-dependent and Fas-independent cell death.
- Vsec, but not cell surface FasL is able to induce Fas-independent, non-apoptotic cell death
- The apoptotic fraction of Vsec-generated cell death was shown to be Fas-dependent, and in the absence of Fas, the non-apoptotic, Fas-independent pathway could compensate for it.
- Our results also indicate that Vsec released by different cells confer partially overlapping but also diverse effects.
- Primary cells, such pre-activated PBMC, (but not quiescent PBMC) freshly isolated human tonsillar lymphocytes were also shown to be highly susceptible to Vsec triggering

Both apoptotic and non-apoptotic cell death are investigated and the functions of a number of signalling proteins are tested that are known to play a role in death-receptor mediated cell death:
Non-apoptotic,

- The exact mechanism of the Fas-independent, non-apoptotic cell death pathway awaits further analysis. This non-apoptotic cell death pathway occurs in cells that lack Fas, FADD, caspase-8, caspase-9 and also RIP.
- Enzymatically caspases, cathepsin B and cathepsin D are not essential for this process.
- Tested inhibitors, such as, perforin inhibitor, RIP kinase inhibitor, JNK inhibitor, NOS inhibitor, poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor have had no blocking ability.
- morphologically we found that this process did not cause nuclear or DNA fragmentation

Apoptotic,

- Vsec-induced apoptosis differs from those induced by cell-surface FasL in the enzymatic and molecular pathways they use.
- In contrast to RIP-independent classical Fas-induced cell death Vsec-induced apoptosis required the presence of RIP and was only partially blocked in the absence of FADD

- Enzymatically Vsec-generated apoptosis could be partially blocked by cathepsin D inhibitor. Caspase-3 activity was observed upon Vsec stimuli, and zVad caspase inhibitor effectively blocked the apoptotic part of cell death.
- Morphologically in Fas- and RIP-positive target cells activation by Vsec resulted in apoptotic nuclear fragmentation
- In Fas or RIP-deficient cells Vsec treatment resulted in Propidium Iodide uptake without nuclear fragmentation, indicating necrosis.

Several articles indicate that human immature dendritic cells (DC) are able to directly and effectively induce apoptotic cell death. DR antagonists were observed consistently blocking of cell death induced by DCs. Our results suggest that:

- TLR3 agonist poly I:C activated monocyte derived human DCs produce cytotoxic supernatant.
- The killing ability of the supernatant of DCs was notably inhibited by TNF antagonist.
- Surprisingly this cytotoxicity in contrast to recombinant TNF-generated cell death, was RIP dependent. (In the classical TNF-induced apoptosis RIP plays inhibitory role.)

These results suggest similar killing mechanisms of DCs and T-cells. Both cell types secret cytotoxic vesicles, inducing non-classical DR-mediated cell death.

Fas-mediates programmed death of B-cells plays crucial role in down-regulating autoimmunity. Engagement of B-cell receptors (BCR) on mature B-cells mediates the escape from cell death resulting in the activation and expansion of antigen specific clones.

- Our results indicate that BCR protects B-cells from FasL-induced apoptosis, but incapable of inhibiting Vsec-generated cell death.

We investigated how the non-antigen specific signals, such as BAFF and bacterial CpG cooperate with BCR in rescuing B-cells from Fas-induced apoptosis.

- The results indicate that BAFFR and TLR9 collaborate with BCR to protect B-cells from Fas-mediated programmed death and the rescue is independent of protein synthesis.
- BAFF and CpG-mediated rescue signals were unable to inhibit V-sec induced cell death.

We suggest that besides direct cell-to-cell contact-induced killing, secreted vesicles may have crucial role in the regulation of autoimmunity.

Current evidence suggests that cell death mechanisms mediated by the immune system may vary extensively. Description of necroptosis along with the beneficial effect of its inhibitor, necrostatin in cancer therapy highlights the importance of newly discovered cell death pathways in the fight against cancer. Our finding that Vsec-stimulated signaling could activate a unique and previously un-described Fas-mediated apoptosis as well as a special form of non-apoptotic cell death underpins the importance of further studies of Vsec components.

Social advantages:

Anikó Hancz's PhD dissertation has been made on the bases of this work (PhD defence in 2012)

Dóra Hancz completed her thesis work in this period studying Fas-induced cell death.

Due to this grant a fruitful and extensive collaboration has been established between the Department of Immunology of the ELTE institute and the laboratory of Death Receptors Signaling and Cancer Therapy (CNRS UMR 6543, Nizza, France) and the Immunology Department of DE OEC.

2 cm

Koncz G, Anikó Hancz, Chakrabandhu K, Gogolák P, Kerekes K, Rajnavölgyi É, Hueber AO: RIP-dependent apoptosis simultaneously with Fas-independent non-apoptotic cell death Journal of Immunology (under revision)

Hancz A,Koncz G,Szili D, Sarmay G: TLR9-mediated signals rescue B-cells from Fas-induced apoptosis via inactivation of caspases Immunology Letters (2012) (in press)

2 cm

Budget: 6.000.000.- HUF

A MUNKAHELYI ÉS A MUNKANÉLKÜLISÉGBŐL FAKADÓ STRESSZ EGÉSZSÉGRE GYAKOROLT KÁROS HATÁSAI, PSZICHOSZOCIÁLIS INTERVENCIÓK HATÉKONYSÁGÁNAK VIZSGÁLATA

Kopp Mária[1], Ádám Szilvia[1], Cserháti Zoltán[1], Győrffy Zsuzsa[1], Stauder Adrienne[1], Salavecz Gyöngyvér[1], Székely András[1]
[1]Semmelweis Egyetem, Magatartástudományi Intézet

A témában két PhD disszertációt védtek meg Győrffy Zsuzsa: „Morbiditás és stressztényezők a magyarországi orvosnők körében" és Salavecz Gyöngyvér: „A munkahelyi stressz és az egészség összefüggései hazai és nemzetközi viszonylatban" címmel Dr. Kopp Mária vezetésével. Két könyv, két angol nyelvű és négy magyar könyvfejezet jelent meg (2. melléklet). Hat nemzetközi és további 15 magyar nyelvű cikk jelent meg, impakt faktorok összesített értéke: 13.211. (1. melléklet) Tizenöt konferencia előadás hangzott el nemzetközi fórumokon, ezek közül három felkért előadás volt.(3.melléklet)

Kérdőívcsomagot állítottunk össze a munkahelyi stresszkezelő beavatkozások hatékonyságának mérésére, nemzetközileg validált munkastressz-kérdőívek és az országos epidemiológiai vizsgálatnál használt életminőség-kérdőívek felhasználásával. Felkérésre nemzetközi összefoglaló cikket írtunk a stressz mérésének lehetőségeiről az epidemiológiai kutatásban. Epidemiológiai vizsgálatok eredményeként két nemzetközi cikkben számoltunk be a munkahelyi stressz és az egészségi állapot összefüggéseiről az un. „poszt-kommunista" országokban és a stresszkezelés különböző kultúrákban is hasonló lehetőségeiről. A korábban kidolgozott stresszvizsgáló tesztbattéria segítségével különböző munkahelyeken elemeztük a munkahelyi stressz összetevőit, a túlvállalás, az erőfeszítés-jutalom egyensúly megbomlását, a munka-család összeegyeztetésének lehetőségeit, valamint a különböző stresszkezelő programok hatékonyságát. 200 kontroll és 200 munkahelyi átszervezésen átesett személy adatainak összehasonlításával megállapítottuk, hogy életkor, nem és iskolázottság szerinti kontroll után ugyan a munkanélküliség jár a legsúlyosabb mentális és szomatikus következményekkel, de a kaotikus, előre nem látható átszervezések majdnem ugyanolyan súlyos mentális következményekkel járnak azok esetében is, akik végül megtarthatták a munkahelyüket. Vizsgáltuk a munkahelyi stressz, a szívritmus variabilitás és a nyál kortizol szint összefüggéseit. A vizsgálat résztvevői 18 és 60 év közötti teljes állásban foglalkoztatott egészséges női dolgozók voltak. Két csoportban hasonlítottuk össze az általunk magyarra fordított és alkalmazott "Williams Életkészségek" stresszkezelő és kommunikációs készségfejlesztő program (www.eletkeszsegek.hu) hatását a pszichológiai jellemzőkre, a munkastressz szintjére, valamint a stressz élettani mutatóira. Az egyik csoport vett részt a munkahelyi stresszkezelő programban (beavatkozás), míg a másik fele nem vett részt ilyen programban (kontrollcsoport). A résztvevőkről két tipikus munkanapon 24 órás időszak során hordozható Actiheart szívritmus mérő eszközzel gyűjtünk adatokat, miközben a vizsgálatban résztvevő személy a mindennapi tevékenységeit folytatta. A megfigyelt 24 óra alatt reggeli kortizol szintet határozunk meg nyálmintából, ébredéskor és 30 perccel később. Emellett egy kérdőív kitöltését kértük amely, olyan életmódbeli tényezőket mért fel, mint a munkahelyi stressz, stresszel összefüggő tünetek, dohányzás, testmozgás. A két 24 órás mérési időszak között 28- 60 nap telt el. Kiemelten vizsgáltuk az egészségügyi dolgozók, ezen belül is az orvosnők, a pszichiáterek, valamint a vezetők munkahelyi stressz terhelését és ennek egészségügyi következményeit.

Eredeti közlemények:

Kopp MS, Konkoly Thege B, Balog P, Stauder A, Salavecz Gy, Rózsa S, Purebl Gy, Ádám Sz: Measures of stress in epidemiological research, JOURNAL OF PSYCHOSOMATIC RESEARCH 69: pp. 211-225 (2010) IF: 2.842

Kopp MS, Skrabski Á, László KD, Janszky I (2011): Gender patterns of socioeconomic differences in premature mortality: FOllow-up of the Hungarian epidemiological panel, INTERNATIONAL JOURNAL OF BEHAVIOURAL MEDICINE 18: pp. 22-34 (2011) IF: 1.762

Laszló K, Kopp M: Effort-reward imbalance and overcommitment at work are associated with painful menstruation: results from the Hungarostudy Epidemiological Panel 2006. JOURNAL OF OCCUPATIONAL AND ENVIRONMENTAL MEDICINE 51: pp. 157-163. (2009) IF: 1.882

László K, Pikhart H, Kopp MS, Bobak M, Pajak A, Malyutina S, Salavecz G, Marmot M.: Job insecurity and health: a study in 16 European countries. SOCIAL SCIENCES AND MEDICINE 70: pp. 867-874. (2010) IF: 2.742

Martos T, Kopp MS: Life goals and well-being: does financial status matter? Evidence from a representative Hungarian sample. SOCIAL INDICATORS RESEARCH 105: pp. 561-568. (2012) DOI: 10.1007/s11205-011-9788-7 IF: 1.000

Salavecz G, Chandola T, Pikhart H, Dragano N, Siegrist J, Jöckel KH, Erbel R, A Pajak, Malyutina S, Kubinova R, Marmot M, Bobak M, Kopp M: Work stress and health in Western European and post-communist countries. An East-West comparison study. JOURNAL OF EPIDEMIOLOGY AND COMMUNITY HEALTH 64: pp. 57-62 (2010) IF: 2.983

Ádám Sz, Cserháti Z, Balog P, Kopp M: Nemi különbségek a stressz szintjében és a pszichoszociális jóllét mutatóiban. MENTÁLHIGIÉNE ÉS PSZICHOSZOMATIKA 11: pp. 255-278 (2010)

Ádám Sz, Győrffy Zs, Harmatta J, Túry F, Kopp M, Szényei G: A magyarországi pszichiáterek egészségi állapota. PSYCHIATRIA HUNGARICA 25: pp. 55-61. (2010)

Ádám Sz, Salavecz Gy: A stressz elméleti háttere és mérése: a Selye János Lelki Egészség Program tesztbattériájának bemutatása. MENTÁLHIGIÉNÉ ÉS PSZICHOSZOMATIKA 11: pp. 53-80.(2010)

Győrffy Zs, Ádám Sz, Kopp M: A pszichés morbiditás prevalenciája és háttértényezői a magyarországi orvosnők körében. NÉPEGÉSZSÉGÜGY 87: pp. 84-93. (2010)

Győrffy Zs, Sándor I, Csoboth Cs, Kopp M (2010) A fizikailag bántalmazott nők reprodukciós zavarai. MENTÁLHIGIÉNE ÉS PSZICHOSZOMATIKA 11: pp. 297-312. (2010)

Kopp M, Balog P, Konkoly Thege B, Salavecz Gy, Stauder A, Csóka Sz, Bódizs R: A lelki egészség epidemiológiai és pszichofiziológiai vizsgálata és a lelki egészségmegőrzés lehetőségei. NÉPEGÉSZSÉGÜGY 87: pp. 52-58 (2009)

Kopp M, Bugán A: A magyar lakosság mentális egészségi állapota, annak kezelése. NÉPEGÉSZSÉGÜGY 87: pp. 291-300 (2009)

Susánszky É, Susánszky A, Szántó Zs, Kopp M: Vezetők életminősége és életstílusa. MENTÁLHIGIÉNE ÉS PSZICHOSZOMATIKA 11: pp. 371-390. (2010)

Szabó G, Szántó Zs, Balog P, Kopp M: Az életesemények, a stressz és a megküzdés nemi különbségei. MENTÁLHIGIÉNE ÉS PSZICHOSZOMATIKA 11: pp. 349-370. (2010)

Budget: 6.000.000.- HUF

HEALTH DETERIORATING EFFECTS OF WORK STRESS AND STRESS CAUSED BY UNEMPLOYMENT, EFFECTIVENESS OF PSYCHOSOCIAL INTERVENTIONS

Mária Kopp[1], Szilvia Ádám[1], Zoltán Cserháti[1], Zsuzsa Győrffy[1], Adrienne Stauder[1], Gyöngyvér Salavecz[1], András Székely[1]
[1]Semmelweis University, Institute of Behavioural Sciences

Two Ph.D. dissertations were completed in this topic: Zsuzsa Győrffy on „Morbidity and stressor predictors among the Hungarian female physicians" and Gyöngyvér Salavecz on „The association between work stress and health on a national and international samples", both under the supervision of Maria Kopp. Two books, two English book chapters and four Hungarian book chapters were published. Six articles were published in international and 15 in Hungarian scientific journals, impact factor is 13.211. Fifteen conference presentations were given at international conferences, three of these as invited presentations.

We developed a battery of questionnaires to measure the effectiveness of work stress management interventions by using international validated work stress questionnaires and quality of life questionnaires. We received a request to write an international review article on the possibilities of measuring stress in epidemiological research. Two articles were published in international journals on the association between work stress and health status in so-called „post-communist" countries and on the possibilities of stress management in different cultures. With the help of our test battery examining stress, we analysed the components of work stress, overcommitment, the imbalance of effort-reward, and the possibilities of harmonizing work and family life, and the effectiveness of stress management programs at various workplaces. Comparing the data of 200 control persons with that of 200 persons who experienced work restructuring, we observed that after controlling for age, sex, and education, unemployment has the most severe consequences on mental and somatic status of the unemployed. However, the chaotic and unpredictable restructuring has almost as severe consequences upon those as well who could keep their jobs finally. We analyzed the associations of work stress, heart rate variability, and salivary cortisol levels. The participants of the survey were healthy full-time female employees aged 18-60. In two groups, we compared the effects of the Williams Life Skills stress management and communication skills development program (www.eletkeszsegek.hu) (translated and adapted by us) on psychological qualities, level of stress and physiological indicators. A group participated in the stress management program (intervention), while the other one did not (control group). We collected data with the help of a portable Actiheart heart rate variability measuring tool that the participants wore on two typical work days for 24 hours while they were carrying out their everyday activities. During the 24-hour observation we defined the cortisol level from the saliva sample of the participants at waking and 30 minutes later. Beside these measurements we requested the participants to fill in a questionnaire exploring factors related to way of life such as work stress, symptoms related to stress, smoking and physical exercise. The time period between the two 24-hour measurements was 28-60 days. We laid emphasis on examining the stress level of health care workers, including female physicians, psychiatrists, health care managers, and the impact of stress on their health.

Original publications:

Kopp MS, Konkoly Thege B, Balog P, Stauder A, Salavecz Gy, Rózsa S, Purebl Gy, Ádám Sz: Measures of stress in epidemiological research, JOURNAL OF PSYCHOSOMATIC RESEARCH 69: pp. 211-225 (2010) IF: 2.842

Kopp MS, Skrabski Á, László KD, Janszky I (2011): Gender patterns of socioeconomic differences in premature mortality: FOllow-up of the Hungarian epidemiological panel, INTERNATIONAL JOURNAL OF BEHAVIOURAL MEDICINE 18: pp. 22-34 (2011) IF: 1.762

Laszló K, Kopp M: Effort-reward imbalance and overcommitment at work are associated with painful menstruation: results from the Hungarostudy Epidemiological Panel 2006. JOURNAL OF OCCUPATIONAL AND ENVIRONMENTAL MEDICINE 51: pp. 157-163. (2009) IF: 1.882

László K, Pikhart H, Kopp MS, Bobak M, Pajak A, Malyutina S, Salavecz G, Marmot M.: Job insecurity and health: a study in 16 European countries. SOCIAL SCIENCES AND MEDICINE 70: pp. 867-874. (2010) IF: 2.742

Martos T, Kopp MS: Life goals and well-being: does financial status matter? Evidence from a representative Hungarian sample. SOCIAL INDICATORS RESEARCH 105: pp. 561-568. (2012) DOI: 10.1007/s11205-011-9788-7 IF: 1.000

Salavecz G, Chandola T, Pikhart H, Dragano N, Siegrist J, Jöckel KH, Erbel R, A Pajak, Malyutina S, Kubinova R, Marmot M, Bobak M, Kopp M: Work stress and health in Western European and post-communist countries. An East-West comparison study. JOURNAL OF EPIDEMIOLOGY AND COMMUNITY HEALTH 64: pp. 57-62 (2010) IF: 2.983

Ádám Sz, Cserháti Z, Balog P, Kopp M: Nemi különbségek a stressz szintjében és a pszichoszociális jóllét mutatóiban. MENTÁLHIGIÉNE ÉS PSZICHOSZOMATIKA 11: pp. 255-278 (2010)

Ádám Sz, Győrffy Zs, Harmatta J, Túry F, Kopp M, Szényei G: A magyarországi pszichiáterek egészségi állapota. PSYCHIATRIA HUNGARICA 25: pp. 55-61. (2010)

Ádám Sz, Salavecz Gy: A stressz elméleti háttere és mérése: a Selye János Lelki Egészség Program tesztbattériájának bemutatása. MENTÁLHIGIÉNÉ ÉS PSZICHOSZOMATIKA 11: pp. 53-80.(2010)

Győrffy Zs, Ádám Sz, Kopp M: A pszichés morbiditás prevalenciája és háttértényezői a magyarországi orvosnők körében. NÉPEGÉSZSÉGÜGY 87: pp. 84-93. (2010)

Győrffy Zs, Sándor I, Csoboth Cs, Kopp M (2010) A fizikailag bántalmazott nők reprodukciós zavarai. MENTÁLHIGIÉNE ÉS PSZICHOSZOMATIKA 11: pp. 297-312. (2010)

Kopp M, Balog P, Konkoly Thege B, Salavecz Gy, Stauder A, Csóka Sz, Bódizs R: A lelki egészség epidemiológiai és pszichofiziológiai vizsgálata és a lelki egészségmegőrzés lehetőségei. NÉPEGÉSZSÉGÜGY 87: pp. 52-58 (2009)

Kopp M, Bugán A: A magyar lakosság mentális egészségi állapota, annak kezelése. NÉPEGÉSZSÉGÜGY 87: pp. 291-300 (2009)

Susánszky É, Susánszky A, Szántó Zs, Kopp M: Vezetők életminősége és életstílusa. MENTÁLHIGIÉNE ÉS PSZICHOSZOMATIKA 11: pp. 371-390. (2010)

Szabó G, Szántó Zs, Balog P, Kopp M: Az életesemények, a stressz és a megküzdés nemi különbségei. MENTÁLHIGIÉNE ÉS PSZICHOSZOMATIKA 11: pp. 349-370. (2010)

Teljes támogatás: 3. 900,000.- HUF

DAGANATOS PROGRESSZIÓ ÉS TERÁPIÁS ÉRZÉKENYSÉG KÖZÖTT ÖSSZEFÜGÉST MUTATÓ MARKEREK VIZSGÁLATA HUMÁN VASTAGBÉLRÁKOKBAN

Kopper László, Krenács Tibor, Sebestyén Anna, Hajdu Melinda, Márk Ágnes, Nemes Karolina, Micsik Tamás
I. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Semmelweis Egyetem

Vizsgálataink célja vastagbélrákok progressziójában potenciálisan szerepet játszó szabályozási jelutak fehérjéinek expressziójában bekövetkező változások immunhisztokémiai vizsgálata és klinikai adatokkal történő összevetése, a progresszióval összefüggésbe hozható markerek keresése volt.

A vizsgálatok első részében összesen 95 betegből származó mintákból - 52.6% férfi és 47.4% nő; median életkor 62 év (34-78 év) - készült tissue microarray (TMA) metszeteken több, különböző sejtfunkciókat meghatározó jelútcsaládok fehérjéinek aktivitását vizsgáltuk: az EGFR/RAS/PI3K utak tagjait (EGFR, HER2, RAS, pRAF1, MAPK, pERK, pAKT, mTOR, PTEN), egyéb, a proliferációt, részben a sejtciklust szabályozó fehérjét (MET, PDGFRb, STAT2 és -3, ciklin D1 és –D3, Ki67), az apoptózist szabályzókat (p53, Bax, Bad, Bcl-2, citokróm C, kaszpáz 8, FLIP, survivin, NFkB), valamint a sejtadhézióban, és a progresszióban szereplőket (E-cadherin, b-katenin, CD44v6, CD138, HLA-DR, CD10, COX2, MMP2). A fehérjék aktivitását az immunhisztokémiai reakciókban (IHC) a pozitív sejtek arányával, illetve a reakciók erősségével jellemeztük.. A vizsgálatok alapján az egyes szabályozók között kevés olyan összefüggés mutatkozott, amelyik a jelenlegi ismereteink szerint szignifikáns mértékben funkcionális kapcsolatot is jelent. Ilyennek ítélhető az erősen szignifikáns összefüggést mutatók között az EGFR és a p53 proliferációt támogató, valamint az NFkB és survivin apoptózist gátló aktivitása. A mérsékelten szignifikáns összefüggést mutató markerek csoportjában néhány kapcsolat további vizsgálatot érdemel, pl.: (a) a MET összefüggése a CD44v6-tal vagy az mTOR-ral, (b) a pERK kapcsolata a pEGFR-rel és a p53-mal, vagy (c) az ugyancsak proproliferatív irányt mutató pAKT és ciklinD1, PDGFRb és HER2, EGFR és b-katenin páros. A minták IHC értékei és a klinikai jellemzők, a progresszióval kapcsolatosan kevés összefüggést mutattak. Az EGFR eredmények azok, amelyek elég egyértelműen utalnak arra, hogy a diagnózishoz vett mintákban igen nagy arányban a normális bélhám proliferációjának szabályozása érvényesül. Ezt erősíti, hogy a jobb teljes túlélés, és a progressziómentes túlélés esetén is az EGFR1 mellett az általa befolyásolt út elemeinek aktivitása jelent még meg (RAS, RAF, ERK). Önmagában tehát az EGFR expressziója nem jelent rossz prognózist. A daganatsejtek terjedését befolyásoló markerek közül az E-cadherin a hosszabb túléléssel, a CD44v6 a rosszabb prognózissal társult, ami egybehangzik az eddigi megfigyelésekkel. A vizsgált beteganyag konvencionális kemoterápiában részesült, a daganatok terápiára adott válaszában a jelek szerint nem az EGFR-út általunk vizsgált tagjai voltak a lényegesen meghatározók (legalábbis nem az egyetlenek), hanem adott daganat klinikai viselkedésében feltehetően az út aktivitását befolyásoló, elsősorban a normálisan működő gátló tényezők hiánya a döntő, azaz a permanens proliferációt a gátlás nem egyensúlyozza. Feltehető ez vezet az esetek közötti jelentős heterogenitáshoz, ami magyarázhatja azt, hogy vizsgálataink alapján a progresszió szempontjából statisztikailag szignifikáns változás egyetlen markercsalád esetében sem jelölhető meg, mert egy-egy szabályozó változása önmagában ritkán meghatározó. Mindez még jobban aláhúzza a markerpanelek vizsgálatának fontosságát, és benne a sejtfunkciókat befolyásoló szuppresszorgének és epigenetikai szabályozás szerepét.
A munka folytatásaként az előbbi eredmények alapján érdekesnek vélt, még kevésbé jellemzett egyik útvonal (PI3K-út) egyik elemének (mTOR) aktivitását vizsgáltuk. Az mTOR, a jelátviteli hálózatok egyik központi elemeként, a vastagbélrákok esetében potenciális terápiás célpontnak is tekinthető. Megvizsgáltuk az mTOR komplexek aktivitását jellemző fehérjék expresszióját (előbbi vizsgálatban az mTOR fehérje mennyiségi vizsgálata erről nem adott felvilágosítást), illetve humán

vastagbélrák sejtvonalak mTOR gátlókkal szembeni érzékenységét. A jelenleg elérhető mTOR-gátlók (rapalógok, így rapamycin, temsirolimus) elsősorban az mTORC1 komplexet (jellemző fehérjéje az mTOR mellett a raptor) gátolják, míg az mTORC2 komplex (jellegzetes eleme a rictor) rapalógokkal szembeni érzékenysége vitatott. TMA-IHC segítségével vizsgáltuk az mTORC1 és mTORC2 komplexekre jellemző rictor és raptor expresszióját, valamint az mTOR fehérje aktivitásának legspecifikusabb jelét a foszforilált S6 (pS6) fehérje expresszióját. A vizsgált esetek 48%-a mutatott fokozott mTOR aktivitást, és ezek 100%-ában ki tudtuk mutatni a raptor, a rictor vagy mindkét komplex jelenlétére utaló fehérjeexpressziót. A rictor (tehát az mTORC2 komplex) domináns expressziója az esetek 38%-át jellemezte. A klinikai és túlélési adatok elemzése azt mutatta, hogy a pS6 negatívitás, vagyis az mTOR aktivitás hiánya egyértelműen jobb prognózisra utal. Az általunk eddig vizsgált különböző humán vastagbélrák sejtvonalak in vitro rapamycin érzékenysége eltérőnek bizonyult: a HT29 és az SW620 sejtvonalak proliferációját szinte teljesen gátolta in vitro a rapamycin kezelés, míg a CaCo, az SW480 és az RKO sejtek kevésbé érzékenyek rapamycinnel és a rapamycint tartalmazó kombinált kezelésekkel szemben. Ennek hátterében ezekben a sejtekben is az mTORC1 és mTORC2 komplex eltérő expressziója állhat. Az mTORC1 és C2 komplexek in situ mennyiségi vizsgálatához fagyasztott és formalin-fixált paraffinba ágyazott szövetekben a Duolink technika segítségével kezdtük meg egy új módszer beállítását. Eddigi vizsgálataink alapján elmondható, hogy az mTORC1 és mTORC2 komplexek potenciális terápiás célpontok lehetnek ezekben a betegekben. A jövőben, illetve a jelenleg lezajlott fáziskísérletek eredményeinek értékelésekor azonban mindenképp figyelembe kell venni a két komplex arányát adott tumor esetében, amelynek nemcsak prognosztikai, hanem prediktív szerepe is lehet, hatékonyabbá téve a terápiás stratégia tervezését.

A témával kapcsolatban megjelent, bemutatott vagy előkészületben álló munkák:

1 könyv - Kopper L., Tímár J., Becságh P., Nagy Zs.: Célzott diagnosztika és célzott terápia az onkológiában. 2. kiadás, Semmelweis Kiadó 2011

1 magyar nyelvű összefoglaló cikk - Kopper L., Tímár J.: mTOR-komplexek – molekuláris pókok a molekuláris hálókban, Magyar Onkológia 55:287-294, 2011

2 kongresszusi absztrakt:

Márk Á., Nagy N., Paku S., Kopper L., Sebestyén A: Fehérjék kölcsönhatásának és aktivitásának új kvantitatív vizsgálati lehetősége in situ. MOT konferencia, Budapest 2011. A poszter szekcióban 1. díj, Magyar Onkológia 2011 55(S1) 47

Márk Á., Nagy N., Paku S., Kopper L., Sebestyén A: Aktivált fehérjék és fehérjekomplexek új vizsgálati módszere in situ. MPT konferencia Siófok 2011. poszter

2 angol nyelvű kézirat előkészületben:

Micsik T, Nagy Zs, Horváth O, Fónyad L, Krenács T, Pogány P, Simon K., Kopper L: Signaling pathways in colorectal cancer - a TMA-IHC study

Sticz T, Sebestyén A, Micsik T, Krenács T, Márk Á., Kopper L.:mTOR acivity and the expression of mTORC1/C2 complexes in colorectal cancer - tissue microarray study

Teljes támogatás: 3. 900,000.- HUF

RELATIONSHIP BETWEEN MOLECULAR MARKERS RESPONSIBLE FOR TUMOR PROGRESSION AND THERAPEUTIC RESPONSE IN HUMAN COLORECTAL CANCERS

Kopper, László, Tibor Krenács, Anna Sebestyén, Melinda Hajdu, Ágnes Márk, Karolina Nemes, Tamás Micsik
I. Department of Pathology and Experimental Cancer Research, Semmelweis University

The aim of this study was to identify changes in the expression of the regulatory pathway proteins playing role in the progression of colorectal cancers. The question was approached by comparing immunohistochemistry and clinical data, as well as by searching for prognostic tumor markers.

In the first part of the study tissue microarray (TMA) blocks were made from samples of 95 patients with colorectal cancer – males 52.6%, females 47.4%, median age 62 yr (34-78 yr). The TMA blocks were used for immunohistochemistry (IHC). Antibodies against several functional groups of regulatory proteins were applied – for the most active pathways: mainly members of the EGFR/RAS/PI3K pathway (EGFR, HER2, RAS, pRAF1, MAPK, pERK, pAKT, mTOR, PTEN), others, regulating proliferation and cell cycle (MET, PDGFRb, STAT2 és -3, ciklin D1 és –D3, Ki67), regulating apoptosis (p53, Bax, Bad, Bcl-2, cytochrome C, caspase 8, FLIP, survivin, NFkB), and those involved in cell adhesion and invasion (E-cadherin, b-katenin, CD44v6, CD138, HLA-DR, CD10, COX2, MMP2). Activity of IHC reaction was estimated by the ratio of positive cells and by the intensity of the reaction. As a result few significant correlations between the different proteins were found. Among them the key proliferation regulators, EGFR and p53, and inhibitors of the apoptosis, NFkB and survivin, were identified. Additionaly, many proteins showed relationships which serve for further studies; e.g. (a) MET with CD44v6 or with mTOR, (b) pERK with pEGFR and p53, or (c) proproliferative pairs of pAKT and ciklin D1, PDGFRb and HER2, EGFR and b-katenin. The activities of IHC reactions showed limited correlation with clinical data. The most impressing result was the strong intensity of the EGFR reactions and reactions for further members of this pathway (RAS, RAF, ERK), practically independently from the progression free or total survival. This indicates the central role of EGFR-pathway not only in the proliferation of normal colonic mucosa but also in colonic cancer cells, and also, that EGFR-pathway itself is not a decisive factor in tumor progression. (At least those members of the pathways which were studied.) From the activity of other markers, expression of E-cadherin was related to the better prognosis, and CD44v6 indicated a worst outcome. The patients received conventional chemotherapy. As a whole, it can be concluded that in colorectal cancers the EGFR-pathway is critical to maintain proliferation, but the progression including the response to therapy is modified by other factors, probably by the lack of inhibitory signals (mostly suppressor genes), and also by the heterogenous effect of epigenetic modifications.

As a continuation of the study emphasis was a given to the activity of mTOR, an interesting, important, but less studied member of the central regulatory pathway (PI3K), or precisely to the mTOR complexes. These complexes as participants of the decision making network could be considered as a target for colorectal cancer therapy. The goals of this part of the study was to measure the expression of proteins forming mTOR complexes (the previous study showed essentially qualitative and not quantitative results) and the sensitivity of colorectal cancer cell lines against mTOR inhibitors. The currently available mTOR-inhibitors (rapalogs, such as rapamycin, temsirolimus) targets mainly mTORC1 (complex 1), while their effectivity against mTORC2 is questioned. Using TMA-IHC the expression of rictor and raptor, characteristic components of mTORC1 and mTORC2 was estimated, together with the expression of the most specific downstream protein of mTOR, phosphorylated S6 (pS6). Forty eight percentages of the samples showed increased mTOR activity, and in all of these samples either raptor, or rictor, or both were present. In 38% of samples expression of rictor (i.e. mTORC2 complex) was dominant. Comparing

the results with clinical data the negativity of pS6, referring to the lack of mTOR activity, was a marker for better prognosis. The various colonic cancer cell lines – in our hand – responded differently to rapamycin: proliferation of HT29 and SW620 cell lines were almost totally inhibited by rapamycin, while CaCo, SW480 and RKO cells were much less sensitive. It is possible that the different response is due to the different expression of the two mTOR complexes. For measuring in situ the quantity of the complexes a method is going to be introduced in frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded samples with Duolink technique. Results obtained so far support the view that mTOR complexes could be therapeutic targets especially when the ratio of the complexes is taking into account. Such estimation should have both prognostic and predictive role in the design of therapeutic strategy.

Books, original articles (published or in manuscript), posters - based on the project:

1 book - Kopper L., Tímár J., Becságh P., Nagy Zs.: Targeted diagnostics and targeted therapy in oncology. 2nd edition. Semmelweis Publishing House, Budapest (in Hungarian: Célzott diagnosztika és célzott terápia az onkológiában. 2. kiadás, Semmelweis Kiadó) 2011
1 review article - Kopper L., Tímár J.: mTOR complexes – molecular spiders in molecular networks (in Hungarian: mTOR-komplexek – molekuláris pókok a molekuláris hálókban). Magyar Onkológia 55:287-294, 2011
2 abstracts:
Márk Á., Nagy N., Paku S., Kopper L., Sebestyén A: The new possibility for in situ quantitative measurement on interactions and activities of proteins (in Hungarian: Fehérjék kölcsönhatásának és aktivitásának új kvantitatív vizsgálati lehetősége in situ) Congress of Hungarian Oncologists, Budapest 2011. First prize in poster section. Magyar Onkológia 2011 55(S1) 47
Márk Á., Nagy N., Paku S., Kopper L., Sebestyén A: The new possibility for in situ quantitative measurement on interactions and activities of proteins (in Hungarian: Aktivált fehérjék és fehérjekomplexek új vizsgálati módszere in situ). Congress of Hungarian Pathologists, Siófok 2011, poster
2 manuscripts (in preparation)
Micsik T, Nagy Zs, Horváth O, Fónyad L, Krenács T, Pogány P, Simon K., Kopper L: Signaling pathways in colorectal cancer - a TMA-IHC study
Sticz T, Sebestyén A, Micsik T, Krenács T, Márk Á., Kopper L.:mTOR acivity and the expression of mTORC1/C2 complexes in colorectal cancer - tissue microarray study

Teljes támogatás: 3.750.000,- Ft

Melléklet a 7. ponthoz: A beszámolási periódusban elért eredmények ismertetése

AZ EGÉSZSÉGI ÁLLAPOT, LELKI EGÉSZSÉG ILL. EZEK DETERMINÁNSAINAK MONITOROZÁSA ÉS JAVÍTÁSA FIATALOK KÖRÉBEN

Kósa Karolina[1], Bíró Éva[1], Bugán Antal[2], Tolvay Katalin[3]
[1] Debreceni Egyetem OEC Népegészségügyi Kar Egészségfejlesztési Tanszék
[2] Debreceni Egyetem OEC Népegészségügyi Kar Magatartástudományi Intézet
[3] Debreceni Egyetem OEC Általános Orvostudományi Kar Pszichiátriai Klinika

1. Tanulmányi szempontból kockázatot jelentő paraméterek azonosítása

Tanulmányaikat az átlagosnál hosszabb ideig végző hallgatók körében azt találtuk, hogy az elhúzódó tanulmányok mögött gyakran súlyos mentális zavar és diszfunkcionális kognitív működés azonosítható. Ezt követően vizsgálatot indítottunk annak érdekében, hogy a tanulmányaikat megszakító és diploma szerzése nélkül kimaradó hallgatók körében kockázati tényezőket azonosítsunk. 2000 és 2009 közt közel 6000 kimaradt hallgatót azonosítottunk a Debreceni Egyetemen, akik körében demográfiai (kor, nem, állandó és ideiglenes lakóhely, családi állapot) és tanulmányaikra vonatkozó adataik (kar, beiratkozott szak, lezárt félévek, felvett tantárgyak, tanulmányi átlag, tanulmányi előmenetel) alapján keresünk olyan jellemzőket, amelyek a kimaradás kockázati tényezőiként azonosíthatók. Az elemzés során számos technikai nehézségbe ütköztünk a több mint 60 ezer rekordot tartalmazó adatbázis feldolgozása során, ezért ez a vizsgálat jelenleg is folyamatban van. Mesterszakos hallgatók körében pszichés stressz szempontjából kockázati tényezőként azonosítottuk kérdőíves vizsgálattal a nem megfelelő időgazdálkodást, illetve kvalitatív vizsgálat során protektív tényezőként az autonómia-igényt és a kompetenciát.

2. Óvodapedagógus és népegészségügyi szakon tanuló egyetemi hallgatók egészségi állapotának vizsgálata

Korábbi, tanárjelöltek közt történt vizsgálatunk módszertanát alkalmazva vizsgáltuk óvodapedagógus és népegészségügyi szakos hallgatók egészségi állapotát, melynek eredményeként megállapítottuk, hogy az óvodapedagógusnak tanulók körében magasabb a rendszeresen dohányzók és alkoholt fogyasztók aránya, mint a korosztályos átlag-populációban, míg a népegészségügyi szakosok egészségmagatartása nem különbözött lényegesen az átlagkorosztálytól. Mindkét hallgatói csoportban jellemző volt azonban, hogy a korosztályhoz képest szignifikánsan magasabb volt a kóros mértékű pszichés stressz-szel küzdők aránya, adalékként ahhoz, hogy az egyetemi hallgatók kedvezőtlen lelki egészsége nemcsak bizonyos szakoknál, hanem általában jellemzőnek tekinthető.

3. Orvostanhallgatók mentális egészségének követéses vizsgálata

A követéses vizsgálatot korábbi eredményeinkre támaszkodva terveztük, a tanulmányaikat a Debreceni Egyetemen 2009-ben kezdő, magyar és angol nyelven tanuló orvostanhallgatók körében, az első három év első féléveinek kezdetén, validált kérdőíves módszert alkalmazva. Célunk volt, hogy az orvostanhallgatók mentális egészségének változását tanulmányaik során jellemezzük, illetve vizsgáljuk, hogy a körükben jelentkező pszichés stressz milyen mértékben vezethető vissza egyéni, a képzésbe való belépéskor is meglévő, illetve a tanulmányokkal kapcsolatos, a képzés során megjelenő oki tényezőkre. A vizsgált elsőéves orvostanhallgatók egytizede állt korábban pszichológiai kezelés alatt, de egészségük összességében kedvezőnek volt mondható. Másodévre azonban lényeges változás következett be: a pszichológiai stressz három különböző skálával mérve is emelkedett mind a magyar, mind az angol nyelven tanulók körében, az emelkedés azonban csak a magyar hallgatók körében bizonyult szignifikánsnak. Harmadév kezdetére a pszichés stressz mértéke javult. A depresszió és a szorongás átlagértéke csak a magyar nyelven tanulóknál növekedett a 2. évre. Figyelemre méltó, hogy mindhárom vizsgált évben, tehát már a képzés kezdetén is, a magyar hallgatók pszichés stressz-szintje szignifikánsan magasabb (rosszabb) volt,

mint a korosztályos átlag. A lelki egészség fontos paraméterei a diszfunkcionális attitűdök, vagyis olyan rejtett, gyakran tudattalan feltételezések, gondolkodási torzítások összessége, amely személyenként tartós, stabil mintát képez, és adott helyzetben befolyásolja az egyén percepcióját. Az orvostanhallgatók diszfunkcionális attitűdjeit az annak mérésére szolgáló eszköz két fő tengelye mentén értékelve azt találtuk, hogy a perfekcionizmus a magyar hallgatók körében szignifikánsan romlott (nőtt) az első évről másodévre, és harmadéven is magas maradt, az angol nyelven tanuló körében nem változott lényegesen a három év alatt, és harmadévre szignifikánsan kisebb mértékű volt, mint a magyarok körében. A dependencia a magyar hallgatóknál nem változott a három vizsgált évben, de mértéke szignifikánsan kedvezőtlenebb (magasabb) volt, mint az angol nyelven tanulók körében. A diszfunkcionális attitűdöknek mind a dependencia, mind a perfekcionizmus dimenziója egyértelmű, szignifikánsan kedvezőtlen összefüggést mutatott a pszichés stresszel. Az Antonovsky által definiált átfogó, dinamikus önbizalmat tükröző koherencia-érzés a fentiekkel ellentétes, bár nem szignifikáns csökkenést mutatott másodév elejére mind az angol, mind a magyar nyelven tanulóknál. A koherencia-érzés átlaga mindhárom évben szignifikánsan magasabb volt a magyar hallgatók körében az angol nyelven tanulókhoz képest. Vizsgáltuk a mentális egészség indikátorainak összefüggését a tanulmányi teljesítménnyel. Nem találtunk összefüggést az első év végi tanulmányi átlag és a másodév eleji pszichés állapot közt, de a második év évi tanulmányi átlag erős szignifikáns negatív összefüggést mutatott a harmadév elején mért pszichés stressz átlagával. Az ismételt, illetve nem teljesített vizsgák szignifikánsan rontották a koherencia-érzést másodévről harmadévre. Vizsgálatunk igazolta, hogy a másodév kulcsfontosságú az orvostanhallgatók mentális egészségét illetően, és történései szignifikánsan rontják az orvostanhallgatók mentális egészségét harmadév elejére. A vizsgált paraméterek közti összefüggések elemzése azt is igazolta, hogy a pszichés stressz szempontjából a koherencia-érzés és a társas támogatás kiemelten fontos protektív tényezőknek tekinthetők.

4. Intervenció kidolgozása egyetemi hallgatók lelki egészségének javítására

A fentiekben leírt, az egyetemi hallgatókat terhelő jelentős pszichés stressz csökkentése és a hallgatók lelki egészségének javítása érdekében a 2011/12-es tanév első félévében 28 órás kreditkurzus meghirdetésére került sor 4-6. éves orvostanhallgatók számára Bálint-csoport formájában, amelynek megkezdésekor, illetve zárásakor is kérdőíves felmérést végeztünk. A hallgatók a kérdőívek kitöltésekor azt jeligével látták el, ennek révén lehetőség volt a hallgatók állapotának egyénenkénti megítélésére is, anélkül, hogy személyazonosságuk ismertté vált volna. Az eredmények alapján a kóros mértékű pszichés stresszel rendelkezők aránya a kurzus végére a kezdeti arány 50%-ára csökkent, és 17%-kal csökkent a pszichés stressz átlagpontszáma is. Eszerint a kurzus alkalmas a pszichés stressz csökkentésére már egy szemeszter alatt is, ezért rendszeres meghirdetése javasolt.

- Bíró É, Balajti I, Ádány R, Kósa K: Determinants of mental wellbeing of medical students. Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology 45:253-258 (2010) IF: 2,147 http://www.springerlink.com/content/5587832m1u83601q/fulltext.pdf
- Bíró É, Olvasztó L, Kósa K: Óvodapedagógus hallgatók mentális egészségének felmérése. Magyar Pedagógia 110(4):285-300 (2010) http://magyarpedagogia.hu/document/Biro_MP1104.pdf
- Tolvay K: Tanulmányaikat az átlagnál jelentősen hosszabb ideig végző egyetemi hallgatók pszichés problémáinak elemzése. Psychiat Hung 25(6):545-552 (2010) http://www.matarka.hu/talalat.php
- Bíró É, Ádány R, Kósa K: Mental health and behaviour of students of public health and their correlation with social support: a cross-sectional study. BMC Public Health 11:871 (2011) http://www.biomedcentral.com/1471-2458/11/871/abstract IF: 2,36

Teljes támogatás: 3.750.000,- Ft

MONITORING AND IMPROVING HEALTH STATUS, MENTAL HEALTH AND THEIR DETERMINANTS IN UNIVERSITY STUDENTS

Kósa Karolina[1], Bíró Éva[1], Bugán Antal[2], Tolvay Katalin[3]
[1] Unit of Health Promotion, Faculty of Public Health, Medical and Health Science Centre, University of Debrecen
[2] Department of Behavioural Sciences, Faculty of Public Health, Medical and Health Science Centre, University of Debrecen
[3] Department of Psychiatry, Faculty of Medicine, Medical and Health Science Centre, University of Debrecen

1. Identification of risk factors for study performance

A qualitative study of university students characterised by significant delay in the duration of their studies found severe mental disorder with marked dysfunctional cognitive functioning in many of these students which required treatment. Subsequently, we launched a study to identify risk factors for student dropout. Almost 6000 students were identified among 2000 and 2009 who dropped out of the University of Debrecen without obtaining a degree. We aimed at finding demographic (age, sex, permanent and temporary residence, marital status) and study indicators (faculty, course, completed semesters, study subjects, study performance) which could be identified as risk factors for becoming a dropout, as well as seeking correlations between these factors. We have encountered a number of technical problems during the analysis of the database containing more than 60 thousand records so this analysis is still ongoing. A questionnaire survey among master students revealed bad time management as a risk factor, whereas another, qualitative study revealed the need for autonomy and competence as protective factors for psychological stress.

2. Health survey of university students of kindergarten education and public health

Applying the methodology of our earlier health survey among students in teacher training and medicine, we examined the health of university students of kindergarten education and public health. Results showed that the proportion of regular smokers and alcohol consumers among those studying kindergarten education is higher than in a reference population of the same age-range, whereas the health behaviour of public health students was similar to the reference population. However, the proportion of students with notable psychological distress was significantly increased in both student groups compared to the reference population, proving that psychological distress can be considered a general feature of students in higher education

3. Follow-up survey of the mental health of medical students

In order to assess the changes of mental health during their studies, as well as the contribution of personality traits and the impact of studies in the generation of mental stress among medical students, a follow-up health survey using validated methodology was started among the cohort of medical students who started their studies in Hungarian and English at the University of Debrecen in 2009. 10% of first year medical students had experienced psychological treatment before but in other respect their health was favourable. An increase of psychological stress as measured by three different scales occurred by the beginning of year two in the Hungarian and English language cohort as well, and the change was significant among Hungarian students. Mean stress improved by year 3. Depression and anxiety

increased among Hungarians from year 1 to 2. It is notable that in all 3 years psychological distress in the Hungarian cohort was significantly higher compared to a Hungarian reference population of the same age. An important feature of mental health is the presence of dysfunctional attitudes based on distorted cognition. Dysfunctional attitudes can be identified behind a number of mental problems, among them anxiety and depression. Examining the 2 major dimensions of dysfunctional attitudes, perfectionism became significantly worse from year 1 to year 2 among Hungarian students and remained so by year 3, whereas there was no change in the English language cohort throughout the examined first 3 years, and in year 3 was significantly better compared to the Hungarian students. Dependence being the other major dimension did not change in either group but was significantly higher among Hungarians than among foreign students. Both dimensions showed a significant correlation with psychological stress. Sense of coherence, a pervasive and dynamic sense of confidence as defined by Antonovsky was significantly higher among Hungarian compared to foreign students but showed a non-significant decline by the beginning of year 2 in both groups. We also analysed the correlation between indicators of mental health and study performance. Whereas there was no correlation between study performance at the end of year 1 and mental health at the beginning of year 2, a strong negative correlation was seen between study performance at the end of year 2 and psychological stress at the beginning of year 3. The number of repeated and not finished study subjects significantly impaired sense of coherence from year 2 to year 3. Our study provided evidence that year 2 is of crucial importance regarding the mental health of medical students, and its events significantly impair it for the beginning of year 3. We also found evidence that sense of coherence and social support are key protective factors for mental health.

4. Developing an intervention to improve the mental health of university students

In order to improve the mental health of university students characterised above, an elective course of 28 hours was developed and made available for medical students. The course was provided as a Balint group for medical students above year 3 and led by 2 senior psychologists. Participants were requested to complete a questionnaire before and after the course, identifying themselves voluntarily by a code, by which individual follow-up of the participants was made possible without revealing their identities. Results showed a 50% reduction of the proportion of those with notable psycchological distress, and mean stress improved by 17%, providing evidence that the mental health of medical students can be improved even within one semester so the course is recommended to be integrated into the list of elective course.

- Bíró É, Balajti I, Ádány R, Kósa K: Determinants of mental wellbeing of medical students. Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology 45:253-258 (2010) IF: 2,147 http://www.springerlink.com/content/5587832m1u83601q/fulltext.pdf
- Bíró É, Olvasztó L, Kósa K: Óvodapedagógus hallgatók mentális egészségének felmérése. Magyar Pedagógia 110(4):285-300 (2010) http://magyarpedagogia.hu/document/Biro_MP1104.pdf
- Tolvay K: Tanulmányaikat az átlagnál jelentősen hosszabb ideig végző egyetemi hallgatók pszichés problémáinak elemzése. Psychiat Hung 25(6):545-552 (2010) http://www.matarka.hu/talalat.php
- Bíró É, Ádány R, Kósa K: Mental health and behaviour of students of public health and their correlation with social support: a cross-sectional study. BMC Public Health 11:871 (2011) http://www.biomedcentral.com/1471-2458/11/871/abstract IF: 2,36

Teljes támogatás: 4,200,000.- Ft

A TRANZIENS RECEPTOR POTENCIÁL VANILLOID-3 (TRPV3) SZEREPE A HUMÁN BŐRSEJTEK BIOLÓGIAI FOLYAMATAINAK SZABÁLYOZÁSÁBAN FIZIOLÓGIÁS ÉS KÓROS KÖRÜLMÉNYEK KÖZÖTT

Kovács László[1], Czifra Gabriella[1], Juhász István[2], Tóth István Balázs[1], Ambrus Lídia[1], Lisztes Erika[2]
Debreceni Egyetem, OEC, [1]Élettani Intézet és [2]Bőrkinika

A projekt keretében a tranziens receptor potenciál vanilloid-3 (TRPV3) ioncsatorna szerepét vizsgáltuk a humán bőr eredetű sejtek biológiai folyamatainak szabályozásában. Kísérleteink során először különféle tenyésztett humán keratinocyta-típusokon tanulmányoztuk a TRPV3 mRNS és fehérje szintű kifejeződését. Kimutattuk, hogy a mind a humán epidermális (primer NHEK és immortalizált HaCaT) keratinocyták, mind a szőrtüsző eredetű külső gyökérhüvely (ORS) keratinocyták jelentős mértékben kifejezik a TRPV3 csatornát. Bebizonyosodott az is, hogy a TRPV3 expressziója fokozódott a sejtek differenciálódása során. Mivel a TRPV3 csatorna Ca-permeabilis, nem-specifikus csatornaként működik, elektrofiziológiai és optikai dinamikus Ca-imaging technikákkal elemeztük továbbá a TRPV3 funkcionalitását is a keratinocytákon. Kísérleteink során növényi eredetű (pl. eugenol, thymol, vagy carvacrol) és szintetikus (pl. 2-aminoetoxidifenil-borát, 2-APB) agonisták alkalmazásával megállapítottuk, hogy a TRPV3 funkcionális, Ca-permeabilis csatornaként működik a sejteken. Ezen túlmenően vizsgáltuk azt is, hogy a TRPV3 aktivitásának, illetve kifejeződésének módosítása milyen hatással bír a keratinocyta-specifikus sejtfolyamatokra. Különféle „nagy-áteresztőképességű" funkcionális assay-k alkalmazásával bebizonyítottuk, hogy a TRPV3 aktiválása a fenti növényi vagy szintetikus agonistákkal jelentősen lecsökkentette az NHEK és ORS keratinocyták növekedési ütemét, fokozta a sejtek differenciálódását jelző markerek expresszióját, valamint apoptózis-vezérelt sejthalált indukált. Végezetül kimutattuk, hogy ezen biológiai válaszok jelentős mértékben visszafordíthatók voltak a sejtek által kifejezett endogén TRPV3 csatornák siRNS technikával történő „lecsendesítésével".

Ezen eredményeinkkel jó összhangban humán hajfollikulus szervkultúrát alkalmazva megállapítottuk, hogy a TRPV3 (eugenol, carvacrol, 2-APB) stimulálása meggátolta a hajszál elongációját. Kombinált statikus imaging technikával emellett kimutattuk, a TRPV3 aktiválása intrafolliculáris apoptózist, valamint a hajciklus katagén (regresszió) stádiumára jellemző morfológiai változásokat indított be.

Mindezen adataink a TRPV3 központi szerepére utalnak a humán keratinocyták növekedésének és túlélésének szabályozásában. Eredményeink emellett felvetik a TRPV3, mint potenciális terápiás célpont alkalmazhatóságának lehetőségét egyes kórosan fokozott növekedéssel járó dermatológiai kórképek (pl. daganatok, psoriasis, hirsutismus) kezelésében.

Kiemelt közlemény:
Borbíró I, Lisztes E, Tóth IB, Czifra G, Oláh A, Szöllősi AG, Szentandrássy N, Nánási PP, Péter Z, Paus R, Kovács L, Bíró T: Activation of Transient Receptor Potential Vanilloid-3 Inhibits Human Hair Growth. J. INVEST. DERMATOL. 131(8): pp 1605-1614 (2011) IF: 6,27

Budget: 4,200,000.- HUF

ROLE OF TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL VANILLOID-3 (TRPV3) IN THE REGULATION OF BIOLOGICAL PROCESSES OF HUMAN SKIN CELLS UNDER PHYSIOLOGICAL AND PATHOLOGICAL CONDITIONS

László Kovács[1], Gabriella Czifra[1], István Juhász[2], Balázs István Tóth[1], Lídia Ambrus[1], Erika Lisztes[2]
University of Debrecen, MHSC, Department of [1]Physiology and [2]Dermatolog

In the frame of the project, we have investigated the role of transient receptor potential vanilloid-3 (TRPV3) ion channel in the regulation of biological processes of human skin-derived cells. First we assessed the presence of TRPV3 (at mRNA and protein levels) on cultured human keratinocytes. The significant expression of TRPV3 was verified on normal human NHEK and immortalized HaCaT keratinocytes as well as on hair follicle-derived outer root sheath (ORS) keratinocytes. Moreover, the level of TRPV3 was found to be elevated in parallel with cellular differentiation. Since TRPV3 operates as a Ca-permeable non-specific channels, using electrophysiology and dynamic Ca-imaging techniques, we have furthermore assess the functionality of TRPV3 on keratinocytes. By employing plant-derived (e.g. eugenol, thymol, and carvacrol) and synthetic (e.g. 2-aminoetoxydiphenyl-borate, 2-APB) agonist we found that TRPV3 indeed functions as a Ca-permeable channel. We have also investigated how the activation of TRPV3 or the modulation of its expression affects the keratinocyte-specific cellular processes. By employing various "high-throughput" functional assays, we have proven that activation of TRPV3 by the above plant-derived or synthetic agonists decreased the growth rate of NHEK and ORS keratinocytes, increased the expression of differentiation markers, and induce apoptosis-driven cell death. Finally, we have shown that these biological responses could be significantly reverted by the siRNA-mediated "silencing" of endogenous TRPV3 channels expressed by these cells.

In good accord with these results, in human hair follicle organ-cultures the TRPV3 activators (eugenol, carvacrol, 2-APB) inhibited hair shaft elongation. Furthermore, using static imaging techniques, we have found that stimulation of TRPV3 induced intrafollicular apoptosis and morphological alterations characteristic of catagen (regression) stage of the hair cycle.

These data collectively argue for the central role of TRPV3 in the regulation of growth and survival of human keratinocytes. Our findings furthermore implicate that TRPV3 may be used as a potential therapeutic target in the management of certain dermatological diseases characterized by pathologically increased growth (e.g. tumors, psoriasis, hirsutism).

Selected publication:
Borbíró I, Lisztes E, Tóth IB, Czifra G, Oláh A, Szöllősi AG, Szentandrássy N, Nánási PP, Péter Z, Paus R, Kovács L, Bíró T: Activation of Transient Receptor Potential Vanilloid-3 Inhibits Human Hair Growth. J. INVEST. DERMATOL. 131(8): pp 1605-1614 (2011) IF: 6,27

Teljes támogatás: 4.500.000 Ft

KLONÁLIS HETEROGENITÁS VIZSGÁLATA EMLŐTUMOROKBAN

Kulka Janina[1], Tőkés Anna-Mária[1], Lotz Gábor[1], Szász Attila-Marcell[1], Dank Magdolna[2], Jakab Ferenc[3], Baranyai Zsolt[4]
[1]Semmelweis Egyetem II.sz. Pathologiai Intézet és [2]Radiológiai és Onkoterápiás Klinika, [3]Fővárosi Uzsoki Utcai Kórház Sebészeti Osztály, [4]Szent Imre Kórház Általános Sebészeti Profil

1 Fiatalkori (<35 év) emlőrákos betegekből álló populáció, valamint kontrollcsoportként idős (>70 év) emlőrákos nőbeteg tumormintáit vizsgáltuk.. Az általunk elemzett fiatalkorban kialakuló daganatoknak több mint fele a közismerten rossz prognózisú csoportokba tartozik. (Székely *et al.*, 2010) (Kulka *et al.* 2010)
2. Összehasonlítva **a** HE metszetek alapján kijelölt eltérő morfológiájú területeket az ER, PgR, HER2, Ki67 immunhisztokémiai metszetekkel megállapítottuk, hogy a különböző morfológiai megjelenésű tumorrégiók immunhisztokémiai mintázatbeli eltérései is ugyanazokra a területekre korlátozódnak. Heterogenitás szempontjából nem tudtunk szignifikáns különbségeket igazolni a két eltérő korcsoport tumoraiban, de szignifikánsan több Her2 típusú daganat fordult elő a fiatal betegekben. (Madaras *et al.*, 2012a)
3. Dual color FISH reakciót végeztünk Her2/TOP2/CEN17 próbával. Tapasztalataink szerint a TOP2A gén számbeli variációi követik a HER2 gén eltéréseit a fiatalkori és időskori esetek túlnyomó részében (Madaras *et al.*, 2012a).
4. Vizsgálatunkban a sejtek osztódási rátáját is jellemeztük a vizsgált emlődaganatokban, mely szerint a Ki67 expressziójánál erősebb prognosztikus index adható meg egyes sejtciklus markerek elemezésével, amelyek nemcsak jobban tükrözik a mitotikus aktivitást és a klinikai lefolyást, hanem a tumorok ploiditásával is összefüggenek (Szász *et al.*, 2012).
5. Az EGFR kifejeződést vizsgáltuk azon daganatokban, amelyekben KRAS szekvenálást is végeztünk, és 9 fiatal daganatos betegből 4-ben a 12-es exon aktiváló mutációját találtuk. Az EGFR expresszióban különbséget ezen csoportban nem találtunk (Madaras *et al.*, 2012b).
6. BRCA szekvenálási eredmények: 41 fiatalkorban kialakult daganat esetében (összesen 103 régióban) és 23 időskorú daganat esetében (összesen 75 régióban) vizsgáltuk a BRCA1 és BRCA2 gén esetében a a hazánkban a leggyakoribb BRCA1 és BRCA2 mutációk előfordulását (BRCA1 gén 5382insC, 300T>G, 185delAG, valamint a BRCA2 gén 9326insA és 6174delT). Előzetes eredményeink alapján három fiatalkorban kialakult daganatban ill. a mellette vizsgált normál emlőszövetben volt kimutatható mutáció a BRCA1 gén esetében (300T>G) és a heterogén régiók nem mutattak különbséget ezen elemzések alapján. A BRCA1 és BRCA2 gén esetében számos igazolt SNP-ről számolnak be az irodalmi adatok, melyeknek szerepe nem tisztázott vagy nem ismert. Munkánk folytatásaként elemezzük a különböző SNP-ket a már meglévő szekvenogramok segítségével a fiatalkori daganatokban és különböző heterogén régiókban, összehasonlítva a kontroll (időskorú) csoporttal.
7. A kiküldött kérdőívekre 49 beteg ill. család válaszolt. A válaszok alapján 24 esetben jeleztek családjukban előforduló emlő- vagy ováriumtumort első és másodfokú rokonságban, 12 esetben más típusú daganatról számoltak be. 11 esetben nem volt daganatos betegség a családokban. (Baranyak *et al.*, 2011)

8. 43 esetben rendelkeztünk elegendő információkkal BRCAPRO (on-line elérhető szoftver) elemzések elvégzéséhez. 10%-os küszöbhatárt figyelembe véve a BRCAPRO modell alapján 15 esetben BRCA1 mutáció, 4,6%-ban BRCA2 mutáció volt valószínűsíthető. (Baranyak *et al.*, 2011)
9. A 85 vizsgált betegből 9 esetben terhesség vagy szoptatás időszakában detektálták az emlődaganatot. 2012-es adatok alapján a 85 vizsgált fiatalkorú emlődaganatos betegből 25 halt meg. Nem volt szignifikáns különbség kimutatható össztúlélés szempontjából a családi halmozódást mutató és családi halmozódást nem mutató betegcsoport között. A Az elhunyt betegek kétharmadának agresszív (Luminalis B és tripla negatív altípusba tartozó) emlődaganata volt. (kézirat beküldésre kész Tőkés *et al*.)
10. Komplex analízis és irodalmi áttekintés útján következtetést vontunk le arra vonatkozóan, hogy a daganatok mely morfológiai, immunhisztokémiai és molekuláris vizsgálattal elkülöníthető tulajdonságai határozzák meg legjobban a gyógyszeres kezelésre adott választ és a klinikai lefolyást, és melyek azok a vizsgálatok, amelyek a klinikai döntéshozásban a jövőben segítséget nyújthatnak (Stoddard *et al.*, 2011).

A pályázathoz szorosan kapcsolódó közlemények és kongresszusi absztraktok:

Székely B, Madaras L, Szentmártoni G, et al: MAGY ONKOL 54: pp. 19-26 (2010)
Kulka J, Hajnáczky A, Madaras L, et al: INTERCONGRESS MEETING OF THE ESP PROCEEDINGS (2010)
B aranyák Z, Madaras L, Tőkés AM, et al: EUR J CANCER 47: p. S360. (2011) IF: 4.944
Madaras L, Szász AM, Baranyák Z et al: MAGY ONKOL, in revision (2012)
Lendvai G, Madaras L, Barbai T, et al: TECHNOLOGY TRANSFER IN DIAGNOSTIC PATHOLOGY 7TH CENTRAL EUROPEAN REGIONAL MEETING - HOT ISSUES IN MOLECULAR PATHOLOGY PROCEEDINGS, submitted (2012)
Stoddard FR, Szász AM, Székely B, et al: memo - MAGAZINE OF EUROPEAN MEDICAL ONCOLOGY 4: pp. 158-162. (2011)
Szász AM, Geszti F, Zsákovics I, et al: EUR J CANCER (SUPPL) accepted (2012) IF: 4.944

A pályázathoz szorosan nem kapcsolódó közlemények, absztraktok, amelyekben köszönetünket fejeztük ki az ETT 088/2009-től kapott támogatásért:

Szász AM et al: EUR J CANCER 8: p. S226 (2010) IF: 4.475
Szász AM et al: ACTA CLIN CROATICA (2010)
Szász AM et al: BIOPOLYMERS AND CELL 26: p. S81 (2010) ISSN 0233-7657
Szász AM et al: BR J CANCER (2012), submitted
Tőkés AM et al: PATHOL ONCOL RES (2011) DOI:10.1007/s12253-011-9481-9 IF: 1.272
Tőkés AM et al: EUR J CANCER (SUPPL) accepted (2012) IF: 4.944

Teljes támogatás: 4.500.000 Ft

EVALUATION OF CLONAL HETERGENEITY IN BREAST CANCER

Kulka, Janina[1]; Tőkés, Anna-Mária[1]; Lotz, Gábor[1], Szász, Attila Marcell[1]; Madaras, Lilla[1]; Dank, Magdolna[2]; Jakab, Ferenc[3]; Baranyai, Zsolt[4]

[1]Semmelweis University, 2nd Department of Pathology, and [2]Department of Diagnostic Radiology and Oncotherapy, [3]Uzsoki Memorial Hospital, Department of Surgery and Vascular Surgery, [4]Szent Imre Hospital, Department of General Surgery

1. Breast cancer samples of young women (<35 years) and a control set of elderly population (70< years) was investigated. More than half of the evaluated tumors of young patients was found to belong to the poor prognosis carcinomas of the breast. (Székely *et al.*, 2010) (Kulka *et al.* 2010)
2. Upon comparing the morphologically distinct areas identified on the HE stained slides regarding the expression of ER, PgR, Her2, Ki67, we have noted that the histologically and immunophenotypically selected areas resemble identical regions. Regarding tissue composition, heterogeneity did not show significantly different occurence except for the heterogenous distribution of HER2 immunostaining in the young patients. Also, HER2+ tumors were more frequent in this latter cohort. (Madaras *et al.*, 2012)
3. Dual color FISH was performed on FFPE slides to evaluate the distribution of HER2/TOP2/CEN17 gene and region copy numbers. The copy numbers of TOP2A were closely following those of the HER2 gene's in the young and elderly breast cancer samples. (Madaras *et al.*, 2012)
4. In this study, we also evaluated the mitotic properties of the tumors, and we identified a prognostic index based on cell cycle markers which is more accurate than Ki67 expression to predict outcome and also reflects mitotic index and DNA ploidy (Szász *et al.*, 2012)
5. Expression of EGFR was evaluated in those samples, which were investigated for mutations int he KRAS gene with RFLP and were confirmed by sequencing. These 9 patients were representing all subtypes from young breast cancer patients, and 4 of them carried activating exon 12 mutation. Although, no difference was found regarding EGFR expression in this subset (Lendvai *et al.*, 2012).
6. Results of BRCA sequencing: mutations of the five most common sites in the BRCA1 and BRCA2 genes (BRCA1: 5382insC, 300T>G, 185delAG; BRCA2: 9326insA, 6174delT) were investigated in 41 young and 23 elderly patient's tumor and normal tissue samples (altogether 103 and 75 regions, respectively). Based on our prelimiary results 3 young breast cancer patients carried BRCA1 mutation (all at 300T>G) both in normal tissues and their tumors in all regions. There are numerous SNPs confirmed in the literature in the BRCA1 and BRCA2 genes which represent unknown significance. As a continuation of our work we are evaluating the SNPs using the existing sequenograms in these young breast cancer patients compared to the elderly population.
7. Questionnaire based evaluation was performed of the young breast cancer patients. Fourty-nine responses were received. In 24 cases, familial breast or ovarian cancer was idenitifed in first or second degree relatives. In 12 patients, other types of tumors were registered. In 11 cases, no other tumor was known to have occured in the family. (Baranyák *et al.*, 2011)

8. In 43 cases, sufficient information was gathered to evaluate the potential risk to carry mutation int he BRCA genes with the BRCAPRO (on-line accessible) software. Accepting the 10% threshold level, 15 cases were found to be likely carrying BRCA1 mutation, and in 4,6% BRCA2 mutation was predicted with BRCAPRO. (Baranyák *et al.*, 2011)
9. In nine out of 85 evaluated breast cancer patients, diagnosis of tumor was made during pregnancy or lactation. According to the state of the follow-up in 2012, twenty-five young breast cancer patients have died out of 85. There was no significant difference in the overall survival between the familially affected and the non-familial groups. Two third of the deceased patients possessed aggressive immunophenotypes (Luminal B and triple negative breast cancer. (Tőkés *et al*. ready to be submitted)
10. We have identified the morphological, immunohistochemical and molecular properties of tumors which contribute to the response to therapy and overall survival based on complex analysis and literature review. We proposed a summary of diagnostic approaches which can aid clinical decision making in the future. (Stoddard *et al.*, 2011)

References closely related to the grant support:

Székely B, Madaras L, Szentmártoni G, et al: MAGY ONKOL 54: pp. 19-26 (2010)
Kulka J, Hajnáczky A, Madaras L, et al: INTERCONGRESS MEETING OF THE ESP PROCEEDINGS (2010)
Baranyák Z, Madaras L, Tőkés AM, et al: EUR J CANCER 47: p. S360. (2011) IF: 4.944
Madaras L, Szász AM, Baranyák Z et al: MAGY ONKOL, in revision (2012)
Lendvai G, Madaras L, Barbai T, et al: TECHNOLOGY TRANSFER IN DIAGNOSTIC PATHOLOGY 7TH CENTRAL EUROPEAN REGIONAL MEETING - HOT ISSUES IN MOLECULAR PATHOLOGY PROCEEDINGS, submitted (2012)
Stoddard FR, Szász AM, Székely B, et al: memo - MAGAZINE OF EUROPEAN MEDICAL ONCOLOGY 4: pp. 158-162. (2011)
Szász AM, Geszti F, Zsákovics I, et al: EUR J CANCER (SUPPL) accepted (2012) IF: 4.944

References not closely related to the grant support but acknowledging the ETT 088/2009 funding:

Szász AM et al: EUR J CANCER 8: p. S226 (2010) IF: 4.475
Szász AM et al: ACTA CLIN CROATICA (2010)
Szász AM et al: BIOPOLYMERS AND CELL 26: p. S81 (2010) ISSN 0233-7657
Szász AM et al: BR J CANCER (2012), submitted
Tőkés AM et al: PATHOL ONCOL RES (2011) DOI:10.1007/s12253-011-9481-9 IF: 1.272
Tőkés AM et al: EUR J CANCER (SUPPL) accepted (2012) IF: 4.944

BISZFOSZFONÁT KEZELÉS OKOZTA ÁLLCSONTNECROSIS GENETIKAI VIZSGÁLATA

Lakatos Péter, Kósa János, Balla Bernadett
Semmelweis Egyetem I. sz. Belgyógyászati Klinika, Budapest

A biszfoszfonátok (BP) indikációja igen széleskörű. Elsősorban az osteoporosis kezelésében alkalmazzák, de emellett csontmetasztázissal járó malignus tumorok esetében is. A biszfoszfonáttal kezeltek betegek száma világszerte évről-évre nő. A BP-ot kapó betegek körében, a készítmény mellékhatásaként, gyakran alakul ki állkapocs necrosis (ONJ), amely döntően a nitrogén tartalmú aminobiszfoszfonátok intravénás alkalmazásakor jelenik meg. Az ONJ kialakulásához vezető kórélettani mechanizmus még nem ismert. A BP-ok hatására túlzott mértékben csökken a csontanyagcsere üteme és emiatt mikroszkopikus frakturák halmozódnak fel az állkapocs állományában. Továbbá, az angiogenesis visszaszorulása avascularis csontsejt-necrosishoz illetve apoptosishoz vezet. A betegség gyógyításában ezidáig egyetlen kezelés sem bizonyult hatásosnak, a terápia teljes mértékben csak tapasztalati. Az állcsontok BP okozta elhalása a környezeti és genetikai tényezők együttes következményeként alakulhat ki. A betegség genetikai hátteréről még nagyon kevés irodalmi adat lelhető fel. Eddig egyetlen gén lehetséges szerepét vizsgálták BP-tal kezelt myeloma multiplexes betegekben. A tanulmány a citokróm P450 *CYP2C8* génben elhelyezkedő egypontos nukleotid polimorfizmus (SNP) és az ONJ között találtak szignifikáns összefüggést. Munkánk célja volt olyan genetikai és klinikai markerek felderítése, amelyek részt vehetnek a BP-ok indukálta állkapocs osteonecrosis kialakulásában, illetve növelhetik az egyén rizikóját a betegség kialakulására.

A Semmelweis Egyetem Arc-, Állcsont-, Szájsebészeti és Fogászati Klinikájával együttműködve összegyűjtöttük 46 biszfoszfonáttal kezelt, diagnosztizált ONJ beteg vérmintáit. A betegek átlag életkora 69,5 év. A vizsgálathoz korban és nemben egyeztetett 224 normál csontparaméterekkel rendelkező kontroll mintáit használtunk. A mintákból meghatároztuk a csontanyagcsere legjellemzőbb laborparamétereit, majd ROCHE High Pure PCR Template Purification kit segítségével genomiális DNS-t izolálunk Az SNP analíziseket az Applied Biosystems Taqman Pre-Designed SNP Genotyping rendszerével végeztük (Applied Biosystems, Foster City, CA). A fluoreszcencia intenzitásokat ABI 7500 RT-PCR rendszerben mértük. Az amplifikációs adatok értékeléséhez 7500 SDS software 1.3 programot használtunk. Az eredmények kiértékeléséhez egy- és többparaméteres statisztikai módszereket alkalmaztunk.

Khi^2 test segítségével nem találtunk szignifikáns különbséget a CYP2C8 gén rs1934951 polimorfizmusának genotípus illetve allél megoszlásában az ONJ és kontroll csoport között. A genotípus megoszlások a következőképpen alakultak: 67,4% normál GG (n=31), 30,4% heterozigota AG (n=14) és 2,2% homozigota AA (n=1) genotípus az ONJ betegek körében összehasonlítva a kontroll csoporttal, ahol 68,7% (n=154), 23,6% (n=53) és 7,6% (n=17) volt a különböző genotípusok aránya. Multiparaméteres logisztikus regresszió analízis felhasználásával kimutattuk, hogy a CYP2C8 vizsgált polimorfizmusa hatással van a betegség lokalizációjára. A gén heterozigota AG genotípusával rendelkezők esetében az ONJ mandibuláris lokalizációjának előfordulása szignifikánsan magasabb volt (19.2x!). Az ONJ megjelenése a mandibuláris régióban (76%) 3,3-szor magasabb volt a maxillához (23%) viszonyítva a CYP2C8 gén AG variációját hordozók körében ($p \leq 0{,}041$). Főkomponens (PCA) analízist alkalmazva kimutattuk, hogy a betegség maxilláris előfordulása pozitív összefüggést mutat a BP-ok intravénás használatával és a szérum zsíranyagcsere markereivel.

Továbbá, az elemzés arra is rávilágított, hogy az ONJ mandibulán történő manifesztálódása összefügg a szérum kalcium és 25-OH-D-vitamin szintjével, valamint a BP adagolás időtartamával (átlagosan 4,79 ± 3,48 év). A betegség visszatérő és súlyos formáját azokban az emlőrákos betegekben találtuk, akik hormon megvonásban is részesültek a biszfoszfonát terápia mellett. Az A allél jelenléte pozitívan korrelált a mandibularis lokalizáció mellett az oralis BP alkalmazással és a csökkent szérum kalcium és 25-OH-D-vitamin szintekkel. A GG genotípus gyakrabban járt együtt a maxillaris ONJ előfordulással, valamint az intravénás BP alkalmazással és eltérő szérum lipid szintekkel.

Vizsgálatunkban biszfoszfonát indukálta állkapocs osteonecrosisban szenvedő betegek számos biokémiai, klinikai és genetikai paraméterét elemeztük, és olyan marker csoportokat azonosítottunk, amelyek jellemzik a betegség lokalizációját. Eredményeink segíthetnek megérteni az ONJ molekuláris patomechanizmusát, illetve rávilágítanak egy olyan potenciális génre, amely farmakológiai célpontokként is szolgálhat a betegség megelőzésében. A kandidáns gén ismeretéből olyan diagnosztikai erővel bíró eljárás fejleszthető, amely az ONJ korai felismerését, illetve a beteg arra való hajlammát mutatja ki.

Balla B, Vaszilko M, Kósa J, Podani J, Takács I, Tóbiás B, Nagy Z, Lazáry Á, Lakatos P: CYP2C8 polymorphism in Hungarian patients with bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw. *Oral diseases – revision (07/12/2011)* IF: 2,145

Kosa J, Balla B, Pintér Cs, Podani J, Kiss L, Takacs I, Speer G, Nagy Zs, Horváth B, Korányi L, Lakatos P: Gene expression changes in femoral head necrosis of human bone tissue. *Annual Meering of the American Society for Bone and Mineral Research,* San Diego, 2011. 09. 11. Proceedings, MO0180.

Balla B, Kósa J, Vaszilkó M, Podani J, Takács I, Tobias B, Nagy Z, Kiss L, Lakatos P: New approach to analyze genetic and clinical data in patients with bisphosphonate induced osteonecrosis of the jaw. *IOF Regionals – 1st Middle-East and Africa Osteoporosis Meeting,* Dubai, United Arab Emirates, 2011. október 19-22. *Osteoporosis Int* 2011, 22(S5):P153.

Kósa J, Balla B, Vaszilkó M, Zsarkó M, Takács I, Tobias B, Nagy Z, Lazáry Á, Lakatos P: Examination of CYP2C8 rs1934951 polymorphism in Hungarian patients suffering from bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw. *European Congress on Osteoporosis and Osteoarthritis - IOF-ECCEO12,* Bordeaux, France, 2012. március 21-24.

GENETIC BACKGROUND OF BISPHOSPHONATE-INDUCED OSTEONECROSIS OF THE JAW

Péter Lakatos, János Kósa, Bernadett Balla
1st Department of Internal Medicine, Semmelweis University, Budapest, Hungary

Bisphosphonates are the most important antiresorptive agents in metabolic bone diseases and bone metastases. They are frequently used in patients with osteoporosis and in the treatment of bone metastases due to different malignant cancers. A potential severe side effect associated with bisphosphonate therapy is the osteonecrosis of the jaw (ONJ). The vast majority of ONJ cases have been reported in patients receiving intravenous administration of high dose nitrogen-containing bisphosphonates. Multiple factors have been involved in the pathomechanism which leads to the manifestation of bisphosphonate-induced ONJ. Cytotoxic effect of bisphosphonates on osteoclast results in over-suppression of bone remodeling process. In addition, these drugs inhibit angiogenesis, which leads to avascular bone cell necrosis and apoptosis. Numerous predisposing risk factors are known to affect the development of bisphosphonate-related ONJ. Therapy with steroids and cytostatic agents, the patient's immunocompetence and other comorbidities (such as diabetes mellitus, obesity, parodontopathies, poor oral hygiene, smoking and hypercholesterolemia) have been found to be associated to ONJ. However, very limited data are available on ONJ marker genes. The possible role of cytochrome P450 CYP2C8 gene has been investigated in connection with this disease, although the results are contradictory. CYP2C8 rs1934951 single nucleotide polymorphism (SNP) was associated with bisphosphonate-related ONJ in multiple myeloma. In another study, this SNP did not show correlation with jaw osteonecrosis in patients suffering from prostate cancer. We aimed to investigate the effect of CYP2C8 rs1934951 SNP and its relationship to a number of clinical and biochemical factors in Hungarian subjects with bisphosphonate-induced ONJ.

Forty six Hungarian subjects suffering in bisphosphonate-induced ONJ were recruited for the study. The diagnosis of ONJ was based on the following criteria: exposed bone in the mandible, maxilla or both which persists for at least 8 weeks, in the absence of previous radiation and metastases in the jaws. Patients were classified in staging system for ONJ recommended by The American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. The control group for the analysis of CYP2C8 rs1934951 polymorphism included 224 blood samples from healthy Hungarian unrelated patients. Exclusion criteria were history of bone, metabolic, or endocrine disease; any chronic illness; hormone replacement, steroid therapy. Blood samples were collected from each subject, and genomic DNA was extracted using High Pure PCR Template Purification kit (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany). The genetic analysis of this CYP2C8 (rs1934951) polymorphism was carried out by pre-designed TaqMan primer/probe sets (Applied Biosystems Foster City, CA, USA). The fluorescent intensity of the PCR products was measured using the ABI 7500 RT-PCR System (Applied Biosystems). The distribution of CYP2C8 rs1934951 genotypes and alleles in healthy and ONJ populations was analyzed by Chi^2-tests.

The genotype distribution was 67.4% normal GG (n=31), 30.4% heterozygote AG (n=14) and 2.2% homozygote AA (n=1) genotype in ONJ patients compared to 68.7% (n=154), 23.6% (n=53) and 7.6% (n=17), respectively, in control samples. There was no difference detected by Chi^2-test in CYP2C8 rs1934951 genotype or allele distribution between ONJ and healthy subjects. In the multivariate logistic regression model, AG genotype was associated with a 19.2-fold increased risk for mandibular ONJ compared to the GG genotype.

ONJ presence in the mandibular region (76%) increased 3.3-fold compared to maxilla (23%) in case of AG carriers ($p \leq 0.041$). There was no significant variation of ONJ localization site in patients with GG genotype (mandible 58%: maxilla 42%, respectively). By multiparametric PCA, strong positive correlation was detected between maxillar localization of ONJ and a group of variables including intravenous bisphosphonate application and serum lipid markers (triglyceride, cholesterol, HDL, LDL). Mandibular localization of ONJ was correlated with another set of variables including serum calcium and 25-OH-vitamin D levels, oral bisphosphonate application and the length of bisphosphonate therapy (mean 4.79 ± 3.48 years). The degree of the disease and the number of recurrences were correlated with the application of hormone-deprivation therapy for breast cancer patients. Also, different variable groups could be ordered to each CYP2C8 rs1934951 allele. The presence of A allele (AA and AG genotype) was positively associated not only with mandibular localization of ONJ but also with oral bisphosphonate use, low serum calcium and 25-OH-vitamin D vitamin levels. GG genotype was related to maxillar localization of ONJ, intravenous bisphosphonate application and serum lipid markers.

In this study, we demonstrated a significant positive correlation between CYP2C8 rs1934951 polymorphism and the localization of ONJ among the affected patients. The occurrence of the mandibular ONJ was significantly higher in AG carriers. Applying PCA to analyze a number of clinical and biochemical factors in subjects with bisphosphonate-associated ONJ, we could sharply separate different groups of variables significantly related to the pathological process. Our data may provide a deeper insight into the pathogenesis of bisphosphonate-induced ONJ, as well as the introduction of PCA into data analysis may contribute to this process.

Balla B, Vaszilko M, Kósa J, Podani J, Takács I, Tóbiás B, Nagy Z, Lazáry Á, Lakatos P: CYP2C8 polymorphism in Hungarian patients with bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw. *Oral diseases – revision (07/12/2011)* IF: 2,145

Kosa J, Balla B, Pintér Cs, Podani J, Kiss L, Takacs I, Speer G, Nagy Zs, Horváth B, Korányi L, Lakatos P: Gene expression changes in femoral head necrosis of human bone tissue. *Annual Meering of the American Society for Bone and Mineral Research,* San Diego, 2011. 09. 11. Proceedings, MO0180.

Balla B, Kósa J, Vaszilkó M, Podani J, Takács I, Tobias B, Nagy Z, Kiss L, Lakatos P: New approach to analyze genetic and clinical data in patients with bisphosphonate induced osteonecrosis of the jaw. *IOF Regionals – 1st Middle-East and Africa Osteoporosis Meeting*, Dubai, United Arab Emirates, 2011. október 19-22. *Osteoporosis Int* 2011, 22(S5):P153.

Kósa J, Balla B, Vaszilkó M, Zsarkó M, Takács I, Tobias B, Nagy Z, Lazáry Á, Lakatos P: Examination of CYP2C8 rs1934951 polymorphism in Hungarian patients suffering from bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw. *European Congress on Osteoporosis and Osteoarthritis - IOF-ECCEO12,* Bordeaux, France, 2012. március 21-24.

Teljes támogatás: 3.000.000,- Ft

TELÍTETLEN ZSÍRSAV-DÚS DIÉTA ÉS FIBRÁTOK EGYÜTTES HATÁSA KÍSÉRLETES SZÍVIZOM INFARKTUSBAN

Leprán István, Kun Attila, Morvay Nikolett
SZTE-ÁOK, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

A telítetlen zsírsavakban dús diéták alkalmazását széles körben javasolják a keringési megbetegedések kockázatának csökkentésére. A zsírsavak – számos hatásuk mellett – a szívizomzatban, erekben megtalálható transzkripciós faktor, a peroxisoma proliferációt aktiváló-α receptor (PPARα) endogén ligandjai. A fibrát származékokat – melyek szintén a PPARα aktivátorai – a hiperlipidémiák, elsősorban a hipertrigliceridémia kezelésében alkalmazzák. Vizsgálataink célja a telítetlen zsírsav-dús diéta és a fenofibrát kísérletes akut, ill. krónikus szívizom károsodás során kifejtett esetleges védőhatásának vizsgálata volt.

Kísérleteinkhez hím, Sprague-Dawley CFY törzshöz tartozó, 260-300 g tömegű patkányokat használtunk. Az állatok 10 % napraforgó olajjal (PUFA; n-6 típusú telítetlen zsírsav-dús diéta), ill. sertés zsírral (SF; telített zsírsav-dús diéta) kiegészített standard patkánytápot fogyasztottak.

Antiaritmiás hatás vizsgálata: Vizsgáltuk az endogén cannabinoidok (telítetlen zsírsavakból keletkező anyagok; CB1-CB2 receptoron kifejtett hatásuk mellett PPAR aktiváló hatásukat is kimutatták) hatását a 6 perc szívizom ischaemiát követő reperfúzió alatt kialakuló aritmiákra. Eredményeink szerint a CB1 (AM251, 3mg/kg ip.) ill. CB2 (AM630, 1mg/kg ip.) receptor antagonista előkezelés csökkentette a PUFA diéta védőhatását. Ez a gátlás arra utal, hogy az ischaemia során fokozott endocannabinoid szintézis hozzájárulhat a PUFA diéta aritmiák számát-súlyosságát csökkentő hatásának kialakulásához.

Akut szívelégtelenség vizsgálata: Négy hétig tartó diétás periódus végén pentobarbital narkózisban a mellkas megnyitása után akut bal coronaria artéria elzárást hoztunk létre, amit 40 perc elteltével 120 perc reperfúzió követett. Kísérleteink során regisztráltuk a balkamrai nyomás változását és az EKG-t. Az előzetes PUFA-diéta csökkentette a coronaria arteria lekötés során a kamrai aritmiák kialakulását és javította a túlélési esélyeket, az aritmia pontszám jelentősen csökkent (2,65±0,50 vs. 4,21±0,48, $P<0,05$). Az SF táplálékot fogyasztó csoportban tartós fenofibrát előkezelés (150 mg/kg/nap per os) önmagában is csökkentette az aritmiák kialakulását (aritmia pontszám: 3,19±0,49); a PUFA-diétás csoportban pedig további jelentős védelmet eredményezett (aritmia pontszám 1,86±0,47, $P<0,01$ az SF kontroll csoporthoz hasonlítva). Eredményeink szerint a krónikus fenofibrát kezelés patkány modellen önmagában is jelentős mértékben csökkenti a 40 perc ischaemia + 120 perc reperfúzió hatására kialakuló károsodást. PUFA diéta alkalmazása esetén a PPARα receptor aktiváció eredményeként kialakuló védőhatás még kifejezettebb.

Krónikus szívelégtelenség vizsgálata: Hím Sprague-Dawley patkányokon éter narkózisban, a bal coronaria artéria lekötésével szívizom infarktust hoztunk létre. Kettő héttel a műtétet követően az infarktus akut fázisát túlélő állatok SF, vagy PUFA kiegészített tápot fogyasztottak 10 héten át. A diétás periódus végén pentobarbital narkózisban echocardiográfiás vizsgálatokat végeztünk (GE Vivid S5, 12 MHz) M-módban és Doppler-módban. A kontroll felvételek után dobutamin-stresszt alkalmaztunk, mely során regisztráltuk a szívfrekvencia- és az artériás vérnyomás változását. A kísérleti periódus végén az infarktusos károsodás nagyságát nitroblue-tetrazolium festéssel határoztuk meg.
Eredményeink szerint az ejekciós frakció, a frakcionális rövidülés és a perctérfogat egyaránt csökkent 12 hetes szívizom infarktus során az SF csoportban, az álműtött csoporthoz hasonlítva (48±7,1 vs. 66±7,0 %; 22±4,1 vs. 34±5,5 %; 15,2±1,2 vs. 20,3±2,8 ml/min/100g). Ezen paraméterekben nem volt szignifikáns eltérés az SF ill. PUFA diétát fogyasztó csoportok között. A dobutamin-stressz hatására jelentősen emelkedett a perctérfogat, de a diétás csoportok között nem

volt szignifikáns eltérés (18,1±1,3 vs. 14,9±1,8 ill. 18,4±2,0 vs. 13,1±1,7 ml/perc/100 g az SF ill. PUFA diétás állatokban). Következtetésünk szerint, a telítetlen zsírsav-dús diéta védő hatású az akut szívizom infarktus kialakulásával szemben, a szívizom infarktus kialakulását követően két héttel elkezdett diéta azonban nem eredményez jelentős védelmet a krónikus szívelégtelenség kialakulásával szemben.

Izolált coronaria arteria vizsgálata: A jobb coronaria artéria (rezisztencia típusú ér) preparálása után izolált érgyűrűk mechanikai aktivitását vizsgáltuk izometriás erőmérővel. Megállapítottuk, hogy az endotélium-függő, acetilkolin (ACh) kiváltotta relaxáció maximuma nem különbözött jelentősen az SF és PUFA csoportban, azonban a PUFA csoportban a dózis-hatás görbe jobbra tolódása figyelhető meg. A PUFA csoportban a ciklooxigenáz enzim gátló indomethacin (INDO) jelenlétében az ACh relaxáció lecsökkent és a dózis-hatás görbe jobbra tolódott, ami a ciklooxigenáz-komponens nagyon jelentős szerepére utal. A nitrogén monoxid (NO) szintáz gátló L-NAME és az INDO együttes jelenlétében az ACh nem hozott létre értónus csökkenést, vagyis – más érterületekkel ellentétben – patkány izolált koszorúéren az endotélium-függő relaxációban az endotélium-eredetű hiperpolarizáló faktor nem játszik szerepet.
Fenofibrat előkezelést követően megfigyelhető ACh dózis-hatás görbe jobbra tolódása a PUFA csoportban. Indomethacin jelenlétében azonban az ACh dózis hatás görbe maximuma csak kis mértékben csökkent, a pD_2 érték nem változott jelentősen. Az eredmény arra utal, hogy a fenofibrát előkezelés növeli az NO hozzáférhetőségét és csökkenti a ciklooxigenáz komponens szerepét az endotélium-függő relaxációban.
Az endotélium-független NO donor nitroprusszid-Na hatásmaximuma és pD_2 értéke nem változott meg SF vagy PUFA diétát követően. Fenofibrát előkezelés nem befolyásolta ezt a hatást.
A simaizom sejteken található magas konduktanciájú Ca^{2+}-aktiválta K^+ csatorna (BK_{Ca}) aktivációja fontos szerepet játszik az NO mediál érrelaxáció kialakulásában. A szelektív csatorna-blokkoló iberiotoxin minden vizsgált csoportban jelentősen gátolta az NO donor nitroprusszid-Na hatását. A BK_{Ca} csatorna aktivátor NS11021 dózis-függő módon csökkentette az erek tónusát, azonban a PUFA csoportban a dózis-hatás görbe jobbra tolódása figyelhető meg. Fenofibrát előkezelés nem befolyásolta a BK_{Ca} csatorna aktivátor maximális hatását, azonban az SF csoportban a dózis-hatás görbe balra tolódott. Eredményeink szerint a telített zsírsavban dús diéta patkány izolált coronaria arterián a BK_{Ca} csatorna aktivitásának csökkenését idézi elő, amit tartós fenofibrát előkezelés képes helyreállítani.

Morvay N, Leprán I: Endocannabinoidok szerepe a telítetlen zsírsav-dús diéta cardioprotektív hatásában. Magyar Élettani Társaság LXXIV. Vándorgyűlése, Szeged, P73 (2010)

Lepran I, Morvay N: Possible role of endocannabinoids in the cardioprotective effects of a polyunsaturated fatty acid-rich diet in rats. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 107 (Suppl. 1), p408 (2010)

Morvay N, Leprán I: Tartós fenofibrát előkezelés hatása szívizom ischemia-reperfúzió által létrehozott károsodásra altatott patkányban. Cardiologica Hungarica 41: F37 (2011)

Morvay N, Leprán I: PPARα aktivátor előkezelés hatása szívizom ischemia-reperfúzió által létrehozott károsodásra különböző zsírdiéták után patkányban. Magyar Farmakológus, Anatómus, Mikrocirkulációs és Élettani Társaságok Közös Tudományos Konferenciája, Pécs, P24-10 (2011)

Morvay N, Leprán I: Effects of a polyunsaturated fatty acid-rich diet on the development of heart failure after myocardial infarction in rats. 75th Anniversary of Albert Szent-Györgyi's Nobel Prize Award Conference, Szeged (2012)

Morvay N, Leprán I: Telítetlen zsírsav-dús diéta echocardiográfiás vizsgálata szívizom infarktust követő szívelégtelenség során patkányban. Magyar Kardiológusok Társasága Tudományos Kongresszusa, No. 4796 (2012)

Budget: 3.000,000.- HUF

EFFECT OF THE COMBINATION OF POLYUNSATURATED FATTY ACID RICH DIET AND FIBRATES IN EXPERIMENTAL MYOCARDIAL INFARCTION

István Leprán, Attila Kun, Nikolett Morvay
Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Faculty of Medicine, University of Szeged

A diet rich in unsaturated fatty acids are widely recommended to reduce the risk of cardiovascular diseases. Fatty acids – among many actions – are endogenous ligands of the peroxisome proliferator-activated receptor α (PPARα) in the myocardium and blood vessels. Fibrate derivatives – that are also PPARα activators – used in the treatment the hyperlipidemia, hyper-triglyceridemia. The aim of our investigations was to study the effects of unsaturated fatty acid-rich diet and fenofibrate in experimental acute and chronic myocardial infarction.

In these experiments male Sprague-Dawley CFY rats, weighing 260-300 g were used. The animals were fed with standard rat chow, supplemented by 10% sunflower seed oil (PUFA, n-6 polyunsaturated fatty acid-rich diet), or pork fat (SF, saturated fat-rich diet).

Antiarrhythmic effects: We investigated the role of endocannabinoids (unsaturated fatty acids derivatives; also activating PPAR besides their CB_1-CB_2 receptor effect) in the development of reperfusion induced arrhythmias after 6 minutes myocardial ischemia. We found that pretreatments with both the CB_1 (AM251, 3 mg/kg ip.) and CB_2 (AM630, 1 mg/kg ip.) receptor antagonist reduced the protective effect of dietary PUFA. These results suggest that increased endocannabinoid synthesis during ischemia may contribute to the protective effect of PUFA diet against the development of reperfusion induced arrhythmias.

Investigations in acute heart failure: After a four-week diet, during pentobarbitone anesthesia the chest was opened and acute coronary artery occlusion was maintained for 40 minutes, that followed by 120 min of reperfusion. The left ventricular pressure and ECG changes were recorded. PUFA diet reduced the development of ventricular arrhythmias and improved survival, significantly decreased the arrhythmia score (2.65±0.50 vs. 4.21±0.48, $P<0.05$). Long-term pretreatment with fenofibrate (150 mg/kg/day orally) in SF diet also reduced the development of arrhythmias (arrhythmia score: 3.19±0.49). In the PUFA diet group fenofibrate resulted in a further significant protection (arrhythmia score 1.86±0.47, $P<0.01$ compared to control SF). These investigations suggest that during acute heart failure in rats a long-term pretreatment with fenofibrate significantly reduces myocardial damage. PUFA diet in combination with the PPARα receptor activator results in even more pronounced protective effect.

Investigations in chronic heart failure: In male Sprague-Dawley rats during ether anesthesia, the left coronary artery was occluded to establish myocardial infarction. In the survivors of the acute phase of myocardial infarction, two weeks after surgery SF or PUFA supplemented diet was administered for 10 weeks. At the end of the diet period, during pentobarbitone anesthesia echocardiographic measurements were performed (GE Vivid S5, 12 MHz) in M-mode and Doppler mode. After the control recordings dobutamine-stress was applied, and the heart rate and arterial blood pressure changes were recorded. At the termination of the experiments, the myocardial infarct size was determined after nitro-blue tetrazolium staining.
Our results show that the ejection fraction, fractional shortening and cardiac output are reduced by 12 weeks of myocardial infarction in the SF group compared to controls (48±7.1 vs. 66±7.0%, 22±4.1 vs. 34±5.5%, 15.2±1.2 vs. 20.3±2.8 ml/min/100g). These parameters were not significantly different between the SF and PUFA diet fed animals. The dobutamine-stress significantly increased the cardiac output in both dietary groups (18.1±1.3 vs. 14.9±1.8, 18.4±2.0 vs. 13.1±1.7 ml/min/100g in the SF and PUFA diet animals, respectively). Our conclusion is that the unsaturated fatty acid-rich diet is protective against the development of acute myocardial infarction, while

similar diet, starting two weeks after myocardial infarction did not offer significant protection against the progression of chronic heart failure in rats.

Testing isolated coronary artery rings: The right coronary artery (resistance-type vessel) was isolated and the contractile activity of isolated rings examined by isometric force transducer. Endothelium-dependent, acetylcholine (ACh)-induced maximum relaxation response did not significantly differ between SF and PUFA fed animals; the dose-response curve in the PUFA group, however, shifted to the right. After PUFA feeding, the cyclooxygenase inhibitor indomethacin (INDO) decreased the maximal effect of ACh relaxation and the dose-response curve was shifted to the right, suggesting the dominance of cyclooxygenase-compounds in the relaxation response. ACh induced vasorelaxation was completely abolished by the co-administration of nitric oxide (NO) synthase inhibitor (L-NAME) and INDO. This means that – unlike to other vessel types – the endothelium-derived hyperpolarizing factor does not play a significant role in the endothelium-dependent relaxation of the isolated rat coronary artery.
After pretreatment with fenofibrate in the PUFA group, ACh dose-response curve was further shifted to the right. Indomethacin, however, only slightly reduced the maximum of ACh dose-response curve, and the pD_2 value does not differ significantly. These results suggest that pretreatment with fenofibrate improves NO availability and reduces the role of the cyclooxygenase component of endothelium-dependent relaxation.
The maximum effect and the pD_2 of the NO donor sodium nitroprusside in SF and PUFA diet does not differ significantly. Pre-treatment with fenofibrate did not influence this response.
The high conductance Ca^{2+}-activated K^+ channels (BK_{Ca}) play an important role in the mediation of NO-induced vasorelaxation in smooth muscle cells. The selective channel blocker, iberiotoxin significantly inhibited the effects of sodium nitroprusside in all studied groups. The BK_{Ca} channel activator, NS11021 dose-dependently decreased the vascular tone; however, after PUFA feeding, a shift to the right is observed. Fenofibrate pretreatment did not influence the maximal response to the BK_{Ca} channel activator, but in the SF group, the dose-response curve is shifted to the left. We may assume that in rat isolated coronary arteries a saturated fatty acid rich diet induces a decrease in response to the BK_{Ca} channel activation that may be improved by long-term fenofibrate pretreatment.

Morvay N, Leprán I: The role of endocannabinoids in the cardioprotective effect of unsaturated fatty acid-rich diet. LXXIV. Conference of Hungarian Physiological Society, Szeged, P73 (2010)

Lepran I, Morvay N: Possible role of endocannabinoids in the cardioprotective effects of a polyunsaturated fatty acid-rich diet in rats. BASIC & CLINICAL PHARMACOLOGY & TOXICOLOGY, 107 (Suppl. 1), p408 (2010)

Morvay N, Leprán I: Effects of long-term fenofibrate pretreatment on the severity of ischemia-reperfusion induced arrhythmias in anesthetized rats. CARDIOLOGICA HUNGARICA 41: F37 (2011)

Morvay N, Leprán I: Influence of pretreatment with a PPARα activator on myocardial ischemia-reperfusion induced damage after feeding different fatty acids in rats. Joint Conference of Hungarian Pharmacological, Anatomy, Microcirculation and Physiology Societies, Pécs, P24-10 (2011)

Morvay N, Leprán I: Effects of a polyunsaturated fatty acid-rich diet on the development of heart failure after myocardial infarction in rats. 75th Anniversary of Albert Szent-Györgyi's Nobel Prize Award Conference, Szeged (2012)

Morvay N, Leprán I: Echocardiographic investigation of a polyunsaturated fatty acid-rich diet on the development of heart failure after myocardial infarction in rats. Conference of the Hungarian Cardiology Society, No. 4796 (2012)

Teljes támogatás: 5 850.000,- Ft

NEUTROFIL GRANULOCITÁK MŰKÖDÉSVÁLTOZÁSA KÁROSÍTÓ KÖRNYEZETI TÉNYEZŐK HATÁSÁRA

Ligeti Erzsébet[1], Timár Csaba[1], Lőrincz Ákos[1], Hably Csilla[1], Iványi Zsolt[2], Kolonics Ferenc[1], Béres András[1]
[1]Semmelweis Egyetem Élettani Intézet, [2]Semmelweis Egyetem Aneszteziológiai és Intenzívterápiás Klinika

Kutatásaink fő célja a neutrofil granulociták (PMN) védekező mechanizmusainak vizsgálata károsító környezeti ártalmakkal szemben, különös tekintettel az eltérő eredetű szepszises állapotokra. Vizsgálatainkat két központi kérdés köré csoportosítottuk:

1. A PMN-eredetű mikrovezikulumok (MV) biológiai szerepének tisztázása

Első lépésként az egészséges donorokból származó PMN-ek által termelt MV áramlási citométerrel történő azonosítását és számszerűsítését dolgoztuk ki. A részecskék mérettartománya (200-800 nm) ugyanis a rutin citométerek mérési tartományának alsó határán van. A CD11b marker elleni antitesttel történő jelölés alkalmas módszernek bizonyult az izolált PMN-ből származó MV detektálására. A humán szérumban jelenlevő, a legkülönbözőbb sejtféleségből származó MV-k között a PMN-eredetűek detektálására CD11b valamint CD177 elleni antitesttel történő kettős jelölést dolgoztuk ki. Ezzel a módszerrel megállapítottuk, hogy egészséges donorok vérében is jelen vannak PMN-eredetű MV-k, szepszises betegekben viszont ezek száma több mint 3-szor magasabb. A jelenlegi esetszám (18) nem teszi még lehetővé a klinikai paraméterek és a MV-szám összefüggésének megbízható elemzését.

Az izolált PMN-ből származó, baktériumnövekedést gátló MV hatásmechanizmusának elemzése során megállapítottuk, hogy a baktériumot és MV-t tartalmazó nagy (1,5 μm-t meghaladó átmérőjű) aggregátumok kialakulása korrelál az antibakteriális hatással. Egészséges donorok szérumából származó PMN-eredetű MV alig mutatott aggregációs hajlamot, míg a szepszises betegekből származó részecskék nagy arányban képeztek aggregátumot friss, nem-opszonizált baktériumokkal. Konfokális mikroszkópos video-felvételeken, fluoreszcens fehérjével jelzett baktériumok segítségével kimutattuk, hogy az aggregátumokon belül a baktériumok szaporodása lassubb, mint szabad környezetben.

2. A PMN-funkciók változásainak jellemzése klinikailag eltérő szepszis-formákban

Előkísérleteinkben megvizsgáltuk a szepszisesre jellemző, változó környezeti tényezők hatását az egészséges donorból származó PMN-ek szuperoxid-termelő és baktériumölő képességére. Megállapítottuk, hogy sem a pH, (7,2 és 7,6 között), sem a hőmérséklet (37-39ºC), sem a glukóz koncentráció (5-15 mM), sem a K^+ koncentráció (5-7 mM) változásai nem befolyásolták a PMN-ek vizsgált funkcióit.

Ezt követően szigorú kritériumok alapján válogatott (krónikus betegség, diabetes mellitus, immunszuppresszív vagy citosztatikus kezelés hiánya), akut szepszises betegek véréből izolált PMN-eken a következő paramétereket mértük meg: spontán szuperoxid termelés, maximális szuperoxid-termelés farmakológiai (PMA) valamint bakteriális ingerekre, baktérium túlélés különböző bakteriális terhelés (baktérium/PMN arányt 10 és 300 között változtatva) mellett. Mind a szuperoxid-termelést, mind a baktérium túlélési tesztet kétféle baktériummal (S. aureus valamint E. coli) végeztük el. Eredményeink azt mutatják, hogy a szepszises betegből származó PMN-ek spontán szuperoxid termelése lényegesen meghaladja az egészséges egyénből származó sejtekét, ugyanakkor mind a maximális szuperoxid-termelő, mind a maximális baktériumölő kapacitás jelentősen beszűkült. Az eddig összegyűjtött esetszám (7 $Gram^-$ és 7 $Gram^+$ baktériummal fertőzött beteg) nem teszi lehetővé a kórokozó típusa, valamint a kiindulási góc szerinti elkülönített elemzést. Az összes eset együttes elemzése viszont egyértelmű összefüggést mutat a klinikai állapot (APACHE score) és a spontán szuperoxid termelés, valamint a maximális kapacitások (szuperoxid

termelés és baktériumölés) között. A klinikai beteganyag vizsgálatát tovább folytatjuk, amíg a tervezett elemzések statisztikailag értékelhető eredményt adnak.

Közlemény:

Antibacterial effect of microvesicles released from human neutrophilic granulocytes

Csaba I. Timár[1*], Ákos M. Lőrincz[1*], Roland Csépányi-Kömi[1], Anna Vályi-Nagy[1], György Nagy[2], Edit Buzás[2], Zsolt Iványi[3], Ágnes Kittel[4], David W. Powell[5], Kenneth R. McLeish[5,6], Erzsébet Ligeti[1]

Közlésre beküldve

Teljes támogatás: 5 850.000,- Ft

ALTERATION OF NEUTROPHIL GRANULOCYTIC FUNCTIONS BY DAMAGING ENVIRONMENTAL FACTORS

Erzsébet Ligeti[1], Csaba Timár[1], Ákos Lőrincz[1], Csilla Hably[1], Zsolt Iványi[2], Ferenc Kolonics[1], András Béres[1]

[1]Semmelweis University, Department of Physiology, [2]Semmelweis University, Clinic for Anaesthesiology and Intensive Therapy

The main goal of our study is the investigation of the defense mechanisms of neutrophilic granulocytes (PMN) against damaging environmental factors, with special emphasis on septic conditions of different origin. We focussed our examinations on two major problems:

1. Investigation of the biological role of PMN-derived microvesicles (MV)

First we established the methodology of identification and quantification of MV issued from PMN of healthy donors by flow cytometry. According to our earlier studies, the size of the PMN-derived MV (200-800 nm) is at the lower limit of the measuring range of flow cytometers. In case of isolated cells, fluorescent antibodies against the marker CD11b proved to be as a suitable method for detection of PMN-derived MV. However, the human serum contains MV issued from a large variety of cells (platelets, lymphocytes, endothel cells, occasionally tumor cells). In this environment double-labeling by antibodies against the markers CD11b and CD177 proved to be necessary for identification of PMN-derived vesicles. With help of this method, we detected PMN-derived MV also in the serum of healthy donors. However, in the serum of septic patients their number was more than 3-fold higher. At the present stage of our investigations the number of investigated patiens (18) does not yet allow the profound analysis of the relation of MV-count with the clinical parameters.

Our investigations with MV issued from isolated PMN revealed that the formation of large (above 1.5 μm) aggregates between MV and bacteria correlated well with the antibacterial effect. MV isolated from the serum of healthy donors did not show any aggregation, whereas vesicles isolated from the serum of septic patients had an increased tendency to formation of aggregates with non-opsonized bacteria. In confocal microscopic images, using bacteria labelled with fluorescent protein, we could show that in the aggregates bacterial proliferation is significantly inhibited.

2. Characterization of the alteration of PMN functions in clinically divergent forms of sepsis

In our preliminary experiments we investigated the effect of various environmental factors on the superoxide producing and bacterial killing capacity of PMN isolated from healthy donors. We observed that alteration of the pH (between 7.2 and 7.6), temperature (37-39ºC), glucose (5-15 mM) and K^+ concentration (5-7 mM) did not affect the measured granulocytic functions.

As a next step, we investigated the function of PMN isolated from acute septic patients. The patients were selected carefully: they did not have diabetes mellitus or any other chronic disease and did not obtain any immunosuppressive or cytostatic treatment. The following parameters were determined: spontaneous superoxide production, maximal superoxide production induced by pharmacological agent (PMA) or by different bacteria, bacterial survival following different bacterial load (ratio of bacteria to PMN was changed between 10 and 300). Both superoxide production and bacterial killing were determined with two different bacteria (*S. aureus* and *E. coli*). Our results indicate that PMN isolated from septic patiens have a significantly elevated spontaneous superoxide production, but their maximal capacity both for superoxide formation and bacterial killing is seriously diminished. The current number of investigated patients (7 + 7 patients infected with Gram positive resp. Gram negative bacteria) does not allow a separated analysis of the relation between PMN functions and clinical state according to the bacterial status or origin of infection. However, analysis of all our results indicates positive correlation between the clinical status

(APACHE II score) and the spontaneous superoxide production resp. maximal antibacterial capacities of PMN. Investigation of the clinical samples will be continued till statistically relevant analysis can be done.

Publication:

Antibacterial effect of microvesicles released from human neutrophilic granulocytes

Csaba I. Timár1*, Ákos M. Lőrincz1*, Roland Csépányi-Kömi1, Anna Vályi-Nagy1, György Nagy2, Edit Buzás2, Zsolt Iványi3, Ágnes Kittel4, David W. Powell5, Kenneth R. McLeish5,6, Erzsébet Ligeti1

Submitted for publication

Teljes támogatás: 6.000.000,- Ft

A TROMBUS KELETKEZÉSÉT ÉS FELOLDÁSÁT BEFOLYÁSOLÓ KOMPONENSEK

Machovich Raymund[1], Kolev Kraszimir[1], Komorowicz Erzsébet[1], Léránt István[1], Wohner Nikolett[1], Bóta Attila[2], Keresztes Zsófia[2], Szabó László[2]
[1] Semmelweis Egyetem, Orvosi Biokémiai Intézet, [2]MTA, Kémiai Kutatóközpont

A trombus keletkezését és feloldását a véralvadási-fibrinolítikus rendszeren kívül befolyásolja az endotélium, az érfal szerkezete és mechanikai tényezők is, illetve a vér egyes celluláris elemei, mint pl. a vérlemezke, a polimorfonukleáris sejt, a vörösvértest (RBC) és egyéb a vérben előforduló molekuláris elem is mint pl. a von Willebrand faktor, leukocita elasztáz, foszfolipidek, immunglobulinok.
A jelen kutatási eredmények azt jelzik, hogy különböző proteázok az érfal emésztése révén trombogén hatásúak, majd fibrinolítikus tulajdonságúak is lehetnek pl. leukocita (1, 2,). A trombus keletkezésében a fibrinogén mellett a vérlemezke játssza a legfontosabb szerepet. Az utóbbi kollagén általi aktivációjában a vonWillebrand faktornak (vWF) van kitüntetett szerepe.
A vWF amellett, hogy szerepet játszik a vérlemezke-érfal kölcsönhatásában, gátolja a fibrinogén plazmin általi degradációját (3) és így az továbbra is alvadóképes marad. A vWF funkcióját részben annak optimális mérete határozza meg, amelyet limitált proteolízis szabályoz. Ebben több enzim (plazmin, elasztáz, trombin) is szerepet játszhat (4).
A trombusokban (egy trombuson belül is különböző eloszlásokban) RBC-ek találhatók, amelyek módosíthatják a fibrin struktúráját és gátolják a plazminogén tPA-val történő aktivációját. Az eredmény a fibrin lítikus rezisztenciája (5). A legújabb experimentális adatok azt jelzik, hogy mechanikai stress (pl. a fibrin szerkezetének megfeszülése a véráramlástól függően) gátlólag hat a plazminogén aktivációjára és így a fibrin feloldására is (6).

1. Wohner N, Keresztes Z, Sótonyi P, Szabó L, Komorowicz E, Machovich R and Kolev K: Neutrophil granulocyte-dependent proteolysis enhamces platelet adhesion to the arterial wall under high-shear flow. ***J. Thromb. Haemost.*** 8: 1624-163, (2010). IF: 6,069
2. Rábai Gy, Szilágyi N, Sótonyi P, Kovalszky I, Szabó L, Machovich R and Kolev K.: Contribution of neutrophil elastase to lysis of obliterating thrombi in the context of their platelet and fibrin content. ***Thromb. Res.*** 126: 94-101, (2010). IF: 2,406.
3. Tanka-Salamon A, Kolev K, Machovich R, and Komorowicz E: Proteolytic resistance conferred to fibrinogen by von Willebrand factor. ***Thromb Haemost*** 103: 291-294, (2010). IF: 4,451
4. Wohner N, Kovács A, Machovich R and Kolev K.: Modulation of the von Willebrand factor-dependent platelet adhesion through alternative proteolytic pathway. ***Thromb. Res.*** In press (2011). IF: 2,406.
5. Wohner N, Sótonyi P, Machovich R Szabó L, Tenekedijev K, Silva M.M.C.G, Lonstaff C and Kolev K : Lytic resistance of fibrin containing red blood cells. ***Arterioscler Thromb Vasc Biol.*** DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.229088. (2011). IF: 7,21.
6. Varju I, Sótonyi P, Machovich R, Szabó L, Tenekedijev K, Silva MMCG, Longstaff C and Kolev K: Hindered dissolution of fibrin formed under mechanical stress. ***J. Thromb. Haemost.*** 9: 979-986, (2011). IF: 6,069

Budget: 6.000.000.- HUF

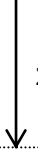
FACTORS INFLUENCING THE FORMATION AND DISSOLUTION OF THROMBUS

Raymund Machovich[1], Kraszimir Kolev [1], Erzsébet Komorowicz [1], István Lérant [1], Nikolett Wohner [1], Attila Bóta [2], Zsófia Keresztes [2], László Szabó [2]
[1] Semmelweis University, Department of Medical Biochemistry, [2] Chemical Research Center of the Hungarian Academy of Sciences

The formation and dissolution of a thrombus is influenced by the blood coagulation-fibrinolytic system, the endothelium, structure of blood vessel wall, mechanical factors and by cellular and molecular components such as platelet, polimorphonuclear cell, red blood cell (RBC), von Willebrand factor, leukocyte elastase, phospholipids, immunglobulins, present in blood circulation. Our research results indicate that the various proteases may be thrombogenic and also fibrinolytic via digesting the blood vessel wall (1,2).
In the formation of a thrombus, besides fibrinogen the platelets play the most important role. To the activation of platelet von Willebrand factor (vWF) contributes significantly. vWF participates in the interaction of platelet and blood vessel wall, also inhibites degradation of fibrinogen by plasmin (3) and in this way it is further clotable. The function of vWF is partly determined by its size, which is controlled by limited proteolysis. In these reactions several enzymes (plasmin, elastase, thrombin) may also play a role (4). In the thrombi RBCs (inside a single thrombus at various distributions) are present, which modify the structure of fibrin and also inhibite the activation of plasminogen by tPA. The consequence is the lytic resistance of fibrin (5). The recent experimental data indicate that mechanical stress (e.g. streched fibrin) causes impaired plasminogen activation (6).

1. Wohner N, Keresztes Z, Sótonyi P ,Szabó L, Komorowicz E, Machovich R and Kolev K: Neutrophil granulocyte-dependent proteolysis enhamces platelet adhesion to the arterial wall under high-shear flow. ***J. Thromb. Haemost.*** 8: 1624-163, (2010). IF: 6,069
2. Rábai Gy, Szilágyi N, Sótonyi P, Kovalszky I, Szabó L, Machovich R and Kolev K.: Contribution of neutrophil elastase to lysis of obliterating thrombi in the context of their platelet and fibrin content. ***Thromb. Res.*** 126: 94-101, (2010). IF: 2,406.
3. Tanka-Salamon A, Kolev K, Machovich R, and Komorowicz E: Proteolytic resistance conferred to fibrinogen by von Willebrand factor. ***Thromb Haemost*** 103; 291-294, (2010). IF: 4,451
4. Wohner N, Kovács A, Machovich R and Kolev K.: Modulation of the von Willebrand factor-dependent platelet adhesion through alternative proteolytic pathway. ***Thromb. Res.*** In press (2011). IF: 2,406.
5. Wohner N, Sótonyi P, Machovich R Szabó L, Tenekedijev K, Silva M.M.C.G, Lonstaff C and Kolev K : Lytic resistance of fibrin containing red blood cells. ***Arterioscler Thromb Vasc Biol.*** DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.229088. (2011). IF: 7,21.
6. Varju I, Sótonyi P, Machovich R, Szabó L, Tenekedijev K, Silva MMCG, Longstaff C and Kolev K: Hindered dissolution of fibrin formed under mechanical stress. ***J. Thromb. Haemost.*** 9: 979-986, (2011). IF: 6,069

Budget: 6.000.000.- HUF



Teljes támogatás: 3.000.000,- Ft

AZ ALVÁSFÜGGŐ LÉGZÉSZAVAROK, MINT KEVÉSBÉ JÓL DOKUMENTÁLT STROKE RIZIKÓFAKTOROK. MELYEK AZOK A PATHOPHYSIOLÓGIAI TÉNYEZŐK, AMELYEK FOKOZZÁK A STROKE RIZIKÓT OBSTRUKTÍV ALVÁSI APNOÉBAN?

Magyar Mária Tünde[1], Kozák Norbert[1], Oláh László[1], Csapó Krisztina[1], Széll Ibolya Katalin[1], Harangi Mariann[2]
[1]DEOEC Neurológiai Klinika, [2]DEOEC I. Belklinika

Vizsgálatok alvási apnoe-ban I.

A stroke prevenciójára vonatkozó ajánlásokban az alvásfüggő légzészavarok, mint kevésbé jól dokumentált rizikófaktorok szerepelnek. 503 (átlagéletkor 49,7±11 év, 358 férfi, 145 nő) alvási apnoes beteget vizsgáltunk. 93-nak enyhe (E), 177-nek közepesen súlyos (KP), 233-nak súlyos (S) alvási apnoeja volt. A három csoportban végeztünk rizikófelmérést.
A csoportok átlagéletkora között szignifikáns különbség volt (p=0.04), a S csoport idősebb volt. A S csoportban nagyobb volt a férfiak aránya. Az összes beteget tekintve a férfiak fiatalabbak voltak a nőkhöz képest (p<0,001). A S csoportban volt a legmagasabb az átlagos testtömegindex (p<0,0001). A férfiak és a nők átlagos BMI-je között nem volt szignifikáns különbség (p=0.06). Az apnoe-hypopnoe index szignifikánsan korrelált a BMI-vel és a korral, míg a kor és a BMI között nem volt szignifikáns korreláció. Az S csoport 76%-a volt hypertoniás, 21,8%-a volt diabeteses, és 30,9%-ának volt ismert a hyperlipidemiája. A betegek 25%-a dohányzott. A betegek egyharmadának volt már valamilyen nagy cardiovascularis esemény az anamnesisében.

Magyar MT: Az alvásfüggő légzészavarok, mint a stroke rizikófaktorai. HÁZIORVOS TOVÁBBKÉPZŐ SZEMLE 14: pp. 27-29 (2009)
Magyar MT, Puskás S, Széll I, Csapó K, Kozák N: Cardiovascularis rizikófelmérés alvási apnoes betegeken. IDEGGYÓGYÁSZATI SZEMLE közlésre elküldve

Vizsgálatok alvási apnoe-ban II.

Eddig tizennyolc (14 ffi, 4 nő, átlagéletkor 49,6±10,9 év) súlyos obstruktív alvási apnoe-ban szenvedő beteget vizsgáltunk CPAP kezelés előtt. Az átlagos apnoe-hypopnoe index (AHI) 61,9±15,8/h , a minimális O_2 saturatio 61,3±15,3% volt. A betegek átlagos BMI-je 39,2±9,18 kg/m^2, átlagos haskörfogata 121,5±15,5 cm volt. Valamennyi beteg esetében részletes cardiovascularis rizikófelmérés, ABPM, Holter EKG, carotis Doppler (átlagos IMT: 0,65±0,08 mm), transcranialis Doppler (átlagos BHI: 51,4±18,4%) történt. A részletes laboratóriumi vizsgálatok mellett vérvétel történt adipocytokinek vizsgálatára. A további vizsgálatok folyamatban vannak.

Holter EKG obstruktív alvási apnoe-ban

A QT szakasz megnyúlása kamrai arrhythmiákkal társulhat. Megnyúlt QT intervallumot és a QT szakasz diszperzióját írták le obstruktív alvási apnoe-ban. Huszonöt kezeletlen, közepesen súlyos obstruktív alvási apnoe-ban szenvedő betegen ambulanter Holter-EKG monitorozást végeztünk. A QT paramétereket és a ventricularis arrhythmiákat vizsgáltuk. A QT intervallum szignifikánsan hosszabb volt az éjszakai periódusban, mint nappal, de a többi vizsgált QT paraméter nem mutatott különbséget. Nem volt ventricularis arrhythmia sem.

Barta K, Szabó Z, Kun C, Munkácsy C, Bene O, **Magyar MT**, Csiba L, Lőrincz I: The effect of sleep apnea on QT interval, QT dispersion and arrhythmias. CLINICAL CARDIOLOGY 33: E. 35-39 (2010) IF:1,807

Az alvási apnoe-s betegeken végzett vizsgálatok módszereinek tesztelésére a következőket végeztük:

Endotheliális dysfunctio vizsgálata
Ötven, kevert kötőszöveti betegségben szenvedő beteget és 38 egészséges személyt vizsgáltunk. Az endotheliális dysfunctio mérésére flow-mediált dilatációt és nitrát-mediált dilatációt alkalmaztunk, valamint intima-media vastagság (IMT) mérés történt az a. carotis internán. Az endothelium-függő (flow-mediált) dilatáció szignifikánsan alacsonyabb volt a kevert kötőszöveti betegségben szenvedő betegekben, mint az egészséges személyekben, míg a nitrát-mediált dilatáció értékeiben nem volt szignifikáns különbség. Az a. carotis IMT nagyobb volt a betegekben, mint az egészségesekben. A flow-mediált dilatáció alacsonyabb volt azokban a betegekben, akiknek már volt valamilyen cardiovascularis esemény az anamnesisükben, mint azokban, akiknek még nem volt.

Soltesz P, Bereczki D, Szodoray P, **Magyar MT,** Der H, Csipo I, Hajas A, Paragh G, Szegedi G, Bodolay E: Endothelial cell markers reflecting endothelial cell dysfunction in patients with mixed connective tissue disease. ARTHRITIS RES THER 12: R. 78 (2010) IF: 4,357

Cerebro- és cardiovascularis reaktivitás vizsgálata
Nyolcvanegy hypertoniás és 94 egészséges személyt vizsgáltunk. Mindkét csoportban head-up tilt teszt (HUTT) során folyamatos, non-invazív, szimultán cardio-és cerebrovascularis hemodinamikai paraméterek monitorozás történt. Szignifikáns különbséget találtunk a két csoport között a cardiovascularis paraméterekben (vérnyomás, totál perifériás index, stroke index), de nem volt különbség az agyi véráramlási sebességben.

Kovács KR, Szekeres CC, Bajkó Z, Csapó K, Molnár S, Oláh L, **Magyar MT**, Bereczki D, Kardos L, Soltész P, Bojtor AB, Csiba L: Cerebro- and cardiovascular reactivity and neuropsychological performance in hypertensive patients. J NEUROL SCI 299: pp. 120-125 (2010) IF: 2,167

2 cm

2 cm

2 cm

2 cm

Budget: 3,000,000.- HUF

SLEEP-DISORDERED BREATHING AS LESS WELL DOCUMENTED STROKE RISK FACTOR. WHICH PATHOPHYSIOLOGICAL FACTORS LEAD ON STROKE RISK IN OBSTRUCTIVE SLEEP APNEA?

Mária Tünde Magyar[1], Norbert Kozák[1], László Oláh[1], Krisztina Csapó[1], Ibolya Katalin Széll[1], Mariann Harangi[2]
[1]Department of Neurology, University of Debrecen, Medical and Health Science Center;
[2]Department of 1st Internal Medicine, University of Debrecen, Medical and Health Science Center

Examinations in sleep apnea I.

Sleep-disordered-breathing appeared as less well documented risk factors in stroke prevention guidelines. 503 (mean age 49.7±11 years, 358 men, 145 women) patients with sleep apnea were examined. 93 patients had mild, 177 patients had moderate, and 233 patients had severe sleep apnea. Cardiovascular risk assessment was performed in these 3 groups. There were significant differences in mean age among the groups ($p=0.04$) the severe group was older than others. Proportion of men was higher in severe group. Men were younger than women considering the whole patients ($p<0.001$). The mean BMI was highest in the severe group ($p<0.0001$). There was no difference in BMI between the genders ($p=0.06$). Significant correlations were found between apnea-hypopnea index (AHI) and age, and AHI and BMI, while age and BMI did not correlate. 76% of the patients in severe group had also hypertension, 21.8% of the patients had diabetes mellitus, 30.9% of the patients had hyperlipidemia. 25% of the patients were smokers. One-third part of the patients had cardiovascular disease in the case history.

Magyar MT: Az alvásfüggő légzészavarok, mint a stroke rizikófaktorai. HÁZIORVOS TOVÁBBKÉPZŐ SZEMLE 14: pp. 27-29 (2009)
Magyar MT, Puskás S, Széll I, Csapó K, Kozák N: Cardiovascularis rizikófelmérés alvási apnoes betegeken. IDEGGYÓGYÁSZATI SZEMLE közlésre elküldve

Examinations in sleep apnea II.

Eighteen (14 men, 4 women, mean age 49.6±10.9 years) patients with severe obstructive sleep apnea were examined before CPAP therapy. The mean apnea-hypopnea index (AHI) was 61.9±15.8/h , the minimal O_2 saturation was 61.3±15.3%. The mean BMI of the patients was 39.2±9.18 kg/m^2 and the mean abdominal circumference was 121.5±15.5 cm. Detailed cardiovascular questionnaire, ABPM, Holter ECG, carotid Doppler (mean IMT: 0.65±0.08 mm), transcranial Doppler (mean BHI: 51.4±18.4%) were performed in each patients. After the detailed laboratory examinations we obtained serum for the measurements of adipocytokines. Further investigations are going on.

Holter-ECG in OSAS patients

The prolongation of QT interval is associated with ventricular arrhythmias. An increased QT interval and QT dispersion has been described in patients with obstructive sleep apnea syndrome. We examined 25 untreated patients with moderate obstructive sleep apnea using ambulatory Holter-ECG measured QT parameters and assessed ventricular arrhythmias. QT interval significantly increased during nighttime period but other QT parameters did not show any change compared to 24-hour and daytime levels. Our study did not reveal a relationship between QT dispersion, ventricular rhythm disturbances and sleep apnea.

Barta K, Szabó Z, Kun C, Munkácsy C, Bene O, **Magyar MT**, Csiba L, Lőrincz I: The effect of sleep apnea on QT interval, QT dispersion and arrhythmias. CLINICAL CARDIOLOGY 33: E. 35-39 (2010) IF:1,807

To test methods of the examination of sleep apnea patients we performed:

Investigation of endothelial dysfunction
Fifty mixed connective tissue disease (MCTD) patients and 38 age- and gender-matched controls were enrolled in this study. In order to describe endothelial dysfunction, we assessed flow-mediated dilation (FMD), nitrate-mediated dilation (NMD) and carotid artery intima-media thickness (IMT). The endothelium dependent vasodilation (FMD) was significantly impaired in patients with MCTD, as compared with controls, while the percentage NMD did not differ. Mean carotid IMT values were higher in patients than in controls. The percentage FMD was significantly lower in MCTD patients with cardiovascular disease (CVD), than in those without CVD.

Soltesz P, Bereczki D, Szodoray P, **Magyar MT,** Der H, Csipo I, Hajas A, Paragh G, Szegedi G, Bodolay E: Endothelial cell markers reflecting endothelial cell dysfunction in patients with mixed connective tissue disease. ARTHRITIS RES THER 12: R. 78 (2010) IF: 4,357

Examination of cerebro- and cardiovascular reactivity
Eighty-one patients were compared with 94 healthy controls. In both groups continuous, non-invasive and simultaneous monitoring of cerebral and cardiac hemodynamical parameters were recorded during head-up tilt table testing (HUTT). During HUTT significant differences were found in certain cardiovascular parameters (blood pressure, total peripheral resistance index, stroke index), but no differences were detected in cerebral blood flow velocity**.**

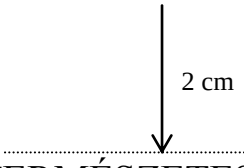
Kovács KR, Szekeres CC, Bajkó Z, Csapó K, Molnár S, Oláh L, **Magyar MT**, Bereczki D, Kardos L, Soltész P, Bojtor AB, Csiba L: Cerebro- and cardiovascular reactivity and neuropsychological performance in hypertensive patients. J NEUROL SCI 299: pp. 120-125 (2010) IF: 2,167

2 cm

2 cm

2 cm

Teljes támogatás: 4.200.000,- Ft



A DEFENZINEK, MINT TERMÉSZETES VÉDEKEZŐ MOLEKULÁK SZEREPE STROKE-BAN, DIABETESBEN ÉS PANCREATITISBEN, VALAMINT A PROBIOTIKUMOK HATÁSMECHANIZMUSÁBAN

Dr Mándi Yvette[1], Dr Vécsei László[2] Dr Takács Tamás [3] Dr Várkonyi Tamás[3] Dr Posfai György[4]
[1]SZTE Orvosi Mikrobiológiai és Immunbiológiai Intézet, [2] Neurológiai Klinika,,[3,]I. Belgyógyászati Klinika, [4]Szegedi Biológiai Központ

Megvizsgáltuk a HBD1-et kódoló gén (DEFB1) egynukleotidos polimorfizmusait (SNP-it), (G-20 A, C-44 G, G-52 A) valamint a defensin alpha gén (DEFA1/DEFA3) kópiaszám polimorfizmusait és plazma szintjeit 233 diabetes mellitusban (98 fő 1-es típusú; 135 fő 2-es típusú) szenvedő beteg esetében., illetve az eredményeket 119 egészséges véradóéval hasonlítottuk össze. A csökkent beta defenzin termelést determináló G-20A és G-52A promóter polimorfizmusok tekintetében szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk diabeteses betegek alcsoportjai illetve a kontroll egyének között. A protektív G allélt hordozó GG homozygoták száma azonban szignifikánsan alacsonyabb volt diabetes esetén, különösen azoknál, ahol nephropathia, neuropathia is jelentkezett (1.5 % vs 9.5 %, illetve 1.2 % vs 9.5 %). Az alpha defenzin plazma szint mindkét diabetes típusban igen magas (29030 ± 5650 pg/ml , illetve 29800 ± 6010 pg/ml) a kontrollokéhoz képest (11940± 2960 pg/ml). A magas alpha defenzin szintek azonban nem korreláltak sem a DEFA1/DEFA3 kópia számmal, sem az mRNS mennyiségével.

2. A DEFB1 gén SNP-i (G-20 A, C-44 G, G-52 A) valamint a DEFB4 copiaszám polimorfizmusok szignifikáns eltéréseket mutattak acut pancreatitisben (n= 124). A csökkent beta defenzin termelést determináló AA genotipusok a G-20A és G-52A promóter polimorfizmusokat illetően szignifikánsan gyakoribbak súlyos acut pancreatitisben. A csökkent beta-defenzin termelést determináló alacsony (<4) DEFB4 kópiaszámok ugyancsak szignifikánsan gyakoribbak súlyos acut pancreatitis esetében .(62% vs 24%)

3. Hasonló vizsgálatokat végeztünk stroke esetében is. 312 ischaemiás stroke-ban szenvedő beteg genotipizálását végeztük el, 221 egészséges kontroll adataival összevetve. A DEFB1 SNPk tekintetében nem találtunk szignifikáns eltérést a betegek és a kontrollok genotipusai kozött. A beta 2 defenzin gén (DEFB4) kópiaszám polimorfizmusai azonban eltérést mutattak; az alacsony kópiaszám szignifikánsan gyakoribb volt a stroke-os betegek között, ami jól korrelált ezen betegek alacsony plazma beta-defenzin szintjeivel is (187 ± 20 pg/ml). Mindez bizonyítja, hogy a fertőzésekkel szembeni csökkent védekezés, így pl. az alacsonyabb defenzin termelés rizikó faktor lehet ischaemiás stroke-ban is.

4. Ezt támasztja alá az a megfigyelésünk, hogy az agyi kapillárisok *Chlamydophyla pneumoniae*-vel történt fertőzése beta defenzint indukál, melynek szerepe lehet a lokális antibakteriális védelemben.
5. Összehasonlítottuk a defenzint indukáló *E.coli* Niessle törzs és egyes mutáns *E.coli* törzsek in vitro defenzin indukáló képességét. Egyértelműen kiderült, hogy a flagella képzést elveszített mutáns nem képes defenzint indukálni. További vizsgálatokat folytatunk arra nézve, hogy mely mutációk hathatnak még a defenzin indukáló képességre

Publikációk:

Tiszlavicz Z, Szabolcs A, Takács T, Farkas G, Kovács-Nagy R, Szántai E, Sasvári-Székely M, Mándi Y.Polymorphisms of beta defensins are associated with the risk of severe acute pancreatitis. PANCREATOLOGY. 10(4):483-90. (2010) IF: 2.195

Tiszlavicz Z, Somogyvári F, Szolnoki Z, Sztriha LK, Németh B, Vécsei L, Mándi Y. Genetic polymorphisms of human β-defensins in patients with ischemic stroke. ACTA NEUROL SCAND. DOI: 10.1111/j1-7-(2011). IF: 2.153

Tiszlavicz Z, Endrész V, Németh B, Megyeri K, Orosz L, Seprényi G, Mándi Y. Inducible expression of human β-defensin 2 by Chlamydophila pneumoniae in brain capillary endothelial cells. INNATE IMMUN. 17(5):463-9 (2011) IF: 2.206

Abstractok

Várkonyi T, B. Németh, F. Somogyvári, R. Laurentzi, A. Szegedi, R. Takács, C. Lengyel, P. Kempler, Y. Mándi, T. Wittmann: Might increased alpha- and beta-defensin levels contribute to the pathogenesis of diabetic complications? DIABETOLOGIA 54. Suppl.1/514.(2011)

Várkonyi,T.,Németh, B., Somogyvári, F.,Takács, R., Lengyel,Cs., Mándi,Y., WittmannT. Alpha and beta defensins: Any role in the pathogenesis of neuropathy and other micro-and macrovascular diabetic complications? 21th Ann. Meeting of the Diabetic Neuropathy Study Group of the EASD (2011).

Budget: 4.200,000.- HUF

THE ROLES OF DEFENSINS-AS NATURAL PROTECTIVE PEPTIDES-IN STROKE, DIABETES AND PANCREATITIS, AND THE MECHANISM OF ACTION OF PROBIOTICS

Dr Mándi Yvette[1], Dr Vécsei László[2] Dr Takács Tamás [3] Dr Várkonyi Tamás[3] Dr Posfai György[4]
[1]Department of Medical Microbiology and Immunobiology, [2]Department of Neurology, 3Department of Medicine, University of Szeged, [4]Biological Research Center Szeged

1. The single nucleotide polymorphisms (SNPs) of beta defensin 1 (DEFB1) G-20 A, C-44 G, G-52 A and the copy number polymorphism of the alpha defensin DEFA1/A3 were investigated in 233 patients with diabetes mellitus(98 type 1 and 135 type 2), and the results were compared with 221 healthy controls. Two of the three SNPs of beta defensin 1 (G-20A and G-52A) in diabetic patients did not differ from healthy controls, while the frequency of the GG genotype in the SNP of C-44G was lower in both types of diabetes than in the controls, especially in patients with neuropathy or nephropathy (1.5 % vs 9.5 %, and 1.2 % vs 9.5 % respectively). The plasma levels of alpha defensin were higher in both types of diabetes (29030 ± 5650 pg/ml , and 29800 ± 6010 pg/ml) than in the control group (11940± 2960 pg/ml).The higher alpha defensin values did not correlate with the DEFA1/A3 copy numbers, and the mRNA expression.

2. Significantly higher frequencies of the AA genotype of G-20A and of G-52A – determinig lower defensin beta 1 expression-were observed among patients with acute pancreatitis (n=124).A higher frequency of a lower (<4) copy number of the DEFB4 gene was observed int he patients of severe acute pancreatitis compared with healthy controls (62% vs 24%).

3.The relevance of the SNP sin the DEFB1 gene and the copy number variant of the DEFB4 genes was investigated also in ischemic stroke. There were no significant differences in the genotype frequencies of the three SNPs of the DEFB1 gene between the patients with stroke(n=312) and the healthy donors(n=221). However, a higher frequency of a lower (<4) copy number of the DEFB4 gene was observed in the patients with ischemic stroke as compared with healthy controls. Additionally, low plasma concentrations of beta defensin (187 ± 20 pg/ml) (187 ± 20 pg/ml) were characteristic of the patients with fewer than 4 copy numbers. The failure in defensin production, involving a weakened antimicrobial defense of the host might be an important risk factor in the pathogenesis of stroke.

4.The importance of defensin production in the central nervous system is proved with our *in vitro* experiments, which indicate that HBD2 is expressed in human brain capillary endothelial cells upon infection with *Chlamydophyla pneumoniae*

5. The defensin inducing capacity of different mutant *E.coli* strains were compared with . Niessle strain .*E.coli* mutant lacking the flagella formation was unable to induce defensin. Further studies are necessary to identify other proteins which are involved in defensin induction.

Publications:

Tiszlavicz Z, Szabolcs A, Takács T, Farkas G, Kovács-Nagy R, Szántai E, Sasvári-Székely M, Mándi Y.Polymorphisms of beta defensins are associated with the risk of severe acute pancreatitis. PANCREATOLOGY. 10(4):483-90. (2010) IF: 2.195

Tiszlavicz Z, Somogyvári F, Szolnoki Z, Sztriha LK, Németh B, Vécsei L, Mándi Y. Genetic polymorphisms of human β-defensins in patients with ischemic stroke. ACTA NEUROL SCAND. DOI: 10.1111/j1-7-(2011). IF: 2.153

Tiszlavicz Z, Endrész V, Németh B, Megyeri K, Orosz L, Seprényi G, Mándi Y. Inducible expression of human β-defensin 2 by Chlamydophila pneumoniae in brain capillary endothelial cells. INNATE IMMUN. 17(5):463-9 (2011) IF: 2.206

Abstracts

Várkonyi T, B. Németh, F. Somogyvári, R. Laurentzi, A. Szegedi, R. Takács, C. Lengyel, P. Kempler, Y. Mándi, T. Wittmann: Might increased alpha- and beta-defensin levels contribute to the pathogenesis of diabetic complications? DIABETOLOGIA 54. Suppl.1/514.(2011)

Várkonyi,T.,Németh, B., Somogyvári, F.,Takács, R.,Lengyel,Cs., Mándi,Y., WittmannT. Alpha and beta defensins: Any role in the pathogenesis of neuropathy and other micro-and macrovascular diabetic complications? 21th Ann. Meeting of the Diabetic Neuropathy Study Group of the EASD (2011).

Teljes támogatás: 3.000.000,- HUF

AZ ÉLETMINŐSÉG FOGORVOSTUDOMÁNYI ASPEKTUSAINAK OBJEKTÍV VIZSGÁLATA AZ ÁTLAGNÉPESSÉGBEN ÉS HÁTRÁNYOS HELYZETŰ ROSSZ FOGÁSZATI MUTATÓKKAL JELLEMZETT BETEGCSOPORTOKBAN. REPREZENTATÍV REGIONÁLIS FELMÉRÉS A DÉL-DUNÁNTÚL RÉGIÓBAN ÉS AZ ÉSZAK-ALFÖLD/ÉSZAK-MAGYARORSZÁG IKERRÉGIÓBAN

Márton Ildikó[1], Hegedűs Csaba[1], Bágyi Kinga[1], Radics Tünde[1], Kiss Csongor[2], Szabó Gyula[3], Szetpétery András[3], Marada Gyula[3], Kende Dóra[3], Ottóffy Gábor[4]
[1]DEOEC Fogorvostudományi Kar, [2]DEOEC Gyermekgyógyászati Klinika, [3]PTE Fogászati és Szájsebészeti Klinika, [4]PTE Gyermekgyógyászati Klinika

Napjainkban a szájegészség és életminőség közötti kapcsolat tanulmányozása egyre elterjedtebb a fogászatban. Számos létező életminőségmérő eszköz közül az OHIP nemzetközileg elfogadott és elterjedt kérdőív. Jelen követéses vizsgálatban a szájegészség által meghatározott életminőség fejlődését tanulmányoztuk szájüregi rehabilitáción átesett betegcsoporton. Mérőeszközként a nemzetközileg elfogadott OHIP 53 kérdéses magyar nyelvű verzióját az OHIP-H Debrecen kérdőívet használtuk, mely a fizikális egészség mellett a páciensek pszichológiai és szociális jólétét helyezi előtérbe. Kiegészítettük továbbá iskolázottságra, táplálék bevitelre és általános egészségi állapotra vonatkozó kérdésekkel. Vizsgálatainkat a Debreceni Egyetem Fogorvostudományi Karán és nyolc további kelet-magyarországi városban és községben (Debrecen, Miskolc, Nyíregyháza, Szolnok, Eger, Szerencs, Báránd, Zsáka) végeztük 2010 szeptembere és 2011 decembere között. Multicentrikus kutatásunk kezdetén a kérdőív megbízhatóságát belső konzisztencia analízis segítségével vizsgáltuk (Spearman koefficiens). 397 szájüregi rehabilitáción átesett páciens töltötte ki az OHIP-H53 Debrecen kérdőívet kezelése előtt (T0), a kezelését követő 1. (T1) és 6-12. hónapokban (T2). Megvizsgáltuk és rögzítettük a kezelés előtti kariológiai és parodontológiai állapotot, a viselt fogpótlás(ok) típusát és a rehabilitáció céljából készülő új fogpótlások típusát. A Spearman korrelációs koefficiens 0,642-nek bizonyult, mely a kérdőív megbízhatóságát jelzi. A betegek 62,6 %-a nő, 37,4 %-a férfi volt. A minta átlagéletkora±SD 57,2±14,1 év volt. Összehasonlítva a kezelés előtti és utáni OHIP pontszámokat elmondható, hogy az életminőség szignifikáns módon javult kezelést követően a kérdőív minden egyes dimenziójában. A fejlődés kifejezettebb volt a kezelést követő 1. hónapban, mint 6—12 hónap múlva. Kezelés előtt a leginkább életminőségrontó panaszként a funkcionális korlátozottságot, fizikai fájdalmat és fizikai korlátozottságot jelölték meg a betegek. Ha fogpótlás típusonként (természetes fogazat/rögzített, részleges kivehető, teljes kivehető fogpótlás) hasonlítjuk össze az életminőség javulás mértékét, megállapítható, hogy a természetes fogazattal/rögzített fogpótlással rendelkező páciensek életminősége javult a leginkább. Az egyéni DMF-T értékeket elemezve a DMF-T index:23,72 volt. A betegek 33,89 %-ának mérsékelt, míg 28,38 %-ának súlyos parodontitise volt. Elmondhatjuk tehát, hogy az OHIP általunk módosított verziója alkalmas a szájegészségfüggő életminőség mérésére. A kemoterápia kapcsán előforduló szájnyálkahártya gyulladás az egyik leggyakoribb és leginkább életminőségrontó mellékhatás. Kutatásunk célja egy kevésbé vizsgált betegcsoporton, intenzív kemoterápiát kapó gyermekeken, tesztelni a PROMS (Betegek által jelzett szájnyálkahártya gyulladás) kérdőívet. 32 írni-olvasni tudó gyermek (8-18 év) töltötte ki a PROMS kérdőívet kemoterápiás kezelése előtt, majd minden egyes héten a kezelés befejeztéig. 22 gyermek szenvedett akut limfoid leukémiában, 1 akut mieloid leukémiában, 4 Hodgkin, 3 non-Hodgkin limfómában, 1-1 nasopharingeális carcinómában és aplasticus anémiában. A gyermekek kariológiai és parodontológiai állapotát speciális adatlapon rögzítettük. Minden gyermek sikeresen töltötte ki a kérdőívet kezelése alatt heti gyakorisággal. A kemoterápiás kezelés megkezdése előtt 4 gyermek panaszkodott szájüregi fájdalomról és nehezített nyelésről. A szájnyálkahártya gyulladással bíró betegek száma fokozatosan nőtt a kutatás során: 7 gyermek esetén a kezelés 1. hetén,10 esetén a 2. héten, 15 esetén a 3. héten jelentkezett orális mucositis. A panaszok többsége 4-5 napig tartó Corsodylos öblögetés és ecsetelés hatására elmúlt. 13 gyermek esetén szisztémás antifungális kezelést alkalmaztak. A szájüregi egészségkutatások további egyre inkább előtérbe kerülő területe a

Teljes támogatás: 3.000.000,- HUF

világszerte egyre növekvő előfordulási gyakoriságú szájüregi daganatok, daganatmegelőző állapotok pathogenezisének, korai diagnosztizálásának és eredményesebb gyógyításának kérdése. Hazánkban 1975 óta közel 350 %-al nőtt a szájüregi daganatok előfordulási gyakorisága és az e betegségből eredő halálozás tekintetében hazánk első helyre került mindkét nemben. A szájüregi daganatos kórformák a hatodik leggyakoribb rosszindulatú megbetegedése az emberiségnek, igen alacsony 5 éves túléléssel. Vizsgálataink során a HPV vírusok pathogenetikai szerepét tanulmányoztuk szájüregi precancerózus és daganatos elváltozásokban. A HPV vírusok előfordulása szignifikánsan eltért a precancerosus és a daganatos elváltozásokban ($P<0,001$) összehasonlítva az egészséges kontrollokkal. A HVP prevalencia tükrözte a kórforma súlyosságát.
Eredményeinket 2011-ben a 45. CED-IADR kongresszuson és a 43. SIOP kongresszuson 1 előadással és 4 poszterrel prezentáltuk.
A kutatást az ETT 299-02/2009. projekt támogatta.
Tar I, Márton I: Az orális lichen planus: Bizonyosságok és kétségek. FOGORV SZLE 102: pp. 103-109 (2009)
Szarka K, Tar I, Fehér E, Gáll T, Kis A, D Tóth E, Boda R, Márton I, Gergely L: Progressive increase of human papillomavirus carriage rates in potentially malignant and malignant oral disorders with increasing malignant potential. ORAL MICROBIOL IMMUNOL 24: pp. 314-318 (2009) IF: 2,336

Budget: 3,000,000.- HUF

QUANTITATIVE ASSESSMENT OF ORAL HEALTH-RELATED QUALITY OF LIFE ITEMS IN THE GENERAL POPULATION AND IN PATIENT GROUPS WITH POOR ORAL HEALTH CONDITIONS. A REPRESENTATIVE AREA PROFILE FROM THE SOUTH TRANSDANUBIA REGION AND FROM THE NORTHERN PLAINES-NORTH HUNGARY TWIN REGIONS OF HUNGARY

Ildikó Márton[1], Csaba Hegedűs[1], Kinga Bágyi[1], Tünde Radics[1], Csongor Kiss[2], Gyula Szabó[3], András Szetpétery[3], Gyula Marada[3], Dóra Kende[3], Gábor Ottóffy[4]
[1]Faculty of Dentistry, Medical and Health Science Center, University of Debrecen; [2]Department of Pediatrics, Medical and Health Science Center, University of Debrecen; [3]Oral and Maxillofacial Surgery, Medical School Department of Dentistry, University of Pécs; [4]Department of Pediatrics, Medical School Department of Dentistry, University of Pécs

Aspects of oral health related quality of life (OHRQoL) are attracting increased attention in dentistry. There are many existing measuring tools, as the internationally, widely used Oral Health Impact Profile (OHIP). In this follow-up study we have investigated the development of oral health-related quality of life (OHRQoL) among patients undergoing oral rehabilitation using the OHIP-H-53 Debrecen questionnaire, which is a version of this internationally widely used measuring tool, focusing on the patients' psychological and social well-being in addition to their physical health. It contains 53 items and further questions about qualification, dietary choices, nutritional intake, and general health. The study was conducted at the University of Debrecen (Faculty of Dentistry) and at eight further East Hungarian cities and villages (Debrecen, Miskolc, Nyíregyháza, Szolnok, Eger, Szerencs, Báránd, Zsáka) between September 2010 and December 2011. Before conducting the multicentric investigation we tested the reliability of the questionnaire using internal consistency analysis (Spearman coefficient). The OHIP-H53 Debrecen questionnaire was administered to 397 prosthodontic patients before treatment (T0), 1 month following the treatment (T1) and 6-12 months after the treatment (T2). We examined the cariological and periodontal conditions, and recorded the type of the denture of each patient before treatment and the new denture type has been made during dental rehabilitation. The Spearman item-scale correlation coefficient was 0,642, which means that the questionnaire was reliable. 62,6 % of the subjects were women and 37,4 % were men; the mean age±SD of the sample was 57,2±14,1 years. Comparing OHIP scores before and after treatment OHRQoL has been significantly developed in each dimensions. The development was more significant at T1 than T2. The most debilitating problems were functional limitation, physical pain and physical disability before treatment. Comparing development of quality of life in three different denture groups (natural/fixed =FPD, partial removable =RPD, complete denture= CD), subjects having their own teeth or FPDs presented the largest improvement. Evaluating the individual DMF-T scores, the DMF-T index was 23,72. According to the registered CPI values 33,89 % of subjects had moderate and 28,38 % had severe periodontitis before oral rehabilitation. Modified OHIP-H proved suitable for evaluating of oral requirements and OHRQoL of patients living in the less resourceful region of Hungary. Oral mucositis (OM) is a frequent and one of the most debilitating side effect of cancer treatment. The aim of this study was to evaluate the Patient-Reported Oral Mucositis Symptom (PROMS) questionnaire which has not yet been performed in children receiving intensive chemotherapy. Thirty two (22 with acute lymphoblastic leukemia, 1 with acute myeloblastic leukemia, 4 with Hodgkin lymphoma, 3 with non-Hodgkin lymphoma 1 with nasopharyngeal carcinoma and 1 with severe aplastic anemia, each; 17 girls and 15 boys; age between 8 and 18 yrs with a mean age of 11,4 yrs) were given the PROMS questionnaire at diagnosis and at regular intervals in course of the treatment. In parallel, dental and parodontal status of the patients was assessed. With the help of their parents/guardians, each child has sucessfully filled in the questionnaire. Four patients complained on oral pain and dysphagia before starting anti-cancer chemotherapy. The ratio of patients with oral complaints due to OM has increased gradually: seven patients after the 1st week, ten patients after the 2nd week and fifteen patients after the 3rd week of therapy. The complaints have stopped after 4-5 days on Corsodyl mouth rinse.

Budget: 3,000,000.- HUF

Thirteen patients required systemic anti-fungal treatment. Use of a validated questionnaire for reliable assessment is the first step in a comprehensive program to reduce a highly distressing side effect of cancer treatment in children. There is an increasingly growing interest world-wide for the oral and dental health, which are among the most pervasive health problems of mankind. The incidence of oral precancerous lesions and malignancies is growing dramatically all around the world, oral cancer is one of the six most common human cancer with an overall 5-year survival rate of 50 %. In Hungary the incidence of the disease has increased, with 350 % since 1975. Among the aims of the study was to explore the possible role of human papillomaviruses (HPVs) in the pathogenesis of oral precancer and cancer development. We detected HPVs significantly more frequently in lesions than in controls ($P<0.001$). HPV prevalence increased gradually with increasing severity of lesions. Our results has been presented at the 45th Meeting of the Continental European Division of the International Association for Dental Research (CED-IADR) and 43rd Congress of the International Society of Paediatric Oncology in 2011.

The work is supported by the ETT 299-02/2009. project.

Tar I, Márton I: Az orális lichen planus: Bizonyosságok és kétségek. FOGORV SZLE 102: pp. 103-109 (2009)

Szarka K, Tar I, Fehér E, Gáll T, Kis A, D Tóth E, Boda R, Márton I, Gergely L: Progressive increase of human papillomavirus carriage rates in potentially malignant and malignant oral disorders with increasing malignant potential. ORAL MICROBIOL IMMUNOL 24: pp. 314-318 (2009) IF: 2,336

Budget: 3.000.000.- HUF

A mikrokörnyezet szerepe a Follicularis Lypmhomák csontvelői terjedése során

Matolcsy András, Szepesi Ágota, Csernus Balázs, Bödör Csaba, Rajnai Hajnalka, Balogh Zsófia, Gagyi Éva

I. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest

Célkitűzés

A follicularis lymphoma (FL) egy indolens megbetegedés, klinikai lefolyása során az esetek 50-80%-ában alakul ki csontvelői érintettség. A nyirokcsomó neoplasticus fooliculisaiban reaktív, nem neoplasticus immunsejtek is megfigyelhetőek, többek között különböző T-lymphocyta csoportok, macrophagok és follicularis dentriticus reticulum hálózat (FDC). A malignus B-lymphocytáknak szükségük van ezen sejtekkel való interakciókra a proliferációhoz. Napjainkban egyre nagyobb szerepet tulajdonítanak a tumor mikrokörnyezet, vagyis a daganatot ínfiltráló immunsejtek vizsgálatának. Irodalmi adatok alapján a betegség prognózisa és a túlélés a nem malignus immunsejtek génexpressziós profiljának változásaival mutat összefüggést. Munkánk célkitűzése a follicularis lymphoma nyirokcsomói és csontvelői mikrokörnyezetének analízise patológiai és immunológiai jellemzők, illetve a klinikai viselkedés tükrében. Továbbá a reaktív nyirokcsomók secunder folliculusainak, valamint az FL-s esetekben észlelt malignus folliculusok FDC hálózatának vizsgálata, illetve a malignus B-lymphocytak és az FDC hálózat analízise céljából a Connexin 43 (Cx43) expresszió vizsgálata.

Módszer

Az immunhisztokémiai vizsgálatokat szöveti multiblokk technológia (TMA) felhasználásával végeztük, melynek során vizsgáltuk a nyirokcsomói és csontvelői mikrokörnyezetben található regulátoros T-lymphocyták, NK-lymphocyták, follicularis helper T-lymphocyták, machrophagok immunfenotípusát. Továbbá szimpla és kettős immunfluoreszcens festéseket végeztünk a Cx43 expresszió meghatározása céljából. Az immunhisztokémiai és immunfluoreszcens vizsgálatok elvégzése után a metszeteket digitalizáltuk, értékelésüket egy pontos és reprodukálható kvantifikálást lehetővé tevő szoftverrel végezzük.

Eredmények

Eredményeink alapján szignifikáns különbség mutatkozik csontvelői manifesztációval rendelkező, illetve nem rendelkező esetek nyirokcsomói reaktív sejt összetételében. A csontvelői infiltrációt mutató esetekben a CD8+ cytotoxicus T-lymphocyták illetve a CD68+ macrophagok a tumoros nyirokcsomó follicularis régiójában alacsonyabb számban voltak jelen. Valamint szignifikáns több $CD8^+$ cytotoxicus T-lymphocyta, $FOXP3^+$ regulator T-lymphocyta, és $CD68^+$ macrophag valamint kevesebb $PD1^+$ follicular B-helper T-lymphocyta volt kimutatható az egyazon beteghez tartozó tumoros csontvelőben, mint a nyirokcsomóban. Továbbá a secunder folliculusokban található FDC hálózathoz képest a FL-s folliculusokban észlelt folliculusokhoz képest hyperplasticusnak mutatkozott. Viszont a CX43 csatornák expressziója jelentősen alacsonyabb volt a malignus folliculusokban.

Megbeszélés

Vizsgálataink során különböző reaktív sejtmintázatot észleltünk az egyazon beteghez tartozó tumoros nyirokcsomó - csontvelő párok között, amely segíthet magyarázatot adni arra a jelenségre, hogy miért található jelentős különbség a tumorsejtek fenotípusa között a csontvelői és nyirokcsomói lokalizáció esetén. A csontvelői infiltrációt mutató, valamint nem mutató esetek összehasonlító vizsgálata során szignifikáns különbség mutatkozott a cytotoxicus T-sejtek és macrophagok szempontjából a két csoport között, amely sugallhatja ezen sejtek tumorsejt propagációra és migrációra kifejtett gátló hatását. Továbbá az FDC hálózat és a gap junctionokat formáló Cx 43 vizsgálata alapján elmondható, hogy a gap junctionok fontos szerepet játszhatnak az FDC hálózat és a B-lymphocyták, így az malígnus B-sejtek közötti interakcióban, illetve elősegíthetik ez utóbbiak túlélését. Fontos szerepük van a follicularis dendriticus sejtek hálózattá formálásában, amely azonban tumorok esetén súlyosan károsodott, így az FDC kontroll elvesztése a B-lymphocyta érés során elősegítheti a malignus folyamatok kialakulását.

Közlemény:

Rajnai H, Bödör Cs, Balogh Zs, Gagyi É, Csomor J, Krenács T, Tóth E, Matolcsy A: Impact of the reactive microenvironment on the bone marrowinvolvement of follicular lymphoma.
Histopathology (2012) DOI: 10.1111/j.1365-2559.2012.04187.x IF: 3.569

Budget: 3.000.000.- HUF

Role of the microenvironment during bone marrow involvement of Follicular Lymphomas

András Matolcsy, Ágota Szepesi, Balázs Csernus, Csaba Bödör, Hajnalka Rajnai, Zsófia Balogh, Éva Gagyi

1st Department of Pathology and Experimental Cancer Research, Faculty of Medicine, Semmelweis University, Budapest, Hungary

Aims

Follicular lymphoma is associated with bone marrow involvement in about 40-70% of the cases. The neoplastic follicles in the lymph node contain numerous reactive, non-neoplastic cells including T-lymphocyte subsets, macrophages and follicular dendritic cells (FDC). Lymphoma cells require cellular interactions with T-cells and FDCs in the GC-like microenvironment for proliferation. Gene expression and immunohistochemical studies suggested that immune microenvironment of FL plays an important role in clinical behavior and progression of the disease. To investigate the role of the microenvironment in the bone marrow involvement of FL, we performed immunophenotypical analysis of the reactive cell populations in the lymph nodes and corresponding bone marrows of 35 patients with FL. The microenvironment patterns of the BM infiltrates were compared to the corresponding features of the LN in cases with BM manifestation; and the LN microenvironment was compared in FL cases with and without BM involvement. Furthermore we compared the FDC of the malignant follicles of FL to the secondary follicles of the reactive lymph nodes, and to investigate the interaction between the malignant B-cell and the FDC we examined the expresson of Connexin 43 (Cx43).

Methods

LN and BM biopsies from 35 untreated patients with FL were selected for this study, based on the availability of formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue blocks for the immunohistochemical as well as for the singe and double immunofluorescent analysis. Automated image-segmentation-based localization and quantitation was performed in scanned whole digital slides of tissue microarrays of formalin-fixed paraffin-embedded tissue biopsies.

Results

We found significantly more $CD8^+$ cytotoxic T-lymphocytes, $FOXP3^+$ regulatory T-lymphocytes, and $CD68^+$ macrophages and less $PD1^+$ follicular B-helper T-lymphocytes in the BM than in the matching LN samples. Furthermore, we observed significantly less infiltrating $CD8^+$ T-cells and $CD68^+$ macrophages in cases involving the bone marrow compared to those localized only to the lymph nodes. Furthermore we found that the malignant follicles of FL contain hyperplastic $CD21^+$ FDC compared to the secondary follicles of the reactive lymph nodes. Whereas we found that the expression of Connexin-43 channels is down-regulated in the malignant follicles compared to secondary follicles.

Conclusions

Our study showed that different tumor cell growth in the LN and BM may generate different microenvironment. The comparative analysis of the microenvironment of LNs in cases with and

without BM infiltration suggest that cytotoxic T-lymphocytes and macrophages play a relevant role in the prevention of tumour cell propagation and migration and that their reduced numbers in FL lymph nodes can be a negative prognostic maker to predict the BM involvement in FL. Regarding the FDC and the gap junction forming CX43 our findings suggest that gap junctions can be involved in FDC-B-cell signalling that may contribute to the rescue of selected B cells from apoptosis, and forming a cellular internet of FDC meshwork within the germinal centre, which is seriously defective in relevant malignant tumours, and loss of FDC control on B cell maturation may contribute to lymphoma development.

Rajnai H, Bödör Cs, Balogh Zs, Gagyi É, Csomor J, Krenács T, Tóth E, Matolcsy A: Impact of the reactive microenvironment on the bone marrowinvolvement of follicular lymphoma.
Histopathology (2012) DOI: 10.1111/j.1365-2559.2012.04187.x IF: 3.569

Teljes támogatás: 4.800.000,- Ft

KOMPLEX GYÓGYSZERBIZTONSÁGI MÓDSZEREK ALKALMAZÁSA A KLINIKAI GYAKORLATBAN

Mátyus Péter[1,2], Kárpáti Sarolta[1,3], Kóbori László[4], Balogh Balázs[2], Dunkel Petra[2], Jeszenői Norbert[2], Blazsek Antal[3], Hatvani Zsófia[3]
[1]Semmelweis Egyetem Gyógyszerkutatási és Gyógyszerbiztonsági Centrum, [2]Semmelweis Egyetem Szerves Vegytani Intézet, [3]Semmelweis Egyetem Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinika, [4]Semmelweis Egyetem Transzplantációs és Sebészeti Klinika

Az eredeti gyógyszerkészítmények száma az elmúlt két évtizedben drámaian visszaesett, miközben a kutatási-fejlesztési költségek jelentősen növekedtek. A fejlesztés sikertelensége a 2000-es évektől legnagyobb hányadban a klinikai toxicitási-biztonságossági szempontokkal, illetve nem megfelelő hatásossággal függ össze. Mindezek miatt különösen nagy szükség van a hatóanyag-jelölteknek e tulajdonságait megfelelő pontossággal becsülni képes preklinikai eljárásokra és módszerekre, melyek alkalmazásával a klinikai fejlesztés költségei csökkenthetők és a kutatás-fejlesztés hatékonysága számottevően növelhető.

Toxicitás-biztonságosság szempontjából elengedhetetlen a gyógyszerhatóanyag szervezetbeli sorsának ismerete. A hatóanyag kölcsönhatása a metabolizmusban szerepet játszó enzimekkel (pl. CYP450) egyrészt toxikus, nem kedvező hatású vegyületek képződéséhez vezethet, másrészt az enzimek fiziológiai funkcióinak nem megfelelő működését eredményezheti. Ráadásul, ma már közismert, hogy ezen enzimek előfordulása egyénenként változhat, ami miatt szintén fontos, hogy – lehetőleg még a gyógyszerterápia megkezdése előtt – az adott hatóanyag(ok) szempontjából releváns enzimek működéséről megfelelő információnk legyen, ugyanis a nem megfelelő enzim-szint nem-kívánt, toxikus mellékhatásokat eredményezhet.

A gyógyhatású készítmények száma és terjedése napjainkban növekvő tendenciát mutat; emiatt is egyre fontosabb e szereknek a szervezet metabolizmus kapacitására és gyógyszerek hatására, toxicitására gyakorolt hatásának ismerete.

Pályázati projektünk e szempontok együttes, komplex vizsgálatára irányult, klinikai és preklinikai vizsgálatokkal. A projekt klinikai részében bizonyos CYP enzimek és gyógyszer mellékhatások kapcsolatát vizsgáltuk. Egyfelől a Semmelweis Egyetem Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinikáján a már panaszokkal jelentkező betegek esetében, a további adverz reakciók elkerülése céljából került sor CYP polimorfizmus meghatározásra. Az eljárás elősegítheti az előzetes genetikai vizsgálatokat követően az individuális gyógyszerrendelést és a korábbi, már mellékhatást elszenvedőt betegek esetében az azonos metabolizmusú, de más hatóanyagú gyógyszerek okozta mellékhatások elkerülését. Másfelől új eljárás fejlesztésére, eredményes alkalmazására került sor donor máj gyógyszer-metabolizáló képességének vizsgálatára perifériás vérminta felhasználásával, valamint gyógyszer-metabolizáló képesség meghatározására egyénre szabott gyógyszeres terápia kialakításához. Az eredmények alapján a donor májak CYP státuszának prospektív vizsgálata, az egyéni gyógyszerelés hozzájárulhat a gyógyszeres mellékhatások és sikertelen kezelések csökkentéséhez májátültetést követően. Az egyéni gyógyszer-metabolizáló képesség aktuális állapotának meghatározásával kialakított egyénre szabott terápiával javítható a gyógyszerhatékonyság, csökkenthető a gyógyszerfogyasztás és a mellékhatások kialakulásának kockázata, lerövidíthető a kórházi ellátás és gyorsabb gyógyulás érhető el.
Projektünk másik részében *in silico* módszerek együttes alkalmazásával és a technikák rendszerbe építésével bioaktív molekulák (gyógyszerek, gyógyszerjelöltek, gyógyhatású vegyületek) molekulaszerkezetétől függő metabolizmus vizsgálatára és ezáltal biztonságos alkalmazhatóságára dolgoztunk ki predikciós eljárást. Megjegyezzük, hogy e területhez kapcsolódóan, szintetikus kémia

munkát is végeztünk, modellvegyületek és modellreakciók tanulmányozása céljából, sőt néhány esetben *in vitro* metabolizmus vizsgálatok is történtek, illetve folyamatban vannak az *in silico* eredmények validálásához.

Eredményekkel kapcsolatos eredeti közlemények jegyzéke:

Földi ÁA, Ludányi K, Bényei AC, Mátyus P: *tert*-Amino Effect in *peri*-Substituted Naphthalenes: Syntheses of Naphthazepine and Naphthazonine Ring Systems. SYNLETT 14: pp. 2109-2113 (2010) IF: 2.447

Károlyházy L, Krajsovszky G, Farkas L, Boros S, Csámpai A, Mátyus P: Reaction of chloropyridazin-3(2*H*)-ones with iodide ion. Part II. ARKIVOC 2: pp. 18-28 (2011) IF (2010): 1.096

Énzsöly A, Dunkel P, Récsán Z, Győrffy H, Tóth J, Marics G, Bori Z, Tóth M, Zelkó R, Di Paolo ML, Mátyus P, Németh J: Preliminary studies of the effects of vascular adhesion protein-1 inhibitors on experimental corneal neovascularization. JOURNAL OF NEURAL TRANSMISSION 118: pp. 1065-1069 (2011) IF (2010): 2.597

Krajsovszky G, Károlyházy L, Dunkel P, Boros S, Grillo A, Mátyus P: Suzuki-aza-Wittig, Suzuki-condensation and aza-Wittig-electrocyclic ring-closure tandem reactions for synthesis of fused nitrogen-containing ring systems. ARKIVOC 10: pp. 229-253 (2011) IF (2010): 1.096

Temesvári M, Kóbori L, Paulik J, Sárváry E, Belic A, Monostory K: Estimation of drug-metabolizing capacity by CYP-genotyping and CYP-expression. J PHARMACOL EXP THER DOI:10.1124/jpet.111.189597 (2012) IF (2010): 4.017

Budget: 4.800.000.- HUF

APPLICATION OF COMPLEX DRUG SAFETY METHODS IN CLINICAL PRACTICE

Péter Mátyus[1,2], Sarolta Kárpáti[1,3], László Kóbori[4], Balázs Balogh[2], Petra Dunkel[2], Norbert Jeszenői[2], Antal Blazsek[3], Zsófia Hatvani[3]
[1]Semmelweis University Drug Discovery and Safety Centre, [2]Semmelweis University Department of Organic Chemistry, [3]Semmelweis University Department of Dermatology, Dermatooncology and Venerology, [4]Semmelweis University Department of Transplantation and Surgery

In the last two decades, the productivity of original drug research and development has significantly declined, while R&D costs have continuously increased. The main reasons for clinical failures in the development have been realized to be related to toxicology/safety and efficacy issues. There is a need and has been made much effort indeed to elaborate new preclinical tools and methods for making reliable predictions for critical features of drug candidates in order to change the trend and avoid unproductive investments, thereby increasing efficiency of the overall process.
From a toxicity-safety point of view, it is necessary to get an insight into the fate of molecules within the human body. The interactions of drugs with major metabolic enzymes (e.g. the CYP450 family) may lead to the formation of metabolites with toxic or untoward effects and/or to the suboptimal operation of enzymes. Moreover, it is also well documented that enzyme activity may often show substantial intra-individual variety. Therefore, careful analysis of all these aspects of metabolism is needed, preferentially before starting drug therapy.

Nowadays, the number of marketed natural products and herbal drugs shows a growing tendency. It is not surprisingly, yet its significance seems to be underestimated that there is a potential risk in their application due to their possible effect on human metabolic capacity, which may lead to unwanted consequences directly or may unfavorably change metabolic pathway of prescribed drugs.

Our project aimed to accomplish a complex investigation of the aforementioned aspects, implementing clinical and preclinical studies. In the clinical part, we focused our attention on possible relationships between CYP enzyme activity and drug adverse effects. At the Department of Dermatology, Dermatooncology and Venerology of the Semmelweis University, there were determined CYP polymorphisms in patients having suffered drug adverse effects, to prevent such reactions in the next therapy. The diagnostic method can assist personalized medication following genetic tests and can help avoid/minimize risk of adverse effects. In another clinical setting, a novel diagnostic method has been developed and applied efficiently for determining the drug metabolizing capacity of donor livers (using peripheral blood samples) and for assessing individual drug metabolizing activities to elaborate personalized drug administration regimes. Based on our results, evaluation of the CYP status of donor livers, personalized medication can help to decrease the risk of drug side effects and therapeutic failures following liver transplantation. Personalized medication regimes elaborated via the assessment of individual drug metabolizing characteristics may result in more safe and efficient drug therapy, thereby in a shorter and more cost-effective hospitalization period.

As a further important aspect of the project we developed a hierarchic system to investigate drug metabolism *in silico*. It is important to mention that such a study is not primarily dependent on the availability of experimentally determined structures of enzymes, and through systematic application of *in silico* tools and methods, i.e. studying enzyme-drug interactions directly by docking or indirectly by drug-based approaches, we are now able to make reliable predictions for metabolism of bioactive molecules (drugs, drug candidates, herbal drugs; as enzymes amine oxidases were also included besides CYPs), therefore assessing some aspects of the safety profile of their applications

in a rapid and highly economic way. It is also noteworthy, that we made some chemical synthesis to obtain model compounds and to study reactions experimentally.
In summary, our results show the relevance of *in silico*, *in vitro* and *in vivo* methods in assessment of metabolic features of drug metabolism, and they also indicate that the use of such methods in combination may provide valuable information in a cost-effective way, in the preclinical phase of drug research and in the clinics as well.

Publications disseminating the results

Földi ÁA, Ludányi K, Bényei AC, Mátyus P: *tert*-Amino Effect in *peri*-Substituted Naphthalenes: Syntheses of Naphthazepine and Naphthazonine Ring Systems. SYNLETT 14: pp. 2109-2113 (2010) IF: 2.447

Károlyházy L, Krajsovszky G, Farkas L, Boros S, Csámpai A, Mátyus P: Reaction of chloropyridazin-3(2*H*)-ones with iodide ion. Part II. ARKIVOC 2: pp. 18-28 (2011) IF (2010): 1.096

Énzsöly A, Dunkel P, Récsán Z, Győrffy H, Tóth J, Marics G, Bori Z, Tóth M, Zelkó R, Di Paolo ML, Mátyus P, Németh J: Preliminary studies of the effects of vascular adhesion protein-1 inhibitors on experimental corneal neovascularization. JOURNAL OF NEURAL TRANSMISSION 118: pp. 1065-1069 (2011) IF (2010): 2.597

Krajsovszky G, Károlyházy L, Dunkel P, Boros S, Grillo A, Mátyus P: Suzuki-aza-Wittig, Suzuki-condensation and aza-Wittig-electrocyclic ring-closure tandem reactions for synthesis of fused nitrogen-containing ring systems. ARKIVOC 10: pp. 229-253 (2011) IF (2010): 1.096

Temesvári M, Kóbori L, Paulik J, Sárváry E, Belic A, Monostory K: Estimation of drug-metabolizing capacity by CYP-genotyping and CYP-expression. J PHARMACOL EXP THER DOI:10.1124/jpet.111.189597 (2012) IF (2010): 4.017

Teljes támogatás: 6 000 000 ,-Ft

Nagy populációkat érintő betegségekre hajlamosító genetikai variánsok és monogénes betegségeket okozó mutációk vizsgálata biobankok segítségével.

Melegh Béla
PTE KK Orvosi Genetikai Intézet, Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ

A Biobanking and Biomolecular Research Infrastructure (BBMRI) hálózathoz is affiliált biobank gyűjteményünk két nagyobb csoportra osztható: a nagy populációkat érintő, poligénes betegségek gyűjteménye, amikben hajlamosító SNP-ket vizsgáltuk, és a ritka betegségek csoportjába tartozó állomány, amiben mutációkat és genotípus-fenotípus elemzéseket tudtunk végezni. Tovább gyarapodott a Roma gyűjtemény, ami ezer feletti mintaszámával jelentős ugyan, de nem éri el a BBMRI kritériumok szerinti ”population cohort” nagyságrendet (> 10,000 minta klinikai adatokkal). A hajlamosító gének csoportjában a stroke, metabolikus szindróma, coronária betegség, IBD (ulcerativ colitis és Crohn betegség), rheumatoid arthritis, spondylosys ankylopoetica, és SLE betegségeket vizsgáltuk. A vizsgálatok egy része replikációs tanulmány, többségük azonban eredeti megfigyelés, amelyek során addig nem ismert hajlamosításokat sikerült megfigyelnünk. A stroke és a metabolikus szindróma területén számos triglicerid metabolizmussal társuló polimorfizmust vizsgáltuk (APOA5, GCKR, GALTN2, MLXIP, ANGPTL3, CILP2, és TRIB1), és tártunk fel hajlamosító vagy védő karaktert ezen gének természetes polimorfizmusai, vagy haplocsoport variánsai vonatkozásában. Érdemes utalni rá, hogy a robosztus GWAS tanulmányok termelik az új hajlamosító géneket, ezen tanulányok limitált helyzetűek, mert etiológiailag stratifikált stroke-os biobank kevés van világszerte, és a GWAS tanulmányokban ritkán végeznek haplocsoport analízist is. Ebből próbálva előnyt kovácsolni csoportunk relatíve sikeres volt a stroke és metabolikus szindróma kutatásban; igazoltuk, hogy bizonyos SNP-k csak bizonyos haplocsoportban mutatnak hajlamosító vagy védő karaktert; ez a körülmény a szokásos GWAS analízisekkel nem derült volna ki. Reumatoid artritisben is sikerült haplocsoport specifikus eltéréseket találnunk. A Roma gyűjteményünk számos farmakogenomikai vizsgálat kivitelezését tette lehetővé; eredeti megfigyeléseket tettünk a VKORC1, CYP2C9, és az MDR1 (ABCB1) variánsok tanulmányozása során; világosnak tűnik, hogy a Roma populáció metabolizáló rendszerei eltérnek az átlag populációtól, ennek gyakorlati jelentősége is van. Monogénes betegségek közül neuromusculáris betegségben zajlottak vizsgálataink, így a mtDNA C11777A mutáció új fenotípus variánsát figyeltük meg, illetve a hazai Rett szindróma genetikai profilját vizsgáltuk biobankunkban.

PUBLIKÁCIÓK

Szolnoki Z, Maasz A, Magyari L, Horvatovich K, Farago B, Kondacs A, Bodor A, Hadarits F, Orosz P, Ille A, Melegh B: CLINICAL NEUROLOGY AND NEUROSURGERY 111: pp. 227-30 (2009) IF: 1,303

Farago B, Talian GC, Komlosi K, Nagy G, Berki T, Gyetvai A, Szekanecz Z, Nyarady Z, Kiss CG, Nemeth P, Czirjak L, Melegh B: RHEUMAT INTERNATIONAL 29: pp. 793-6 (2009) IF: 1,493

Lakner L, Csöngei V, Sarlós P, Járomi L, Sáfrány E, Varga M, Orosz P, Magyari L, Bene J, Miheller P, Tulassay Z, Melegh B: INTERNATIONAL JOURNAL OF COLORECTAL DISEASE 24: pp. 503-7 (2009) IF: 2,102

Sáfrány E, Pazár B, Csöngei V, Járomi L, Polgár N, Sipeky C, Horváth IF, Zeher M, Poór G, Melegh B: SCAND JOURNAL OF IMMUNOLOGY 70: pp. 68-74 (2009) IF: 2,108

Sipeky C, Csongei V, Jaromi L, Safrany E, Polgar N, Lakner L, Szabo M, Takacs I, Melegh B: PHARMACOGENOMICS 10: pp. 1025-32 (2009) IF: 3,893

Sipeky C, Lakner L, Szabo M, Takacs I, Tamasi V, Polgar N, Falus A, Melegh B: BLOOD CELLS, MOLECULES & DISEASES 43: pp. 239-42 (2009) IF: 2,901

Talián G, Lakner L, Bene J, Komlósi K, Horváth K, Gasztonyi B, Miheller P, Figler M, Mózsik G, Tulassay Z, Melegh B: INT JOURNAL IMMUNOGENETICS 36: pp. 329-35 (2009) IF: 1,522
Safrany E, Melegh B: CURR MEDICINAL CHEMISTRY 16: pp. 3766-74 (2009) IF: 4,708
Kisfali P, Mohás M, Maász A, Polgár N, Hadarits F, Markó L, Brasnyó P, Horvatovich K, Oroszlán T, Bagosi Z, Bujtor Z, Gasztonyi B, Rinfel J, Wittmann I, Melegh B: NUTRITION, METABOLISM AND CARDIOVASCULAR DISEASES 20: pp. 505-11 (2010) IF: 3,517
Safrany E, Hobor R, Jakab L, Tarr T, Csongei V, Jaromi L, Sipeky C, Valasek A, Zeher M, Fust G, Czirjak L, Melegh B: INFLAMMATION RES 59: pp. 159-64 (2010) IF 2,004
Mohás M, Kisfali P, Baricza E, Mérei A, Maász A, Cseh J, Mikolás E, Szijártó IA, Melegh B, Wittmann I: EXPERIMENTAL AND CLINICAL ENDOCRINOLOGY & DIABETES 118: pp. 209-12 (2010) IF: 1,826
Járomi L, Csöngei V, Polgár N, Szolnoki Z, Maász A, Horvatovich K, Faragó B, Sipeky C, Sáfrány E, Magyari L, Kisfali P, Mohás M, Janicsek I, Lakner L, Melegh B: JOURNAL OF MOLECULAR NEUROSCIENCE 41: pp. 121-8 (2010) IF: 2,922
Csöngei V, Járomi L, Sáfrány E, Sipeky C, Magyari L, Faragó B, Bene J, Polgár N, Lakner L, Sarlós P, Varga M, Melegh B: WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY 16: pp. 176-83 (2010) IF: 2,240
Polgár N, Járomi L, Csöngei V, Maász A, Sipeky C, Sáfrány E, Szabó M, Melegh B: EUROPEAN JOURNAL OF NEUROLOGY 17: pp. 1033-9 (2010) IF: 3,765
Hadzsiev K, Maasz A, Kisfali P, Kalman E, Gomori E, Pal E, Berenyi E, Komlosi K, Melegh B: NEUROMOLECULAR MEDICINE 12: pp. 277-84 (2010) IF: 4,657
Maasz A, Melegh B: GENOME MEDICINE 2: pp. 64 (2010) IF: 0
Csiky B, Nyul Z, Tóth G, Wittmann I, Melegh B, Rauh M, Rascher W, Sulyok E: EXP CLINICAL ENDOCRINOLOGY & DIABETES 118: pp. 735-40 (2010) IF: 1,826
Kisfali P, Polgár N, Sáfrány E, Sümegi K, Melegh BI, Bene J, Wéber A, Hetyésy K, Melegh B: CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY 17: pp. 3533-41 (2010) IF: 4,630
Mohás M, Kisfali P, Járomi L, Maász A, Fehér E, Csöngei V, Polgár N, Sáfrány E, Cseh J, Sümegi K, Hetyésy K, Wittmann I, Melegh B: CARDIOVASC DIABETOLOGY 9: pp. 79 (2010) IF: 2,720
Hadarits F, Kisfali P, Mohás M, Maász A, Sümegi K, Szabó M, Hetyésy K, Valasek A, Janicsek I, Wittmann I, Melegh B: POR 17: pp. 39-44 (2011) IF: 1,483
Hadzsiev K, Polgar N, Bene J, Komlosi K, Karteszi J, Hollody K, Kosztolanyi G, Renieri A, Melegh B: JOURNAL OF HUMAN GENETICS 56: pp. 183-7 (2011) IF: 5,047
Horvatovich K, Bokor S, Baroth C, Maasz A, Kisfali P, Jaromi L, Polgar N, Toth D, Ros J, Endreffy E, Molnar D, Melegh B: INTERNATIONAL JOURNAL OF PEDIATRIC OBESITY 6: pp. 318-25 (2011) IF: 2,654
Bene J, Csiky B, Komlosi K, Sulyok E, Melegh B: SCANDINAVIAN JOURNAL OF CLINICAL & LABORATORY 71: pp. 280-6 (2011) IF: 1,629
Csöngei V, Járomi L, Sáfrány E, Sipeky C, Magyari L, Polgár N, Bene J, Sarlós P, Lakner L, Baricza E, Szabó M, Rappai G, Melegh B: INTERNATIONAL JOURNAL OF COLORECTAL DISEASE 26: pp. 1119-25 (2011) IF: 2,645
Járomi L, Csöngei V, Polgár N, Rappai G, Szolnoki Z, Maász A, Horvatovich K, Sáfrány E, Sipeky C, Magyari L, Melegh B: NEUROMOLECULAR MEDICINE 13: pp. 179-86 (2011) IF: 4,657
Horvatovich K, Bokor S, Polgar N, Kisfali P, Hadarits F, Jaromi L, Csongei V, Repasy J, Molnar D, Melegh B: DIABETES & METABOLISM 37: pp. 432-9 (2011) IF: 3,033
Safrany E, Szell M, Csongei V, Jaromi L, Sipeky C, Szabo T, Kemeny L, Nagy J, Melegh B: INFLAMMATION 34: pp. 603-8 (2011) IF: 1,777
Sipeky C, Csongei V, Jaromi L, Safrany E, Maasz A, Takacs I, Beres J, Fodor L, Szabo M, Melegh B: DRUG METABOLISM PHARMACOKINETICS 26: pp. 206-15 (2011) IF: 2,558
Hadarits F, Kisfali P, Mohás M, Maász A, Duga B, Janicsek I, Wittmann I, Melegh B: MOLECULAR BIOLOGY REPORTS 39: pp. 1949-55 (2012) IF: 1,87

Budget: 6 000 000 ,-Ft

Study of genetic susceptibility factors associated with common polygenic diseases, and of mutations associated with monogenic diseases by using biobanks.

Béla Melegh
Department of Medical Genetics, University of Pécs, Clinical Center

The collections of our biobank, which had already been affiliated to the Biobanking and Biomolecular Research Infrastructure (BBMRI) network, belong to two major biobank types: first, collections of samples from subjects having diseases affecting large populations with polygenic origin in which we could study different susceptibility SNPs; and second, the collections of rare disease phenotypes, in which we could perform specific mutation oriented studies and genotype-phenotype association investigations. We could further increase our Roma collection size, which now is over the 1000 samples; this is significant, however does not fulfill the ”population cohort” criteria of the BBMRI (> 10 000 samples with clinical dataset). In the susceptibility gene cohort we studied the stroke, metabolic syndrome, coronary heart disease, IBD (ulcerative colitis and Crohn’s disease), rheumatoid arthritis, spondylosys ankylopoetica, and SLE diseases. Part of our investigations were replication studies, most of them, however, were original observations, in which we could reveal previously unknown susceptibility associations. We investigated several functional polymorphysms of genes known to associate with altered triglyceride metabolism (APOA5, GCKR, GALTN2, MLXIP, ANGPTL3, CILP2, and TRIB1) in stroke and metabolic syndrome affected individuals, and could verify susceptibility of protecting features for these SNP-s, or for their naturally occurring heliotypes. It should be noted, that the robust GWAS studies verify dozens of the novel risk conferring alleles, these efforts are in limited position, since the number of the etiology-stratified stroke collections are still just very few worldwide, and the GWAS studies are not extended to do haplotype analysis either. We tried to take the advantage of this status; and could reveal that certain SNP-s has susceptibility or protective nature only in certain haplotye combinations in stroke and metabolic syndrome, such associations would had not been revealed by the usual GWAS studies. We could find such associations for rheumatoid arthritis, as well. Our Roma collection enabled us to perform several pharmcogenomic investigations, we had original observations with VKORC1, CYP2C9, and MDR1 (ABCB1) natural variants and natural haplotype combinations; it is clear that these drug metabolization systems in Romany people strongly differs from the average Hungarian population, which has also clear clinical significance either. Amongst the monogenic diseases we investigated selected neuromuscular diseases; thus, we could observe novel phenotypic variant of the mtDNA C11777A mutation, and also performed Rett syndrome genetic profiling in our Rett biobank.

PUBLICATIONS

Szolnoki Z, Maasz A, Magyari L, Horvatovich K, Farago B, Kondacs A, Bodor A, Hadarits F, Orosz P, Ille A, Melegh B: CLINICAL NEUROLOGY AND NEUROSURGERY 111: pp. 227-30 (2009) IF: 1,303

Farago B, Talian GC, Komlosi K, Nagy G, Berki T, Gyetvai A, Szekanecz Z, Nyarady Z, Kiss CG, Nemeth P, Czirjak L, Melegh B: RHEUMAT INTERNATIONAL 29: pp. 793-6 (2009) IF: 1,493

Lakner L, Csöngei V, Sarlós P, Járomi L, Sáfrány E, Varga M, Orosz P, Magyari L, Bene J, Miheller P, Tulassay Z, Melegh B: INTERNATIONAL JOURNAL OF COLORECTAL DISEASE 24: pp. 503-7 (2009) IF: 2,102

Sáfrány E, Pazár B, Csöngei V, Járomi L, Polgár N, Sipeky C, Horváth IF, Zeher M, Poór G, Melegh B: SCAND JOURNAL OF IMMUNOLOGY 70: pp. 68-74 (2009) IF: 2,108

Sipeky C, Csongei V, Jaromi L, Safrany E, Polgar N, Lakner L, Szabo M, Takacs I, Melegh B: PHARMACOGENOMICS 10: pp. 1025-32 (2009) IF: 3,893

Sipeky C, Lakner L, Szabo M, Takacs I, Tamasi V, Polgar N, Falus A, Melegh B: BLOOD CELLS, MOLECULES & DISEASES 43: pp. 239-42 (2009) IF: 2,901

Talián G, Lakner L, Bene J, Komlósi K, Horváth K, Gasztonyi B, Miheller P, Figler M, Mózsik G, Tulassay Z, Melegh B: INT JOURNAL IMMUNOGENETICS 36: pp. 329-35 (2009) IF: 1,522
Safrany E, Melegh B: CURR MEDICINAL CHEMISTRY 16: pp. 3766-74 (2009) IF: 4,708
Kisfali P, Mohás M, Maász A, Polgár N, Hadarits F, Markó L, Brasnyó P, Horvatovich K, Oroszlán T, Bagosi Z, Bujtor Z, Gasztonyi B, Rinfel J, Wittmann I, Melegh B: NUTRITION, METABOLISM AND CARDIOVASCULAR DISEASES 20: pp. 505-11 (2010) IF: 3,517
Safrany E, Hobor R, Jakab L, Tarr T, Csongei V, Jaromi L, Sipeky C, Valasek A, Zeher M, Fust G, Czirjak L, Melegh B: INFLAMMATION RES 59: pp. 159-64 (2010) IF 2,004
Mohás M, Kisfali P, Baricza E, Mérei A, Maász A, Cseh J, Mikolás E, Szijártó IA, Melegh B, Wittmann I: EXPERIMENTAL AND CLINICAL ENDOCRINOLOGY & DIABETES 118: pp. 209-12 (2010) IF: 1,826
Járomi L, Csöngei V, Polgár N, Szolnoki Z, Maász A, Horvatovich K, Faragó B, Sipeky C, Sáfrány E, Magyari L, Kisfali P, Mohás M, Janicsek I, Lakner L, Melegh B: JOURNAL OF MOLECULAR NEUROSCIENCE 41: pp. 121-8 (2010) IF: 2,922
Csöngei V, Járomi L, Sáfrány E, Sipeky C, Magyari L, Faragó B, Bene J, Polgár N, Lakner L, Sarlós P, Varga M, Melegh B: WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY 16: pp. 176-83 (2010) IF: 2,240
Polgár N, Járomi L, Csöngei V, Maász A, Sipeky C, Sáfrány E, Szabó M, Melegh B: EUROPEAN JOURNAL OF NEUROLOGY 17: pp. 1033-9 (2010) IF: 3,765
Hadzsiev K, Maasz A, Kisfali P, Kalman E, Gomori E, Pal E, Berenyi E, Komlosi K, Melegh B: NEUROMOLECULAR MEDICINE 12: pp. 277-84 (2010) IF: 4,657
Maasz A, Melegh B: GENOME MEDICINE 2: pp. 64 (2010) IF: 0
Csiky B, Nyul Z, Tóth G, Wittmann I, Melegh B, Rauh M, Rascher W, Sulyok E: EXP CLINICAL ENDOCRINOLOGY & DIABETES *1*18: pp. 735-40 (2010) IF: 1,826
Kisfali P, Polgár N, Sáfrány E, Sümegi K, Melegh BI, Bene J, Wéber A, Hetyésy K, Melegh B: CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY 17: pp. 3533-41 (2010) IF: 4,630
Mohás M, Kisfali P, Járomi L, Maász A, Fehér E, Csöngei V, Polgár N, Sáfrány E, Cseh J, Sümegi K, Hetyésy K, Wittmann I, Melegh B: CARDIOVASC DIABETOLOGY 9: pp. 79 (2010) IF: 2,720
Hadarits F, Kisfali P, Mohás M, Maász A, Sümegi K, Szabó M, Hetyésy K, Valasek A, Janicsek I, Wittmann I, Melegh B: POR 17: pp. 39-44 (2011) IF: 1,483
Hadzsiev K, Polgar N, Bene J, Komlosi K, Karteszi J, Hollody K, Kosztolanyi G, Renieri A, Melegh B: JOURNAL OF HUMAN GENETICS 56: pp. 183-7 (2011) IF: 5,047
Horvatovich K, Bokor S, Baroth C, Maasz A, Kisfali P, Jaromi L, Polgar N, Toth D, Ros J, Endreffy E, Molnar D, Melegh B: INTERNATIONAL JOURNAL OF PEDIATRIC OBESITY 6: pp. 318-25 (2011) IF: 2,654
Bene J, Csiky B, Komlosi K, Sulyok E, Melegh B: SCANDINAVIAN JOURNAL OF CLINICAL & LABORATORY 71: pp. 280-6 (2011) IF: 1,629
Csöngei V, Járomi L, Sáfrány E, Sipeky C, Magyari L, Polgár N, Bene J, Sarlós P, Lakner L, Baricza E, Szabó M, Rappai G, Melegh B: INTERNATIONAL JOURNAL OF COLORECTAL DISEASE 26: pp. 1119-25 (2011) IF: 2,645
Járomi L, Csöngei V, Polgár N, Rappai G, Szolnoki Z, Maász A, Horvatovich K, Sáfrány E, Sipeky C, Magyari L, Melegh B: NEUROMOLECULAR MEDICINE 13: pp. 179-86 (2011) IF: 4,657
Horvatovich K, Bokor S, Polgar N, Kisfali P, Hadarits F, Jaromi L, Csongei V, Repasy J, Molnar D, Melegh B: DIABETES & METABOLISM 37: pp. 432-9 (2011) IF: 3,033
Safrany E, Szell M, Csongei V, Jaromi L, Sipeky C, Szabo T, Kemeny L, Nagy J, Melegh B: INFLAMMATION 34: pp. 603-8 (2011) IF: 1,777
Sipeky C, Csongei V, Jaromi L, Safrany E, Maasz A, Takacs I, Beres J, Fodor L, Szabo M, Melegh B: DRUG METABOLISM AND PHARMACOKINETICS 26: pp. 206-15 (2011) IF: 2,558
Hadarits F, Kisfali P, Mohás M, Maász A, Duga B, Janicsek I, Wittmann I, Melegh B: MOLECULAR BIOLOGY REPORTS 39: pp. 1949-55 (2012) IF: 1,87

Teljes támogatás: 3.000.000,- Ft

A POLI-ADP-RIBÓZ POLIMERÁZ (PARP-1) SZEREPE KARDIOVASZKULÁRIS REGENERÁCIÓBAN

Sümegi Balázs, Berente Zoltán, Kovács Krisztina, Rácz Boglárka, Debreceni Balázs, Radnai Balázs, Tucsek Zsuzsanna, Veres Balázs Bognár Eszter – Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet

A vérnyomás megemelkedésére a szív a bal kamra megnagyobbodásával (ventrikuláris hipertrófia) válaszol, mely gyakran az első lépés a szívelégedetlenség kialakulásához. A hipertóniás szívbetegség gyakran a szív struktúrájának és funkciójának a megváltozásával jár, beleértve a miociták hipertrófiáját, intersticiális fibrózis kialakulását, ami végül a miokardium teljesítményének és hemodinamikájának a károsodásához vezethet ezért igen fontos lenne megismerni a károsodott szövet regenerációs mechanizmusát. Az ismert, hogy a MAP kinázok, MAP kináz foszfatáz-1 és HSP-k fontos szerepet játszanak a kardióvaszkulár regenerációban (FASEB J. 2010 Aug;24(8):2985-97, Circ Res. 2011 Apr 15;108(8):960-70). Ebben a pályázatban megvizsgáltuk a PARP inhibítorok hatását a regenerációs folyamatokban. Ismert tény, hogy a magas vérnyomással és öregedéssel kapcsolatos szívbetegségek kialakulásában a szív minden része, beleértve a miociták és nem-miocitikus sejtek, úgymint fibroblasztok, endothel sejtek, az extracelluláris mátrix fehérjék, fibrillárlis kollagén és szív erei is érintett. A hipertónia oxidatív stresszt indukál, azonban nem ismert minden reaktív oxigén gyök (ROS) eredete, ezért felmerül a lehetősége a NADPH oxidáz, nitrogén-monoxid szintáz, lipooxigenáz, ciklo-oxigenáz, xanthinoxidáz, és citokróm P450 enzimek valamint a mitokondriális légzési lánc fontos szerepének a szabadgyökök termelésében. Oxidatív stressz által indukált kedvezőtlen folyamatok; mint DNS károsodás és változások a jelátviteli útvonalakban jelentős mértékben hozzájárul a szív átalakulásának folyamatához és a negatívan befolyásolja a regenerációban fontos kináz kaszkádok és transzkripciós faktorok szabályozását, mely változások negatívan hathatnak a szöveti regenerációra (Mol Biol Rep. 2011 Jan;38(1):9-16). A DNS károsodás indukálja a nukleáris poli(ADP)ribóz-polimeráz 1 (PARP1) aktivációját ami csökkenti a sejt NAD+ és ATP készletét, és indukálhat nemkívánatos változásokat a kináz kaszkádokban, ami apoptopikus vagy nekrotikus sejt halálhoz vezethet. PARP aktivációja bizonyított az ischemiás szív modellekben és HF emberek biopsziás mintáiból.

Számos kísérleti adat bizonyítja, hogy a PARP gátlók védik a szívet ischemia-repefúzió által okozott károsodásoktól. Nincs még adat azonban a PARP gátlók potenciális védelmi hatásáról hipertóniás patkányoknál, akik a HF valamelyik stádiumában vannak.

Korábbi munkáink során kimutattuk, hogy a PARP inhibitorok pozitív hatással vannak a stressz hatására kialakuló jelátviteli útvonalak változásaira, mint például: ERK1/2, p38 MAP kináz, JNK és PI-3-kináz-Akt-GSK-3β útvonalak, amik kritikus szerepet játszanak a szív hipertóniás növekedése során.

A spontán hipertóniás patkány (SHR) egy kísérleti modell, ami a hosszú távú magas vérnyomás és konzekvens hipertóniás kardiomiopátia és HF közötti kapcsolatot tanulmányozza. Elért eredményeink alapján elmondható, hogy a PARP gátlása kedvező hatással van a szív átalakulására a kardiomiopátiás/HF modellben. Először bizonyítottuk, hogy a PARP enzim krónikus gátlása (L2286) a szív maladaptív átrendeződét a különféle kináz kaszkádok kedvező befolyásával akadályozza meg.

Eredmények: Kísérletünk kezdetén a kontroll (CFY) és magas vérnyomású (SHR) állatok vérnyomása között nem találtunk különbséget. A spontán hipertenzív állatoknál, melyek nem kaptak kezelést a kísérletsorozat végére, ekcentrikus balkamra hipertrófiát és csökkent bal kamra funkciót (LV) mutattak, míg ugyanezen csoport (SHR), aki PARP gátló kezelést kapott megőrizte a kezdeti szisztolés

bal kamra funkcióját. Az L2286 nevű PARP gátlóval történt kezelés a túlélési arányt is szignifikáns mértékben javította ($p<0.01$). A PARP gátló kezelés nem befolyásolta a magas vérnyomást a spontán hipertenzív állatcsoportban, azonban csökkentette a plazma BNP-szintet($p<0.01$) és ugyancsak kedvezően befolyásolta a mért gravimetriás paramétereket ($p<0.05$) illetve a fibrózis kiterjedésének a nagyságát ($p<0.05$). A PARP gátlás esetében megnövekedett Akt-1/GSK-3 beta($p<0.01$), ERK ½ ($p<0.01$) és PKC epszilon ($p<0.01$) foszforilációt és csökkent JNK ($p<0.05$), p-38MAPK ($p<0.01$), PKC pan beta II és PKC zeta/lambda ($p<0.01$), PKC alfa/betaII és delta foszforilációt tudtunk kimutatni. Eredményeink alapján elmondható, hogy a PARP gátlás a különféle kináz kaszkádok modulálása révén csökkenti az NF-kappaB transzkripciós faktor aktivációját, melynek elsődleges szerepe van a remodelling folyamata során. Az utóbbi időben kimutattuk, hogy a PARP gátlás jelentősen növeli a c-Kit(CD117) expresszióját oxidatív stresszben, melynek fontos szerepe lehet a progenitor sejtek szabályozásában (Circ Res. 2011 Oct 14;109(9):1044-54.). Hosszan tartó PARP gátló kezelés esetén a legfontosabb oxidatív stressz során befolyásolt jelátviteli útvonalak hosszú-távú és kedvező változásai figyelhetők meg. A PARP gátlása megakadályozza a remodelling folyamatát, megőrzi a szisztolés funkciót és késlelteti a szívelégtelenség kialakulását hipertenzív kardiomiopátia során.

Ismert tény, hogy az egyik kemoterápiás gyógyszerünk- a Doxorubicin- alkalmazásának egyik legsúlyosabb szövődménye a kardiomiopátia kialakulása. A különféle reaktív oxigén gyökök (ROS) megemelkedett mennyisége és különféle patológiás jelátviteli kaszkádok aktiválódása fontos szerepet játszik a kardiomiopátia kialakulásában. Megvizsgáltuk a PARP gátló, L2286 vegyület, és egy szuperoxid-dizmutáz-hatású vegyület, a Tempol, szerepét Doxorubicin indukálta szívelégtelenség modellben. H9C2 sejtvonalon-patkány kardiomiociták- a PARP gátló L2286 koncentráció-függő módon csökkentette a Doxorubinin-indukálta sejtkárosodás mértékét. In vitro kísérleteink során az egerek 1 hétig L2286 illetve Tempol kezelést kaptak a Doxorubicin alkalmazását megelőzően. Mindkét alkalmazott vegyület fokozta a citoprotektív jelátviteli útvonalak, úgymint Akt, foszfo-specifikus protein kináz Cζ/λ aktivitását, és csökkentették a sejthalált indukáló útvonalak aktivitását, úgymint GSK3-beta, JNK, p38 MAPK útvonalak. A PARP gátló kezelés hatása kifejezettebb volt, és a túlélést is kedvezőbben befolyásolta. Az L2286 kezelés megnövelte a proapoptotikus FKHR1 transzkripciós faktor foszforilációját és fokozta a Hsp72 és Hsp90 expresszióját. Ezen eredményeink alapján azt feltételezzük, hogy a PARP gátlása a hő-sokk-faktor-1 (Hsf1) aktivitását növeli. A PARP gátlás citoprotektív hatása nemcsak a különféle jelátviteli útvonalak kedvező befolyásolásával, de a hő-sokk fehérjék expressziós szintjének kedvező befolyásolásával jár. A PARP gátlás a Creb, FKHR1 és Hsf1 transzkripciós faktorok aktivációját okozza.

Ezek az adatok mutatják, hogy PARP modulálja azokat a jelátviteli utakat, melyek jelentősek lehetnek a szöveti regenerációban.

Teljes támogatás: 3.000.000,- Ft

ROLE OF POLY-ADP-RIBOSE POLYMERASE (PARP-1) IN CARDIOVASCULAR REGENERATION

Balazs Sumegi, Zoltan Berente, Krisztina Kovacs, Boglarka Racz, Balazs Debreceni, Balazs Radnai, Zsuzsanna Tucsek, Balazs Veres, Eszter Bognar - University of Pecs Medical School Department of Biochemistry and Medical chemistry

The development of left ventricular hypertrophy (LVH) is an adaptive response to pressure overload and often is an initial step in the process to congestive heart failure (HF). Hypertensive heart disease involves alterations in cardiac structure and function, including hypertrophy of myocytes, ischemia, and interstitial fibrosis, leading eventually to impaired myocardial performance and apoptosis. It is well documented that MAP kinases, MAP kinase phosphatase-1 and heat shock proteins play and important roles in cardiovascular regeneration (FASEB J. 2010 Aug;24(8):2985-97, Circ Res. 2011 Apr 15;108(8):960-70). In this study we investigated the effect of PARP inhibitors in the regulation these proteins and try to reveal their role in the regeneration processes. DNA damage activates the nuclear enzyme poly(ADP-ribose)polymerase-1 (PARP) which can induce necrotic and apoptotic cell death, and can induce unfavorable changes in kinase cascades promoting changes in the activation of transcription factors which can negatively affect tissue regereration (Mol Biol Rep. 2011 Jan;38(1):9-16). These changes in the activation of transcription factor can contribute to the cardiac remodeling.

It was suggested that the release of nuclearly formed ADP-ribose polymers or ADP-ribosylated proteins could be responsible for the cytosolic and mitochondrial effects of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)-1 activation in oxidative stress. In this report, we provide a novel alternative mechanism. We found that reactive oxygen species-activated PARP-1 regulated the activation of JNK and p38 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) because inhibition of PARP-1 by pharmacons, small interfering RNA silencing of PARP-1 expression, or the transdominant expression of enzymatically inactive PARP-1 resulted in the inactivation of these MAPKs. This regulation was achieved by increased expression and enlarged cytoplasmic localization of MAPK phosphatase-1 (MKP-1) upon PARP-1 inhibition in oxidative stress because changes in MKP-1 expression were reflected in the phosphorylation states of JNK and p38. Furthermore, we found that in MKP-1-silenced cells, PARP inhibition was unable to exert its protective effect, indicating the pivotal roles of JNK and p38 in mediating the oxidative-stress-induced cell death as well as that of increased MKP-1 expression in mediating the protective effect of PARP inhibition. We suggest that regulation of a protein that can directly influence cytoplasmic signaling cascades at the expression level represents a novel mechanism for the cytoplasmic action of PARP-1 inhibition. Most recent data showed that PARP inhibition induced the activation of PI-3-kinase-Akt pathway, and this pathway can activates Creb transcription factors, and we showed that PARP inhibition by activating Akt activates Creb2 transcription factor which is responsible for the activation of MKP-1 expression.

Oxidative stress followed by abnormal signaling can play a critical role in the development of long-term, high blood pressure-induced cardiac remodeling in heart failure (HF). Since oxidative stress-induced poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) activation and cell death have been observed in several experimental models, we investigated the possibility that inhibition of nuclear PARP improves cardiac performance and delays transition from hypertensive cardiopathy to HF in a spontaneously hypertensive rat (SHR) model of HF. At the beginning of the study, systolic function was similar in both CFY and SHR groups. In the SHR-C group at the end of the study, eccentric hypertrophy with poor left ventricular (LV) systolic function was observed, while PARP inhibitor treatment preserved systolic LV function. Due to these favorably changes, the survival rate of SHRs was significantly improved ($P < 0.01$) by the administration of the PARP inhibitor (L-2286). The PARP inhibitor used

did not affect the elevated blood pressure of SHR rats, but moderated the level of plasma-BNP ($P < 0.01$) and favorably influenced all the measured gravimetric parameters ($P < 0.05$) and the extent of myocardial fibrosis ($P < 0.05$). The inhibition of PARP increased the phosporylation of Akt-1/GSK-3beta ($P < 0.01$), ERK 1/2 ($P < 0.01$), and PKC epsilon ($P < 0.01$), and decreased the phosphorylation of JNK ($P < 0.05$), p-38 MAPK ($P < 0.01$), PKC pan betaII and PKC zeta/lambda ($P < 0.01$), and PKC alpha/betaII and delta ($P < 0.05$). These data show that PARP inhibitor though the modulation of kinase cascades attenuated the activation of NF-kappaB transcription factor which which is a significant extent responsible for the remodeling processes. Most recently we showed that under oxidative strees PARP inhibition significantly increase the expression of c-Kit(CD117) which is a significant regulator in progenitor cells (Circ Res. 2011 Oct 14;109(9):1044-54.). That is, chronic inhibition of PARP induces long-term favorable changes in the most important signaling pathways related to oxidative stress. PARP inhibition also prevents remodeling, preserves systolic function, and delays transition of hypertensive cardiopathy to HF in SHRs.

It is well known that cardiomyopathy is one of the most severe side effects of the chemotherapeutic agent doxorubicin (DOX). The formation of reactive oxygen species plays a critical role in the development of cardiomyopathies, and the pathophysiological cascade activates nuclear enzyme poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), and kinase pathways. We characterized the effects of the PARP-inhibitor and kinase-modulator compound L-2286 in DOX-induced cardiac injury models. We studied the effect of the established superoxide dismutase-mimic Tempol and compared the effects of this agent with those of the PARP inhibitor. In the rat H9C2 cardiomyocytes, in which DOX-induced poly(ADP-ribosyl)ation, L-2286 protected them from the DOX-induced injury in a concentration-dependent manner. In the in vivo studies, mice were pretreated (for 1 week) with L-2286 or Tempol before the DOX treatment. Both the agents improved the activation of cytoprotective kinases, Akt, phospho-specific protein kinase Cζ/λ and suppressed the activity of cell death promoting kinases glycogen synthase kinase-3β, JNK, and p38 mitogen-activated protein kinase, but the effect of PARP inhibitor was more pronounced and improved the survival as well. L-2286 activated the phosphorylation of proapoptotic transcription factor FKHR1 and promoted the expression of Hsp72 and Hsp90 which suggest that PARP inhibition can activates heat shock factor-1 (Hsf1). These data suggest that the mode of the cytoprotective action of the PARP inhibitor may include the modulation of kinase pathways and heat shock protein expression.

These data show that inhibition of PARP can modulates signaling pathway and the activation of transcription factors like Creb, FKHR1 and Hsf1 which is favourable for tissue regeneration.

2 cm

Budget: 2.400,000.- HUF

ENHANCER VEGYÜLETEK, (-)-DEPRENIL ÉS (-)-BPAP, ÉLETMEGHOSSZABBÍTÓ HATÁSÁNAK ANALÍZISE

Miklya Ildikó
Semmelweis Egyetem, Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet

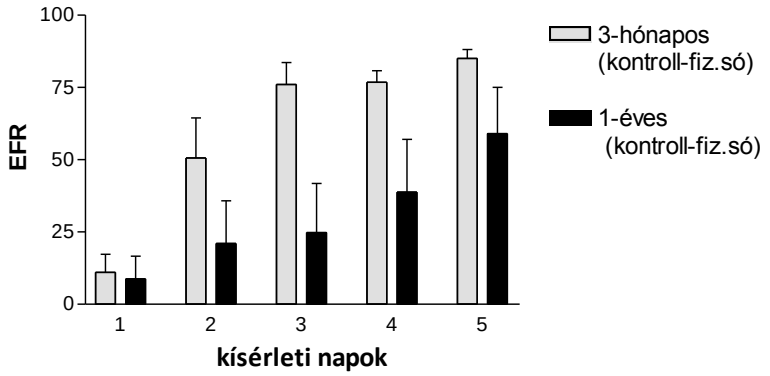
2010 májusában 200 Charles River hím patkánnyal kezdtünk el egy élethosszra tervezett („longevity") kísérletet. A még élő állatok jelenleg 23 hónaposak. Az állatokat 2 hónapos koruk betöltése után kezdtük el az 1. táblázatban foglaltak szerint fiziológiás sóval illetve a mi általunk kifejlesztett két specifikus hatásmódú, úgynevezett enhancer vegyülettel [(-)-deprenil és R-(-)-1-(benzofurán-2-yl)-2-propilaminopentán, (-)-BPAP] kezelni.

1. táblázat Öt csoport krónikus kezelése szubkután, hetente háromszor (hétfő, szerda, péntek).

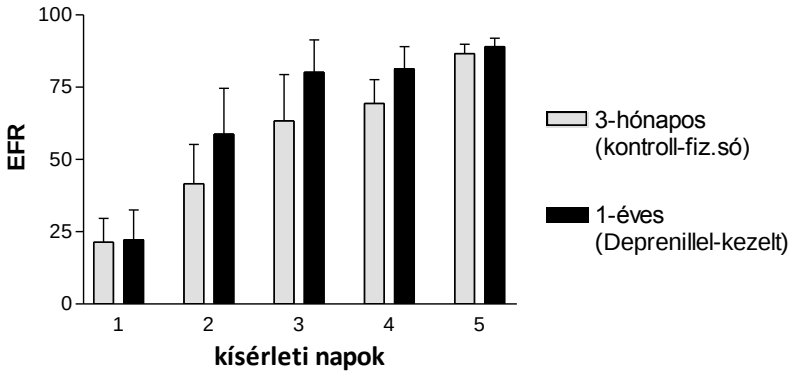
CSOPORT	KEZELÉS	DÓZIS	ÁLLATOK SZÁMA
1	Fiziológiás sóoldat	0.5 ml/kg	40
2	(-)-Deprenil	0.1 mg/kg	40
3	(-)-Deprenil	0.001 mg/kg	40
4	(-)-BPAP	0.05 mg/kg	40
5	(-)-BPAP	0.0001 mg/kg	40

A kezelés során 3 havonta vizsgáltuk az állatok tanulási képességét. A shuttle boxban végzett mérések az mutatták, hogy az enhancer anyagok számottevő tanulási teljesítményt fokozó hatása 4 hónapos kezelés után jelentkezett (feltételezhetően az igen alacsony dózistartományok miatt).

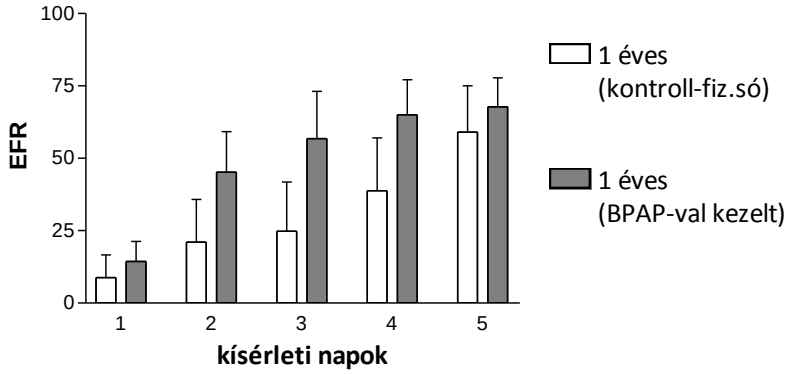
Az 1. ábrán jól látható a kontroll csoportokban a tanulás korfüggő hanyatlása [csökkenő elhárító feltételes reflex (EFR) szám], mely jelzi a katecholaminerg rendszer működésének gyengülését, mivel a fiziológiás sóoldattal kezelt 3 hónapos állatok tanulási képessége szignifikánsan jobb volt, mint az 1 éves kontroll állatok teljesítménye az 5 kísérleti napon.



1. ábra
3 hónapos és 1 éves állatok shuttle boxban mért tanulási képességének összehasonlítása. Az állatokat naponta 100 ciklus ideje alatt treníroztuk. A két csoport között mutatkozó szignifikáns különbséget (P<0.001) kétutas ANOVA statisztikai próbával határoztuk meg.



2. ábra szemléletesen mutatja, hogy a 0.1 mg/kg (-)-deprenil kezelés hatására megszűnt az 1 éves állatok tanulási teljesítményében mutatkozó korfüggő hanyatlás (P>0.05). Az állatokat naponta 100 ciklus ideje alatt treníroztuk. Értékeléshez a kétutas ANOVA statisztikai próbát használtuk.



3. ábra Első kísérletes bizonyíték 0.0001 mg/kg (-)-BPAP antiaging hatására (P<0.05). Az állatokat naponta 100 ciklus ideje alatt treníroztuk shuttle boxban. Értékeléshez a kétutas ANOVA statisztikai próbát használtuk.

A 3. ábrán jól látható, hogy 10 hónapig tartó 0,0001 mg/kg-os (-)-BPAP krónikus kezeléssel az 1 éves állatok tanulási teljesítménye jelentősen javítható (P<0.05).

2. táblázat

A kezelt csoportokban (N=40) bekövetkezett pusztulások időbeli lefolyása.

Kor (hónap)	Fiziológiás sóoldat (0,5 ml/kg)	(-)-deprenil 0.1 mg/kg	(-)-deprenil 0.001 mg/kg	(-)-BPAP 0.05 mg/kg	(-)-BPAP 0.0001 mg/kg
8.	1				
9.					
10.					
11.		1			
12.					
13.			1		
14.	3		2	1	
15.	1		1		
16.			1		1
17.	1	1	1	2	3
18.	3		2		1
19.	1		2	1	
20.	3	4	2	2	2
21.	3	4	2	3	
22.	4	2		4	2
Elhullott állatok száma	**20**	**12**	**14**	**13**	**9**

A 2. táblázat mutatja a fiziológiás sóval illetve enhancer vegyülettel kezelt csoportokban a 22. hónap végéig bekövetkezett pusztulásokat. Az adatokból jól látható, hogy a (-)-deprenil és a (-)-BPAP mindkét vizsgált dózisában már eddig is jelentősen csökkentette az elhalálozások számát. A sóval kezelt csoportban az első állatot már 8 hónapos korában vesztettük el, és a 22. hónap végéig már 20 állat pusztult el. A leghatékonyabbnak a 0.0001 mg/kg (-)-BPAP bizonyult. Ebben a csoportban az elhullás csak a 16. hónapban kezdődött el, és a 22. hónap végéig csak 9 állatot vesztettünk el.

A most folyó kísérletek előtt még nem végeztünk élettartam meghosszabbító méréseket (-)-deprenilnek az enhancer-hatású dózisaival, és a (-)-BPAP-val ez az első „longevity" kísérlet.

A kísérletek még tovább folynak. Az idei év végéig várható az összes állat kipusztulása, vagyis a kísérlet befejezése, majd az eredmények közlése.

2 cm

Budget: 2.400,000.- HUF

QUESTION OF LIFE OR DEATH

Ildikó Miklya
Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Semmelweis University

In May 2010 we started a still running longevity study which measures for the first time the effect of (-)-deprenyl and R-(-)-1-(benzofuran-2-yl)-2-propilaminopentan, (-)-BPAP, on the lifespan of rats on low doses of the enhancer substances. We started working with 2-month-old Charles River male rats. The rats have completed the 22nd month of their life.

Table 1. Longevity Study on 200 Charles River male rats. Treatment subcutaneously, 3 times a week (Monday, Wednesday, Friday).

Group	Treatment	Dose	Number of animals
1	Saline	0.5 ml/kg	40
2	(-)-Deprenyl	0.1 mg/kg	40
3	(-)-Deprenyl	0.001 mg/kg	40
4	(-)-BPAP	0.05 mg/kg	40
5	(-)-BPAP	0.0001 mg/kg	40

Every three months we are testing the aging-related changes in their learning performance. Fig.1 shows that, due primarily to normal aging of the catecholaminergic neuronal system in the brain stem, saline-treated 3-month-old rats are significantly better performing than their 1-year-old peers.

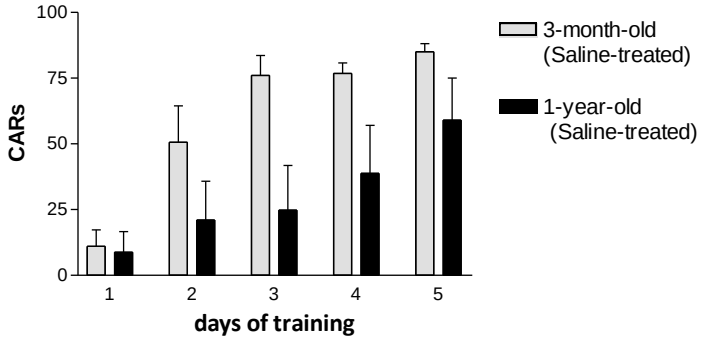


Fig.1. Experimental evidence that 3-month-old rats are significantly better learners than their 1-year-old peers *(P*<0.001). Significance was evaluated by multi-factor analysis of variance (ANOVA). Rats were trained in the shuttle box with 100 trials per day. Conditioned avoidance responses (CARs).

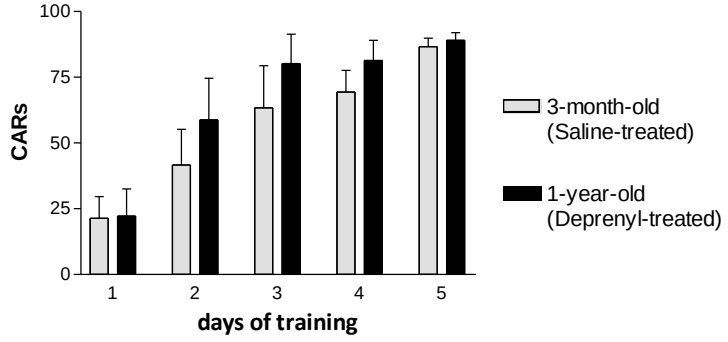


Fig.2. Experimental evidence shows that in rats treated with 0.1 mg/kg (-)-deprenyl there is no sign of aging-related decay in the learning ability. Rats were trained in the shuttle box with 100 trials per day. Significance was evaluated by multi-factor analysis of variance (ANOVA). Conditioned avoidance responses (CARs).

Fig.2 shows that due to the anti-aging effect of (-)-deprenyl, in the group of rats treated with 0.1 mg/kg (-)-deprenyl there is no sign of aging-related decay in the learning ability.

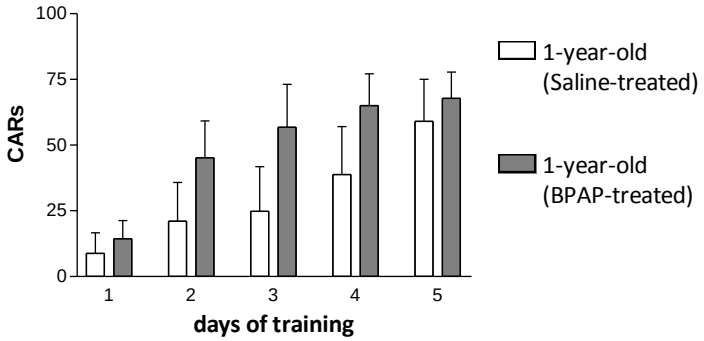


Fig.3. First evidence for the anti-aging effect of 0.0001 mg/kg (-)-BPAP (P<0.05). Rats were trained in the shuttle box with 100 trials per day. Significance was evaluated by multi-factor analysis of variance (ANOVA).

In the still running longevity study we already observed the effectiveness of (-)-BPAP. 1-year-old rats treated for 10 months subcutaneously, 3-times a week, with the extremely low dose of (-)-BPAP (0.1 nanogram/kg!) performed in the shuttle box significantly better (P<0.05) than their peers treated similarly with saline (Fig.3).

Table 2 shows the number of rats deceased in various groups prior to the end of the 22th month of their life. It is already in this stage of the still running longevity study perceptible that treatment with 0.1 mg/kg (-)-deprenyl and 0.05 and 0.0001 mg/kg (-)-BPAP, respectively, slows the dying out of the rats.

Table 2.

The dying out of Charles River male rats, prior to the end of the 22th month of their life.

Age (months)	Saline	(-)-deprenyl 0.1 mg/kg	(-)-deprenyl 0.001 mg/kg	(-)-BPAP 0.05 mg/kg	(-)-BPAP 0.0001 mg/kg
8th	1				
9th					
10th					
11th		1			
12th					
13th			1		
14th	3		2	1	
15th	1		1		
16th			1		1
17th	1	1	1	2	3
18th	3		2		1
19th	1		2	1	
20th	3	4	2	2	2
21th	3	4	2	3	
22th	4	2		4	2
Number of deceased rats	**20**	**12**	**14**	**13**	**9**

Considering the preliminary results of the still running longevity study, demonstrated in Fig.1-3 and Table 2, *we can conclude that the enhancer effect is responsible for the observed anti-aging effects of (-)-deprenyl and (-)-BPAP*.

2 cm

2 cm

Teljes támogatás: 3.600.000 Ft

ÍZÜLETI CSÚSZÓFELSZÍN-DEFEKTUSOK REKONSTRUKCIÓJÁNAK TOVÁBBFEJLESZTÉSE

Dr. Módis László[1], Dr. Hangody László[2], Dr. Vásárhelyi Gábor[2], Dr.Bartha Lajos[2], Dr. Hangody László Rudolf[2]., Dr.Szerb Imre[2], Dr. Tibay György[2],

[1]DEOEC Anatómiai, Szövet-,és Fejlődéstani Intézet, Debrecen
[2] Fővárosi Uzsoki utcai Kórház, Orthopéd-Traumatologiai Osztály, Budapest

Klinikai és hisztológiai vizsgálatainkkal kapott eredményeink közül kiemelendő, hogy két szintetikus polymer, az osteoconductiv és osteoinductív hatásúnak bizonyult polyethylen oxid terephtalat/polybuthylen terephtalat (PEOBT/PBT, PolyActiv), valamint egy másik anyag, a ChondroMimetic igen eredményesen használhatók a mozaikplasztika (MP), a nemzetközileg egyik legelfogadottabb ízületi csúszófelszín rekonstrukciós módszer során létrehozott, az autolog osteochondralis graftokat szolgáltató donor-helyek tömeszelésére. Ezáltal megakadályozható a porcszövetet épségét veszélyeztető postoperativ intraarticularis vérzés. A betegek operált ízületeinek funkcióit különböző klinikai tesztekkel ellenőrízve, valamint a műtéti helyekből a műtétek után 9 hónappal vett biopsziás mintákban proteoglycan és kollagén-szelektív hisztokémiai valamint polarizációs mikroszkópos vizsgálatokkal értékelve igazoltuk, hogy a PolyActív igen jól használható a donor-csatornákból kiinduló esetleges vérzés és a következményes hemarthros megelőzésére (Bartha et al, 2011). A PolyActiv alkalmazása lényegesen jobb eredményekhez vezetett, mint a korábban általunk állatkísérletekben tesztelt hatféle, a sebészetben gyakran használt mesterséges és természetes anyag, ideértve a komprimált kollagén szivacsot. A PolyActiv alkalmazása után nem csupán az osteoconductiv és osteoinductív hatást, hanem az ízületi üreg felé tekintő felszíneket borító rostos porc kialakulását is megfigyelhettük.

Hasonló vizsgálatokat végeztünk a PolyActiv alkalmazásával lovakon végrehajtott MP után. Számítógépes mikroszkópos képanalitikai, valamint kvantitatív polarizációs mikroszkópos vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy a porózus PolyActív dugókban számos új szabálytalan alakú csontgerenda képződik, és ezekben a kollagén rostok térbeli orientációs mintázata megegyezik a műtéti területek mellett található, érintetlen csont trabeculák kollagén szerkezetével (Albert et al., 2010, és in press).

A biodegradábilis ChondroMimetic – mint egy időleges mikroszkópos váz-anyag – alkalmasnak bizonyult humán osteochondrális defektusok helyreállítására is (Vásárhelyi et al, közlésre előkészítve).

Ugyancsak klinikai és szövettani módszerekkel megvizsgáltuk a friss osteochondrális (élődonoros) graftok humán ortopédsebészeti alkalmazhatóságát. Az eddigi eredmények ígéretesek (Hangody et al, közlésre előkészítve).

A MP témából több alkalommal készíttetünk review cikket. A beszámolási időszakban két ilyen publikáció született: egy folyóirat-cikk (Hangody et al., 2010), és egy kézikönyvfejezet (Hangody et al, 2010).

Budget: 3.600.000 HUF

FURTHER DEVELOPMENT OF RECONSTRUCTION OF THE WEIGHT BEARING ARTICULAR SURFACE DEFECTS

Módis, László, MD, DSc[1], Hangody, László, MD, DSc[2], Vásárhelyi, Gábor MD[2] , Bartha, Lajos, MD, PhD[2], Hangody, László Rudolf, MD[2], Szerb, Imre, MD, PhD[2], Tibay, György MD[2]

[1]University of Debrecen, Medical and Health Science Center, Department of Anatomy, Histology and Embryology, Debrecen
[2] Orthopaedic and Trauma Department, Uzsoki Hospital, Budapest

Our clinical and histological studies suggest that the following two synthetic materials, the osteoconductive and osteoinductive polyethyleneoxyde terephthalate/polybutylene terephthalate (PEOBT/PBT, PolyActiv), and the ChondroMimetic can be used in MosaicPlasty (MP) which became an internationally and widely used orthopaedic surgical reconstruction technique of weight bearing articular surface lesions. In MP, it is a critical step to prevent postoperative intraarticular bleeding by filling the donor tunnels where the autologous osteochondral grafts were taken from. Using postoperative clinical investigations as well as histological and polarized light microscopic analyses of proteoglycan and collagen structure in biopsy samples taken 9 months after the surgery we found that PolyActiv is and optimal material to prevent bleeding and development of haemarthrosis (Bartha et al, 2011). PolyActiv proved to be better as compared to other six different natural and synthetic materials including compressed collagen sponge tested ealier in our labs in animal experiments. In addition to its osteoconductive and osteoinductive effects of the PolyActiv, we also observed appearance of fibrocartilage at the surface of PolyActiv plugs.

Similar studies were carried out by us in equine surgery using PolyActiv as a donor tunnel filling material during MP. According to our computer assisted microscopic image analytical and quantitative polarized ligh microscopical results, a high number of irregular bone trabeculae are formed within the PolyActiv plug but the spatial orientation pattern of their collagen fibers remains unchanged as compared to that of the bone trabeculae found in the vicinity of the operated area (Albert et al,, 2010, and in press).

The ChondroMimetic, which is a synthetic and biodegradable material proved to be also useful for the articular surface reconstruction in human orthopaedic surgery (Vásárhelyi et al., prepared for publication).

Using clinical and histological methods, we also tested the results of osteochondral allograft transplantation from a living donor. Our preliminary results are promising (Hangody et al., prepared for publication).

Two review papers were published about MP during this period: one in an international journal (Hangody et al., 2010), and one in a handbook (Hangody et al, 2010).

Budget: 3.600,000.- HUF

CARDIOVASCULARIS RIZIKÓÉRTÉKELÉSI MÓDSZER KIDOLGOZÁSA, TESZTELÉSE ÉS IMPLEMENTÁCIÓJA GYERMEK POPULÁCIÓRA

Molnár Dénes[1]
[1]Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ, Gyermekgyógyászati Klinika

A felnőtt populáció szív-érrendszeri kockázatbecslése céljára többféle hatékony eljárás került kidolgozásra, közös hátrányuk azonban, hogy a detektált fázisban a megbetegedés már nem visszafordítható. A gyermekkori rizikószűrés más megközelítést igényel: nem hagyatkozhatunk olyan tényezőkre (pl. kóros labor paraméterek), melyek jelentkezése hosszabb időtávlatban realisztikus csak. Ezzel szemben vannak olyan paraméterek, ill. a korai fejlődésnek olyan kritikus periódusai, melyeknek az összefüggését a későbbi rizikó státusszal igazolták. Az intrauterin fejlődés tekintetében ilyen a gesztációs korhoz képest kis születési súly, mely a későbbi életszakaszban utolérő súlygyarapodást implikál; vagy a nagy születési súly, mely általában kedvezőtlen hormonális imprintingre utal. Hasonlóképpen, a korai „adiposity rebound" (amikor a BMI grafikon lefutása a normális 6-8 éves életkor helyett korábban vált emelkedőbe) is előrejelzője a későbbi obesitasnak. A szoptatás protektív jelentősége, még ha az csekély mértékű is, jól ismert az egyes nem fertőző betegségek megelőzésében. Evidens, hogy a genetikai prediszpozició is jelentős hozzájáruló tényező, azonban populációs szintű szűrés molekulárbiológiai módszerekkel financiális és egyéb okok miatt jelenleg még nem lehetséges. Ezt részben kiválthatjuk a családi anamnézis gondos feltárásával, ami utalhat szív-érrendszeri betegségek kialakulásának fokozott veszélyére.

A fenti szempontok figyelembe vételével javasolt egy gyermek korosztályra konfigurált szűrési paraméter cluster (1. táblázat) mely egyéni és családi tényezőkből tevődik össze. A szív-érrendszeri kockázati cluster fix részét a családban előfordult bizonyos megbetegedések és kockázati tényezők, valamint a gyermek korai fejlődési adatai jellemzik. Ezek a paraméterek, melyek detektálásuk idején már nem befolyásolhatók, permanens rizikószintet jelentenek. További egyéni paraméterek (antropometriai adatok, valamint a vérnyomás) jelzik az aktuális állapotot: ezek viszont változtathatók, intervencióval hatékonyan befolyásolhatók.

A módszert az IDEFICS (**I**dentification and prevention of **D**ietary and lifestyle-induced health **EF**fects **I**n **C**hildren and infant**S**) multicentrikus, az Európai Unió 6-os kutatási-fejlesztési keretprogramjából támogatott projektünkben vizsgáltuk. A teljes nemzetközi mintából 5834, ezen belül 1671 magyar gyermek felelt meg annak a kritériumnak, hogy a fenti rizikóbecslő eljárás paraméterei rendelkezésre álltak. A populációban közel azonos volt a fiú-lány arány; a főbb jellemzők (átlag ± SD) a teljes ill. a magyar mintában:, életkor 6,3 ± 1,75 év ill. 6,3 ± 1,74 év, testmagasság 119, 4 ± 12,51 cm ill. 119, 7 ± 12,71 cm, testsúly 23,7 ± 6,99 kg ill. 23,7 ± 7,58 kg, BMI 16,3 ± 2,38 kgm^{-2} ill. 16,1 ± 2,61 kgm^{-2}. Az egyes kockázati tényezők előfordulási gyakoriságát a nemzetközi és a magyar mintában az 1. táblázat mutatja.

1. táblázat Egyéni és családi kockázati paraméterek, valamint előfordulási gyakoriságuk.

Változó	**Pontérték**	**Prevalencia a teljes mintában**	**Prevalencia a magyar mintában**
EGYÉNI KOCKÁZATI PARAMÉTEREK			
elhízás (BMI >30 kgm^{-2}; Cole, 2000)	2	5,5%	5,7 %
túlsúly (BMI >25 kgm^{-2}; Cole, 2000)	1	12,3%	10,6 %
derék körfogat > magasság fele	1	15,9%	16,8 %
pre-hipertonia ill. hipertonia (>90 ill. >95 percentil, NIH ajánlás)	1	10,2 % ill. 8,0%	10,4 % ill. 9,6 %
Gesztációs korhoz képest alacsony születési súly (SGA), ill. Gesztációs korhoz képest magas születési súly (LGA)	1	1,5% ill. 5%	1,4 % ill. 3,7 %

CSALÁDI KOCKÁZATI PARAMÉTEREK			
Korai cardiovascularis megbetegedés (<45 év)	Szülők, ill. testvérek esetében 2; nagyszülők esetében 1	31,4%	37,1 %
2-es típusú diabetes mellitus		28,3%	32,3 %
Hipertonia		57,6%	56,8 %
Dyslipidaemia		23,0%	16,3 %

A következő lépés azon score érték meghatározása volt, mely valóban érdemi mértékű kockázat emelkedést implikál. Ebben a korosztályban betegség diagnózist, mint határozott kimeneti kritériumot nem tudunk felállítani. Emiatt konszenzusos kritérium mentén validáltuk a pontértéket: kóros laboratóriumi paraméterek meglétével. Ezek a következők voltak: koleszterin, HDL-koleszterin, LDL-koleszterin, triglicerid, éhgyomri vércukor, HOMA-IR, HgbA1c, CRP. A kóros laborparaméterek $p<0,001$ szinten korreláltak a score értékekkel; lineáris regressziós modellben $R=0,112$ összefüggést mutattak. A 2. táblázat mutatja a pontértékek egyes összevont sávjainak a prevalenciáját, valamint e sávokban a 3 vagy több kóros laborparaméter meglétének az esélyét.

2. táblázat Három vagy több kóros laborparaméter meglétének az esélye egyes pontértéki sávokban

Össz. score érték	**Prevalencia (%)**		Labor score cut-off: 3 v több kóros labor paraméter megléte			
			Odds ratio* (95% CI)		Szignifikancia (khi-négyzet)	
	teljes	***magyar***	***teljes***	***magyar***	***teljes***	***magyar***
0	15,4	12,2	referencia		-	
1-3	60,9	61,0	1,1 (0,45 – 2,66)	0,5 (0,14 – 2,01)	NS (p = 1,000)	NS (p = 0,406)
4-6	20,5	22,5	3,6 (1,47 – 8,64)	1,6 (0,44 – 6,14)	p = 0,003	NS (p = 0,554)
7 vagy több	3,2	4,2	**8,3** (2,97 – 23,09)	**5,1** (1,18 – 21,82)	**p < 0,001**	**p = 0,029**

*A 0 score értékkel rendelkezőkhöz viszonyítva

Fenti eredmények alapján cut-off értéknek a 7-es score értéket választottuk ki, mint javasolt szűrési határértéket. Ezeknek a gyermekeknek a további kivizsgálása, életmódi tanácsadása mindenképpen indokolt. A két cluster-es kockázatbecslés előnyei a következők:

(1) kizárólag noninvazív elemeket tartalmaz, így alkalmas szűrésre az alapellátásban is;

(2) a korai fejlődési tényezők és a családi anamnézis bevonása révén képes azonosítani kockázattal érintett gyermekeket, még mielőtt kialakulnak/azonosíthatóak a patológiás leletek;

(3) átirányítja a figyelmet a preventív megközelítésre: az állandó elemek, melyek egy adott kockázati szintet jelölnek, jelzik az intervenció intenzitása iránti szükségletet; miközben a módosítható faktorok útmutatást jelentenek az intervenció célzott kialakításához, ill. változásuk közvetlen visszajelzést ad annak sikerességéről.

Az adatok további analízise során finomítani kívánjuk az egyes paraméterek pontértékben kifejezett relatív súlyát, illetve megvizsgáljuk a cluster kiegészítésének szükségességét (pl. cardiofitness és/vagy a fizikai aktivitás szint markerének beiktatása), hogy növeljük a módszer prediktív értékét. A cardiovascularis rizikót jelző további labor paraméterek meghatározása is megtörtént (adiponektin, leptin, vizelet albumin), ezek statisztikai feldolgozása még folyamatban van. A cardiovascularis rizikóbecslés ezen módszere elképzelésünk szerint támogatólag fog hozzájárulni ezeknek a népegészségügyi szempontból kiemelt jelentőségű megbetegedéseknek a primer prevenciójához.

Kovács É, Stomfai S, Molnár D: Szív- és érrendszeri megbetegedések rizikóbecslése gyermekkorban. GYERMEKGYÓGYÁSZAT, közlésre elfogadva.

Budget: 3.600,000.- HUF

ELABORATING, TESTING AND IMPLEMENTING OF A CARDIOVASCULAR RISK ASSESSMENT METHOD IN CHILD POPULATION

Dénes Molnár[1]
[1]Pécs University, Clinical Centre, Dept. Of Paediatrics

For the cardiovascular risk assessment in adult population several effective methods have been elaborated, however, their common disadvantage is that by the time of the risk detection it can't pathophysiologically reversed. Childhood risk assessment requires a different approach: we can't rely on such factors (e.g. pathological laboratory findings) which develop at a later stage. On the other hand, there are certain parameters and critical periods of early development the correlation of which with later risk status has been verified. Small for date newborns show fast catch-up growth during early postnatal life, while birth weight large for gestational age generally refers to unfavourable hormonal imprinting. Similarly, the early adiposity rebound (when BMI starts to increase earlier than 6-8 years of age) is a predictor of later obesity. The protective effect of breast-feeding, though being small-scaled, is well-known in several aspects. It is evident that the genetic predisposition is an important contributor, however, population-based screening on DNA level is not possible for financial and several other reasons. This can partly be substituted with family history that can signal the susceptibility of the proband to cardiovascular diseases.

Taking into account the above aspects, we recommend a screening parameter cluster (Table 1.) which is composed of individual and family factors. The unmodifiable part of cardiovascular risk cluster consists of family risk factors and early developmental parameters of the child. These factors, which can't be influenced, describe a permanent risk level. Further individual parameters (anthropometric parameters and blood pressure) describe the actual status: these can be modified and effectively influenced by intervention.

We tested this method in the study population of the IDEFICS (**I**dentification and prevention of **D**ietary and lifestyle-induced health **EF**fects **I**n **C**hildren and infant**S**) multicentre project supported by the 6th research-development framework of the European Union. From the total study population 5834 children (1671 Hungarian) fulfilled the inclusion criteria of having all the required anthropometric, laboratory and anamnestic data. The gender ratio was balanced in the study population. The characteristics of the total and Hungarian sample were the following: (mean ± SD), age: 6,3 ± 1,75 and 6,3 ± 1,74 years; height: 119, 4 ± 12,51 and 119, 7 ± 12,71 cm; weight: 23,7 ± 6,99 and 23,7 ± 7,58 kg; BMI: 16,3 ± 2,38 and 16,1 ± 2,61 kgm^{-2}. The prevalence of cardiovascular risk parameters in the international and Hungarian sample is shown in Table 1.

Table 1. The prevalence of individual and family risk parameters

Variable	**Score value**	**Prevalence in total sample**	**Prevalence in Hungarian sample**
INDIVUDAUL RISK PARAMETERS			
Obesity (BMI >30 kgm^{-2}; Cole, 2000)	2	5,5%	5,7 %
Overweight (BMI >25 kgm^{-2}; Cole, 2000)	1	12,3%	10,6 %
Waist circumference > half of height	1	15,9%	16,8 %
Pre-hypertension and/or hypertension (>90 ill. >95 percentile, NIH recommendation)	1	10,2 % resp. 8,0%	10,4 % resp. 9,6 %
birth weight small (SGA), or large (LGA) for gestational age	1	1,5% resp. 5%	1,4 % resp. 3,7 %
FAMILY RISK PARAMETERS			

Early cardiovascular disease (<45 év)	Parents or siblings: 2; grandparents: 1	31,4%	37,1 %
Type 2 diabetes mellitus		28,3%	32,3 %
Hypertension		57,6%	56,8 %
Dyslipidaemia		23,0%	16,3 %

As a next step we determined the possible score value which indicates significant difference in risk level. In this age group we can't diagnose a definite disease as hard endpoint. Therefore the cut-off point of the risk score was validated by the presence of pathologic laboratory values. These were the following: total cholesterol, HDL- cholesterol, LDL- cholesterol, triglyceride, fasting blood glucose, HOMA-IR, HgbA1c and CRP. The pathologic laboratory parameters correlated on $p<0,001$ level with the score values; in linear regression model showed significant association ($R=0,112$). Table 2 demonstrates the prevalence of certain ranges of risk score values and the odds ratio of having 3 or more pathologic laboratory values in the international and Hungarian sample, respectively.

Table 2. The relative risk of the presence of 3 or more pathologic laboratory according to risk score values

total score value	**Prevalence (%)**		Presence of 3 or more pathologic laboratory values			
			Odds ratio* (95% CI)		Significance (khi-square)	
	total	***Hungarian***	***total***	***Hungarian***	***total***	***Hungarian***
0	15,4	12,2	reference		-	
1-3	60,9	61,0	1,1 (0,45 – 2,66)	0,5 (0,14 – 2,01)	NS (p = 1,000)	NS (p = 0,406)
4-6	20,5	22,5	3,6 (1,47 – 8,64)	1,6 (0,44 – 6,14)	p = 0,003	NS (p = 0,554)
7 or more	3,2	4,2	**8,3** (2,97 – 23,09)	**5,1** (1,18 – 21,82)	**p < 0,001**	**p = 0,029**

Based on the above data we have selected the risk score value of 7 or more as recommended cut-off for screening. In case of these children the further diagnostic investigations and the lifestyle counselling is grounded.

The advantages of this two-clustered risk assessment are the following:

(1) it contains only non-invasive elements and therefore it is proper for screening even in primary care setting;

(2) by including family and early developmental parameters it is able to identify the children prone to risk long before the development of the manifest disease;

(3) redirects the attention to a preventive approach: the permanent elements which indicate a certain risk level, define the demand for intervention; while the modifiable factors give a guidance to targeted intervention; and their changes indicate directly its success or failure.

During the further analysis of the data, we will refine the relative contributory value of certain parameters expressed in risk points; and will consider the necessity of extending the cluster (e.g. by including markers of cardio-fitness and/or of physical activity level) in favour of increasing the predictive value of this approach. The measurement of further laboratory parameters indicating cardiovascular risk level (adiponectin, leptin, urine albumin) has been performed; their statistical analysis is in progress. This method of cardiovascular risk assessment may contribute to the primary prevention of these diseases of major public health concern.

Budget: 3.600,000.- HUF

Kovács É, Stomfai S, Molnár D: cardiovascular risk assessment in childhood. GYERMEKGYÓGYÁSZAT, accepted for publication.

2 cm

Teljes támogatás: 4500.000,- Ft

AZ OBSTRUKTÍV ALVÁSI APNOE ÉS A KARDIOVASZKULÁRIS MORBIDITÁS KAPCSOLATA MAGAS KARDIOVASZKULÁRIS RIZIKÓJÚ BETEGCSOPORTOKBAN

Mucsi István[1], Andréka Péter[2] , Molnár Miklós Zsolt[1], Dunai Andrea[1], Novák Márta[1], Szőcs Júlia Luca[1], Szentkirályi András[1], Torzsa Péter[3], Zoller Rezső[1]
[1]Semmelweis Egyetem Magatartástudományi Intézet, [2] Országos Gottsegen György Kardiológiai Intézet, [3]Semmelweis Egyetem Családorvosi Tanszék

Kutatásunkba száz vesetranszplantált, ötven, a transzplantációs várólistán szereplő hemodializált beteget, 24 szívtranszplantált és 68 metabolikus szindrómás beteget vontunk be. E betegek mindegyikénél poliszomnográfiás alvásvizsgálat történt, valamint echocardiographiát, érfali merevség mérést, ambuláns vérnyomás mérést és EKG monitorozást végeztünk. Biomarker vizsgálatokra szérumot fagyasztottunk, s a betegek egy rész esetében megtörtént számos gyulladásos marker és adipokin meghatározása. Ezen felül megvizsgáltuk egyes alvászavarok és egyes rizikó-magatartások, illetve rizikófaktorok kapcsolatát két független, nagy elemszámú kohortban. Az eredményekből eddig öt eredeti közlemény született, melyeket rangos nemzetközi szaklapokban publikáltunk. További elemzések már megtörténtek, ezek eredményeit hazai és nemzetközi konferenciákon mutattuk be, a teljes közlmények publikálása folyamatban van. Ezen felül további elemzéseket tervezünk, illetve vannak folyamatban a munkacsoportban, illetve a lefagyasztott mintákból további paraméterek meghatározását is tervezzük további források rendelkezésre állásának függvényében.

Nyolcszázhuszonhárom vesetranszplantált betegnél a Berlin kérdőív segítségével mértük fel az OSA kockázatát. E betegcsoport 28%-a mutatkozott magas kockázatúnak az OSA szempontjából. Többváltozós Cox proporcionális hazard modellben vizsgálva az OSA magas kozkázata számos együttváltozóra (életkor, társbetegségek, magasvérnyomás, BMI, vesefunkció, veseelégtelenség fennállásának ideje, több laboratóriumi parameter és a transzplantációval kapcsolatos változók) történt statisztikai korrekció után is szignifikáns kapcsolatot mutatott a graftvesztés kockázatával nőkben (HR=3.05; CI: 1.24-7.51; p= 0.015), míg ez a kapcsolat nem volt szignifikáns férfiakban.

Száz vesetranszplantált beteg poliszomnográfiával nyert adatainak elemzése azt mutatta, hogy a betegek 18%-ánál enyhe (5/h≤apnea-hypopnea index (AHI)<15/h), 11%-ánál mérsékelten súlyos (15/h≤AHI<30/h) és 14%-ánál súlyos (AHI≥30/h) alvási apnoe áll fenn. Ugyanezek az adatok és 50 várólistás dializált beteg esetében 28%, 16% and 10% voltak. Az AHI vesetranszplantált betegek körében szignifikáns korrelációt mutatott az életkorral (rho=0.34), a testtömeg index-szel (rho=0.45), a nyak- (rho=0.4) és a haskörfogattal (rho=0.51) valamint a hemoglobin értékkel (rho=0.24). A három vagy több antihypertensiv gyógyszert szedő betegek aránya az OSA-ban szenvedő transzplantáltak körében szignifikánsan magasabb volt, mint az OSA-ban nem szenvedő betegek körében (56% vs 31%; p=0.022). Annak ellenére, hogy az OSA betegek több vérnyomáscsökkentő szert szedtek, átlagos szisztolés vényomásuk magasabb volt (147±21 mmHg vs 139±18 mmHg; p=0.059).

E betegcsoport adatainak további elemzése révén megállapítottuk, hogy a mély alvás és a szisztolés vérnyomás értéke között negatív korreláció áll fenn (r=-0.31, p<0,001). Hasonló, de gyenge kapcsolatot találtunk a mélyalvás mennyisége és a diasztolés vérnyomás között (r=-0.16, p=0.053). Többváltozós modellben a mélyalvás és a szisztolés vérnyomás közötti kapcsolat független volt az életkortól, a nemtől, és több klinikai paramétertől is (B=-0.56, p=0.005).

Megállapítottuk továbbá, hogy az alváshatékonyság negatív korrelációt mutatott az életkorral (Spearman's rho=-0.439; p<0.001) és a szérum IL-6 koncentrációval (rho=-0.337; p=0.001), valamint közel szignifikáns kapcsolatot találtunk a szérum TNF-alpha koncentráció és az alváshatékonység között (rho=0.198; p=0.053). Többváltozós lineáris regressziós modellben a szérum IL-6 szint és az alváshatékonyság közötti kapcsolat férfiak körében szignifikáns volt.

A poliszimnográfiás vizsgálatba bevont betegek esetében megvizsgáltuk a periodikus lábmozgás zavar gyakoriságát (Periodic Limb Movements in Sleep - PLMS). A koronária betegség kockázatát a Framingham Score alkalmazásával mértük. Ugyancsak kiszámítottuk a stroke kockázatát is (Framingham Stroke Risk Profile). A PLMS a transzplantáltak 27%-ban, míg a dializáltak 42%-ában volt jelen (p=0.094); a súlyos PLMS azonban már szignifikánsan gyakoribb volt a dializáltak körében (32 vs. 16%, p=0.024). A súlyos PLMS magasabb koronária (18%(8-22) vs. 7%(4-14); p=0.002) és magasabb stroke kockázattal járt együtt (10%(7-17) vs. 5%(4-10); p=0.002). Ez a különbség statisztikailag szignifikáns maradt számos társváltozóra való korrekciót követően is.

Metabolikus szindrómában (MetSyn) (International Diabetes Federation kritériumok) szenvedő férfiakban az OSA súlyossága és a szívritmus variabilitás (HRV) közötti kapcsolatot elemeztük. 14 betegnél súlyos, 6 esetében mérsékelt, 8 esetében enyhe OSA állt fenn, 7 betegnél nem volt OSA kimutatható. A súlyosabb OSA csökkent SDNN-nel (Standard Deviation of all Normal-to-Normal RR intervals) állt kapcsolatban (143.6±22.6 ms vs. 101.6±28.5; p=0.008). A súlyos OSA csoportban a nem OSA-s betegekhez képest a nappali LFP (Low Frequency Power) és az éjszakai HFP (High Frequency Power) szignifikáns mértékben csökkent volt (244.3 ± 146.2 ms^2 vs. 695.4 ± 584.0 ms^2, p=0.034; 210.0 ± 114.6 ms^2 vs. 666.1 ± 518.2 ms^2, p=0.026). Metabolikus szindrómás férfiakban OSA fennállása esetén a HRV csökkent, s megváltozik a paraszimpatikus moduláció circadian ritmusa is ami fokozott kardiovaszkuláris kockázatot jelezhet.

Ugyanebben a betegcsoportban az alvásvizsgálattal egyidejűleg Medtronic Minimed CGMS készülékkel detektáltuk ötperces gyakorisággal az alvás alatti szöveti cukorszinteket. A normál és enyhe apnoés csoportot a középsúlyos-súlyos csoporttal összehasonlítva: középsúlyos-súlyos OSA csoport esti hosszú hatású inzulin adagja magasabb volt (8,1±15,1 vs. 24,4±22,3 IU; p=0,017), és körükben alacsonyabb volt a CGMS adatok átlaga (6,3±1,6 vs. 5,6±0,8; p=0,038). A súlyosabb OSA csoportban nagyobb volt a CGMS adatok szórása (0,51±0,2 vs. 0,79±0,5; p=0,032), a maximum-minimum értékek közötti különbség (2,1±0,7 vs. 3,2±1,7; p=0,028) és magasabb volt az ötperces értékek különbségeinek átlaga (0,07±0,03 vs. 0,12±0,07; p=0,06). A szöveti cukorértékek változékonysága a cukorszintek szórása közepesen erős, pozitív korrelációt mutatott (r=0,367; p=0,039) a RDI-vel (Respiratory Disturbance Index), amely a légzési erőfeszítéssel összefüggő mikroébredéseket is figyelembe veszi. MetSyn-ben szenvedő betegek körében az OSA súlyossága összefüggést mutat a szöveti cukorértékek változékonyságával.

A szívtranszplantált **(H)** és vesetranszplantált **(K)** betegek, valamint egy egészséges kontrollcsoport **(C)** (minden csoportban 20-20 egyén) alvásvisgálatának eredményeit elemeztük, s a következő eredményeket kaptuk. A teljes csoportban 42 férfi és 18 nő volt, átlagéletkoruk 49.7±10.9 év volt. A három csoport alvás-stádiumainak aránya eltérő volt: 1. stádium (median[interquartilis tartomány]: C: 11.4%[9.3]; H: 4.2%[3.9]; K: 8.5%[9.7]; p=0.001), 2. stádium (C: 39%[13.1]; H: 54.4%[15.6]; K: 41.8%[25.9]; p=0.001) mély alvás(C: 13.9%[13.7]; H 9.6% [12.1]; K: 10.3%[11.8]; p=0.039). A három csoport között szintén szignifikáns különbség volt az apnoe-hypopnoe index (C: 0[2]; H: 5[8]; K: 7.3[26]; p=0.043) és a periodikus lábmozgás- index (C: 0[5]; H: 3[12]; K: 7.8[26]; p<0.001) tekintetében.

PUBLIKÁCIÓK

Molnár MZ, Lázár AS Lazar, Lindner A, Fornádi K, Czira ME, Dunai A, Zoller R, Szentkiralyi A, Rosivall L, Shapiro CM, Novák M, Mucsi I: CLIN J AM SOC NEPHROL. 5: pp. 125-32. (2010) IF: 4.844

Kovacs AZ, Molnar MZ, Szeifert L, Szentkiralyi A, Ambrus C, Molnar-Varga M, Mucsi I and Novak M.: NEPHROL DIAL TRANSPLANT. 26: pp. 1058-65. (2011) IF: 3.564

Szentkirályi A, Czira ME, Molnar MZ, Szeifert L, Rudas A, Ujszaszi A, Remport A, Novak M, Mucsi I: *SLEEP MEDICINE* 12: pp. 267-273. (2011) IF: 3.430

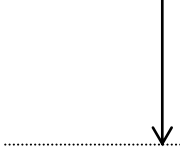
Torzsa P, Keszei A, Kalabay L, Vamos EP, Zoller R, Mucsi I, Novak M and Kopp MS.: SLEEP BREATH. 15: pp. 809-18. (2011) IF: 1.684

Lindner A, Fornadi K, Lazar AS, Czira ME, Dunai A, Zoller R, Szentkiralyi A, Novak M, Mucsi I and Molnar MZ: JOURNAL OF SLEEP RESEARCH Epub ahead doi: 10.1111/j.1365-2869.2011.00956.x. (2011 Sep 14). IF: 3.361

2 cm

2 cm

2 cm



Budget: 4500,000.- HUF

OBSTRUCTIVE SLEEP APNOE AND CARDIOVASCULAR MORBIDITY IN PATIENTS WITH HIGH CARDIOVASCULAR RISK

Mucsi István[1], Andréka Péter[2] , Molnár Miklós Zsolt[1], Dunai Andrea[1], Novák Márta[1], Szőcs Júlia Luca[1], Szentkirályi András[1], Torzsa Péter[3], Zoller Rezső[1]
[1]Semmelweis Egyetem Magatartástudományi Intézet, [2] Országos Gottsegen György Kardiológiai Intézet, [3]Semmelweis Egyetem Családorvosi Tanszék

In these analyses we included 100 kidney transplant recipients (Tx), 50 waitlisted hemodialysis patients (WL), 24 patients after heart transplant (HTx) and 68 patients with the metabolcic syndrome (Metsyn). All patients underwent overnight polysomnography. We also performed echocardiography, assessment of vascular stiffness, ambulatory blood pressure and ECG monitoring. We froze sera for subsequent measurement of biomarkers and we have already measure inflammatory markers and adipokines for many of the included patients. In two additional, independent cohorts we assessed the association between various sleep disorders and high risk health behaviors and cardiovascular risk factors. We published our results in five original publications in high rank international journals. We have also performed additional analyses, the results of which were presented at Hungarian and international conferences. The publication of additional full papers is under way.

We assessed the risk of OSA in 823 patients who completed the Berlin questionnaire. Of them 28% had high risk of OSA (HRO) at baseline. In multivariate Cox proportional hazard models HRO was an independent predictor of graft loss among females after adjusting for age, co-morbidity, hypertension, BMI, kidney function, duration of chronic kidney disease, other laboratory parameters and transplant-related data (HR=3.05; CI: 1.24-7.51; p= 0.015), while HRO did not predict graft survival among males. HRO at baseline was not independently associated with all-cause mortality in the sample.

In a cross-sectional study of 100 Tx and 50 WL patients the prevalence of mild (5/h≤apnea-hypopnea index (AHI)<15/h), moderate (15/h≤AHI<30/h) and severe OSA (AHI≥30/h) was 18%, 11% and 14% in the Tx group and 28%, 16% and 10% among WL, respectively. The AHI was significantly correlated with age (rho=0.34), body mass index (rho=0.45), neck- (rho=0.4), abdominal circumference (rho=0.51) and hemoglobin (rho=0.24) in the Tx group. The proportion of Tx patients, treated with three or more anti-hypertensive drugs was significantly higher in the OSA group (56% vs 31%; p=0.022). In spite of taking significantly more anti-hypertensives, the average systolic blood pressure was still higher in OSA vs non OSA patients (147±21 mmHg vs 139±18 mmHg; p=0.059). The prevalence of OSA is similar in Tx and WL patients and it may contribute to presence of hypertension in transplanted patients.

Further analysis of the data revealed a negative correlation between deep sleep and systolic daytime blood pressure (r=-0.31, p<0,001). Similar but weak association was found between the amount of deep sleep and diastolic blood pressure (r=-0.16, p=0.053). The association between deep sleep and systolic blood pressure remained significant even after statistical adjustment for age, gender and several potentially important clinical covariables (B=-0.56, p=0.005). In the same group of patients we found a significant negative correlation between sleep efficiency (SE) and age (Spearman's rho=-0.439; p<0.001) and IL-6 (rho=-0.337; p=0.001). The association between SE and TNF-alpha was marginally significant (rho=0.198; p=0.053). In gender-stratified groups IL-6 was in a significant negative relationship with SE in males, but not in females.

In these patients we also assessed the prevalence and correlats of Periodic Leg Movements in Sleep (PLMS). Coronary heart disease risk was estimated using the Framingham Score. The risk of stroke was calculated according to the modified Framingham Stroke Risk Profile. PLMS was present in 27% of the transplanted and 42% of the wait-listed group (p=0.094); the proportion of severe disease was twice as high in wait-listed versus transplanted patients (32 vs. 16%, p=0.024). Patients with severe disease had higher ten-year estimated risk of stroke in the transplanted group (10(7-17)

vs. 5(4-10); p=0.002) and higher ten-year coronary heart disease risk in both the transplanted (18(8-22) vs. 7(4-14); p=0.002), and the wait-listed groups (11(5-18) vs. 4(1-9); p=0.032). In multivariable linear regression models the PLMSI was independently associated with the Framingham cardiovascular and cerebrovascular scores after adjusting for important co-variables.

In males with the Metsyn (International Diabetes Federation criteria) we assessed the association between OSA severity and Heart Rate Variability (HRV). Fourteen patients were diagnosed with severe OSA (AHI ≥30/h), 6 with moderate OSA (AHI ≥15/h and <30/h), 8 with mild OSA (AHI ≥5/h and <15/h) and 7 with no OSA. Increasing OSA severity was associated with lower SDNN (Standard Deviation of all Normal-to-Normal RR intervals). Comparing with the non-OSA group, in severe OSA group SDNN was decreased almost 50 % (143.6±22.6 ms vs. 101.6±28.5; p=0.008). Daytime LFP (Low Frequency Power) and night-time HFP (High Frequency Power) reduced significantly in severe OSA group compared to patients without OSA, respectively. (244.3 ± 146.2 ms^2 vs. 695.4 ± 584.0 ms^2, p=0.034; 210.0 ± 114.6 ms^2 vs. 666.1 ± 518.2 ms^2, p=0.026). OSA is associated with depressed HRV and altered circadian rhythm of the parasympathetic modulation among male patients with the Metsyn. This may increase the cardiovascular vulnerability.

In the same group of patients the five-minute averages of the interstitial glucose values were detected using CGMS during the entire duration of the polysomnography. When the normal-mild versus the moderate-severe OSA groups were compared the evening dose of the long acting insulin was higher (8.1±15.1 vs. 24.4±22.3 IU; p=0.017) and the average of the CGMS data was lower (6.3±1.6 vs. 5.6±0.8; p=0.038) in the moderate-severe OSA group. In the more severe OSA group the standard deviation (0.51±0.2 vs. 0.79±0.5; p=0.032), the difference between the maximum and minimum values (2.1±0.7 vs. 3.2±1.7; p=0.028) and the average of the difference of the five-minute values (0.07±0.03 vs. 0.12±0.07; p=0.06) of the interstitial glucose values were all higher. We found a moderate positive correlation with both the standard deviation (r=0.367; p=0.039) and the difference between the maximum and minimum levels (r=0,365; p=0,04) of the glucose values and RDI (Respiratory Disturbance Index) which also includes micro-arousals related to respiratory effort. The severity of OSA is associated with the variability of the night-time intersticial glucose values in patients with the MetSyn.

In a cross-sectional study we compared sleep parameters measured with PSG of 20 heart- (H) and 20 kidney (K) transplanted patients, and 20 healthy individuals without sleep complaints (C). The groups were matched according to gender and age. Mean age was 49.7±10.9 years, the total group contained 42 males and 18 females. There were significant differences between the groups in stage 1 (median[interquartile range]: C: 11.4[9.3]; H: 4.2[3.9]; K: 8.5[9.7]; p=0.001), in stage 2 (C: 39[13.1]; H: 54.4[15.6]; K: 41.8[25.9]; p=0.001) and also in deep sleep (C: 13.9[13.7]; H 9.6: [12.1]; K: 10.3[11.8]; p=0.039). The periodic limb movement index (C: 0[5]; H: 3[12]; K: 7.8[26]; p<0.001) and the apnea-hypopnea index (C: 0[2]; H: 5[8]; K: 7.3[26]; p=0.043) significantly differed between the 3 groups as well.

PUBLICATIONS*:* Molnár MZ, Lázár AS Lazar, Lindner A, Fornádi K, Czira ME, Dunai A, Zoller R, Szentkiralyi A, Rosivall L, Shapiro CM, Novák M, Mucsi I: CLIN J AM SOC NEPHROL. 5: pp. 125-32. (2010) IF: 4.844

Kovacs AZ, Molnar MZ, Szeifert L, Szentkiralyi A, Ambrus C, Molnar-Varga M, Mucsi I and Novak M.: NEPHROL DIAL TRANSPLANT. 26: pp. 1058-65. (2011) IF: 3.564

Szentkirályi A, Czira ME, Molnar MZ, Szeifert L, Rudas A, Ujszaszi A, Remport A, Novak M, Mucsi I: *SLEEP MEDICINE* 12: pp. 267-273. (2011) IF: 3.430

Torzsa P, Keszei A, Kalabay L, Vamos EP, Zoller R, Mucsi I, Novak M and Kopp MS.: SLEEP BREATH. 15: pp. 809-18. (2011) IF: 1.684

Lindner A, Fornadi K, Lazar AS, Czira ME, Dunai A, Zoller R, Szentkiralyi A, Novak M, Mucsi I and Molnar MZ: JOURNAL OF SLEEP RESEARCH Epub ahead doi: 10.1111/j.1365-2869.2011.00956.x. (2011 Sep 14). IF: 3.361

2 cm

2 cm

Teljes támogatás: 6.000.000,- Ft

XIII-AS FAKTOR ATEROTROMBOTIKUS MEGBETEGEDÉSEKBEN

Muszbek László[1], Bereczky Zsuzsanna[1], Bagoly Zsuzsa[1], Balogh László[2], Katona Éva[1], Mezei Zoltán[1], Koncz Zsuzsa[1], Tarr Tünde[3], Shemirani Amir Houshang[1], Kávai Mária[3]
Debreceni Egyetem, Orvos és Egészségtudományi Centrum, [1]Klinikai Kutató Központ, [2]Kardiológiai Intézet, [3]III. sz. Belgyógyászati Klinika

A) A plazma XIII-as faktor és a FXIII-A Val34Leu polimorfizmus kardiovaszkuláris megbetegedésekben

1/ Prospektív tanulmány a FXIII szintek és a FXIII-A Val34Leu polimorfizmus miokardiális infarktus kialakulására kifejtett hatásának vizsgálatára. A tanulmány egy korábban elindított, 617 koronáriabetegségben szenvedő kohorsz vizsgálatának folytatását jelentette. Az átlagos követési idő 5,06±4,04 év volt. A számos paraméterre kiterjedő vizsgálat eredményei közül itt csak a FXIII és az elhalálozás, mint végpont közötti összefüggéseket részletezzük. A Leu34 allélt hordozók között alacsonyabb volt az elhaltak aránya (élők: vad/mutáns=256/220, elhunytak: vad/mutáns=87/54, p=0,096). A mutációt nem hordozókat a homozigótákkal összevetve a különbség szignifikánsnak bizonyult (élők: vad/homozigóta=256/35, elhunytak: vad/homozigóta=87/4, p=0,036). A magas FXIII aktivitás és antigén koncentrációval rendelkezők aránya nem különbözött szignifikánsan a két csoport között. (További adatok begyűjtése folyik, a tanulmány lezárása 1 év múlva várható.)

2/ Fiatal korban (40 év alatt) miokardiális infarktuson átesett betegek FXIII szintje és a FXIII polimorfizmusok gyakorisága. A vizsgálatokba eddig 107 myocardiális infarctust (MI+) elszenvedett, 40 éves kor alatti személyt és 96 korban megfeleltetett, de MI-t nem szenvedett, coronarographiás vizsgálattal igazoltan, coronaria szűkülettel nem rendelkező, klinikai kontrollt (MI-) válogattunk be. A perifériás vérmintából az ismert rizikó faktorok mellett FXIII aktivitás és FXIII antigén meghatározás történt. Meghatároztuk az alábbi FXIII polimorfizmusokat is: FXIII-A V34L, Y204F, FXIII-B H95R és Intron K nt29567C›G. A dohányzók (80% vs 37%, p‹0,0001) és a hiperlipidémiában szenvedők (53% vs 37%, p=0,032) száma szignifikánsan magasabb volt a betegcsoportban. A korrigált FXIII aktivitás és antigén koncentráció szignifikánsan magasabb volt az MI+ csoportban, de az emelkedett FXIII szintek a MI kockázatát szignifikánsan nem fokozták. A vizsgált FXIII polimorfizmusok közül a MI előfordulásának rizikóját csak a FXIII-B intron K nt29576C›G befolyásolta, igen jelentős védőhatást fejtett ki, a korrigált OR: 0,298 (CI: 0,127-0,702). A genotípus prevalenciát egy korra és nemre megfeleltetett populációs kontroll cspoporttal is összehasonlítottuk és a fentiekkel megegyező eredményeket kaptunk. (Az eredmények kongresszusi absztrakt formájában megjelentek, a közlemények összeállítása folyamatban)

3/ FXIII-A Val34Leu polimorfizmus hatása az atherothrombotikus ischemiás stroke (AIS) kialakulására és kimenetlére. Tekintettel a coronária betegség és az AIS patomechanizmusának hasonlóságára, vizsgálatainkat AIS-t túlélő betegekre is kiterjesztettük. 496 AIS-t túlélt betegnek és 496 korra és nemre illesztett klinikai kontrollnak határoztuk meg FXIII-A Val34Leu genotípusát. A meghatározásokat egy 1146 főből álló populációs kontroll csoportnál is elvégeztük. A polimorfizmus egyik nemben és egyik korcsoportban sem befolyásolta az AIS kialakulásának esélyét. AIS-ben elhaltak postmortem anyagából is elvégeztük a genotípus meghatározásokat. A FXIII-A Leu34 homozigótaság nőkben mintegy 3 x-osra fokozta az AIS halálos kimenetélének az esélyét (1).

4/ A FXIII szintek és FXIII-A Val34Leu polimorfizmus hatása a stent resztenózis kialakulására.
A beválogatási időszak alatt stent beültetésen átesett betegek száma 262 volt (71 nő, 191 férfi), akik közül a követési idő alatt 87 személynél alakult ki restenosis (24 nő, 63 férfi). A restenosist elszenvedett (R+) és el nem szenvedett (R-) csoport életkor tekintetében igen hasonló volt. A stent beültetésen átesett betegek közül a követési idő alatt összesen 35-en haltak meg (az R+ csoportban 16, az R- csoportban 19 személy). A beültetés előtt mért plazma FXIII aktivitás és antigén nem különbözött szignifikánsan az R+ és R- csoportban. Ugyanakkor a felső harmadba eső (>115%) plazma FXIII aktivitás tendenciájában fokozta a restsnosis gykoriságát OR (95% CI): 1.695 (0,951-

3,021), p=0,074, ami további esetek begyüjtése esetén elérheti a szignifikáns szintet. A FXIII-A Val34Leu polimorfizmusa sem mutatott összefüggést a restenosis bekövetkeztével. Számos rizikó tényezőt logisztikus regresszióval vizsgálva a restenosist szignifikánsan egyedül a stent hossza befolyásolta. (További adatok begyüjtése folyik, a tanulmány lezárása 1 év mulva várható.)

5/ A faktor V (FV) Leiden mutáció hatása a FXIII aktiválásra.

Tekintettel arra, hogy a FV Leiden mutáció, mely a vénás thrombosisok kialakulásának veszélyét fokozza, egyes betegcsoportokban (pl. fiatal dohányos nőkön) az artériás thrombozisokra is fokozott veszélyt jelent, vizsgálatainkat erre a területre is kiterjesztettük. Kimutattuk, hogy normál plazmában a trombomodulin késlelteti a FXIII aktiválódását, ez a hatás FV Leiden mutáció esetében elmarad, ami hozzájárulhat a mutáció protrombotikus hatásához (2).

6/ A fibrin FXIII által történő keresztkötésének hatása a trombociták adhéziójára

Egy további, a FXIII és az aterotrombotikus megbetegedések összefüggése szempontjából fontos eredményünk volt, hogy a fibrin aktív FXIII által történő keresztkötése gátolja a trombociták fibrinhez történő adhézióját aminek szerepe lehet a trombus növekedésének szabályozásában (3).

7/ A FXIII és a trombotikus megbetegedések összefüggéseivel és a FXIII meghatározással kapcsolatos munkáinkat és a vonatkozó irodalmat felkért review-kban foglaltuk össze (4-6).

B) A celluláris FXIII (cFXIII) szerepe a fokozott aterotrombozis hajlam kialakulásában systemás lupus erythematosus-ban (SLE-ben) és végstádiumú vese betegségben

A kísérleti terv AbdAlla et al. (Cell, 2004; 119: 343-54) eredményein alapult. E szerzők kimutatták, hogy hipertenzív betegek monocitáiban mind a cFXIII mind az angiotenzin II képződés aktiválódik, utóbbi hatására az angiotensin 1 (AT1) receptor dimerizálódik. Ezt a homodimert a cFXIIIa kovalensen keresztbe köti, ami fokozott szignalizációt és a monocyták érendotél sejtekhez való fozott adhézióját eredményezte. Az angiotenzin II vagy a cFXIIIa gátlása csökkentette az AT1 receptor keresztkötését és az aterogenezist apo-E deficiens egerekben. Hasonló mechanizmust tételeztük fel a gyorsult aterosclerotikus folyamattal járó SLE-ben és végstádiumú vese eleégtelenségben. Egészséges egyének véréből szeparált monocytákban jelentős mennyiségű FXIII-A volt kimutatható, és AT1 receptort is detektálhatunk. Receptor homodimerizációt viszont nem tudtunk felfedezni hosszú ideje fennálló SLE-ben szenvedő betegek monocytáiban sem, ha a monocytákat angiotenzin II-vel stimuláltuk Ca^{2+} ionofor jelenlétében. Kiderült, hogy más kutatóknak sem sikerült megismételni a fenti szerzők eredményeit.

A negatív eredmények fényében módosítottunk a kísérleti terven és SLE-ben és/vagy antifoszfolipid szindrómában (APS) szenvedő betegek plazma FXIII aktivitását és antigén szintjét, a FXIII-A polimorfizmusait, ill. egyéb a vaszkuláris hemosztázis szemponjából érdekes faktorok, faktor VIII (FVIII), von Willebrand faktor (vWF) szintjét kezdtük el vizsgálni. APS nélkül antifoszfolipid antitesttel (APA-val) rendelkező egyéneket is bevontunk a vizsgálatba. Mind APS-ben, mind SLE-ben ill. a kettő kombinációjában lényegesen emelkedtek a FVIII és a vWF antigén szintek a kontrollokhoz és az APS-sel nem társuló, APA-val rendelkező csoporthoz viszonyítva. Az emelkedés nem járt együtt a CRP szintek szignifikáns emelkedésével, azaz nem egy általános gyulladásos jelenség következménye volt. A FVIII és vWF szintek emelkedése egyrészt az ateroszklerózis patogenezise szempontjából fontos endoteliális diszfunkciót jelzi, másrészt hozzájárul e betegek fokozott trombózis hajlamához. A FXIII szintje APS-sel nem társuló SLE-ben ahol APA is megjelent szignifikánsan alacsonyabb volt, ami felveti a csökkent FXIII-as szintek védőhatását trombózissal szemben. A FXIII-A Leu34 allélfrekvencia nem mutatott szignifikáns különbséget a vizsgált csoportok között. (Jelenleg az eredmények összeállítása folyik)

A celluláris FXIII-ra vonatkozó ismereteinket és ezzel kapcsolatos saját munkánkat felkért review-ban foglaltuk össze (7).

1. Shemirani et al. THROMB RES 126: pp. 159–162 (2010) IF: 2,372
2. Koncz et al. THROMB RES (2011), doi:10.1016/j.thromres.2011.06.030 IF: 2,372
3. Bagoly et al. THROMB RES (2011), doi:10.1016/j.thromres.2011.11.040 IF: 2,372
4. Muszbek et al. CURRENT OPINION IN HEMATOLOGY 18: pp. 366-72 (2011) IF: 4,953
5. Muszbek et al. SEMIN THROMB HEMOST 36: pp.18-33 (2011) IF: 4,169
6. Bereczky and Muszbek SEMIN THROMB HEMOST 37: pp. 305-14 (2011) IF: 4,169

Teljes támogatás: 6.000.000,- Ft

7. Muszbek et al. PHYSIOLOGICAL REVIEWS 91: pp. 931-72 (2011) IF: 28,417

Budget: 6,000,000.- HUF

FACTOR XIII IN ATHEROTHROMBOTIC DISEASES

László Muszbek[1], Zsuzsanna Bereczky[1], Zsuzsa Bagoly[1], László Balogh[2], Éva Katona[1], Zoltán Mezei[1], Zsuzsa Koncz[1], Tünde Tarr[3], Amir Houshang Shemirani[1], Mária Kávai[3]
University of Debrecen, Medical and Health Science Center, [1]Clinical Research Center, [2]Institute of Cardiology, [3]3rd Department of Medicine

A) Plasma FXIII levels and the FXIII-A Val34Leu polymorphism in cardiovascular diseases

1/ Prospective study on the relationship between FXIII levels, FXIII-A Val34Leu polymorphism and the development of myocardial infarction. The study was an extension of a previously started cohort study involving 617 patients suffering from coronary artery disease. The mean follow-up time was 5.06±4.04 years. Among the several investigated parameters and outcomes here only the relationships between FXIII and mortality as an end-point are shown. Among those patients who carried the Leu34 allele the frequency of mortality was lower (survivors: wild type/mutant=256/220, deceased: wild type/mutant=87/54, p=0.096). If wild type individuals were compared to homozygous mutants the difference in survival rate was significant (survivors: wild type/homozygotes=256/35, deceased: wild type/homozygotes=87/4, p=0,036). There was no significant difference in survival time between patients having elevated or lower FXIII levels. (Collection of further data is in progress, the study is planned to be closed by the end of 2012.)

2/ FXIII levels and the frequency of FXIII polymorphisms in young (below 40) individuals with the history of myocardial infarction (MI). 107 patients with the history of MI and 96 age-matched clinical controls were involved in the study. As established by coronary angiography the controls were exempt of significant coronary stenosis. In addition to traditional risk factors plasma FXIII activity and antigen levels were measured. The following FXIII polymorphisms were also determined: FXIII-A V34L, Y204F, FXIII-B H95R and Intron K nt29567C›G. The number of smokers and hyperlipidemic individuals was significantly higher in the patients' group (80% vs 37%, p‹0,0001) and (53% vs 37%, p=0,032), respectively. Adjusted FXIII activity and antigen levels were significantly higher in the patients' group, but elevated FXIII levels did not increase the risk of MI. Among the polymorphisms only FXIII-B intron K nt29576C›G had an effect on the occurrance of MI; it exerted a highly significant protective effect. Similar results were obtained when comparison with an age and gender matched population control group carried out. The results have been presented at an international congress in Kyoto; publication is in preparation.)

3/ The effect of FXIII-A Val34Leu polymorphism on the occurrence and outcome of atherothrombotic ischemic stroke (AIS). Considering the similarity in the pathomechanism of coronary disease and AIS we extended the project to patients surviving AIS. FXIII-A V34L genotype was determined in 496 AIS survivors and 496 age and sex matched controls plus in a population control group (n=1146). The polymorphism was without effect on the risk of AIS in both genders (1). Genotype determination was also performed on postmortem materials of patients not surviving AIS. Homozygousity for the Leu34 allele increased the odds of lethal outcome 3-fold.

4/ The effect of elevated FXIII levels and the FXIII-A Val34Leu polymorphism on the risk of stent restenosis. 262 patients (71 females, 191 males) who went through stent implantation were recruited for the study. Among them 87 patients (24 females, 63 males) were diagnosed as having restenosis during the follow-up period. The restenosis group (R+) and the group without restenosis (R-) were similar in age. Among patients with stent implantation 35 individuals died during the follow-up period (R+ group 16 patients, R- group 19 patients, p=0.117). Plasma FXIII activity and antigen concentration measured before stent implantation did not differ significantly between the R+ and R- groups, and the results were similar if the patients were sub-grouped according to gender. Elevated FXIII activity (upper tertile, above 115%) showed a tendency toward enhancing the risk of restenosis, OR (95% CI): 1.695 (0,951-3,021), p=0,074, which could reach statistically significant level if the number of cases were increased. FXIII-A Val34Leu polymorphism was not related to

the restenosis. Among the risk factors investigated by logistic regression only stent length influenced significantly the development of restenosis (p=0.001). (To increase the statistical powere collection of further data is warranted, the study is expected to be finished in 2013.)

5/ The effect of factor V (FV) Leiden mutation on the activation of FXIII.

FV Leiden mutation increases the risk of venous thromboembolism and to certain populations (e.g., to young female smokers) it also confers an increased risk ot arterial thrombosis. We extended the investigations to this field and demonstrated that in normal plasma thrombomodulin delays the activation of FXIII, which effect is abrogated by FV Leiden mutation. This mechanism could contribute to the increased thrombotic risk of individuals with FV Leiden mutation (2).

6/ The effect of fibrin cross-linking on the adhesion of platelets to fibrin.

It was demonstrated that the cross-linking of fibrin chains by activated FXIII inhibits the adhesion of platelets to fibrin surface. This finding has important implications concerning the regulation of thrombus growth by FXIII (3).

7/ Our results and the respective literature on the relationship of FXIII and thrombotic disorders and on FXIII assays were summarized in invited reviews requested by journal editors (4-6).

B) The role of cellular FXIII (cFXIII) in the elevated risk of atherothrombosis in patients systemic lupus erythematosus (SLE) and end-stage renal disease (ESRD).

This part of the project was based on the results described by AbdAlla et al. (Cell, 2004; 119: 343-54). The authors reported that in monocytes of patients with hypertension both FXIII and angiotensin II production becomes up-regulated and the angiotensin receptor, AT1 becomes a dimer. This dimer is covalently cross-linked by cFXIIIa resulting in increased signalization and the adhesion of monocytes to endothelial cells. The inhibition of angiotensin II or cFXIIIa decreased the cross-linking of AT1 and the atherogenesis in apo-E deficient mice. Similar mechanism was presumed in SLE and ESRD, in which conditions accelerated atherogenesis takes place. In monocytes from healthy subjects cFXIII was present in significant amount, and AT1 was also well detectable. However no AT1 dimerization could be verified in the monocytes of long-term SLE patients and ESRD patients. Furthermore, we could not confirm the results of AbdAlla et al. concerning AT1 dimerization in monocytes stimulated by angiotensin II in the presence of Ca^{2+} ionophore. It turned out that other laboratories were also unable to confirm these results.

In the light of the negative results the research plan was modified and we investigated FXIIIl activity and antigen levels, FXIII polymorphisms and further factors, like factor VIII (FVIII) and von Willebrand factor (vWF), involved in vascular hemostasis in SLE patients and in patients with antiphospholipid syndrome (APS). Individuals with antiphospholipid antibodies (APA), but without APS were also involved in the study. In SLE and in APS and in their combination FVIII and vWT levels were significantly elevated without the elevation of CRP, i.e., the elevation was not due a general inflammatory process. The elevation of FVIII and vWF is a marker of endothelial dysfunction, which is an important step in atherogenesis. They, as thrombosis risk factors, could also contribute to the increased thrombosis risk in these diseases. In SLE patients without APS, but with APA the level of FXIII was decreased raising the possibility of an antithrombotic effect exerted by low FXIII level. There was no difference in the frequency of FXIII-A L34 allele among groups involved in the study. (Further analysis of the results is in progress.)

We gave an overview on cFXIII, including our own results, in an invited review published in the journal Physiological Reviews (7).

1. Shemirani et al. THROMB RES 126: pp. 159–162 (2010) IF: 2.372
2. Koncz et al. THROMB RES (2011), doi:10.1016/j.thromres.2011.06.030 IF: 2.372
3. Bagoly et al. THROMB RES (2011), doi:10.1016/j.thromres.2011.11.040 IF: 2.372
4. Muszbek et al. CURRENT OPINION IN HEMATOLOGY 18: pp. 366-72 (2011) IF: 4.953
5. Muszbek et al. SEMIN THROMB HEMOST 36: pp.18-33 (2011) IF: 4.169
6. Bereczky and Muszbek SEMIN THROMB HEMOST 37: pp. 305-14 (2011) IF: 4.169
7. Muszbek et al. PHYSIOLOGICAL REVIEWS 91: pp. 931-72 (2011) IF: 28.41

Teljes támogatás: 3.000.000,- Ft

RhD geno és fenotípusok kimutatása anyai vérből izolált magzati „szabad" nukleinsavak felhasználásával (nem-invazív mintavétellel)

Nagy Bálint, Lázár Levente, Görbe Éva, Harmath Ágnes, Jaeger Judit, Várkonyi Tibor, Nils Kehler,
Semmelweis Egyetem, I.Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika, Budapest

A terhesség során a magzati sejtek kis mennyiségben bejutnak az anyai vérkeringésbe. A magzati vörösvérsejtek által okozott anyai immunizáció a terhességek egy részében a képződött IgG típusú immunoglobulin transzplacentáris passzázsával egyre súlyosbodó magzati haemolysishez és anaemiahoz vezethet, súlyos esetben magzati ascites, subcutan oedema, pleuralis és pericardialis folyadékgyülem (hydrops fetalis) alakul ki, amely kezeletlen esetben a magzat in utero elhalásához vezet.

Az RhD antigénért felelős gén az 1-es kromoszómán helyezkedik el, az emberek mintegy 16%-ban a gén deléciója figyelhető meg, ők az Rh negatívak. A terhesség során az anyai keringésbe bejutó magzati sejteket az esetek többségében az anyai reticuloendothelialis rendszer eliminálja, így az anya immunizációja nem alakul ki. Amennyiben nagy mennyiségű magzati vörösvérsejt jut az anyai keringésbe az stimulálja az anyai immunrendszert, az immunválasz második lépéseként termelődő IgG gyorsan átjut a méhlepényen és a magzati vörösvérsejtek elpusztításával anaemia kialakulásához vezet. Az immunprophylaxis bevezetése előtt az újszülöttek mintegy 1% -át érintette az újszülöttkori haemolyticus betegség. Amennyiben az alloimmunizáció létrejött a magzati anaemia a magzatvíz spektrofotometriás vizsgálatával a chordocentesis útján nyert köldökzsinór-vérből határozható meg. A non-invazív monitorizálás napjainkban jórészt a magzati anaemia jeleinek korai felismerését jelenti a magzati arteria cerebri media áramlásának vizsgálata révén. A kialakult alloimmunizáció terápiája rendkívül bonyolult és költséges ugyanakkor nem veszélytelen a magzat számára.

Az anyai plazmában fellelhető szabad magzati DNS viszonylag egyszerű kimutatása új lehetőségeket nyitott a non-invazív praenatalis diagnosztika számára. Egyik ilyen lehetőség a magzati eredetű DNS egy az RhD gén meghatározásával a magzati Rh status non-invazív meghatározása. A magzati vércsoport in utero meghatározása lehetővé teszi Rh negatív terhesek esetén azon esetek kiválasztását, ahol a magzat vércsoportja Rh pozitív, és fennáll a lehetősége a magzati hydrops kialakulásának.

Célkitűzések:

a. a centrifugálási paraméterek beállítása, az összes anyai sejt eltávolítására az anyai vérből
b. a különböző gyártók által forgalmazott DNS izoláló kitek összehasonlítása
c. a DNS izoláláshoz a kiindulási anyai vérplazma optimális mennyiségének megállapítása
d. a valósidejű PCR módszer beállítása, az RhD biztonságos kimutatására

Eredmények:

a. A centrifugálási paraméterek beállítása során a két lépésben végzett centrifugálás volt a legmegfelelőbb módszer az anyai sejtek teljes eltávolítására az anyai EDTA-s vérmintákból. A kiindulási 16 ml vért először 2.500 g-n 10 perces, majd az eltávolított plazma 14.500 RPM-n centrifugálva, hűthető centrifugán, lehet az összes anyai sejtet a mintákból eltávolítani.

b. Két DNS izoláló kitet hasonlítottunk össze (High Pure PCR Template Preparation, Roche, és a Nucleospin Plasma XS, Macharey Nagel). A DNS koncentrációkat Invitrogen Qubit Fluorometerrel határoztuk meg fluorometriás módszerrel. Különböző kiindulási plazma mennyiségeket felhasználva (0,25 ml és 0,5 ml), a nagyobb mennyiséggel több szabad DNS-t nyertünk (átlagosan 2,96 ng/µl Roche és 3,09 ng/µl MN), statisztikailag nem volt lényeges különbség a két módszerrel a nyert DNS mennyiségekben.

c. TaqMan típusú valósidejű PCR módszert állítottunk be LightCycler készüléken az RhD exonjának a kimutatására alacsony koncentrációban jelenlévő szabad DNS

kimutatására. Opzimalizálásra kerültek a primer és próba koncentrációk, az annealing hőmérséklet és idő. Pozitív és negatív kontroll minták felhasználásával történtek meg a megfelelő paraméterek beállítása.

d. A beállított optimális valósidejű PCR módszerrel 135 magzatvízből izolált DNS mintából és 63 anyai vérből izolált szabad DNS mintából határoztuk meg az RhD-t. A magzatvíz mintákban 42 (31,1%) esetben találtunk RhD negativitás, a szabad nukleinsavak esetében 19 (30,15%) RhD negatív mintát találtunk.

e. A nem meghatározására is beállítottunk valósidejű PCR módszert az SRY gén felhasználásával. A magzatvíz minták esetében 100%-os megegyezés mutatkozott a hagyományosan alkalmazott módszerekkel, míg a szabad nukleinsavak esetében 2 esetben eltérés mutatkozott.

Összefoglalás: Munkánk során az anyai vérben és a mazatvízmintában fellelhető szabad nukleinsavakból az RhD meghatározására módszert fejlesztettünk ki. Ehhez olyan centrifugálási protokoll került kidolgozásra, amellyel az anyai sejtek megbízhatóan eltávolíthatók az anyai plazmából. Az DNS izolálás minőségét érzékeny fluorometriás módszerrel határoztuk meg. Két kereskedelmi forgalomban lévő kitet összehasonlítva azt állapítottuk meg, hogy maguk a felhasznált kitek nem, viszont az izoláláshoz használt plazma mennyisége befolyásolja a kinyert szabad DNS mennyiségét. Beállítottunk az RhD exonjának valamint az SRY gén meghatározására alkalmas valósidejű PCR módszert, amellyel lehetséges magzatvízből és szabad nukleinsavakból izolált DNS kiválasztott génjeinek a meghatározása.

Eredményeinkről beszámoltunk hazai és nemzetközi kongresszusokon, folyóirat cikkben és könyv részletben. A vizsgálati eredményekből egy diplomamunka is készült. A szabad nukleinsav témában 2010-ben megszerveztük a 1st Central-Eastern European Symposium on Free Nucleic Acids rendezvényt, amelyen 19 országból vettek részt. A szimpóziumon, számos hazai és nemzetközi előadás hangzott el a magzati vércsoport nem invazív meghatározásának eredményeiről is.

2011- októberében egy hetes laborlátogatáson vettünk részt a holland vérellátó (Sanquin) molekuláris biológiai laboratóriumában, ahol beszámoltunk eredményeinkről és számos tapasztalatra tettünk szert a metodika fejlesztésében.

További optimalizálással és több mintán végzett kísérletek után lehetséges lehet a módszer rutin diagnosztikába történő bevezetése és ez által az anti-D ellenanyag fogyasztás csökkentése valamint a módszer más vércsoportrendszerekre.

Budget: 3.000,000.- HUF

Determination of the RhD geno- and phenotypes using „free" nucleic acids isolated from maternal plasma (non-invasive sampling)

B. Nagy, L. Lázár, É. Görbe, Á. Harmath, J. Jaeger , T. Várkonyi, N Kehler

1st Department of Obstetrics and Gynecology, Semmelweis University, Budapest

Rhesus D (RhD) blood group incompatibility between mother and fetus can occasionally result in maternal alloimmunization where the resultant anti-D can cross the placenta and attack the fetal red cells, which in worse case scenarios can cause fetal anemia and ultimately death. The detection of human circulatory cell-free DNA (cfDNA) looks back on a history of 5 decades. The presence of cfDNA was first described by Mendel et Métias in 1948.

The presence of fetal cells in tissues of pregnant women was first described in 1893 by Schmorl, in tissues of women with fatal complications of eclampsia. Three types of fetal cells can be detected in maternal circulation: fetal nucleated erythrocytes, fetal lymphocytes, and placental trophoblasts. syndrome, fetal aneuploidies from the values detected in normal pregnancy. Together with fetal cells, cell-free nucleic acids enter to maternal circulation. The presence of fetal nucleic acids in maternal circulation gives the possibility of non invasive prenatal diagnosis. One of this diagnostical possibility is to detect the fetal RhD blood group, and to prevent fetal alloimmunization. The gene of RhD blood group is located on chromosome 1. The detection of different exones of the gene gives s high sensitivity and specificity method for blood group determination.

Aims:

a. to optimalize centrifugation parameters for maternal cell separation from samples

b. to compare the different DNA isolation kits efficiency

c. to determine the optimal plasma quantity for cell-free DNA isolation

d. optimalization of real time PCR parameters for RhD detection

Results:

a. The most efficient method to eliminate maternal cells from sample:
16 ml blood needed to be collected in EDTA tubes. We used two step centrifugation, first at 2.500 g for ten minutes. Following the collection of the supernatant another centrifugation at 14.500 RMP for ten minutes removes all maternal originated cells.

b. Two sample preparation kits were used to compare the efficiency of DNA isolation: High Pure PCR Template Preparation, Roche, and Nucleospin Plasma XS, Macharey Nagel. The obtained DNA concentrations were determined by fluorimetric method using Invitrogen Qubit Fluorometer. Different initial plasma quantity (0,25 and 0,5 ml) were compared with both kits. From higher quantity the mean detected DNA quantity

was 2,96 ng/µl Roche and 3,09 ng/µl MN respectively. There was no statistical difference between these two groups.

c. TaqMan real-time PCR (Ligh Cycler Roche) was used to determine the exon 7. of RhD gene. Primer and probe concentrations, PCR reaction temperatures were optimalized. Positive and negative controlls were determined, and introduced in the PCR protocoll.

d. DNA was isolated from 135 amniotic fluids and 63 cell-free fetal DNA samples. We found 31,1% of the amniotic fluid of samples to be RhD negative as PCR amplification was not detected. We detected 30,15% of the fetal free-nucleic acids RhD negative.

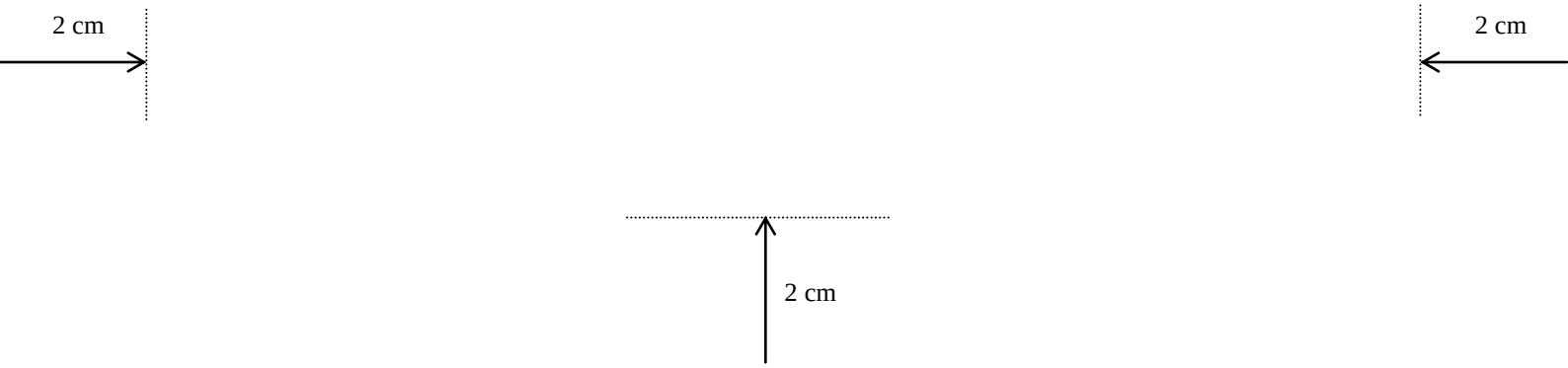
e. As an internal control, the presence of fetal DNA in sample SRY gene was also detected with similar method. To use as internal control first we optimized, and controlled the SRY gene detection. In case of amniotic fluid the sensitivity and specificity of gender determination using SRY gene detection was 100% . In case of plasma samples two false negative case was detected.

Conclusions

We determinded the diagnostic possibilitie from cell-free fetal DNA from maternal plasma, and amniotic fluid cell samples. Centrifugation protocolls were determined, which is suitable for the removal of all maternal cells from the samples. We determined the quantity and quality of the isolated DNA by using fluorimetric method. We compared two commercially available DNA isolation kit, we concluded that there is no significant difference among these kits, while the quantity of the initial sera has effect ont he quantity of the obtained DNA. Fetal RhD detection was performed with the detection of RhD exon7. Our results were presented on international and local congresses, in different publications, and one diplomawork was made on this subject.

On the topic of free-nucleic acids we organized the 1st Central-Eastern European Symposium on Free Nucleic Acids, where participants arrived from 19 different countries. Lecturers from all aroud Europe presented their results in the topics of non invasive prenatal diagnosis. One of our collegues visited the Dutch Sanquin company last year where could discuss the latest methods on this field.

We suppose that by making more optimalization and specification, the use of fetal-free nucleic acid based detection of RhD is possible. By using this screening method the quantity of the anti-RhD antibody could be reduced, and theoretically it is possible to detect other blood groups too.



Teljes támogatás: 4.200.000,- Ft

KRÓNIKUS GYULLADÁSOS KÓRKÉPEK, AZAZ A PSORIASIS, A GYULLADÁSOS BÉLBETEGSÉGEK (BELEÉRTVE A CROHN BETEGSÉGET ÉS COLITIS ULCEROSA-T) ÉS A RHEUMATOID ARTHRITIS GÉNEXPRESSZIÓS MINTÁZATAINAK ELEMZÉSE PERIFÉRIÁS MONONUKLEÁRIS SEJTEKBŐL

Meskó Bertalan[1], Póliska Szilárd[1,4], Szegedi Andrea[3], Szekanecz Zoltán[5], Palatka Károly[6] and Nagy László[1, 2, 4]

[1]Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet és [2] a Magyar Tudományos Akadémia Apoptózis és Genomikai Kutatócsoportja, Molekuláris Medicine Kutatóközpont, Orvos és Egészségtudományi Centrum , Debreceni Egyetem, Debrecen
[3]Bőrgyógyászati klinika, Orvos és Egészségtudományi Centrum , Debreceni Egyetem, Debrecen
[4] Klinikai Genomikai Központ, Orvos és Egészségtudományi Centrum , Debreceni Egyetem, Debrecen
[5]Rheumatológia Intézet, Orvos és Egészségtudományi Centrum , Debreceni Egyetem, Debrecen
[6]II. sz. Belgyógyászati Klinikai, Orvos és Egészségtudományi Centrum , Debreceni Egyetem, Debrecen

A krónikus gyulladásos kórképek mind szociológiai, mind gazdasági szempontból kulcsproblémát jelentenek világszerte. A krónikus gyulladásos kórképek közé tartoznak a gyulladásos bélbetegségek (IBD, beleértve a Crohn betegséget és colitis ulcerosat), a psoriasis, rheumatoid arthritis (RA), továbbá az osteoarthritis, a krónikus obstruktív tüdőbetegség és az atherosclerosis. Ezen betegségek genetikai háttere széleskörűen dokumentált, de a közös vagy eltérő génexpressziós mintázatokat ezidáig nem vizsgálták.

E kórképek jelentősége, a közös autoimmun pathomechanizmus és a témában folyó intenzív kutatások ellenére aránylag kevés innovatív áttörés született a hasonló vagy eltérő genetikai hátterüket illetően.

Munkánk során a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Centrum Rheumatológia Intézetéből rheumatoid arthritises, a Bőrklinikáról krónikus plakkos psoriasisos, a II. számú Belgyógyászati klinikáról IBD-s betegektől vettünk perifériás vérmintákat. Vizsgáltuk a krónikus gyulladásos kórképek közös és eltérő génexpressziós mintázatait betegségspecifikus és gyulladásspecifikus markerek keresése céljából. Klinikai markerek segítségével az egyes betegségek altípusainak, illetve különböző progresszióval járó formáinak elkülönítése szerepelt céljaink között.

A klinikusok segítségével a szigorú beválogatási és kizárási kritériumok meghatározása után perifériás vérminták gyűjtése ment végbe egészséges kontroll egyénekkel kiegészítve. A mintákból perifériás mononukleáris sejteket izolálunk, majd RNS-t. Az RNS-t cDNS-se írjuk át és RT-QPCR-val Taqman Low Density Array analízist végzünk abból a célból, hogy perifériás genetikai markereket találjunk. A nyers QPCR eredményeket, többek között, Mann-Whitney U-test segítségével hasonlítjuk össze.

Sikerült génpaneleket azonosítani, melyek az egyes kórképek és az egészséges kontrollcsoport között mutattak szignifikáns különbséget; illetve találtunk 5 gént, melyek a krónikus gyulladás általános markereinek tekinthetők. Az 50-nél is több statisztikailag is releváns gén egy hálózatot alkot a „Gene interaction” elemzés alapján, illetve a génexpressziós mintázatok ezen kórképek hasonló pathomechanizmusbeli háttereket mutattak. [1]

A projekt folytatásaként rheumatoid arthritises betegek tocilizumab kezelésénél megfigyelt válaszkészség génexpressziós mintázatait kutattuk azzal a céllal, hogy olyan génlistát azonosítsunk,

mely egy vérvétel után meghatározott génexpressziós profil és klinikai markerek kombinálásával a kezelés előtt jelzi a terápiára való válaszkészséget. 13 pácienstől a kezelés előtt és 4 héttel utána vett vérminták globális génexpressziós (microarray technológia) elemzése során olyan génpaneleket azonosítottunk, melyek elválasztják a válaszadó és nem válaszadó csoportokat egymástól már a kezelés előtt. Eredményeinket technikai validációval; illetve egy matematikai módszerrel (Canonical Variates Analysis) sikerült megerősíteni. [2]

A személyre szabott orvoslás jegyében, a betegségre hajlamos egyének, vagy az egy betegségen belüli különböző progressziójú betegek elkülönítése, illetve a kórképekben használt biológiai terápiára adott válasz előzetes meghatározása jelentősen elősegítheti a kezelés sikerességét. Egy ilyen vizsgálathoz a beteg számára legkevésbé megterhelő mintavételi eljárást (perifériás vérminta) és laboratóriumi feldolgozást érdemes használni, mely így potenciális eszköz lehet a diagnosztikában a klinikus kezében. [3]

A vizsgálatok várt hosszú távú eredménye, hogy olyan perifériás vérminták génexpressziós profiljain alapuló génpaneleket alkossunk, amelyek alkalmas lehet diagnosztikai kitek fejlesztésére.

Irodalomjegyzék:

1) Peripheral blood gene expression patterns discriminate among chronic inflammatory diseases and healthy controls and identify novel targets
Meskó B., Póliska Sz., Szegedi A., Szekanecz Z., Palatka K., Papp M. and Nagy L., BMC Medical Genomics 2010, 3:15 IF:3,77

2) Peripheral blood gene expression and IgG glycosylation profiles as markers of tocilizumab treatment in rheumatoid arthritis
Meskó B., Póliska Sz., Szamosi Sz., Szekanecz Z., Podani J., Váradi Cs., Guttman A. and Nagy L.; Journal of Rheumatology (in press) IF:3,85

3) Gene expression profiles in peripheral blood for the diagnosis of autoimmune diseases
Meskó B., Póliska Sz., Nagy L., Trends In Molecular Medicine; Volume 17, Issue 4, April 2011, Pages 223–233 IF:11,049

Budget: 4.200,000.- HUF

THE ANALYSIS OF GENE EXPRESSION PATTERNS OF CHRONIC INFLAMMATORY DISEASES SUCH AS PSORIASIS, INFLAMMATORY BOWEL DISEASE (INCLUDING CROHN'S DISEASE AND ULCERATIVE COLITIS) AND RHEUMATOID ARTHRITIS IN PERIPHERAL BLOOD SAMPLES.

Bertalan Mesko[1*], Szilard Poliska[1,4*], Andrea Szegedi[3], Zoltan Szekanecz[5], Karoly Palatka[6], and Laszlo Nagy[1, 2, 4§]

[1]Department of Biochemistry and Molecular Biology and [2] Apoptosis and Genomics Research Group of the Hungarian Academy of Sciences, Research Center for Molecular Medicine, Medical and Health Science Center, University of Debrecen, Debrecen, Hungary;
[3]Department of Dermatology, Medical and Health Science Center, University of Debrecen, Debrecen, Hungary;
[4] Clinical Genomics Center, Medical and Health Science Center, University of Debrecen, Debrecen, Hungary,
[5]Department of Rheumatology, Institute of Medicine, University of Debrecen, Medical and Health Science Center, Debrecen, Hungary
[6]2nd Department of Internal Medicine, University of Debrecen, Medical and Health Science Center, Debrecen, Hungary

Chronic inflammatory diseases are a substantial burden in social and economic terms worldwide, and because of frequent co-morbidity, several other disorders are also related to this group of diseases. Chronic inflammmatory diseases include inflammatory bowel disease (IBD; including Crohn's disease and ulcerative colitis), psoriasis, rheumatoid arthritis, as well as osteoarthritis, chronic obstructive pulmonary disease and atherosclerosis. Despite the importance of these diseases and intensive global research, there have been relatively few innovative breakthroughs into the description of their genetic background regarding common or different genetic patterns.

The pathogeneses and genetic background of these medical conditions are widely documented, but their common gene expression patterns have never been analyzed. Our goal was to find disease-specific and inflammation-specific markers that can seperate different medical conditions effectively or identify different states of prognosis for each diseases.

Peripheral blood samples were collected from patients affected by chronic inflammatory diseases such as psoriasis, rheumatoid arthritis, and inflammatory bowel diseases; and healthy controls after determining inclusion and exclusion criteria.

RNA was isolated from mononuclear cells; converted RNA into cDNAs and perform RT-QPCR analysis on Taqman Low Density Arrays in order to identify peripheral genetic markers. QPCR data were analyzed with the Mann-Whitney u test, among others.

We managed to identify gene panels that can differentiate between the above mentioned conditions and healthy controls; and also found 5 genes that could be considered the markers of chronic inflammation. More than 50 genes that showed statistically significant differences form a network based on the Gene Interaction analysis and similar gene expression patterns underscore the notion that these conditions have similar pathogenetic background as well. [1]

As a next step in the project, we turned our attention to biologic therapies and investigated the resposiveness of rheumatoid arthritis patients receiving tocilizumab therapy in order to find gene lists that can predict the response in combination with clinical markers. Peripheral blood samples were collected from 13 patients before and 4 weeks after the therapy and global gene

expression analysis (microarray technology) was performed. Gene panels differentiating between responder and non-responder patients at baseline were found. Our results were confirmed by technical validation and by a statistical method (Canonical Variates Analysis). [2]

To think in terms of personalized medicine, differentiating between people with higher and lower risk for these medical conditions; between patients with different types of prognoses in each disease; or predicting the effectiveness of biological therapy can determine the success of the treatment. The least invasive peripheral blood sampling and the simple laboratory process can lead to a diagnostic tool in the hands of clinicians. [3]

The expected long-term result of our project is to create gene panels from peripheral blood samples that can be used for the development of diagnostic kits.

References:

1) Peripheral blood gene expression patterns discriminate among chronic inflammatory diseases and healthy controls and identify novel targets
Meskó B., Póliska Sz., Szegedi A., Szekanecz Z., Palatka K., Papp M. and Nagy L., BMC Medical Genomics 2010, 3:15 IF:3,77

2) Peripheral blood gene expression and IgG glycosylation profiles as markers of tocilizumab treatment in rheumatoid arthritis
Meskó B., Póliska Sz., Szamosi Sz., Szekanecz Z., Podani J., Váradi Cs., Guttman A. and Nagy L.; Journal of Rheumatology (in press) IF:3,85

3) Gene expression profiles in peripheral blood for the diagnosis of autoimmune diseases
Meskó B., Póliska Sz., Nagy L., Trends In Molecular Medicine; Volume 17, Issue 4, April 2011, Pages 223–233 IF:11,049

Teljes támogatás: 3.000.000,- Ft

ÚJ INTRACELLULÁRIS JELÁTVIVŐ MECHANIZMUS SZEREPE A D2 DOPAMIN ((DA) RECEPTOR ÁLTAL KÖZVETÍTETT HIPOFIZIS SEJT TÚLÉLÉSBEN.

Nagy M. György, Bodnár Ibolya, Oláh Márk
Semmelweis Egyetem, Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézet

Munkánk során patkány hypophysisekből nyert elülső lebenyi homogenizátumokból western-blot technikával foszfo-ERK (Thr202/Tyr204) és foszfo-Akt (Thr308) kvantitatív meghatározását laboratóriumunkban sikeresen beállítottuk és jelenleg a módszert rutinszerűen alkalmazzuk. Hím, ovariektomizált (OVX), és laktáló nőstény patkányokban farmakológiás DA megvonást (D2-receptor gátlók: haloperidol; HAL, raclopride; RAC, DA bioszintézist gátló: α-methyl-p-tyrosine; αMpT kezelést) követően a foszfo-Akt mennyisége igen jelentősen megemelkedett. Ez az emelkedés szoros korrelációt mutatott a plazma prolaktin szintek alakulásával. Ugyanakkor, a hypophysis elülső lebeny szöveti cAMP szintje, hasonló kísérleti feltételek mellett nem változik. A β-arrestin/Akt/PP2A komplex létrejöttét megakadályozandó, intracerebro-ventriculáris (icv) okadánsav (PP2A gátló) beadását követő szisztémás farmakológiás kezeléseket (D2-receptor gátló: haloperidol) is végeztünk. Eredményeink egyértelműen arra utalnak, hogy az un. β-arrestin függő jelátvivő (és G-fehérje független) út alapvető jelentőséggel bír a hypophysis prolaktin elválasztásának tónusos hypothalamikus gátló befolyásolásában. A β-arrestin függő jelátvivő mechanizmus matematikai ill. reakció-kinetikai modellje alátámasztja és mindenben megfelel a kísérleti eredmények által felállított tónusos gátló befolyás modelljének.

Igazoltuk tehát, hogy a DA tartós szinaptikus jelenléte a β-arrestin-Akt-PP2A komplex létrejöttét eredményezi a hypophysis elülső lebenyében, tehát egy új, ún. β-arrestin-függő jelátvitel bekapcsolódását, amelynek fiziológiás jelentősége van. Ezt indirekt módon is bizonyítottuk, mivel laktáló állatokban a szopási inger növeli az Akt és a MAPK foszforilációját. Ugyanakkor bizonyítékot szolgáltattunk arra is, hogy a MAPK működése a prolaktin-elválasztás szabályozásában közvetlenül nem érintett. Eredményeink az hypophysis hormonok elválasztásának hypothalamikus szabályozásában szerepet játszó eddig nem ismert jelátviteli mechanizmusnak a jelentőségére irányította a figyelmet. Ez hozzájárulhat a tónusos DAerg gátlás, és a hypophysis sejtekben zajló túlélési és apoptotikus mechanizmusok pontosabb megértéséhez. A β-arrestin függő jelátviteli mechanizmus részletesebb megismerése nemcsak a laktáció során fellépő fiziológiás változások pontosabb feltérképezése céljából fontos, de jelentős többlet információt adhat a különféle DAerg diszfunkcióval járó, a környezeti károsító tényezők kiváltotta kórképek (pl. Parkinson-kór, drog-abúzus stb.) hátterének megismerésében, ill. azok hatékonyabb kezelésében is.

Feltételezésünk szerint, a laktáció alatti hormonelválasztás jellegének megváltozása hátterében a hypophysealis DAnerg rendszerek eltérő válaszkészsége, valamint megváltozott elülső-, és közti lebenyi POMC hasítás állhatnak. A közti-lebenyben végződő neuroendokrin DAerg (NEDA) neuronok, mint a periventriculo-hypophysealis (PHDA) és a tuberohypophysealis (THDA) neuronok alapvető szerepe hím és ovariektomizált nőstény állatokban – a PRL ürítésre gyakorolt szabályozó hatásuk mellett - a melanotrop sejtek α-MSH ürítésének szabályozásában van, míg a szoptatás ideje alatt a fenti hypothalamikus DAerg neuronok átveszik az ACTH elválasztás szabályozását is. Feltételezhető, hogy szoptató anyákban a plazma ACTH forrása nem az elülső lebeny, hanem a közti lebeny. Ebben a speciális helyzetben a közti lebenyi ACTH fedezheti a laktáció során megnövekedett ACTH szükségletet a hypothalamo-hypophysealis-mellékvese-tengely megtartott működése mellett. Feltételezésünk szerint, a "közti-lebenyi ACTH-elválasztás" hátterében a DA D2-receptor érzékenysége és/vagy a prohormon konvertázok (PC1/PC2) illetve a 7B2 kofaktor megváltozott működése állhat. A hypophysealis, hátsó lebenyi-arginin-vazopresszin (AVP) rendszer viszont nem vesz részt a szoptatás alatti az ACTH szabályozásban. Megállapíthatjuk, hogy a szoptatás és a tejtermelés fenntartásához intakt a NEDA rendszer, ill. a DAerg axon végződésekben a TH enzimaktivitás épsége szükséges.

Mindezek mellett számos, az eredeti témához részben kapcsolódó, kollaborációs munkában is részt vettünk, melyekből számos közlemény született.

1. Csercsik D, Hangos MK, **Nagy GM:** A simple reaction kinetic model of rapid (G-protein dependent) and slow (β-arrestin dependent) transmission. *Journal of Theorethical Biology 255:119-128, 2008,* ***IF:2.264***

2. Oláh M, Fehér P, Ihm Zs, Bácskay I, Kiss T, Freeman ME, **Nagy GM**, Vecsernyés M: Dopamine (DA) regulated ACTH secretion in lactating rats Functional plasticity of melanotropes. *Neuroendocrinology 90:391-401, 2009,* ***IF: 2.295***

3. Fehér P, Oláh M, Bodnár I, Hechtl D, Bácskaya I, Juhász B, **Nagy GM**, Vecsernyés M: Dephosphorylation/inactivation of tyrosine hydroxylase at the median eminence of the hypothalamus is required for suckling-induced prolactin and adrenocorticotrop hormone responses. *Brain Research Bulletin Apr 29;82(1-2):141-5. 2010,* ***IF: 2.184***

4. Könczöl K, Bodnár I, Zelena D, Pintér O, Papp SR, Palkovits M, **Nagy GM,** Tóth EZs: Nesfatin-1 activates the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Neurochemistry International, 57(3):189-97. 2010,* ***IF: 3.541***

5. Cservenák M, Bodnár I, Usdin TB, Palkovits M, **Nagy GM**, Dobolyi A: Tuberoinfundibular Peptide of 39 Residues Is Activated during Lactation and Participates in the Suckling-Induced Prolactin Release in Rat. *Endocrinology. 151(12):5830-40. 2010,* ***IF: 4.752***

6. Oláh M, Bodnár I; Galit D, Tóth EB, Vecsernyés M, **Nagy GM:** Role of Salsolinol in the Regulation of Pituitary Prolactin and Peripheral Dopamine Release. *Reproductive Medicine and Biology 10(3):143-151. 2011,* ***IF:***

7. Oláh M, Bodnár I, Szepesi Zs, Fehér P, Vecsernyés M, **Nagy GM:** Akt/GSK3 signaling coupled with D2-class dopamine (DA) receptors of pituitary mammotropes is responsible for tonic inhibition of PRL secretion. *(Submitted) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2012.*

2 cm

2 cm

2 cm

Budget: 3,000,000.- HUF

THE ROLE OF A NEW INTRACELLULAR SIGNALLING MECHANISM IN PITUITARY CELL SURVIVAL MEDIATED BY THE D2 DOPAMINE (DA) RECEPTOR

Nagy M. György, Bodnár Ibolya, Oláh Márk
Department of Human Morphology and Developmental Embriology, Semmelweis University

It has been demonstrated first time that physiological and pharmacological manipulations of neuroendocrine DAerg (NEDA) neurons result in a definitive change of DA-mediated signaling coupled with the β-arrestin-Akt-PP2A complex. Pharmacological depletion of DA, parallel with the plasma PRL response, resulted in a distinct increase in the phosphorilation states of Akt (pAkt) in the anterior lobe of the pituitary gland, without having any detectable changes in cAMP level. However the downstream elements of the cascade are not fully understood yet, but involvement of the above mentioned anti-apoptotic pathway is un-doubtful. Systematic, intraperitoneal (i.p) administration of D2-receptor antagonist haloperidol (HAL) or the most selective raclopride (RAC) also elevated the level of pAkt in the anterior lobe of male, ovariectomized (OVX) as well as lactating female rats indicating uncoupling of the above mentioned complexes, therefore the functional role of a β-arrestin-dependent signaling mechanism. Since the suckling stimulus results in a similar increase of pAkt, we can conclude that this alternative signaling mechanism must have a significant role in the mediation of tonic DAerg inhibition of pituitary prolactin secretion. A simple reaction kinetic model of rapid (G-protein dependent) and slow (β-arrestin dependent) transmission completely fits to our experimental findings.
We can also hypothesize that the hormone secretion pattern during lactation is based on an altered responsiveness of the hypothalamic DAerg systems resulting in a difference of pro-opiomelanocortine (POMC) processing in the anterior-, and the intermediate lobe of the pituitary gland. In male as well as in female animals, the NEDA neurons projecting to the intermediate lobe are primarily associated with the control of α-MSH secretion. In contrast, in lactating females they can also participate in the regulation of ACTH secretion, therefore providing an additional source for the required higher ACTH level independently from the hypothalamo-pituitary-adrenal gland (HPA) axis. Since the pharmacological withdrawal resulted in a clear difference in the ACTH secretion between OVX and lactating group and surgical denervation of the posterior pituitary have also elevated basal levels of ACTH, it seems very likely that hypothalamic NEDA neurons play a significant and previously unrecognized role in the regulation of ACTH secretion during lactation. The ACTH, detected in the plasma of lactating dams, appears to originate partially from the intermediate lobe. Furthermore, differences in ACTH and α-MSH responses between OVX and lactating females indicate the existence of a physiologically important plasticity of melanotropes of the pituitary gland. Our findings obtained by using phosphor-Ser40 specific TH antibody is the first functional neuromorphological observation, which clearly shows that the level of phosphorylation i.e. activation of TH in the ME region of the hypothalamus (TIDA neurons) is closely related with the plasma level of PRL and ACTH in lactating rats.
Besides of these experimental findings, our group has also participated in a few collaborations that have been partially related with our original experimental project.

1. Csercsik D, Hangos MK, **Nagy GM:** A simple reaction kinetic model of rapid (G-protein dependent) and slow (β-arrestin dependent) transmission. *Journal of Theorethical Biology 255:119-128, 2008, **IF:2.264***

2. Oláh M, Fehér P, Ihm Zs, Bácskay I, Kiss T, Freeman ME, **Nagy GM**, Vecsernyés M: Dopamine (DA) regulated ACTH secretion in lactating rats Functional plasticity of melanotropes. *Neuroendocrinology 90:391-401, 2009, **IF: 2.295***

3. Fehér P, Oláh M, Bodnár I, Hechtl D, Bácskaya I, Juhász B, **Nagy GM**, Vecsernyés M: Dephosphorylation/inactivation of tyrosine hydroxylase at the median eminence of the

hypothalamus is required for suckling-induced prolactin and adrenocorticotrop hormone responses. *Brain Research Bulletin Apr 29;82(1-2):141-5. 2010,* ***IF: 2.184***

4. Könczöl K, Bodnár I, Zelena D, Pintér O, Papp SR, Palkovits M, **Nagy GM,** Tóth EZs: Nesfatin-1 activates the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Neurochemistry International, 57(3):189-97. 2010,* ***IF: 3.541***

5. Cservenák M, Bodnár I, Usdin TB, Palkovits M, **Nagy GM**, Dobolyi A: Tuberoinfundibular Peptide of 39 Residues Is Activated during Lactation and Participates in the Suckling-Induced Prolactin Release in Rat. *Endocrinology. 151(12):5830-40. 2010,* ***IF: 4.752***

6. Oláh M, Bodnár I; Galit D, Tóth EB, Vecsernyés M, **Nagy GM:** Role of Salsolinol in the Regulation of Pituitary Prolactin and Peripheral Dopamine Release. *Reproductive Medicine and Biology 10(3):143-151. 2011,* ***IF:***

7. Oláh M, Bodnár I, Szepesi Zs, Fehér P, Vecsernyés M, **Nagy GM:** Akt/GSK3 signaling coupled with D2-class dopamine (DA) receptors of pituitary mammotropes is responsible for tonic inhibition of PRL secretion. *(Submitted) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2012.*

2 cm

2 cm

2 cm

Teljes támogatás: 4.500.000,- Ft

A SZŰRŐVIZSGÁLATOKKAL KAPCSOLATOS ISMERETEK ÉS ATTITŰDÖK MEGHATÁROZÓI A DÉL-ALFÖLDI RÉGIÓBAN

Nagymajtényi László, Paulik Edit, Müller Anna, Molnár Regina, Erdős Csaba
SZTE ÁOK Népegészségtani Intézet

A pályázat célja a Magyarországon második leggyakoribb halálokkal, a rosszindulatú megbetegedésekkel kapcsolatos azon ismeretek feltárása volt, amelyek szerepet játszanak a lakosság szűrővizsgálatokon való részvételének alakulásában. Felmérésünket különböző életkorú és szocio-demográfiai helyzetű lakosságcsoportok körében végeztük, annak megállapítása céljából, hogy milyenek a szűrővizsgálatokkal kapcsolatos ismereteik, s milyen attitűdök befolyásolják az azokban való részvételüket.
A vizsgálat célpopulációja a Dél-alföldi Régió (Bács-Kiskun, Békés, Csongrád megyék) 16-64 éves népessége volt, az alábbi csoportokra fókuszálva: 1. az egészségügyi ellátást igénybevevők (páciensek, potenciális páciensek); 2. középiskolások, egyetemi hallgatók; 3. pedagógusok; 4. egészségügyi dolgozók (orvosok, nővérek, védőnők).
A 16-64 éves populációt a 3 megye népességnagyság szerint kiválasztott településein – egy megyeszékhely, három város és hat község – vizsgáltuk. A megyeszékhely Szeged volt, mivel itt találhatók a régió egészségügyi ellátásában meghatározó szereppel bíró egyetemi klinikák; megyénként egy-egy olyan város, ahol nincs fekvőbeteg-intézeti ellátás; a falvak pedig azon 1000-2000 lakosságszámú települések, ahol van helyben háziorvos, de nincs szakellátás.
A szakirodalom áttekintésén alapuló – csoport-specifikus – kérdőív alkalmazásával végzett keresztmetszeti vizsgálat kérdezőbiztosok közreműködésével, anonim módon történt. A fő kérdéscsoportok a szocio-demográfiai jellemzőkre, az egészségi állapotra, egészségmagatartásra, a daganatokkal, szűrővizsgálatokkal kapcsolatos általános és az egyes daganattípusok specifikus szempontjaira irányultak.
A vizsgálatot a Szegedi Tudományegyetem Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ Regionális Humán Orvosbiológiai Kutatásetikai Bizottsága engedélyezte (Engedélyszám: 53/2010).

1. Az egészségügyi ellátást igénybevevők (n=590)
1/A. Az egészségügyi ellátást igénybevevők egyik vizsgálati csoportját a 25-64 év közötti nők képezték (n=385); az átlagéletkor 45,08±11,11 év volt. Mintegy felük jónak ítélte meg saját egészségi állapotát; közel felük normál tápláltsági állapotú, harmaduk túlsúlyos, egyötödük pedig elhízott volt. A rendszeres dohányzás prevalenciája 34,4% volt ezen női populációban.
Az emlőrák kockázati tényezőivel kapcsolatos ismereteik hiányosnak mondhatóak: mindössze 21,7% tudta, hogy az elhízás növeli annak rizikóját, a rendszeres dohányzás gyakoriságnövelő hatását 18,4% hamisnak vélte, 24,1% pedig e tekintetben nem tudott állást foglalni, és alig több mint harmaduk tudta a rendszeres alkoholfogyasztás ez irányú veszélyeztető effektusát, 27,1%-uk nem tudta, hogy a szoptatás csökkenti az emlőrák rizikóját. A csoport mintegy fele nem, vagy csak kis mértékben érezte magát veszélyeztetettnek az emlődaganat kialakulása szempontjából, s mintegy kétharmaduk (67,4%) gondolta megelőzhetőnek azt.
A válaszadók 80,8%-a végzett emlőönvizsgálatot, de mindössze egyharmaduk (32,0%) rendelkezett helyes ismerettel arról, hogy azt a cikluson belül mikor kell elvégezni. Azok esetében, akik hozzátartozói között előfordult emlőrák, az önvizsgálat végzése lényegesen magasabb gyakoriságot mutatott. Iskolázottság szerint a középfokú végzettségűeknél volt az önvizsgálat gyakorisága a legmagasabb. Megyénként nem mutatkozott szignifikáns különbség, településtípusonként viszont a megyeszékhelyeken volt a legmagasabb az önvizsgálat gyakorisága.
Mammográfiás emlőszűrésen a megkérdezettek 64,8%-a vett részt a népegészségügyi ajánlásnak megfelelően 2 évente, 15,6%-uk pedig még soha nem volt. 76,0%-uk meghívólevél alapján, 18,0% pedig saját elhatározásából, háziorvosi beutalóval vette igénybe a szűrővizsgálatot.
A mammográfiás vizsgálaton való részvétel motiváló tényezői közül az egészségtudatosság és a preventív szemlélet magas szintjét jelző paraméterek – jó tudni, hogy nincs problémám, fontos a

megelőzés és a korai felismerés – domináltak. Növelte a részvételi arányt a szűrővizsgálatra való meghívás, és annak ingyenessége sem volt közömbös.
1/B. A mindkét nemet azonos arányban reprezentáló 45-64 éves korcsoportra (n=401) vonatkozóan megvizsgáltuk, hogy milyen befolyásoló tényezők játszanak szerepet a nők, illetve férfiak szűrővizsgálaton való részvétele relációjában. A szűréseken való részvétel vonatkozásában szignifikáns különbség volt a nemek között, míg a nőknek 87,9%-a, a férfiaknak csak 34,1%-a vett már részt életében valamilyen daganat szűrésén. Mindkét nem vonatkozásában igen alacsony volt a vastag/végbélrák szűrési mutatója. A férfiak körében szignifikánsan magasabb volt a szűrésen résztvevők aránya azok esetében, akiknek van/volt tumorban szenvedő hozzátartozója. Nagyobb arányban voltak szűrésen a magasabb iskolai végzettségűek, a házastársi/élettársi kapcsolatban élők, valamint azok, akik a megyeszékhelyen laktak. A megkérdezettek többsége (71,4%) utalt arra, hogy motiváló tényező lenne a részvételre, ha egyes egészségügyi kiadásai (pl. gyógyszerek ára) azt követően csökkennének.
1/C. A daganatokkal, illetve szűrővizsgálatokkal kapcsolatos információk több csatornán is eljutnak a lakossághoz. Mintegy háromnegyedük különböző médiumokból (TV, rádió), illetve kb. 60%-uk háziorvosától vagy szakorvosától is szerez információkat. Jelentősnek tekinthető az életmódmagazinokból, illetve a családon belüli információcserével történő tájékozódás, s bár kevesebb, mint 40%-uk jut adatokhoz az internet használat alapján, úgy tűnik, hogy ez utóbbi egyre inkább előtérbe kerül.
2. Középiskolások (n=371), egyetemi hallgatók (n=658)
A középiskolások a megyeszékhelyeken működő iskolákból, az egyetemi hallgatók pedig a Szegedi Tudományegyetem különböző karain tanuló hallgatók közül kerültek ki. Mindkét csoport a dohányzást tartotta a legfontosabbnak a daganatok kialakulása szempontjából, s legkevésbé a táplálkozást. A daganatos megbetegedésekkel kapcsolatos információszerzés tekintetében leginkább az egészségügyi személyzetre hagyatkoznának. A motivációt, információszerzést tekintve a specifikus weboldalak, a híres emberek, valamint a súlyos esetek általi figyelemfelkeltés egyaránt informatív volt mindkét csoport esetében.
3. Pedagógusok (n=381)
A pedagógusok ugyanazon középiskolákból kerültek ki, mint a diákok. A nemek szerinti megoszlás 33,5% férfi, 66,5% nő volt. A megkérdezettek több mint fele (55,8%) jónak ítélte az egészségi állapotát, mindössze 6,7% tartotta nagyon jónak, 34,6% közepesnek, 2,9% pedig rossznak. Többségük (61,1%) normál tápláltsági állapotú, 28,7% túlsúlyos, 4,8% elhízott és 5,4% sovány volt. A rendszeres dohányzás prevalenciája 11% volt.
A nők 92%-a vett részt méhnyakrák, a férfiak 28,3%-a prosztatarák szűrésen. A vastagbél rákszűrésen résztvevők aránya egyik csoportnál sem érte el a 20%-ot.
4. Egészségügyi dolgozók
A többszöri próbálkozásunk ellenére is igen alacsony válaszadási arány miatt a kérdőívek statisztikai feldolgozása nem volt lehetséges.

A mortalitási mutatók további javításához változatlanul szükség van a rákszűrővizsgálatok folyamatos végzésére, melyek csak akkor lehetnek hatékonyak, ha a szűrendő populáció tagjainak is van igénye rájuk. Az emlők önvizsgálatát és annak jelentőségét már fiatalkorban módszeresen tanítani és gyakoroltatni kellene. Tudatosítani kell – mindenek előtt a fiatalok körében – az időbeni orvoshoz fordulás szerepét az emlőrák és más daganatos betegségek korai diagnózisa és kellően effektív terápiája céljából. Megfontolandó egyes egészségügyi kiadások csökkentésének motiváló hatása is a szűrővizsgálatokon való részvétel növelése érdekében.
Az információszerzéssel kapcsolatban fokozott figyelmet kell fordítani a televízió által nyújtott információkra, hogy az ott elmondottak, bemutatottak a lakosság széles rétegei számára „hasznosak” és egyértelműek legyenek, valamint a különböző internet-portálokon betegségekkel, daganatokkal, azok megelőzésével, szűrésével és gyógyításával kapcsolatosan közzétett adatokra.

Budget: 4.500.000. - HUF

DETERMINANTS OF SCREENING RELATED KNOWLEDGE AND ATTITUDES IN SOUTHERN GREAT PLAIN OF HUNGARY

Nagymajtényi László, Paulik Edit, Müller Anna, Molnár Regina, Erdős Csaba
Department of Public Health, Faculty of Medicine, University of Szeged

The aim of the application was to reveal the knowledge about malignant tumours – which are the second leading cause of death in Hungary – that may alter the participation rate in screenings for cancer. Our survey was carried out among different age groups and socio-demographic populations in order to find the determinants of screening related knowledge and attitudes that can influence the partaking in screenings.
The target population of the study was the 16-64 years old people of the Southern Great Plain of Hungary (Bács-Kiskun, Békés, Csongrád Counties) focusing on the following groups: 1. those who make use of health care (patients, potential patients); 2. secondary school students, university students; 3. teachers; 4. health care professionals (physicians, nurses, midwives).
The 16-64 years old population was examined in certain settlements of the three counties (one county town, three towns and six villages) selected according to the number of population. Szeged was chosen as the county town, because there are the university clinics that are involved in the regional health care. From towns those were selected (one per county) where there is no in-patient clinic and the villages were chosen as those 1000-2000 population settlements where there is general practitioner on the spot but no ambulatory care.
The cross-sectional study was made by group-specific and anonym questionnaires carried out by the help of interviewers. The questionnaire was prepared on the base of literature review. The main groups of questions were directed toward socio-demographic characteristics, health status, health behaviour, general concerns about tumours and screenings, and tumour-specific consideration.
The study was permitted by the Szent-Györgyi Albert Clinical Centre Regional Human Medical-biological Ethical Committee (permission number: 53/2010).

1. Those who make use of health care (n=590)
1/A. 25-64 years women were examined as one study group of those who had made use of health care (n=385). The mean age was 45.08± 11.11 years. Half of them considered its own health status as good; nutritional status of almost half of them was normal, third part of them was overweight, fifth part of them was obese. Prevalence of regular smoking was 34.4% in this female population.
We can say that their knowledge about risk factors of breast cancer is insufficient: altogether 21.7% of them knew that obesity raise its risk, 18.4% of them believed that regular smoking is not a risk increasing factor and 24.1% had no point of view in this question. Hardly more than third of them were aware of this way harmful effect of drinking alcohol. 21.7% were not familiar with the fact that breastfeeding decrease the risk of breast cancer. Half of the group did not believe that they are at risk of developing breast cancer or thought that they are at risk moderately, and two third of the population (67.4%) thought that breast cancer is preventable.
80.8% of the respondents did self-examination of breasts, but only one third of them (33.0%) knew exactly when to do it within a cycle. Self-examination was more frequent among those whose relatives had breast cancer. According to level of education self-examination was the most common among those attended secondary education. From the point of view of occurrence of self-examination there was no difference between counties, but aligning different types of settlements county towns were the places where the frequency was the highest.
64.8% of the interviewed people took part in mammography every two years in accordance with public health recommendations, and 15.6% of them never did. 76.0% went to screenings in response to invitation letter and 18.0% did it by his own decision with GP assignment.
From motivating factors of taking part in mammography health awareness and some high level indicators of preventive approach – it is good to know that there is no problem, prevention and early

diagnosis is important – dominated. Invitation to screenings and its free of charge raised the participation rate.

1/B. Factors influencing women' and men' participation rate at screenings was studied in the 45-64 years age group (n=401) representing both gender equally. There was significant difference between genders, 87.9% of women, while only 34.1% of men went for cancer screening at least once in their lifetime. Screening rate of colon/rectal cancer was very low in case of both males and females. Among men participation rate was significantly higher in case of those having a relative suffering/suffered from tumour. Attendance rate was also higher among those having high educational level, married people or living in common-law marriage and among those living in county town. Majority of the interviewed people (71.4%) answered that it would be a motivating factor if their health expenses could be reduced by following appearance at cancer screening.

1/C. Information about tumors and screenings can reach the people by various ways. Three quarters of the respondents gain information from the media (television, radio) and 60% of them from their family physician or specialist. Considerable inquiry came from lifestyle magazines, family and from the internet, though this latter is used by only 40% of the respondents; it seems that this became a more and more favourable channel of information.

2. Secondary school students (n=371), university students (n=658)

Responding secondary school students were from schools of the county town, university students were from undergraduates of several faculties of University of Szeged. Both group regarded smoking as the most important and nutrition as the least important risk factor of tumours. They prefer relying on health care professionals if they need information about cancer. Concerning motivation and getting information specific websites and calling attention by famous people or by severe cases were considered as very informative in both group.

3. Teachers (n=381)

Teachers were from the same schools as the students. 33.5% of them were males and 66.5% were females. More than half of the respondents (55.8%) considered their health status as good, altogether 6.7% thought as very good, 34.6% as average and 2.9% as bad. Nutritional status of majority of them (61.1%) was normal, 28.7% was overweight, 4.8% obese and 5.4% of them was thin. Prevalence of regular smoking was 11%.

92% of the women took part in cervical cancer and 28.3% of men participated in prostate cancer screening. Of those partaking at colon cancer screening did not reach 20% at any group.

4. Health care professionals

Respondence rate was very low despite our several efforts; therefore statistical analysis of the questionnaires was impossible.

To improve mortality rates continuing cancer screenings is essential, but they can be effective only if the population to be screened demand them. Self-examination of the breasts and its importance should be taught and practiced already in younger age groups. The fact that going to doctor in time is beneficial from the point of view of breast cancer and early diagnosis of other tumours and in order to make a more effective therapy should be emphasized especially among the young ones. It worth considering the motivating effect of decreased health expenses with the purpose of increasing the participation rate at screenings.

In relation to getting information it is of utmost importance that what is coming from the television should be useful and unambiguous for wide ranges of the population, and data of diseases, tumours, their prevention, screening and therapy shown on internet websites should be also followed with attention.

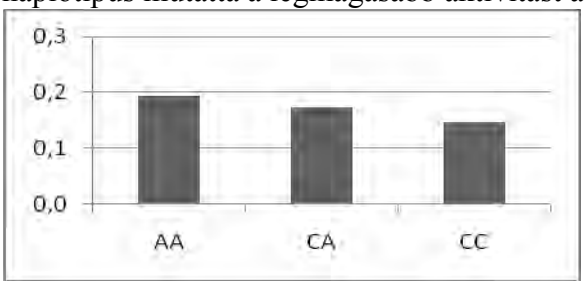
Teljes támogatás: 3.000.000,- Ft

PURINERG P2X7 RECEPTOR GÉN VARIÁNSAINAK SZEREPE DEPRESSZIÓ KIALAKULÁSÁBAN

Nemoda Zsófia, Keszler Gergely, Abdul Rahman Omar
Semmelweis Egyetem, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet

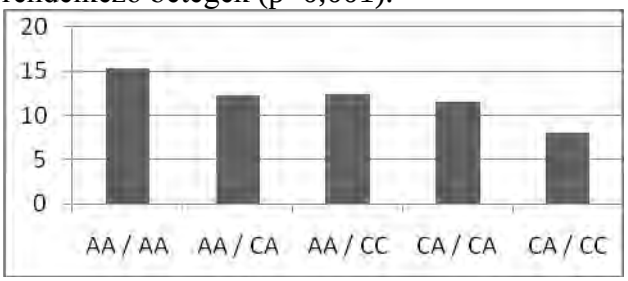
A pszichiátriai zavarok között az egyik leggyakoribb kórkép a major depresszió (major depression: MD). Magyar felmérések szerint a MD éves prevalenciája nőknél 19,7%, míg férfiaknál 9,2%, emiatt Magyarországon is egyre fontosabb társadalmi és egészségügyi kérdésként lép fel a depresszió időben való felismerése és kezelése. A MD kialakulásában mind genetikai, mind környezeti faktorok fontos szerepet játszanak. Családvizsgálatok eredményei alapján a genetikai háttér átfedést mutat a bipoláris zavarral (bipolar disorder: BD), ahol depressziós és mániás szakaszok váltakoznak a kedélybetegség lefolyása alatt, ezért genetikai elemzésünkben e két kórkép valamelyikében szenvedő betegeket vontunk be.
Mivel teljes genom vizsgálatokkal egyelőre nem sikerült nagy hatású génvariánsokat azonosítani a pszichiátriai kórképek területén, továbbra is fontos a kandidáns gének vizsgálata. A 12q23-24 kromoszóma régiót MD-vel és BD-vel is kapcsolatba hozták, részletesebb vizsgálatok pedig a P2RX7 (P2X7 purin receptort kódoló) gént emelték ki. Nemrégiben munkacsoportunk összefüggést mutatott ki a P2RX7 gén aminosav cserét okozó Gln460Arg polimorfizmusa és a depresszív tünetek súlyossága között az említett pszichiátriai betegpopulációban, valamint 2-es típusú cukorbetegek körében. A pszichiátriai betegek mellett a cukorbetegek kiválasztására azért került sor, mert e betegcsoportban közel kétszeres a depresszióra való hajlam az átlag populációhoz képest. Jelenlegi pályázat célja a P2RX7 gén részletesebb vizsgálata volt e két betegmintában. Mivel a legújabb nemzetközi, nagy esetszámú genetikai vizsgálatok nem támasztották alá a Gln460Arg polimorfizmus szerepét MD-ban illetve BD-ben, a génen belüli egyéb génvariánsok vizsgálatát tűztük ki célul.
Első lépésként a szakirodalomban fellelhető, aminosavcserével járó génvariánsokat vizsgáltuk meg a Gln460Arg polimorfizmus környékén (név szerint Thr348Ala, Thr357Ser, Ala496Glu és Ile568Asn). Genetikai asszociáció elemzésünk (MANOVA: multivariate analysis of variance) során a pszichiátriai betegek (N=154) és a diabéteszes betegek (N=246) által kitöltött Hospital Anxiety and Depression Scale kérdőív depresszív és szorongásos tünetskáláját használtuk. Mind a depresszív, mind a szorongásos tünetek asszociációt mutattak a Thr348Ala polimorfizmussal. A Thr-allél hordozása egy vagy két példányban növekvő tünet-súlyossággal mutatott összefüggést (pszichiátriai betegek: szorongás: $F(2,149)=4,14$, $p=0,018$, depresszió: $F(2,149)=9,77$, $p<0,001$, diabéteszes betegek: szorongás: $F(2,241)=3,97$, $p=0,020$, depresszió: $F(2,241)=8,11$, $p<0,001$).
Emellett a P2RX7 gén 3’ nem-kódoló régiójában kerestünk olyan polimorfizmusokat, amelyek létrehozhatnak vagy megszüntethetnek lehetséges mikroRNS kötőhelyet, magyarázva az esetleges funkcionalitást a gén szintjén. Az *in silico* vizsgálataink alapján az rs1653625 A/C SNP (single nucleotide polymorphism) gyakori génvariáns bizonyult potenciálisan érdekes polimorfizmusnak. Azonban ezt az SNP-t technikailag problematikus szekvencia veszi körül (másik két ritka SNP található a szomszédságában, illetve poli-C és poli-A traktus övezi a két oldalról), így a széles körben elterjedt allél-specifikus genotipizálási módszereket nem tudtunk alkalmazni. A technikai problémát egy módosított primer segítségével, RFLP (restrikciós fragmentum hosszúság-polimorfizmus) módszer alkalmazásával oldottuk meg. Dimenzionális asszociáció vizsgálatunk az rs1653625 A-allél hordozásának fontosságára mutatott rá a depresszív és szorongásos tünetek hátterében mindkét betegcsoportban (pszichiátriai betegek: szorongás: $F(2,149)=4,16$, $p=0,017$, depresszió: $F(2,149)=10,08$, $p<0,001$, diabéteszes betegek: szorongás: $F(2,240)=3,05$, $p=0,049$, depresszió: $F(2,240)=3,84$, $p=0,023$). A másik két ritka génvariáns (rs1718106 A/C és rs28969482 A/C) közül csak az rs1718106 mutatott polimorf jelleget a vizsgált mintáinkon, 22 random személy szekvenálási eredményei alapján. Mivel ez az A/C SNP szomszédos a fent említett rs1653625 A/C SNP-vel (a két A/C SNP a P2RX7 gén 2164-es és 2165-ös pozíciójában helyezkedik el), további vizsgálatainkban a két polimorfizmus kombinációját vizsgáltuk.

A P2RX7 gén 3' nem-kódoló régiójában lévő SNP-k funkcionális vizsgálatát luciferáz-riportergén rendszerben, HEK (humán embrionális vese) sejtek tranziens transzfekciójával végeztük el, kontrollként a pGL3-B plazmidot használva. A pMIR riporter plazmidba a P2RX7 gén teljes 3' nem-kódoló régióját vittük be. A 2164-es pozícióban lévő rs1653625 A/C SNP és a 2165-ös pozícióban lévő rs1718106 A/C SNP kombinációjaképpen négy lehetséges haplotípus képzelhető el, de genotipizálási és szekvenálási eredményeik alapján csak három variáció fordult elő a magyar populációnkban (AA, CA és CC; az AC haplotípusra nem láttunk példát 420 beteg és 150 kontroll személy elemzése során). Mindhárom P2RX7 konstruktum csökkent aktivitást mutatott a kontroll (üres) pMIR plazmid aktivitásához képest (lásd relatív aktivitás értékei az y tengelyen), az AA haplotípus mutatta a legmagasabb aktivitást a három haplotípus közül (p=0,03).



A P2RX7 gén 3' nem-kódoló régiójában lévő haplotípusok relatív aktivitás értékei (a luciferáz aktivitást a β-galaktozidáz aktivitásokkal normalizáltuk).

A tünetsúlyosság asszociáció vizsgálata során a pszichiátriai betegek körében figyeltünk meg szignifikáns összefüggést a P2RX7 haplotípusok és a depresszív tünetek között. Az AA haplotípust hordozó betegek magasabb skála értékkel rendelkeztek, mint a CC vagy CA haplotípussal rendelkező betegek (p=0,001).



A depresszív tünetek súlyossági értéke a különböző P2RX7 haplotípussal rendelkező betegek körében (a két kromoszómán található kétfajta haplotípus van csoportonként feltüntetve).

Eredményeik alapján úgy gondoljuk, hogy a P2RX7 gén 3' nem-kódoló régiójában lévő polimorfizmusok génexpressziót befolyásoló hatása magyarázatul szolgálhat a P2RX7 gén és a depresszív tünetek között megfigyelt összefüggésre. Eredményeinket hazai és nemzetközi konferenciákon mutattuk be és két kéziraton dolgozunk. A nemzetközi újságokban való publikációkhoz remélhetőleg nagyobb esetszámú pszichiátriai betegcsoportot tudunk felhasználni, mert egy 2010-ben elindult pályázat során a munkacsoportunk újabb 159 pszichiátriai beteg anyagát kapta meg 2011-ben, ezeknek a mintáknak a genetikai elemzését 2011 novemberében tudtuk elkezdeni. Mivel alacsony esetszámmal gyakran visszautasítják a kéziratokat, genetikai elemzésünket tervezzük megerősíteni a kibővült pszichiátriai beteg csoporton (N=313).

Rahman OA, Sasvári-Székely M, Székely A, Faludi G, Guttman A, Nemoda Z. Analysis of a polymorphic microRNA target site in the purinergic receptor P2RX7 gene. ELECTROPHORESIS 31: 1790-5 (2010) IF: 3,569

Nemoda Z, Abdul Rahman O, Vereczkei A, Somogyi A, Faludi G, Sasvári-Székely M. Purinerg receptor P2RX7 gén polimorfizmusok és depressziós tünetek asszociáció vizsgálata. Magyar Biokémiai Egyesület 2010. évi Vándorgyűlése, Budapest, 2010. augusztus 25-28.

Nemoda Z, Abdul Rahman O, Vereczkei A, Somogyi A, Faludi G, Sasvári-Székely M. Purinergic receptor P2RX7 gene polymorphisms: association study with depressive symptoms and molecular genetic analysis. XIXth World Congress Psychiatric Genetics, Washington, DC, USA, 2011. szeptember 10-14.

Teljes támogatás: 3.000.000,- Ft

PURINERGIC P2X7 RECEPTOR GENE VARIANTS AND DEPRESSION

Zsófia Nemoda, Gergely Keszler, Omar Abdul Rahman
Department of Medical Chemistry, Molecular Biology and Pathobiochemistry, Semmelweis University

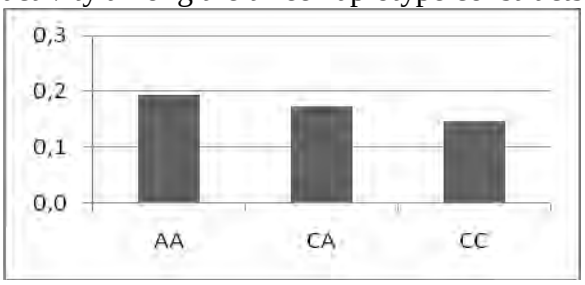
Major depression (MD) is one of the most common psychiatric disorders. According to Hungarian epidemiological data, the prevalence rate for MD is 19.7% among women and 9.2% among men, therefore, the timely diagnosis and treatment of depression is an increasingly important social and health care issue. In the pathogenesis of MD both environmental and genetic factors are important players. Based on the results of family studies, the genetic background of MD has an overlap with bipolar disorder (BD), where the depressive episodes alternate with manic episodes during the course of the disorder. Therefore, psychiatric patients with a diagnosis of either MD or BD were included in our genetic analyses.

Since whole genome analyses have not been able to discover major genetic risk factors in psychiatric disorders, studying candidate genes with minor effects is still an important research area in psychogenetics. The 12q23-24 chromosomal region was indicated by linkage studies both in MD and BD. Subsequent, in-depth genetic analyses indicated the potential importance of the P2RX7 gene (coding for the P2X7 purinergic receptor). Recently, our workgroup reported association between the Gln460Arg polymorphism and depressive symptom severity in a psychiatric patient and a diabetic patient population. In addition to patients with BD or MD, patients with type 2 diabetes mellitus were selected, because, compared to the general population, they are at twofold higher risk for developing depressive symptoms. Our present aim was to study other P2RX7 gene variants in these two patient samples, because more recent large-scale genetic analyses did not support the importance of the Gln460Arg polymorphism in either MD or BD.

First we analyzed non-synonymous polymorphisms causing amino acid change in the neighborhood of the Gln460Arg polymorphism (namely the Thr348Ala, Thr357Ser, Ala496Glu, and Ile568Asn). In our genetic association analyses (MANOVA: multivariate analysis of variance) the depression and anxiety symptom severity scales of the Hospital Anxiety and Depression Scale were used in the psychiatric patient (N=154) and the diabetic patient (N=246) samples. Both the depressive and anxiety symptoms showed association with the Thr348Ala polymorphism. Carrying one or two copies of the Thr allele showed a stepwise increase on the symptom severity scales (psychiatric patients: anxiety: $F(2,149)=4{,}14$, $p=0{,}018$, depression: $F(2,149)=9.77$, $p<0.001$, diabetic patients: anxiety: $F(2,241)=3.97$, $p=0.020$, depression: $F(2,241)=8.11$, $p<0.001$).

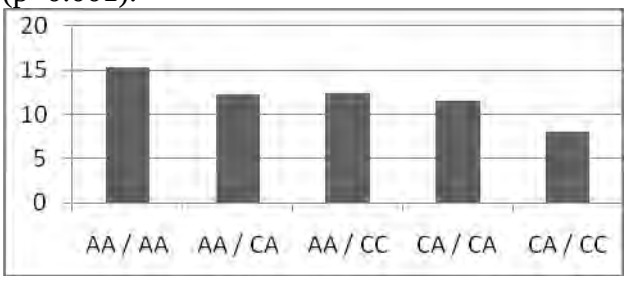
In addition, we searched for polymorphic microRNA target sites in the 3' untranslated region (UTR) of the P2RX7 gene which might affect putative microRNA binding, explaining the functionality of the P2RX7 gene effect. Based on our *in silico* search, we selected the rs1653625 A/C SNP (single nucleotide polymorphism) for the genetic analysis, because this SNP was indicated by two databases (PolymiRTS and Patrocles). However, this SNP resides in a problematic sequence: there are two additional SNPs in close proximity, and a polycytosine tract on one side and a polyadenine tract on the other side hinder the applicability of regularly used genotyping techniques with allele specific primers or probes. Therefore, we applied a modified primer using the RFLP (restriction fragment length polymorphism) technique to overcome this genotyping problem. The dimensional association analyses showed the importance of the A-allele of the rs1653625 at both depressive and anxiety symptoms in both patient populations (psychiatric patients: anxiety: $F(2,149)=4.16$, $p=0.017$, depression: $F(2,149)=10.08$, $p<0.001$, diabetic patients: anxiety: $F(2,240)=3.05$, $p=0.049$, depression: $F(2,240)=3.84$, $p=0.023$). Among the two other rare genetic variants (rs1718106 A/C and rs28969482 A/C) only the rs1718106 was polymorphic in our Hungarian sample, based on the sequencing results of 22 randomly selected samples. Since this A/C SNP is located in a neighboring position, next to the above mentioned rs1653625 A/C SNP, we studied the combination of these two SNPs in our subsequent analyses.

In the molecular analyses HEK (human embryonic kidney) cells were transfected with the pMIR vector constructs containing the P2RX7 3' UTR downstream of the luciferase gene as well as with the pGL3-B plasmid as a control. There are four possible haplotypes of the rs1653625 A/C SNP located at the 2164th position and the rs1718106 A/C SNP located at the 2165th position, however, we observed only three haplotypes in our sample (the AA, CA, and CC haplotyes; we could not detect any AC haplotype among the 420 patient and 150 control samples). All three P2RX7 constructs showed repressed activity compared to the control (empty) pMIR plasmid (see the relative activity values on the y axis). The AA haplotype showed the highest relative luciferase activity among the three haplotype constructs (p=0.03).



The relative activity of the P2RX7 3' UTR haplotype constructs (the luciferase activity was normalized to the β-galactosidase activity).

The genetic analysis showed significant association between depressive symptom severity and the P2RX7 3' UTR haplotypes in the psychiatric patient sample. Patients carrying the AA haplotype showed higher scores on the depression scale compared to those with the CC or CA haplotypes (p=0.001).



Depressive scale scores of the patient groups with different P2RX7 haplotypes (the two haplotypes located on the two chromosomes are indicated in each group).

Based on our results, we think that the association between depression and the P2RX7 gene might be explained by the effects of the polymorphisms of the P2RX7 3' untranslated region. We presented these results on national and international conferences, and there are two manuscripts under preparation. For the publications in international journals we are planning to use an extended psychiatric patient population, because there were 159 additional samples collected in a new collaborative research started in 2010. We could start genotyping these new samples in our laboratory only in 2011 November, and we expect to finish the genetic analyses in the following months. Since high impact factor journals tend to reject manuscripts with small sample sizes, we plan to support our genetic findings in the bigger psychiatric patient sample (N=313).

Rahman OA, Sasvári-Székely M, Székely A, Faludi G, Guttman A, Nemoda Z. Analysis of a polymorphic microRNA target site in the purinergic receptor P2RX7 gene. ELECTROPHORESIS 31: 1790-5 (2010) IF: 3.569

Nemoda Z, Abdul Rahman O, Vereczkei A, Somogyi A, Faludi G, Sasvári-Székely M. Association analyses of depressive symptoms and purinergic receptor P2RX7 gene polymorphisms. The yearly workshop of the Molecular Biology Section of the Hungarian Biochemical Society, Budapest, 2010. August 25-28.

Nemoda Z, Abdul Rahman O, Vereczkei A, Somogyi A, Faludi G, Sasvári-Székely M. Purinergic receptor P2RX7 gene polymorphisms: association study with depressive symptoms and molecular genetic analysis. The XIXth World Congress Psychiatric Genetics, Washington, DC, USA, 2011. September 10-14.

2 cm

Budget: 3,000,000.- HUF

AZ ELHÍZÁS ÉS A FIZIKAI AKTIVITÁS HATÁSA AZ AGY ÖREGEDÉSÉRE

Nyakas Csaba[1], Jónás Izabella[1], Gertjan van Dijk[2], Felszeghy Klára[1], Kacsándi Anna[1]
[1]Semmelweis Egyetem, Sporttudományi Kutatóintézet, [2]Groningeni Egyetem, Neuroendokrinológia Kutató Csoport

Ismert, hogy az öregedés együtt jár a neurodegeneratív megbetegedések gyakoribb előfordulásával. Még az un. normális agyi öregedés is gátolja az agy egyre csökkenő teljesítmény kapacitásának a kihasználását, ami neuronális plaszticitás beszűkülést és memória kieséseket eredményez. A betegségekre irányuló kockázati tényezők mind a normális, mind a patológiás agyi öregedést jelentősen befolyásolják. Az elhízás és a következményes metabolikus szindróma, valamint a komorbiditások igen jelentős kockázati tényezőknek tekinthetők. Az elhízás, és az egyre gyakoribb gyermekkori elhízás szoros összefüggésben áll a fizikai aktivitással, táplálkozással és az életmóddal. Jogos az a feltételezés, hogy az életkorban minél korábban jelentkeznek a patológiás eltérések, azok annál mélyrehatóbb hatásúak az egész további életszakaszokra. Ez összefüggésben van a fejlődő szervezet fokozott érzékenységével a metabolikus bevéső dés folyamataira. A spontán és a szakszerűen végzett fizikai testedzés megelőzési faktorként szerepel mind az elhízásra, mind a kóros agyi öregedésre nézve. A támogatott kutatások e komplex, de még korai stádiumban lévő tudományos ismeretanyag bővítésére szolgáltak.

Patkányokon végzett kísérleteinkben igazoltuk, hogy a testsúly, a táplálkozás és az anyagcsere, valamint az elhízási hajlam fenotipizálódása már a magzati korban megkezdődik az anyagcsere bevéső dési folyamatok révén. Ennek példája a többszörösen telítetlen zsírsavak (PUFA) szerepe, amit vizsgáltunk. Az ω-3 zsírsavak, főleg a dokozahexaénsav (DHA), preventív hatásúak, míg a PUFA hiányos étrend mellett a metabolikus szindrómára emlékeztető tünetek korai megjelenése a jellemző. A korai DHA hatás magában foglalja a glukóz tolerancia növekedését, az alacsonyabb testsúlyt, a csökkent inzulin és leptin vérszinteket a testsúlyra számított fokozott tápanyag felvétel mellett. A magzati korban kiegészítésképpen adagolt DHA az agyszövet membrán foszfolipidekre kifejtett biokémiai hatása a felnőttkorig felismerhető, ami jelentős hosszantartó hatásnak fogadható el. Ezen túlmenően ugyanez a kezelés az egész élettartamra kiterjedő funkcionális hatást is kivált, mert mérsékli a kognitív teljesítmény csökkenésének mértékét még öregkorban is, ami kimutatható volt Morris térbeli útvesztő tanulási tesztben. Ez utóbbi eredmény talán az első olyan megfigyelés, hogy a magzati korban a zsíranyagcsere modulálásával egy élethosszig tartó pozitív, preventív jellegű változás érhető el a kognitív teljesítményben. A magzati korban PUFA hiányos táppal történt kezelés mellett viszont emelkedik a testsúly, nő a vér triglicerid tartalma felnőttkorban és csökken a glukóz tolerancia. Továbbá a PUFA hiány mellett csökken az élettartam is, ami a szervezet öregedésére kifejtett komplex hatásnak tulajdonítható.

Ha a testedzés szerepét kívánjuk megismerni szintén célszerű a korai, epigenetikai kategóriájú élettani hatásokat vizsgálni. Fizikai aktivitás alapján 32 generáción át szelektált (genetikai szelekció) aktív egerek táplálkozása, anyagcseréje, spontán fizikai aktivitása igen markánsan az elhízással szembeni rezisztencia irányába tereli a fenotípust; ezek az egerek szinte rezisztensé válnak a zsírdús diéta indukálta elhízással szemben. Csökken a testsúlyuk és csökken a zsírdepók nagysága is, ami az öregedéssel különben fokozódik a laboratóriumi rágcsálókban. Hogy a fizikai aktivitás alapján szelektált egerek anyagcseréje és agyi működése miképpen öregszik, további ígéretes vizsgálatokat igényel, mely vizsgálatok folyamatban vannak. Ezek a vizsgálatok pl. fókuszálnak az agy cholinerg neurotranszmitter rendszerének vizsgálatára. Meg kell jegyezni, hogy míg a szomatikus anyagcsere-hatások nagyon pozitívak és az egészséget támogató irányba változnak a szelektált egerekben, addig a viselkedésük komplex irányba változik, ami jelentős szempont lehet az agy öregedésének vizsgálatakor. Például, felnőttkorra csökken az agy szerotonin anyagcseréje és az állatok anxietást mutatnak új környezetben. Ez és további megfigyeléseink abba az irányba mutatnak, hogy a fokozott fizikai aktivitás addiktív jellegű is lehet, ugyanis a genetikai szelekció alapján hiperaktív állatokat is szelektáltunk egyes szelekciós vonalakban.

Következtetések: (1) a rendszeres testedzés jelentős tényező az egészségi állapot fenntartásában és a fejlődő szervezetre kifejtett hatása hosszabb távú az élet előrehaladása során, ami feltehetően epigenetikai mechanizmusra utal, (2) a magzati metabolikus bevésési folyamatokban kitüntetett szerepe lehet a zsírsavaknak, különös tekintettel a többszörösen telítetlen zsírsavakra, melyek hiánya az elhízásra és a metabolikus szindrómára hajlamosító tényező és az agy öregedését is modulálja, (3) a fokozott fizikai aktivitás és a korai PUFA kezelés hosszantartó hatásai élettanilag összevethetők, ha a szervezet anyagcseréjét és az elhízással szembeni ellenálló képességét vizsgáljuk.

Közlemények

1) Jonas I, Vaanholt L, Doornbos M, Garland T Jr, Scheurink AJ, Nyakas C, van Dijk G: Effects of selective breeding for increased wheel-running behavior on circadian timing of substrate oxidation and ingestive behavior. PHYSIOLOGY AND BEHAVIOR 99: pp. 549-554 (2010) IF: 3,295

2) Jonas I, Schubert KA, Reijne AC, Scholte J, Garland T Jr, Gerkema MP, Scheurink AJ, Nyakas C, van Dijk G: Behavioral traits are affected by selective breeding for increased wheel-running behavior in mice. BEHAVIORAL GENETICS 40: pp. 542-550 (2010) IF: 3,117

3) Nyakas C, Granic I, Halmy LG, Banerjee P, Luiten PGM: The basal forebrain cholinergic system in ageing and dementia. Rescuing cholinergic neurons from neurotoxic amyloid-β42 with memantine. BEHAVIORAL BRAIN RESEARCH 221: pp. 594-603 (2011) IF: 3,393

4) van Dijk G, Evers S, Guidotti S, Thornton SN, Scheurink AJ, Nyakas C: The lateral hypothalamus: A site for integration of nutrient and fluid balance. BEHAVIORAL BRAIN RESEARCH 221: pp. 481-487 (2011) IF: 3,393

5) van Dijk G, Kacsándi A, Kóbor-Nyakas DE, Hőgyes E, Nyakas C: Perinatal polyunstaurated fatty acids supplementation causes alterations in fuel homeostasis in adult male rats but does not offer resistance against STZ-induced diabetes. HORMONE AND METABOLIC RESEARCH 43: pp. 938-943 (2011) IF: 2,690

2 cm

2 cm

Budget: 3,000,000.- HUF

2 cm

EFFECTS OF OBESITY AND PHYSICAL ACTIVITY ON BRAIN AGING

Csaba Nyakas[1], Izabella Jónás[1], Gertjan van Dijk[2], Klára Felszeghy[1], Anna Kacsándi[1]
[1]Research Institute of Sport Sciences, Semmelweis University; [2]Neuroendocrine Unit, University of Groningen, The Netherlands

2 cm

The incidence of neurodegenerative diseases in the course of aging increases. Even the so called normal aging may interfere with the utilisation of the already decreasing functional capacity of the brain which leads to diminished neuronal plasticity and memory problems. The risk factors for diseases substantially influence both normal and pathological brain aging. The obesity and the coupled metabolic syndrome and the comorbidities should be regarded as serious risk factors in this sense. The increased incidence of obesity and especially that of child obesity is closely linked to physical activity, proper nutrition and life style. It is plausible to assume that the earlier the appearance of pathological symptoms the deeper its impact on the coming periods of lifespan. This is linked to the increased sensitivity of developing organism to metabolic imprinting of either healthy or pathological directions. The spontaneous and guided physical exercise can be considered as a preventive factor against both obesity and pathological brain aging. The supported investigation summarized here serves to extend the screen of the relatively scarce scientific knowledge on this research field.

Our experiments performed on rats showed that phenotyping of body growth, nutrition behaviour, fuel metabolism and risk for obesity already starts in the fetal age by means of metabolic imprinting. Our study focused on the role of polyunsaturated fatty acids (PUFA) in this aspect. The ω-3 fatty acids, first of all docosahexaenoic acid (DHA), are preventive in nature regarding to a number of above mentioned risk factors, while in case of PUFA deficiency in the fetal age the long-term effects are resembling to the symptoms of metabolic syndrome and early obesity. The fetal DHA exposure increased glucose tolerance, resulted in decreased body mass, decreased insulin and leptin blood levels even in cases of increased food intake per body mass. Supplemented DHA treatment in the fetal age altered phospholipid composition of membranes of brain homogenates up to 13 months of age, and that was absent in old age of 24 months. In addition the same treatment exposed an even longer effect of fetal DHA on cognition, i.e. Morris water maze spatial learning was better maintained in the old 24 months of age in both genders of rats after DHA treatment. This observation is a new finding showing a lifelong effect of fetal PUFA administration, namely a preventive action against the cognitive decline during normal aging of rats. Contrary to the beneficial effects of PUFA, first of all DHA treatment in the fetal age, the PUFA-deficient diet given to the pregnant rats resulted in increased body mass in adult age accompanied by increased blood triglyceride, insulin and leptin levels, and decreased glucose tolerance. In addition the lifespan of the PUFA-deficient diet-treated rats decreased showing a complex metabolic action of this type of fetal exposition.

If we like to understand the mechanism of beneficial effects of physical exercise in general the developmental aspect including the assumption of epigenetic changes seems to be a fruitful approach. We used mice selected on the bases of increased physical activity throughout 32 generation to study the metabolic and hormonal profile of their feeding behaviour, fuel metabolism, body mass regulation, and adaptive behaviour like learning, relearning, emotion, etc. It was found that the phenotype of selected mice was strongly shifted towards showing a resistance against obesity, namely against high fat diet induced obesity (DIO). In fact these animals were completely resistant against DIO. Furthermore, their body mass was lean, they had decreased fat mass size all over the body. They preferred to eat charbohydrate against high fat diet and their spontaneous

physical activity was much above controls. The question how these animals are aging and how their brain is aging will be studied in the future? In our research on brain aging we focus first of all on the cholinergic system which has been reviewed recently, i.e. in the course of this research support. It is worth to mention that while the somatic type of metabolic actions of physical activity were all beneficial in the selected mice their behaviour changed in diverse directions which can be important in their brain aging period. For example, by adult age the serotonin content and metabolism declined in their forebrain and they exposed increased anxiety. Their maze learning was not different from their controls but their reversal learning was inferior. Some of the selected lines contained hyperactive animals especially among the females. Thus, it might be assumed that genetically determined hyperactivity can evoke addiction like behaviour.

Conclusions: (1) the regular physical activity exposes beneficial metabolic action on the organism and especially developmentally effective through probably the more sensitive imprinting mechanisms, (2) regarding polyunsaturated fatty acids again the early development age, the fetal age, is sensitive for long-term regulation of those functions which are important in the development of obesity, metabolic syndrome or cognitive functions in old age, (3) on these bases the imprinting actions of physical activity or PUFAs possess similarities and can results in a number of beneficial metabolic outcome which implies preventive aspects against both obesity and comorbidities and against cognitive decline in old age.

References

1. Jonas I, Vaanholt L, Doornbos M, Garland T Jr, Scheurink AJ, Nyakas C, van Dijk G: Effects of selective breeding for increased wheel-running behavior on circadian timing of substrate oxidation and ingestive behavior. PHYSIOLOGY AND BEHAVIOR 99: pp. 549-554 (2010) IF: 3,295
2. Jonas I, Schubert KA, Reijne AC, Scholte J, Garland T Jr, Gerkema MP, Scheurink AJ, Nyakas C, van Dijk G: Behavioral traits are affected by selective breeding for increased wheel-running behavior in mice. BEHAVIORAL GENETICS 40: pp. 542-550 (2010) IF: 3,117
3. Nyakas C, Granic I, Halmy LG, Banerjee P, Luiten PGM: The basal forebrain cholinergic system in ageing and dementia. Rescuing cholinergic neurons from neurotoxic amyloid-β42 with memantine. BEHAVIORAL BRAIN RESEARCH 221: pp. 594-603 (2011) IF: 3,393
4. van Dijk G, Evers S, Guidotti S, Thornton SN, Scheurink AJ, Nyakas C: The lateral hypothalamus: A site for integration of nutrient and fluid balance. BEHAVIORAL BRAIN RESEARCH 221: pp. 481-487 (2011) IF: 3,393
5. van Dijk G, Kacsándi A, Kóbor-Nyakas DE, Hőgyes E, Nyakas C: Perinatal polyunstaurated fatty acids supplementation causes alterations in fuel homeostasis in adult male rats but does not offer resistance against STZ-induced diabetes. HORMONE AND METABOLIC RESEARCH 43: pp. 938-943 (2011) IF: 2,690

2 cm

2 cm

2 cm

Teljes támogatás: 3.000.000,- Ft

A SZÍVINFARCTUS ELŐFORDULÁSÁNAK, ELLÁTÁSÁNAK VIZSGÁLATA EPIDEMIOLÓGIAI MÓDSZEREKKEL (INFARCTUS REGISZTER)

dr. Ofner Péter, prof.dr. Jánosi András
Gottsegen György Országos Kardiológiai Intézet

Előzmény: A kardiovaszkuláris betegségek népegészségügyi jelentősége jól ismert, mivel az összes halálozás fele ilyen okból következik be. Ezen betegcsoporton belül is kiemelkedő jelentőségű a szívinfarktus, amely mind a halálozás, mind a tartós egészségkárosodás leggyakoribb oka. Magyarországon a kardiovaszkuláris betegségekkel kapcsolatban csak finanszírozási adatokkal rendelkezünk, amelyek nem alkalmasak a betegségek epidemiológiai adatainak vizsgálatára, a betegség különböző klinikai formái kórlefolyásának illetve az ellátás minőségi paramétereinek tanulmányozására. Ezen problémák miatt kezdtük el az *Infarctus Regiszter Pilóta Vizsgálat*ot.

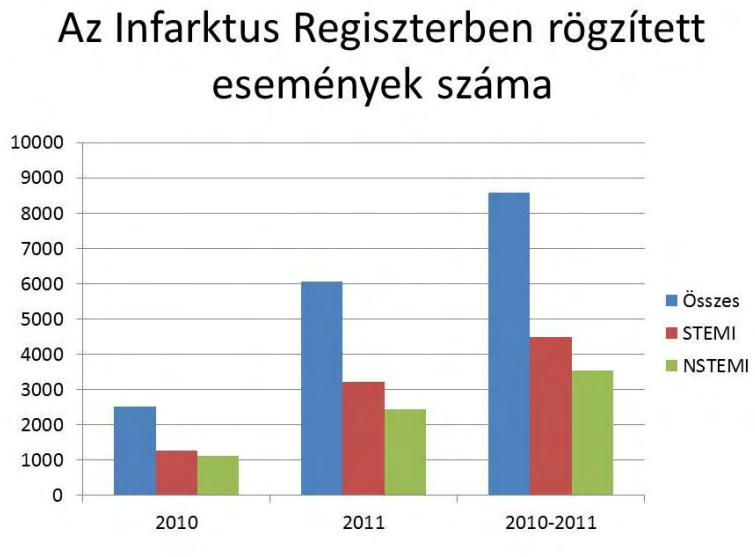
Módszer: Prospektív vizsgálatot indítottunk Budapest öt kerületében (II., III., IX., X., XVII. kerületek) és Szabolcs-Szatmár- Bereg megyében a heveny miokardiális infarktus két klinikai formáinak (*ST-elevációval járó* –STEMI, és *nem ST-elevációval* járó -NSTEMI) miokardiális infarktus ellátásának, kórlefolyásának és késő prognózisának megítélésére. Az egységes adatgyűjtés érdekében standardizált kérdőíveket alakítottunk ki, amelynek tartalma szakmai konszenzus eredménye. A budapesti „pilot" területen vizsgáltuk a prehospitalis eseményeket, míg Szabolcs Szatmár-Bereg megye 4 fekvőbeteg intézetében kórházi regisztereket működtetünk. Az adatgyűjtés az Internet felhasználásával on-line történik. A nyilvántartásba kerülő betegek írásos beleegyezésüket adják a személyes és az egészségügyi adataik együttes kezeléséhez. A betegek késői kórlefolyásának követése céljából utánvizsgálatot végzünk, ennek hiányában levélben kérünk adatokat a betegektől illetve felhasználjuk az Országos Egészségbiztosítás Pénztár adatait. A program részletes leírása a https://ir.kardio.hu weblapon olvasható, mind magyarul, mind angolul.

Eredmények:
A „pilot" vizsgálatot a tervezettnek megfelelően 2011. december 31-én befejeztük. Ennek keretében az alábbi feladatokat végeztük el:

1. Szakmai konszenzus és a működés során szerzett tapasztalatok alapján kialakítottuk az különböző adatlapok (alapvizsgálati lap, utánvizsgálati lap, pehospitalis halálesetet rögzítő adatlap) végleges formáját.
2. Kialakítottuk egy olyan számítógépes szoftvert, amely képes az adatok fogadására, az adatok logikai ellenőrzésére és on-line –különböző szempontok szerinti- statisztikai feldolgozására.
3. A szoftver lehetővé teszi bármely adatcsoport - Excel formátumú- exportálását további feldolgozás céljából.
4. Kialakítottuk és működtetjük a rögzített adatok minőségi ellenőrzését.
5. Megteremtettük a forrásdokumentumok orvosi ellenőrzésének rendszerét.
6. A két éves működés során bizonyítottuk, hogy a fenti rendszer folyamatosan működőképes, alkalmas nagyszámú adat fogadására, és a vizsgálóhelyek száma tetszőlegesen bővíthető.
7. A vizsgálat indulásakor 12 kórház/klinika vett részt a programban, ami a „pilot" vizsgálat befejezésének idejére 32 –re növekedett. A Regiszter munkájában részt vesz valamennyi orvosegyetem, szívkatéteres centrum, és- kettő kivételével- minden megyei kórház.

Az Infarktus Regiszterben 2011. December 31-én 8071 beteg, 8342 eseményének adatait rögzítettük. A regisztrált események számát évenkénti bontásban mutatja be az alábbi ábra

Teljes támogatás: 3.000.000,- Ft



A programot alkalmasnak tartjuk országos bevezetésre.

Jánosi A. Ofner P, Merkely B és mtsai: Infarctus Regiszter-2010. Tapasztalatok-első eredmények. ORVOSI HETILAP 152:PP1278-1283 (2011) IF:0

Budget: 3.000.000,- HUF

EPIDEMIOLOGICAL STUDY ON THE PREVALENCE AND TREATMENT OF MYOCARDIAL INFARCTION (INFARCTION REGISTRY)

Peter Ofner MD, Andras Janosi MD.
Gottsegen György Hungarian Institute of Cardiology

Precedings

The significant contribution of cardiovascular diseases to overall mortality in the population is well known. Amongst them, myocardial infarction is of special importance, because of its role in death and chronic deterioration of health condition of the patients. At present, there is no appropriate database in Hungary that could provide details regarding the incidence, treatment methods, and long-term prognosis of different types of myocardial infarction. Therefore Gottsegen Hungarian Institute of Cardiology decided to launch the *Infarction Registry Program Pilot Study* in Hungary.

Methods: Data regarding the treatment methods, clinical course, and long-term outcome of ST-elevation and non-ST-elevation forms of myocardial infarction were prospectively collected in five districts of Budapest and in Szabolcs-Szatmár-Bereg county. Patients´ informed consent was obtained from each patient. Standardised data sheets were formed according to expert consensus. Data sheets were completed through the internet. Clinical registry was built from the retrieved data in the hospitals of Szabolcs-Szatmár-Bereg county. In the pilot districts of Budapest, prehospital events were also examined. Long-term outcome was followed up, or patients were contacted by mail. When necessary, the database of the National Health Insurance Fund Administration was checked. Detailed description of the program is found at https://ir.kardio.hu/.

Results:

The pilot study was finished by the 31st of December, 2011.

Main achievements:

1. We updated the data sheets (case report form, follow-up form, prehospital mortality form) according to the expert consensus and the experiences gained during the study course.
2. A computer software capable of receiving, checking, and statistically analysing data on-line was programmed.
3. This software also enables the export of data in excel sheet for further processing.
4. Quality control of registered data is guaranteed.
5. Source documents are medically overviewed.
6. We proved that the system is reliable, operates constantly and securely, and able to manage great amount of data simultaneously. The system can be extended optionally by additional examination sites.
7. The pilot study was launched by 12 clinics/hospitals. By the end of the pilot period, the number of examination sites increased to 32, including all medical universities and centres for cardiac catheterization in Hungary and county hospitals except for two.

Based on our results, we believe that Infarction Registry Program is now ready for national extension.

Teljes támogatás: 4.200.000 Ft

Téma nyilvántartási szám: ETT-ESKI 006/2009 Támogatás: 4.200.000 Ft
Szakfeladat száma: ETT 7219221, ELTE/1335/1(T-242)2010

2009-2011. ÉVI SZAKMAI JELENTÉS

Témavezető neve: **Dr Orosz László**
Résztvevők: Dr. Stéger Viktor, Dr. Semsey Szabolcs, Szabolcsi Zoltán, Bakos Katalin ELTE TTK Genetikai Tanszék Budapest
A téma címe: **A csontritkulás genetikai háttere**
A csontritkulás genetikai hátterének feltárása a gímszarvas ciklikus fiziológiás oszteoporózisában szerepet játszó gének expresszió-dinamikájának megismerése útján, valamint az így nyert tudás felhasználása az emberi csontritkulás gyógyászatában a humán ortológ gének elemzése által.

A 2009-2011. évben elvégzett munka és az elért eredmények rövid ismertetése:

A kutatás célja a gímszarvas agancs robosztus fejlődését és az ezzel a vázcsontozatban kapcsolt ciklikus fiziológiás oszteoporózist irányító, s az ásványi anyag forgalomban fontos szerepet játszó gének azonosítása és klónozása volt. Az elmúlt 4 évben közölt kutatásaink rámutattak, hogy a gímszarvas agancs mineralizációja a vázcsontozat (szegycsont, bordák, csigolyák, medence) átmeneti, fiziológiás csontritkulását okozza, amelyet később az állat képes regenerálni, s az elveszett ásványi anyagokat pótolni. A minél teljesebb genetikai háttér megismerését átvezettük és folyamatosan átvezetjük a humán gyógyászati genetikára: oszteoporózis diagnosztikára és gyógyszerfejlesztési célpontok kijelölése felé. Folyamatosan különös figyelmet fordítunk és fordítottunk azokra a génekre, amelyek a fejlődő agancsra jellemző kalcifikálódó előporc és porc szövetében működnek a leghevesebben.

A munka kiterjesztése volt annak a kutatásunknak, amelyet 9 éve kezdtünk el a SOTE 1 sz Belgyógyászati Klinikán Dr Lakatos Péter professzor csoportjával és a Kaposvári Egyetem Gímszarvas tenyésztési ágazatával, személy szerint Dr Horn Péter akadémikussal és Dr Zomborszky Zoltán professzorral, s amelybe 2010-ben bekapcsolódott a Kaposvári Egyetem Diagnosztikai és Onkoradiológiai Intézete is (lásd www.MTA.hu/agancs).

A kutatás eredményeit folyamatosan publikáltuk és publikáljuk a genetika és genomika elsőszámú vezető nemzetközi folyóiratában az MGG-ben (Molecular Genetics and Genomics). A 2007 és 2010 között az MGG-ben, az ETT pályázatok által támogatott, az „agancs/ robusztus csontfejlődés/oszteoporózis" témából megjelent 4 in-extenso publikáció tudományos értékét jelzi, hogy 2011 januárjától az elkövetkező 5 évben az MGG címlapját „ díszíti" a téma. Elismerve, hogy a molekuláris genetikai kutatásokban új területet nyitott meg új megközelítéseket alkalmazott és amely új innovációkat ígér.

Részletesebb összefoglalás:

Általánosan hasznosítható módszertani fejlesztéseink és koreográfiánk segítségével azonosítottuk, klónoztuk a releváns géneket, expresszióikat kvantitative jellemeztük, ill. átvezettük csontritkulásban szenvedő és nem szenvedő betegcsoport jellemzésére.

A metodikai repertoár részei voltak:

(i) saját fejlesztésű heterológ chip technológia az „antler chip" kifejlesztése, amely 3200 cDNS klónra épült, amely cDNS-ek az agancsra specifikusan jellemző mineralizálódó porcszövet expresszóit reprezentálták,

(ii) zoocloning eljárás tovább fejlesztése a releváns gímszarvas gének promoter régióinak klónozása céljából (szarvasmarha genomi és gímszarvas cDNS szekvenciákra alapozott PCR segítségével, amely megoldást lehetővé tette a két faj ortológ génjeinek 95-100% homológiája,

Teljes támogatás: 4.200.000 Ft

(iii) Génexpresszók mérése és összehasonlítása 3 független megközelítéssel: QRT-PCR, Heterolog Affimetrix elemzés (gímszarvas gének vs. Bos taurus 24K cDNS templát), Northern elemzések kvantitatív kiértékelése (STORMTM imaging, Molecular Dinamics és Gene Tools/Syngene program),
(iv) „a gímszarvas javasolta gének" expressziós mintázatának összehasonlítása többváltozós statisztikai elemzésekkel (főkomponens analízis/PCA, diszkriminancia analízis/CVA),
(v.) saját fejlesztésű szekvencia analízisek (EMBOSS programcsomag),
(vi.) GCMS csont metabolit elemzések,
(vii) csont szerkezet anatómiai leírása (agancs, csigolyatest, tövisnyúlvány, borda, lapocka),
(viii) nagy felbontású metabolit analízisek (GCMS) az agancs csont és a váz csontozat egyidejű összehasonlítása céljából.
Megállapítottuk:
1.„Az agancs porc sejtjeiről
(i) A „kanonikus" csont mátrix gének („mineralizációs" gének: ColA1, ColA2, Col3A1, Sparc, Ibsp, MGP) az agancs porc sejtekben 5-10 szeresen hevesebben expresszálódnak, mint a hozzá legközelebb álló porcban (növekedési porc),
(ii) A „kanonikus" porc mátrix gének 2-szeresen hevesebben működnek (Col2A1, Col10A1),
(iii) a Runx2 és OSX mester regulátor gének expressziója 5-szörösre emelkedik.
2., Az agancs csont sejtjeiről
(i) A „kanonikus" csont mátrix gének („mineralizációs" gének: ColA1, ColA2, Col3A1, Sparc, Ibsp, MGP) az agancs csontsejtekben 10-50 szeresen hevesebben expresszálódnak, mint a hozzá legközelebb álló szerkezetű váz csontokban (csigolyatest, borda, lapocka),
(ii) A „kanonikus" porc mátrix gének működése nem detektálható (Col2A1, Col10A1), ami jelzi a megközelítésünk helyességét,
(iii) a Runx2 mester regulátor csont gén expressziója 15-szörösre, az OSX mester regulátoré 50-szeresre emelkedik. A hatalmas energia igényt szabályozó *Oc* gén aktivitása 10-szeresre nő az agancs csontsejtjeiben a vázhoz képest,
(iv) A GCMS mérések jelezték, hogy az agancs fejlődésekor a váz csontozatban bomlik a csont szerves és szervetlen váz anyaga és alacsony a szintézisekhez szükséges energia felhasználás, szemben az agancs csonttal, ahol nincs kollagén bomlás, szabad foszfát és hatalmas a fehérje szintézis igényit biztosító glükóz felhasználás.
3., A gímszarvas javasolta gének expressziós mintázatával tökéletesen megkülönböztethetők az oszteoporótikus és nem oszteoporótikus paciensek.
4., Az agancs fejlődés genetikai útvonalára modellt állítottunk fel: agyi központ (AGC)-háromosztatú ideg érző rostjai- barkás agancs- CGRP morfogén-Runx2 mester regulátor aktiválása-Osx és Oc gének aktiválása- csont mátrix mineralizációs gének 10-50-szeres intenzitás növelése.

A 2009-2011 pályázati ciklushoz közvetlenül az alábbi publikációk kapcsolódnak:

(1) Borsy A, J Podani, V Steger,..Z Szabolcsi,... S Semsey, T Vellai , P Lakatos, L Orosz (2009) Identifying novel genes involved in both deer physiological and human pathological osteoporosis. **Molecular Genetics and Genomics (2009) 281:301-313**
(2) Steger V, ..Z Szabolcsi,.. J Podani, S Semsey, P Lakatos, L Orosz (2010) Antler development and coupled osteoporosis in the skeleton of red deer Cervus elaphus: expression dynamics for regulatory and effector genes**.** **Molecular Genetics and Genomics (2010) 284:273-287**

Budapest, 2012. Január 9

Teljes támogatás: 4.200.000 Ft

Project No.: ETT-ESKI 006/2009
Task ID: ETT 7219221
ELTE/1335/1(T-242)2010

2009-2011. Progress Report

Principal investigator: László Orosz PhD. HUAS
Contributors: Viktor Stéger PhD, Semsey Szabolcs PhD, Zoltán Szabolcsi, Katalin Bakos Eötvös Loránd Science University Dept. of Genetics, Budapest.

On the genetic background of osteoporosis II.
Unearthing the genetic background of the cyclic physiological osteoporosis of red deer Cervus elaphus by studying genome wide gene expression dynamics, and transfering the knowledge gained to human medicine of osteoporosis II.

Red deer stag: Robust bone development in antler vs osteoporosis in skeleton.
Genes involved in the development of the red deer stag's antlers and in the coupled transport of mineral substances are targeted to be identified. Mineralization of red deer's antlers within a short time results temporarly in physiological osteoporosis in the skeleton (sternum, ribs, vertebrae, pelvis) of the animal. Deer stag has the ability to replenish the missing minerals in the skeleton after antler mineralization is completed. Gene expression patterns are to be monitored in the sternum, ribs, vertebrae and pelvis during antler's calcification with the aim to find genes (using DNA chip technique) involved in osteoporosis and its reversal in red deer stag. Understanding the genetic backround of the process could be beneficial in genetics based human therapeutica (diagnostics) and pharmacentical developments.
Antlers of deer display the fastest and most robust bone development in the animal kingdom. Deposition of the minerals in the cartilage preceding ossification is a specific feature of the developing antler. We have cloned 28 genes which are upregulated in the cartilaginous section (called mineralized cartilage) of the developing ("velvet") antler of red deer stags, compared to their levels in the foetal cartilage. Fifteen of these genes were further characterized by their expression pattern along the tissue zones (i.e. antler mesenchyme, precartilage, cartilage, bone), and by in situ hybridization of the gene activities at the cellular level. Expression dynamics of genes col1A1, col1A2, col3A1, ibsp, mgp, sparc, runx2, and osteocalcin were monitored and compared in the ossified part of the velvet antler and in the skeleton (in ribs and vertebrae). Expression levels of these genes in the ossified part of the velvet antler exceeded the skeletal levels 10-30 fold or more. Gene expression and comparative sequence analyses of cDNAs and the cognate 5' cis-regulatory regions in deer, cattle and human suggested that the genes runx2 and osx have a master regulatory role. GC-MS metabolite analyses of glucose, phosphate, ethanolamine-phosphate, and hydroxyproline utilizations confirmed the high activity of mineralization genes in governing the flow of the minerals from the skeleton to the antler bone. Gene expression patterns and quantitative metabolite data for the robust bone development in the antler are discussed in an integrated manner. A model is proposed for the epigenetic pathway for the ossification of the developing antler: Antler Groth Center (Brain) → Nervus trigeminus → velvet antler → CGRP morphogene neuropeptide → Runx2 → Oc and Osx → mineralization matrix genes (antler). We also discuss the potential implication of our findings on the deer genes in human osteoporosis research.

Teljes támogatás: 4.200.000 Ft

Red deer stag: physiological osteoporosis vs Human pathological osteoporosis

Cyclic physiological osteoporosis is a consequence of the annual antler cycle. In the period of intense antler growth, the demand for calcium and phosphate is partially filled by mobilizing minerals from the skeleton. This phenomenon raises the possibility to identify genes involved in the regulation of bone mineral density on the basis of comparative genomics between deer and human.
We compare gene expression activity of osteoporotic and regenerating rib bone samples versus autumn dwell control in red deer by microarray hybridization. Identified genes were tested on human femoral bone tissue from non-osteoporotic controls and patients affected with age-related osteoporosis. Expression data were evaluated by Principal Components Analysis and Canonical Variates Analysis.
Separation of patients into a normal and an affected group based on 10 formerly known osteoporosis reference genes was significantly improved by expanding the data with newly identified genes. These genes include IGSF4, FABP3, FABP4, FKBP2, TIMP2, TMSB4X, TRIB2 and elements of the Wnt signaling. Moreover, our data strengthened the hypothesis that LRP4 is a member of the Wnt signaling pathway; even raised the possibility that osteoporosis might develop in two independent ways, namely, due to a defect in either the BMP/Hedgehog or Wingless signaling.
This study supports that extensive comparative genomic analyses, in our case healthy deer and diseased human, provide a novel approach to identify genetic markers. The highly sensitive biostatistical methods applied here may open an innovative way in gene expression data analysis. Genes identified by the combination of comparative genomics and statistics in this study are potential diagnostical and pharmaceutical targets for osteoporosis prevention and treatment. The exact function of these factors in bone biology needs further clarification.
Borsy A, J Podani, V Steger,..Z Szabolcsi,... S Semsey, T Vellai , P Lakatos, L Orosz (2009) Identifying novel genes involved in both deer physiological and human pathological osteoporosis.

Publications:

(1) Borsy A, J Podani, V Steger,..Z Szabolcsi,... S Semsey, T Vellai , P Lakatos, L Orosz (2009) Identifying novel genes involved in both deer physiological and human pathological osteoporosis. **Molecular Genetics and Genomics (2009) 281:301-313**

(2) Steger V, ..Z Szabolcsi,.. J Podani, S Semsey, P Lakatos, L Orosz (2010) Antler development and coupled osteoporosis in the skeleton of red deer Cervus elaphus: expression dynamics for regulatory and effector genes**.**
Molecular Genetics and Genomics (2010) 284:273-287

Budapest, 2012-01-09

4.200.000 Ft

MIKROVEZIKULÁK A FÖTO-MATERNÁLIS HATÁRVONALON: EGY ÚJ SZABÁLYOZÓ RENDSZER VIZSGÁLATA A TERHESSÉGI IMMUNTOLERANCIA KIALAKÍTÁSÁBAN ÉS FENNTARTÁSÁBAN.

Dr. Pállinger Éva[1], Nyitrayné Dr Pap Erna[2], Dr Falus András[1,2], Dr Kőhidai László[2], Dr Láng Orsolya[2], Dr Kiss Attila András[3]
[1] MTA-SE Gyulladásbiológiai és Immungenomikai Kutatócsoport
[2] SE Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet
[3] MH Honvédkórház

Hipotézis:
A trofoblaszt eredetű mikrovezikulák (MV-k) által közvetített hatások szerepet játszanak a szemiallograft fötusz védelmét szolgáló anyai tolerogén immunválasz kialakulásában.

Előzmények:
Korábbi munkánkban (ETT 140/2006), egészséges terhesek vérében vizsgáltuk a keringő MV mintázatot. Vizsgálatainkkal igazoltuk, hogy 1) terhességben megváltozik a keringő MV mintázat; 2) az anyai plazmában kimutathatók HLA-G+ trofoblaszt eredetű MV-k; 3) az anyai trofoblaszt- és trombocita eredetű MV-k célsejtjei a perifériás T sejtek; 4) a trombocitákból származó MV-k részben a CD62P-PSGL1 interakción keresztül kapcsolódnak a T sejtekhez, ami befolyásolhatja a T sejtek működését; 4) a MV-k befolyásolják az IL-2 indukálta STAT3 foszforilációt a T sejtekben.

Vizsgálati módszerek:
A trofoblaszt – limfocita kölcsönhatások *in vitro* modellezéséhez a BeWo humán koriokarcinóma sejtvonalat használtuk fel. Vizsgálatainkat áramlási citometria, RT-PCR és ECIS módszerekkel végeztük.

Kísérleti eredmények:

1. Többszínű FACS módszerrel jellemeztük a BeWo sejtvonal és a BeWo eredetű MV-k (MV(BeWo)) immunfenotípusát, ill. polisztirén referencia mikrogyöngyök felhasználásával meghatároztuk a sejtvonal felülúszójából izolált MV(BeWo) méret tartományát. A HLA-G, a PSR, a CD54 és a FasL expresszió detektálásával igazoltuk, hogy a BeWo sejtvonal alkalmas a trofoblasztok indukálta immunológiai változások modellezésére.
2. A trofoblaszt - limfocita interakciók vizsgálatával kimutattuk, hogy a BeWo eredetű MV-k kizárólag a T limfocitákhoz kötődnek, de a B és az NK sejtekhez nem. Igazoltuk, hogy az MV - T sejt interakció szubpopuláció függő: a MV-k nagyobb mértékben kötődnek CD3+/CD4+ Th sejtekhez, mint a CD3+/CD8+ Tc limfocitákhoz.
3. Monoklonális antitestekkel történő gátlással igazoltuk, hogy a limfocita – MV(BeWo) kapcsolódás részben az foszfatidilszerin (PS) – PSR, részben a Fas – FasL interakción keresztül valósul meg.
4. Az anyai célsejtek MV(BeWo) kötődés indukálta funkcionális változásainak jellemzésére megvizsgáltuk nyugvó és in vitro stimulált humán lymphocyták sejtciklusát. Kimutattuk, hogy az MV(BeWo)-k gátolják a ConA-val stimulált aktiválódott limfociták proliferációját.
5. Bizonyítottuk, hogy a trofoblaszt – limfocita kölcsönhatás, mind a direkt sejt-sejt interakció, mind az MV közvetített, IL-6 és IL-10 termelést indukál. Többszínű áramlási citometriás módszerrel igazoltuk, hogy az izolált BeWo eredetű MV-k, direkt sejt-sejt interakció nélkül is IL-10 termelést indukálnak a CD4+ limfocitákban.
6. Igazoltuk, hogy sem a trofoblaszt – limfocita direkt sejt-sejt interakció, sem az izolált MV(BeWo) kezelés nem befolyásolja a limfociták IFNγ, IL-4 és IL-17 termelését.
7. Az IL-6Rα expresszió detektálásával megvizsgáltuk a limfociták IL-6 iránti érzékenységét. Kimutattuk, hogy a trofoblaszt eredetű MV-k hatására a CD4+ T limfociták IL-6Rα expressziója csökken, azaz csökken a CD4+ T sejtek IL-6 iránti érzékenysége.

4.200.000 Ft

Összefoglalás:

A sikeres terhesség feltétele az anya és a magzat között zajló immunológiai párbeszéd, amely direkt sejt-sejt interakciókon, szolubilis molekulákon és mikrovezikulákon keresztül valósul meg. A trofoblaszt sejtek lokális és a szisztémás immunválaszt moduláló hatásai napjainkban már jól ismertek, ugyanakkor számos nyitott kérdés van még a trofoblasztok által kibocsátott MV-k szerepére vonatkozóan.

Kísérleteinkkel igazoltuk, hogy a trofoblaszt – limfocita kölcsönhatás indukálta citokin miliő kialakulásában és fenntartásában a trofoblaszt eredetű MV-k is szerepet játszanak. Elsőként igazoltuk, hogy a lokális IL-6 felszaporodás terhességre kedvezőtlen hatását a trofoblaszt eredetű MV-k hatására, a CD4+ T sejteken detektálható IL6Rα expresszió csökkenés ellensúlyozza. Bebizonyítottuk, hogy az IL-6Rα expresszió csökkenése a lokális CD4+ T sejtek Treg irányú differenciálódásának kedvez, amit a CD4+ T sejtek IL-10 termelésének detektálásával is alátámasztottunk.

Következtetések:

Vizsgálatainkkal elsőként bizonyítottuk, hogy a trofoblaszt eredetű MV-k a CD4+ T sejtek IL-6 iránti érzékenységnek (IL-6Rα expresszió) a szabályozása révén vesznek részt a szemiallograft fötusz védelmét szolgáló lokális anyai immuntolerancia kialakításában és fenntartásában. Tekintettel arra, hogy a trofoblaszt eredetű (HLA-G+) MV-k jelenléte a terhesség során folyamatosan kimutatható a keringésben, eredményeink arra is utalnak, hogy számolni kell a szisztémás immunválaszt szabályozó hatásaikkal is.

Közlemények:

1. Pap E, Pállinger E, Pásztói M, Falus A. Highlights of a new type of intercellular communication: microvesicle-based information transfer. INFLAMM. RES. 58(1):1-8.(2009) IF: 1,504
2. Pap E, Pállinger E, Falus A. The role of membrane vesicles in tumorigenesis. CRIT REV ONCOL HEMATOL. 79(3):213-23. (2011) IF: 5,269
3. György B, Módos K, Pállinger E, Pálóczi K, Pásztói M, Misják P, Deli MA, Sipos A, Szalai A, Voszka I, Polgár A, Tóth K, Csete M, Nagy G, Gay S, Falus A, Kittel A, Buzás EI. Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes due to shared biophysical parameters. BLOOD 117(4): 39-48. (2011) IF: 10,555
4. Pap E, Pallinger E, Falus A The immunogenic role of microvesicles in asthmatic and healthy pregnants. INFLAMM RES. 59:S344-S344 (2010) IF: 1,504
5. György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, László V, Pállinger E, Pap E, Kittel A, Nagy G, Falus A, Buzás EI. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. CELL MOL LIFE SCI. 68(16):2667-88. (2011) IF: 7,047
6. Kiss A A, Pap E, Falus A, Török M, Pállinger É. Regulatórikus T sejtek a terhességi immuntolerancia fenntartásában. Magyar Nőorvosok Lapja 72(6):283-288 (2009) IF: nincs
7. Hogyan beszélgetnek a sejtek?, avagy a mikrovezikulák mint a sejtek közötti kommunikáció újonnan felismert szereplői. Pap E., Pállinger É, Falus A. Magyar Tudomány 2009 december IF: nincs
8. Kiss A A, Falus A, Pap E, Török M, Pállinger É. Citokinek a terhességben: a Janus-arcú IL-6. Magyar Nőorvosok Lapja 74(3):5-12 (2011) IF: nincs

IF: 25,879

4.200.000 Ft

MICROVESICLES ON THE FETO-MATERNAL INTERFACE: STUDIES ON A NEW REGULATORY SYSTEM, ESTABLISHING IMMUNTOLERANCE AND THE MAINTENANCE OF PREGNANCY

Dr. Pállinger Éva[1], Nyitrayné Dr Pap Erna[2], Dr Falus András[1,2], Dr Kőhidai László[2], Dr Láng Orsolya[2], Dr Kiss Attila András[3]

[1] Research Group for Inflammation Biology and Immunogenomics of the Hungarian Academy of Sciences and Semmelweis University

[2] Department of Genetics, Cell- and Immunobiology, Semmelweis University

[3] Department of Gynecology and Obstetrics of Military Hospital of Hungarian Army

Hypothesis:

Trophoblast derived microvesicles (MVs) have a role in the induction and the maintenance of maternal immunotolerance.

Previous results:

In our earlier works (ETT 140/2006) we investigated the circulating MV pattern of pregnants. We proved that 1) circulating MV pattern changed during pregnancy; 2) HLA-G+, trophoblast derived MVs could be detected in the pregnant samples; 3) platelet- and trophoblast - derived MVs bound to circulating T lymphocytes; 4) thrombocyte - derived MV – T cell interaction occurs (partially) through CD62P-PSGL-1 interaction; 4) MV binding modulates the IL-2 induced STAT3 phosphorylation in T cells.

Methods:

The BeWo human choriocarcinoma cell line was chosen as an *in vitro* model system. We used flow cytometry, RT-PCR and ECIS in our experimental systems.

Results:

1. Immunophenotype of BeWo cells and BeWo-derived MVs (MV(BeWo)) were characterized by multicolor flow cytometry. The size distribution of MV(BeWo) was also determined by FACS, by using polystyrene reference beads. The competence of BeWo cell line for in vitro experiments of trophoblast induced immunological changes was certified by the detection of cell-surface expression of HLA-G, PSR, CD54 and FasL.
2. We found that BeWo-derived MVs bound to CD3+ T cells, but not to B cells or NK cells. Discrepancies could be detected when comparing the interactions between BeWo derived MVs and different T cell subpopulations. The binding ability of BeWo derived MVs to CD4+ T cell was higher as compared to CD8+ T cell subset.
3. The binding of MV(BeWo) could be partially inhibited by covering the cells or MVs with anti-PSR, anti-Annexin V, anti-Fas or anti-FasL monoclonal antibodies. Therefore we concluded that PSR and Fas may be the target binding sites of MVs derived from trophoblasts and this coupling could be important in the MV mediated regulation of T cells.
4. The changes in lymphocyte proliferation, induced by MV (BeWo) – lymphocyte interaction was investigated by propidium iodide incorporation. We certified, that MV(BeWo) treatment inhibits the proliferating activity of ConA stimulated lymphocytes.
5. We could detect that both direct BeWo cell - lymphocyte interaction and MV(BeWo) – T cell binding induce IL-6 and IL-10 production. We proved by intracellular cytokine staining, that isolated MV(BeWo) induced IL-10 production in CD4+ T cells.
6. We certified that neither direct BeWo cell - lymphocyte interaction nor MV(BeWo) – T cell binding alter IFNγ, IL-4 and IL-17 secretion of the lymphocytes.
7. IL-6 sensitivity of lymphocytes was characterized by the investigation of IL6Rα expression of lymphocytes. Decreased IL6Ra expression could be detected after the induction of BeWo – derived MVs. So we could prove that the IL-6 sensitivity of CD4+ T cells decrease after MV(BeWo) – T cell interaction.

4.200.000 Ft

Summary:
Successful pregnancy is based on the perpetual immunological communication between the fetus and the mother. Fetal cells (direct cell-cell interactions), microvesicles and soluble regulators induce the local and systemic immunotolerance during pregnancy. Although the regulatory role of trophoblasts has been well-known, there remain many open questions in the field of trophoblast-derived microvesicles.
We could certify that trophoblast-derived MVs have a role in the induction and maintenance of local cytokine milieu induced by trophoblast cell – maternal immune cell interactions.
We determined for the first time, that trophoblast derived MVs modify the IL-6 sensitivity of CD4+ lymphocytes by the down-regulation of their IL-6Rα expression, which means that the oppository effects of IL-6 can be counterbalanced by trophoblast-derived MVs.
Conclusion:
Considering that trophoblast derived MVs target maternal T cells, we propose that the negative influence of IL-6 on regulatory T cell differentiation is compensated by trophoblast derived MVs, via the down-regulation of IL-6Ra expression of CD4+ T lymphocytes. Therefore trophoblast derived MVs contribute to the establishment and maintenance of local maternal immunotolerance, which is a prerequisite for healthy pregnancy. In regard to the presence of trophoblast-derived (HLA-G+) MVs that can be detected permanently in the plasma of pregnants, our results suggest the regulatory role of trophoblast-derived MVs in the systemic immune response of the mother.

Publications:

1. Pap E, Pállinger E, Pásztói M, Falus A. Highlights of a new type of intercellular communication: microvesicle-based information transfer. INFLAMM. RES. 58(1):1-8.(2009) IF: 1,504
2. Pap E, Pállinger E, Falus A. The role of membrane vesicles in tumorigenesis. CRIT REV ONCOL HEMATOL. 79(3):213-23. (2011) IF: 5,269
3. György B, Módos K, Pállinger E, Pálóczi K, Pásztói M, Misják P, Deli MA, Sipos A, Szalai A, Voszka I, Polgár A, Tóth K, Csete M, Nagy G, Gay S, Falus A, Kittel A, Buzás EI. Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes due to shared biophysical parameters. BLOOD 117(4): 39-48. (2011) IF: 10,555
4. Pap E, Pallinger E, Falus A The immunogenic role of microvesicles in asthmatic and healthy pregnants. INFLAMM RES. 59:S344-S344 (2010) IF: 1,504
5. György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, László V, Pállinger E, Pap E, Kittel A, Nagy G, Falus A, Buzás EI. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. CELL MOL LIFE SCI. 68(16):2667-88. (2011) IF: 7,047
6. Kiss A A, Pap E, Falus A, Török M, Pállinger É. Regulatórikus T sejtek a terhességi immuntolerancia fenntartásában. Magyar Nőorvosok Lapja 72(6):283-288 (2009) IF: nincs
7. Hogyan beszélgetnek a sejtek?, avagy a mikrovezikulák mint a sejtek közötti kommunikáció újonnan felismert szereplői. Pap E., Pállinger É, Falus A. Magyar Tudomány 2009 december IF: nincs
8. Kiss A A, Falus A, Pap E, Török M, Pállinger É. Citokinek a terhességben: a Janus-arcú IL-6. Magyar Nőorvosok Lapja 74(3):5-12 (2011) IF: nincs

IF: 25,879

Teljes támogatás: 3.000.000,- Ft

IONCSATORNÁK SZEREPÉNEK VIZSGÁLATA DIFFERENCIÁLÓDÓ PORCSEJTEKEN

Panyi György[1], Varga Zotán[1], Bartók Ádám[1], Csernoch László[2], Zákány Róza[3]

[1]DEOEC Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet, [2]DEOEC Élettani Intézet, [3]DEOEC Anatómiai Szövet- és Fejlődéstani Intézet

A porcsejtek nem ingerelhető sejtek, melyek plazmamembrán ioncsatornáiról kevés információ áll rendelkezésre. Kutatásunk célja ezen ioncsatornák azonosítása illetve az ioncsatornák differenciációban játszott szerepének megértése volt.

In vitro kísérleti modellként négy napos csirkeembrió végtagtelepeiből izolált nagy sűrűségű mezenchimális sejtkultúra kondroprogenitor sejtjeit alkalmaztuk. A kísérletek során mRNS- és fehérjeexpressziós vizsgálatokkal, illetve teljes sejt konfigurációjú patch-clamp mérésekkel különböző nátrium- illetve káliumcsatornákat azonosítottunk, melyek megjelenése, és kifejeződési mintázata az izolációt követően eltelt időtől függött.

A sejteken mért, befelé folyó feszültség-aktivált nátriumáramok elektrofiziológiai és farmakológiai vizsgálatának eredménye $Na_V1.4$, vagy $Na_V1.3$ csatorna jelenlétére utalt a sejtmembránban. Az mRNS vizsgálatok igazolták az $Na_V1.4$ kifejeződését a sejtekben, mely az izolálás napjától eltelt második, illetve harmadik napon a kezdeti érték négyszeresére emelkedett. Az mRNS vizsgálatok eredménye egybeesik az elektofiziológiai vizsgálatok során tapasztaltakkal.

A kifelé folyó kálium áram nagy eltéréseket mutatott az egyes sejteken mind amplitúdóban, inaktivációs kinetikában, illetve tetraetilammóniummal (TEA) szemben mutatott érzékenységben. Ezek alapján úgy véltük, hogy a plazmamembránon átfolyó káliumáramot több feszültségfüggő és feszültségfüggetlen csatorna együttes jelenléte határozza meg. Feltételezéseink szerint ezek a csatornák a feszültség függő $K_V1.1$, $K_V4.1$ és feszültség független kétpórusú csatornák. A mért káliumáramokat MS Excel programmal modelleztük, alapul véve a lehetséges csatornák inaktivációs kinetikáját és TEA-érzékenységét, hogy meghatározzuk az áramot alkotó különböző csatornák arányát az egyes sejteken.

A porcszövet differenciálódása során nyomon követtük a feszültség függő $K_V1.1$ és $K_V4.1$ csatornák mRNS expresszióját. A $K_V4.1$ csatorna expressziója az izolálást követő 2. és 3. napon érte el a csúcsértéket, míg a $K_V1.1$ csatorna expressziója közel állandó értéket mutatott. A teljes sejtlizátumon végzett Western blot kísérletek eredménye hasonló mintázatott mutatott a fehérjeexpresszió szint változásában, míg a csupán sejtmembránt tartalmazó frakció vizsgálata a $K_V1.1$ csatorna expresszió erősödését mutatta a 2. és 3. napokon, illetve a $K_V4.1$ esetében az expresszió alacsonyabb, állandó értéket mutatott.

A K_V csatornák differenciációban játszott szerepét bizonyítja, hogy 20 mM TEA alkalmazása a tenyésztő oldatban lecsökkentette a mátrixképződést és a porcra jellemző molekulák kifejeződését.

Az NMDA receptorok NR1, NR2A, NR2B, NR3A és NR3B alegységei kimutathatóak voltak a sejtekben a differenciáció során mRNS és fehérje szinten egyaránt. A receptor antagonista gátlószereinek alkalmazása megváltoztatta a differenciáció folyamatát, illetve az NR1 alegység génjének átmeneti csendesítése késleltette a differenciációt. Elektrofiziológiai mérések szintén bizonyították funkcionális NMDA receptorok jelenlétét a sejteken.

A mechanikai hatás differenciációra gyakorolt hatásának vizsgálata jelenleg zajlik.

Az itt bemutatott eredmények közelebb visznek minket a porcsejtek differenciálódásának megértéséhez, és hangsúlyozzák a különböző ioncsatornák működésének fontosságát a folyamat lezajlásában. Ezen csatornák azonosításával a porcképződés elősegítését célzó eljárások hatékonysága javítható lehet.

Varga Z, Juhász T, Matta C, Fodor J, Katona É, Bartok A, Oláh T, Sebe A, Csernoch L, **Panyi** G, Zákány R: Switch of voltage-gated K+ channel expression in the plasma membrane of chondrogenic cells affects cytosolic Ca2+-oscillations and cartilage formation.
PLoS One. 6:e27957. (2011) IF: 4.411

Budget: 3.000.000.- HUF

INVESTIGATION OF THE ROLE OF ION CHANNELS IN DIFFERENTIATING CHONDROCYTES

Gyorgy Panyi[1], Zoltan Varga[1], Adam Bartok[1], Laszlo Csernoch[2], Roza Zakany[3]
[1]Department of Biophysics and Cell Biology, University of Debrecen MHSC, [2] Department of Physiology, University of Debrecen MHSC, [3]Department of Anatomy, Histology and Embryology, University of Debrecen MHSC

Chondrocytes are non-excitable cells and little is known about their plasma membrane ion channels. The aim of our project was to identify ion channels and establish their roles in differentiating chondrocytes.

Our *in vitro* chondrogenesis model system is a high density mesenchymal cell culture, in which chondroprogenitor cells are isolated from limb buds of 4-day-old chicken embryos. Measuring mRNA and protein expression levels and using whole-cell patch-clamp we identified different sodium and potassium channels in these differentiating cells with changes in expression pattern depended on the time elapsed since isolation.

The electrophysiological and pharmacological characterization of voltage gated inward Na^+ currents suggested the presence of $Na_V1.4$ or $Na_V1.3$ channels. mRNA analysis proved the expression of $Na_V1.4$ showing a peak-like pattern with a four-fold elevation on days 2 and 3 compared to day 0. This data correlates with the results of the electrophysiological measurements.

Outward K^+ currents showed high heterogeneity in amplitude, inactivation kinetics and tetraethylammonium (TEA) sensitivity suggesting the presence of different voltage dependent and independent K^+ channels in the plasma membrane. We presumed the presence of voltage gated $K_V1.1$, $K_V4.1$ and voltage independent 2-pore channels playing role in K^+ conductance. Measured K^+ currents and their TEA sensitivity were modeled by MS Excel, considering the inactivation kinetics and TEA sensitivity of the possible K^+ channels respectively to estimate the ratio of three different channel types contributing to the outward current.

We detected the mRNA and protein expression of voltage gated potassium channels Kv1.1 and Kv4.1 during cartilage differentiation. The mRNA expression of $K_V4.1$ followed a peak-like pattern with a considerable elevation on days 2 and 3 compared to day 0, while the mRNA expression level of $K_V1.1$ was found to be relatively constant during differentiation. The protein expression of the Kv channels followed very similar pattern when Western blot analyses were performed on total cell lysates. However, in the plasma membrane fraction $K_V1.1$ exhibited a strong expression on culturing days 1 and 2, while $K_V4.1$ was characterized by a constant lower level expression.

The role of K_V channels in chondrogenesis was further studied by the administration of a general blocker of K_V channels TEA to the culture medium. TEA treatments (20 mM) attenuated matrix production, as well as the expression of cartilage-specific marker molecules.

Protein and mRNA expressions of NMDA receptor subunits NR1, NR2A, NR2B, NR3A and NR3B were detected on various days of culturing. Pharmacological inhibition of the receptors with antagonists altered the differentiation process of the cells. Transient gene silencing of NR1 subunit caused delay in the differentiation process. Electrophysiological measurements also proved the functional presence of NMDA receptors in the cells.

Experiments on the effect of mechanical stress on the differentiation process are in progress.

Results presented above may lead to the better understanding of the differentiation process of chondrocytes and point at the importance of the function of various ion channels in the plasma membrane during chondrogenesis. The identification of these channels may give better methods for the stimulation of chondrogenesis

Varga Z, Juhász T, Matta C, Fodor J, Katona É, Bartok A, Oláh T, Sebe A, Csernoch L, **Panyi** G, Zákány R: Switch of voltage-gated K+ channel expression in the plasma membrane of chondrogenic cells affects cytosolic Ca2+-oscillations and cartilage formation.
PLoS One. 6:e27957. (2011) IF: 4.411

Teljes támogatás: 6 000 000 Ft

A PROINFLAMMATORIKUS HDL KVANTITATÍV ÉS KVALITATÍV VÁLTOZÁSAINAK VIZSGÁLATA HUMÁN KRÓNIKUS GYULLADÁSSAL JÁRÓ KÓRKÉPEKBEN, KÜLÖNÖS TEKINTETTEL AZ ANTIOXIDÁNS TULAJDONSÁGOK VÁLTOZÁSÁRA.

Paragh György[1], Seres Ildikó[1], Remenyik Éva[2], Harangi Mariann[1], Balogh Zoltán[1], Sztanek Ferenc[1]
DE OEC, [1]I. Belklinika, [2]Bőrklinika

Az érelmeszesedéshez vezető eltérések közül a dyslipidémia régóta ismert. A lipoproteinek közül egyedül a HDL véd az atherosclerosissal szemben. Az utóbbi években nyilvánvalóvá vált, hogy a HDL szintjének kvantitatív meghatározása nem alkalmas a HDL antiatherogén hatásának becslésére. Akut és krónikus gyulladásos kórállapotokban a HDL összetétele és funkciója drasztikusan megváltozik, az antiatherogén HDL pro-atherogénné alakulhat. Ez a diszfunkcionális HDL fontos szerepet játszik a fokozott érelmeszesedési hajlam kialakulásában.

A HDL részecske antiatherogén hatásáért elsősorban antioxidáns enzimeinek működése felelős. Ezek az enzimek képesek megakadályozni az LDL oxidációját, mely az érelmeszesedés kialakulásának központi tényezője. Közülük is kitüntetett a humán paraoxonáz-1 (PON1) enzim szerepe, mivel ennek van a legjelentősebb antioxidáns potenciálja. Számos, részben saját kutatás is igazolta, hogy a PON1 aktivitás csökkenése megnövekedett kardiovaszkuláris rizikóval jár.

A szisztémás autoimmun betegségekben észlelt magas kardiovaszkuláris morbiditás és mortalitás nem magyarázható kizárólag a fokozott érelmeszesedéshez vezető tradicionális rizikófaktorokkal. A krónikusan fennálló alacsony fokú gyulladás ezekben a kórképekben az érelmeszesedés kialakulását gyorsíthatja. A Sjögren szindróma (SS) kardiovaszkuláris szövődményeivel kapcsolatban azonban kevés adat áll rendelkezésre, de a krónikus gyulladás tartós fennállása valószínűsíti a fokozott kardiovaszkuláris kockázatot. A pályázat keretén belül megvizsgáltuk 57 SS beteg PON1 státuszát és korban, nemben illesztett egészséges 17 kontroll egyénhez hasonlítva megállapítottuk, hogy a betegcsoport PON1 aktivitása szignifikánsan alacsonyabb a kontrollcsoporthoz képest, ami arra utal, hogy a diszfunkcionális HDL arány magasabb SS esetén. Ez a felismerés különösen azért lényeges, mert a HDL szintek nem különböztek szignifikánsan a kontroll csoporthoz képest, így SS esetében sem jellemzi a HDL szintje annak antiatherogén hatékonyságát. Az az eredmény, hogy a PON1 enzim koncentrációját jellemző arylészteráz aktivitás a SS betegekben nem különbözött a kontrolhoz képest arra utal, hogy a PON1 aktivitáscsökkenésének hátterében nem az enzim csökkent termelődése áll, hanem egyéb, az SS-re jellemző tényezők is fontos szerepet játszanak. A SS betegek esetében szignifikánsan nagyobb arányban észleltünk emelkedett (>2,1 mg/l) C-reaktív protein (CRP) szintet a kontroll csoporthoz képest, ami jellemzi a SS-hoz társuló szisztémás gyulladás krónikus jelenlétét. A betegek öt éves követéses vizsgálata során a cerebro- és kardiovaszkuláris események előfordulását is vizsgáltuk. Eredményeink alapján a követési periódus során kialakult vaszkuláris komplikációkkal rendelkező és nem rendelkező betegek összevetésekor a PON1 aktivitásban nem találtunk szignifikáns különbséget, valószínűleg a követési periódus viszonylag rövid volta miatt, hiszen az érelmeszesedés kialakulása évtizedekig tartó folyamat. Eredményeinket 2010-ben közöltük (Int Immunol. 2010;22(7):605-9., IF: 3,301).

Munkacsoportunk másfél évtizede vizsgálja krónikus veseelégtelenségben szenvedő, hemodialízált és veseátültetett betegekben az oxidatív és antioxidatív tényezők oki szerepét ezen betegek fokozott érelmeszesedési kockázatában. Korább vizsgálataink során, melyek egy része szintén ETT támogatással készült (ETT 503/2003), azt találtuk, hogy ezeknél a betegeknél, hasonlóan a krónikus autoimmun kórképekhez, szintén jelen van a krónikus alacsony fokú gyulladás, és a PON1 aktivitásuk, mely a HDL antiatherogén funkcióját jellemzi, csökkent. A PON1 enzim fiziológiás szubsztrátja sokáig nem volt ismert. Néhány éve azonban felmerült, hogy az enzim fiziológiás szerepe a fehérjék védelme a homociszteinilációtól (ún. laktonáz aktivitás). Vesebetegekben a homocisztein szintje emelkedett, és a hiperhomociszteinémia az egyik fontos kockázati tényező a szív- és érrendszeri betegségek szempontjából, mivel a homociszteiniláció a fehérjék fiziológiás szerepének elvesztésével jár. Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a PON1

enzim laktonáz aktivitása kardiovaszkuláris megbetegedésben csökkent. A világon elsőként vizsgáltuk hemodializált (HD) és vesetranszplantált (TRX) betegekben a szérum laktonáz aktivitást, és ennek összefüggését gyulladásos markerek és egyéb kardiovaszkuláris kockázati tényezők szintjével. Ezek közül kiemelt jelentőségű az aszimmetrikus dimetilarginin (ADMA), mely a nitrogén-monoxid szintetáz enzim kompetitív inhibitoraként hozzájárul az NO szintjének kóros csökkenéséhez, mely endothel diszfunkciót, csökkent vazodilatációt, emelkedett vérnyomást és fokozott kardiovaszkuláris kockázatot eredményez. Krónikus veseelégtelenségben a magas homocisztein szint gátolja a dimetilarginin dimetilaminohidroláz (DDAH) aktivitását, mely az ADMA bontásáért felel. Korábbi vizsgálatok alapján az emelkedett ADMA szint hozzájárul a fokozott érelmeszesedéshez krónikus veseelégtelenségben, míg a vesetranszplantáció az ADMA szint csökkentésén keresztül mérsékli az érelmeszesedés kockázatát. Vizsgálatunkba 108 HD, 78 TRX beteg és 63 egészséges kontroll személyt vontunk be. A krónikus gyulladásos folyamat markereként meghatározott hsCRP szintje szignifikánsan magasabbnak bizonyult mind a HD, mind a TRX betegcsoportban az egészséges kontrollokhoz viszonyítva. A HD betegek hsCRP szintje szignifikánsan magasabbnak bizonyult a TRX betegekhez képest. Mindez arra utal, hogy a veseelégteleségben észlelt krónikus gyulladás mértékét a veseátültetés valamelyest képes ellensúlyozni. Az érelmeszesedés szempontjából védő hatású HDL-C szintje szignifikánsan alacsonyabb volt a HD betegekben mind a kontroll csoporthoz, mind a TRX betegcsoporthoz viszonyítva, míg a vesetranszplantáltak HDL-C szintje nem tért el szignifikánsan a kontroll csoport értékeitől. Mindebből azt a következtetést lehetne levonni, hogy a vesetranszplantáció helyreállítja a HDL-C szintet, ezzel a HDL funkciót is. A HDL antiatherogén funkcióját jellemző PON1 laktonáz aktivitása szignifikánsan alacsonyabb volt mind a HD, mind a TRX betegcsoportban a kontrollhoz képest. Érdekes módon, a transzplantált csoportban a laktonáz aktivitás magasabb volt a HD csoporthoz viszonyítva, a különbség nem bizonyult szignifikánsnak. Mindez arra utal, hogy a HDL-C szintjének normalizálódása ellenére a HDL védő funkciója továbbra is károsodott a veseátültetést követően, vagyis szív- és érrendszeri kockázatuk továbbra is fokozott, melyet figyelembe kell venni a vesetranszplantáltak gondozása és kezelése során. A laktonáz és a hsCRP szintje között szignifikáns negatív korrelációt találtunk a teljes vizsgálati populációban. Mindhárom populációban negatív korreláció igazolódott a laktonáz aktivitás és az ADMA szint között. Mindezek alapján krónikus veseelégtelenségben a laktonáz aktivitás új kardiovaszkuláris biomarkernek tekinthető.

A dysfunkcionális HDL meghatározására új módszert dolgoztunk ki, amely az LDL oxidatív rezisztenciájának gátlásán alapszik. Ehhez egészséges kontroll egyénektől vett vérből poolozott LDL-t izoláltunk gradiens ultracentrifugálással. A dysfunkcionális HDL meghatározását az LDL oxidatív rezisztenciáját jellemző lag-time mérésére vezettük vissza. Az LDL-hez adott, betegből izolált HDL - antioxidáns potenciáljával arányosan - a lag-time-ot lerövidíti (proinflammatorikus HDL) vagy megnyújtja (antiatherogén HDL). A metodika közlése folyamatban van.

Rheumatoid arthritises (RA) betegekben vizsgáltuk a biológiai terápia hatását a HDL funkcióira. A golimumab egy anti-TNFα monoklonális antitest, amely nagy affinitású és specificitású és effektíven semlegesíti a TNFα bioaktív hatásait. 13 RA betegben követtük a szubkután havonta adott golimumab kezelés hatását 9 hónapig. A golimumab kezelés az LDL oxidatív rezisztenciáját megnyújtotta, vagyis a korábban dysfunkcionális HDL funkcióját kedvezően befolyásolta. Korábbi vizsgálatainknak megfelelően az RA betegek PON1 aktivitása szignifikánsan alacsonyabb az egészséges kontrollénál. Pozitív korrelációt találtunk a PON1 aktivitása és a lag time között. A betegek követése még folyamatban van, a gyulladásra jellemző biomarkerek elemzése és az eredmények publikálása a közeljövőben várható.

A munkatervben szereplő, krónikus gyulladásos bélbetegségben szenvedő betegek bevonása megtörtént, mintáik mérése folyamatban van.

Eredményeinkről számos hazai és nemzetközi kongresszuson beszámoltunk.

In extenso publikációk:

Int Immunol. 2010;22(7):605-9., IF: 3.301

Nephrol. Dial. Transplant. (2012) DOI: 10.1093/ndt/gfr753 IF: 3.564

Kidney and Blood Pressure Research (2012) DOI: 10.1159/000334650 IF: 1.500

Teljes támogatás: 6 000 000 Ft

INVESTIGATION OF THE QUANTITATIVE AND QUALITATIVE CHANGES OF PROINFLAMMATORY HDL IN HUMAN CHRONIC INFLAMMATORY DISEASES, PARTICULARLY THE CHANGES IN ANTIATHEROGENIC FUNCTIONS.

György Paragh[1], Ildikó Seres[1], Éva Remenyik[2], Mariann Harangi[1], Zoltán Balogh[1], Ferenc Sztanek[1]
University of Debrecen Medical and Health Science Center
[1]1st Department of Internal Medicine
[2]Department of Dermatology

Dyslipidemia has long been recognized as a risk factor of atherosclerosis. Amongst the lipoproteins, high-density lipoprotein (HDL) is the only one with a protective role against atherosclerosis. Recent studies have demonstrated that quantitative measurement of HDL is not suitable for estimating its anti-atherogenic effect. Composition and function of HDL could significantly be altered in acute and chronic inflammations, and the anti-atherogenic HDL might be transformed to a pro-atherogenic particle. This dysfunctional HDL plays a pivotal role in the development of atherosclerosis.

The protective role of HDL is mainly based upon the functioning of its antioxidant enzymes that can inhibit LDL oxidation which is the key step in the progression of atherosclerosis. Having the most powerful antioxidant capacity, human paraoxonase-1 (PON1) is the major part of the defensive system. We and others have previously demonstrated that decreased PON1 activity led to increased cardiovascular (CV) risk.

Also, increased CV risk observed in systemic autoimmune diseases cannot be solely explained with traditional risk factors. Chronic inflammation may also lead to the development of atherosclerosis in these diseases. Data are scant regarding CV complications in Sjögren's syndrome (SS); however, a chronic inflammatory state implicates increased CV risk in these patients. With the support of this grant, we evaluated PON1 status of 57 patients with SS and compared their data to 17 healthy controls matched in age and gender. SS patients showed a significantly reduced PON1 activity demonstrating an increased ratio of dysfunctional HDL in this disease. Since HDL levels were not significantly different between the two groups, this finding is of major importance highlighting the fact that HDL level measured quantitatively does not correlate with its anti-atherogenic effect. It should also be noted that PON1 arylesterase activity, the indicator of enzyme concentration, was not significantly different in patients compared to controls. This result underlies other the role of other factors specific to SS, since decreased PON1 activity cannot be explained by reduced protein synthesis in these patients. The presence of chronic inflammation in SS was characterized by elevated (>2.1 mg/L) C-reactive protein (CRP) levels in these patients. We also followed the incidence of cerebrovascular and cardiovascular events in the patients for 5 years. PON1 activity was not found to be significantly different in patients with vascular complications when compared to those who have developed such events. Since the development of atherosclerosis takes decades, this result might be explained by the limited investigation time. We published our results in 2010 (*Int Immunol* 2010; 22(7):605-9. IF: 3.301).

We have also been investigating the role of pro- and anti-oxidant factors in accelerated atherosclerosis of hemodialysed or transplanted patients with chronic kidney disease (CKD). Supported partly by an ETT grant (ETT 503/2003), we have previously demonstrated the presence of chronic low-grade inflammation and reduced PON1 activity in CKD patients. The physiological substrate of PON1 has long been unknown. Some studies have indicated that based upon its lactonase activity, PON1 might protect proteins from homocysteinylation and loss of protein function. Homocysteine has been reported to be elevated in CKD patients and hyperhomocysteinemia is a known major risk factor of CV diseases in which PON1 lactonase activity is known to be reduced. We have been the first to investigate lactonase activity and its association with inflammatory markers and other CV risk factors in hemodialyzed and kidney transplanted patients. Being a competitive inhibitor of nitric oxide (NO) synthase, increased level of asymmetric dimethyl-arginine (ADMA) leads to a decline in NO levels, endothel dysfunction,

impaired vasodilation and elevated blood pressure resulting in an increased CV risk. Elevated homocysteine levels inhibit dimethylarginine-dimethyl-aminohydrolase (DDAH), which is responsible for the degradation of ADMA. CKD is characterized by increased ADMA levels and kidney transplantation has been reported to be associated with reduced levels of ADMA.

We investigated 108 hemodialyzed and 78 kidney transplanted patients and compared their data to 63 healthy controls. CRP was found to be significantly decreased in both patient groups compared to healthy individuals; while CRP was found to be higher in hemodialyzed patients compared to those that had undergone kidney transplantation. Our results indicate that kidney transplantation might act against chronic inflammation in CKD. HDL was found to be reduced in hemodialyzed patients when compared to healthy controls and transplanted patients, respectively; while it did not show a significant difference between transplanted patients and healthy subjects. Based upon these data one might conclude that kidney transplantation restores HDL level and HDL function, too. Contrary to that, we found PON1 lactonase activity to be significantly decreased in both patient groups compared to healthy controls. Interestingly, although measured to be slightly higher in transplanted patients compared to hemodialyzed ones, this difference in lactonase activity did not reach statistical significance. These results show that despite being normalized to the normal level, the protective role of HDL is still impaired after kidney transplantation in CKD patients indicating a permanently increased CV risk that should be taken into consideration during patient care and treatment. We also found a significant negative correlation between lactonase activity and CRP level in each investigated group. Similarly, a significant negative correlation was detected between lactonase activity and ADMA level in all groups. Our results indicate that lactonase activity can be considered as a new cardiovascular biomarker in chronic kidney disease. Our manuscript was accepted in 2011 and it was published online in January 2012 (*Nephrol Dial Transplant*, DOI: 10.1093/ndt/gfr753, IF: 3.564).

To determine dysfunctional HDL, we have also developed a novel method that is based upon the inhibition of oxidative resistance of LDL, characterized by lag-time measurements. We are using pooled LDL that is isolated from healthy individuals with gradient ultracentrifugation. Proportionately to its antioxidant capacity, administration of HDL might decrease (pro-inflammatory HDL) or increase (anti-atherogenic HDL) the LDL oxidation lag-time. Currently, we are preparing the manuscript for publication describing the method.

We have also investigated the impact of biological therapy on HDL function in patients with rheumatoid arthritis (RA). Golimumab, a monoclonal antibody targeted against TNFα, have been used in the treatment of RA. Given subcutaneously in each month, we studied the impact of this drug on the oxidative resistance of LDL for 9 months. We found a beneficial influence of golimumab treatment on the restoration of HDL function, increasing the oxidative resistance of LDL. Corroborating our previous results, PON1 activity was found to be decreased in RA patients compared to healthy controls. We also detected a positive correlation between PON1 activity and LDL oxidation lag-time. We are in the phase of patient follow-up and data analysis; results are expected to be published in the near future.

Patients with inflammatory bowel diseases have already been enrolled; we are measuring their samples recently.

We have presented our results on several local and international meetings.

In extenso publications:

Int Immunol. 2010;22(7):605-9., IF: 3.301
Nephrol. Dial. Transplant. (2012) DOI: 10.1093/ndt/gfr753 IF: 3.564
Kidney and Blood Pressure Research (2012) DOI: 10.1159/000334650 IF: 1.500

Teljes támogatás: 4.500.000- HUF

Genetikai és epigenetikai vizsgálatok hypophysis daganatokban

Patócs Attila[1], Butz Henriett[2], [3]Korbonits Márta, [4]Rácz Károly
[1]MTA-SE Molekuláris Medicina Kutatócsoport, [1]Semmelweis Egyetem Doktori Iskola, [3] Barts and The London Medical School, London, UK, [4]Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinika

Munkánk során a hypophysis daganatok genetikai és epigenetikai hátterének vizsgálatát tűztük ki célul. Daganatszövetek felhasználásával teljes **mikroRNS expressziós profilt** határoztunk meg Taqman génexpressziós kártyával (TLDA, Applied Biosystems). Összesen 3 profilt azonosítottunk. Az első csoportba ép hypophysis szövetek, a második csoportban növekedési hormont (GH) termelő, a harmadik csoportban hormont nem termelő (NFA) daganatszöveteket választottunk. Munkán első részében, a fokozottan megjelenő mikroRNS-ek vizsgálatát végeztük el egyedi mikroRNS-ek mérésével valós idejű PCR-t használva. Összesen 5 (hsa-miR-128a, hsa-miR-93, hsa-miR-155, hsa-miR-20a és a hsa-miR-516a-3p) mikroRNS mérését végeztük el 35 (10 ép, 7 GH-t termelő, 18 NFA) szövetben. Az öt mikroRNS kiválasztása során bioinformatikai targetkereső algoritmusokat (TargetScan, PicTar és a miRanda) használtunk. A bioinformatika elemzések a Wee1 nevű sejtciklus szabályozásban résztvevő gént vetették fel. Az öt mikroRNS fokozott expressziót mutatott az NFA szövetekben, míg a GH-t termelő daganatokban csak a miR-155 és miR-93 volt felül expresszált. Sejtbiológiai és molekuláris biológiai módszerek segítségével (in vitro luciferáz assay, Wee1 fehérje mérése western blot technikával a kérdéses mikroRNS fokozott expresszáltatása után) igazoltuk, hogy öt mikroRNS közül a **miR-128, miR-155 és miR-516-3p célozza a Wee1 3'UTR régióját**[1].

Kutatásaink későbbi szakászában az NFA daganatokra fókuszáltunk. Preamplifikációval kiegészített TaqMan Low Density Array metodikát használva mikorRNS profilt határozutnk meg. A 678 különböző miR-ből 194 miR expressziója nem volt kimutatható, 5 miR (miR-198, miR-299-5p, miR-497*, miR-548c-3p, miR-622) csak az ép hypophysisben, és 3 miR (miR-124*, miR-515-5p, miR-872) csak a NFA mintákban volt mérhető. A mindkét csoportban expresszálódó 478 miR közül 92 fokozottan, 70 pedig alulexpresszálódott legalább 2-szeres mértékben a NFA csoportban a normál szövethez képest. 5 miR (miR-424, miR-503, miR-542-3p, miR-629 és miR-214) szignifikáns negatív korrelációt mutatott a tumormérettel. A szignifikánsan overexpresszált miR-ek bioinformatikai (DIANA-mirPath szoftver) elemzésével a jelátviteli utak közül a legszignifikánsabban érintettnek (**205 miR-mRNS interakcióval 51 gén és 39 miR közö**tt) a **TGFβ jelátviteli útvonal igazolódott**. Ebben a jelátviteli útban a Smad3 fehérjének központi szerepe van. Expresszióját a daganatokban csökkentnek találtuk az ép szövethez képest. 74 mikroRNS expressziója korrelációt mutatott a Smad3 expresszióval. Statisztikai és bioinformatikai módszerekkel (DIANA-mirPath, TargetScan, PicTar, MicroCosm, microRNA.org) végül 20 olyan mikroRNS-et azonosítottunk, amelyek expressziója fordítottan korrelált a Smad3 expresszióval és célozhatja a *Smad3* 3'UTR-ét. A TGFβ jelátviteli út további tagjainak expresszióját vizsgálva kimutattuk, hogy még a Smad6 és Smad9 alul expresszálódott a daganatokban viszonyítva[2].

Munkánk során a Molecular and Cellular Endocrinology felkérésére egy összefoglaló tanulmányt készítettünk a menin fehérje és ezen fehérje funkcionális interakcióiról, amelyeknek potenciális szerepe lehet hypophysis daganatok kialakulásban[3].

Ebben a periódusban a Magyar Belorvosi Archívumban ismertettük a mikroRNS kutatás elvi és módszertani alapjait[4].

A kutatás eddig közölt eredményeinkről további három felkérésre összeállított könyvfejezet (1 magyar és két angol nyelvű) is készült[5-7].

Munkacsoportunk a 2011. év végén felkérést kapott a Trends in Phamacological Sciences folyóirattól egy összefoglaló tanulmány készítésére, amelynek témája a mikroRNS és TGFβ jelátviteli utak közötti több szintű kapcsolat bemutatása. Jelenleg revizó alatt van[8].

A Wee1 fehérje mellett tanulmányoztuk a CDC25 fehérjét is, amely szintén a sejtciklus G2/M átmenetében játszik fontos szerepet. Egyedi összeállítású Taqman expressziós kártya felhasználásával szisztematikusan elemeztük, az összes G2/M átmenetben szereppel bírható gén expresszióját daganat és ép szövetben. Adat elemzés és közlemény készítése folyamatban van.

Teljes támogatás: 4.500.000- HUF

A nagy kapacitású technológiák előretörése lehetőséget biztosított számunkra is, hogy a mikroRNS expressziós profilt meghatározzuk az ún. új generációs szekvenálási technológiával (NGS) (Life Technologies Solid technológiáját használva) is. Célunk, hogy összehasonlítsuk ugyannak a mintának a különböző technológiákkal meghatározott mikroRNS profilját az egyedi assayekkel történt meghatározás eredményeivel annak érdekében, hogy a későbbiek során ki tudjuk választani nagy kapacitású technológiák közül azt, amelyik a mikroRNS profil meghatározásásra a legmegfelelőbb.

A pályázathoz kapcsolódva megjelent:

a. Folyóirat cikkek:

1. Butz H, Likó I, Czirják S, Igaz P, Khan MM, Zivkovic V, Bálint K, Korbonits M, Rácz K, Patócs A: ***JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM*** 95:(10) pp. E181-E191. Paper PMID: 20668041. (2010) **IF: 6.202***
2. Butz H, Likó I, Czirják S, Igaz P, Korbonits M, Rácz K, Patócs A: ***PITUITARY*** 14(2):112-124, PMID: 21063788. (2010) **IF: 2.021***
3. Balogh K, Patócs A[a], Hunyady L, Rácz K: ***MOLECULAR AND CELLULAR ENDOCRINOLOGY*** 326:(1-2) pp. 80-84. (2010) **IF: 3.503*** 20399832
4. Butz H, Likó I, Boyle B, Lendvai N, Igaz P, Czirják S, Korbonits M, Rácz K, Patócs A: **Magyar Belorvosi Archívum** 2009 62(3): 355-362.

b. Könyvfejezetek:

5. Patócs Attila: Multiplex endokrin neoplasiák. In: Leövey András, Nagy V Endre, Paragh György, Rácz Károly (szerk.) **Endokrin és anyagcsere-betegségek gyakorlati kézikönyve**. Budapest: Medicina Könyvkiadó, 2010. pp. 447-464.
6. Butz H, Racz K, Patócs A: **Tumor Suppressor Genes**, Intech, 2012. ISBN 978-953-307-879-3
7. Butz H, Patocs A: Springer, **TUMORS OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM** editor E Hayat, megjelenés év: 2012, **elfogadott**).

c. Kongresszusi előadások (szerzők, cím, a kongresszus helye, ideje);

1. Butz H, Likó I, Boyle B, Czirják S, Igaz P, Rácz K, Patócs A: MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 61: p. 238. (2008) Magyar Endokrinológiai és Anyagcsere Társaság (MEAT) XXII. Kongresszusa Eger, 2008
2. Butz H, Likó I, Czirják S, Igaz P, Zivkovic V, Korbonits M, Rácz K, Patócs A: In: ENDO09 (Congress of the Endocrine Society). 13.*p. OR39-3. Paper OR39-3.*Washington, Amerikai Egyesült Államok, 2009.06.10-13.
3. Butz H, Likó I, Czirják S, Igaz P, Munayem Khan M, Zivkovic V, Bálint K, Korbonits M, Rácz K, Patócs A: MBA *63*: p. 204. (2010) Magyar Endokrinológiai és Anyagcsere Társaság (MEAT) XXIII. Kongresszusa, Visegrád, 2010 május 6-8.
4. Butz H, Likó I, Czirják S, Igaz P, Bekő G, Korbonits M, Rácz K, Patócs A: CLINICAL CHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE 49**:**(Spec. suppl.) *p. S416. Paper 0443.* (2011) IFCC – WorldLab – EuroMedLab, Berlin, 15-19 May 2011
5. Butz H, Likó I, Czirják S, Korbonits M, Rácz K, Patócs A: (European Scoiety for Clinical Investigators ESCI, Budapest, 2012 március 22-24)
6. Butz H, Likó I, Czirják S, Korbonits M, Rácz K, Patócs A: ICE-ECE, Firenze, 2012. május 5-9).

d. kongresszusi poszterek (szerzők, cím, a kongresszus helye, ideje);

1. Butz H, Likó I, Boyle B, Czirjak S, Igaz P, Patócs A, Rácz K: ENDOCRINE ABSTRACTS 20: p. *P566.* (2009) 11th European Congress of Endocrinology, Isztambul, May 7-11, 2009.

Budapest 2011. január hó 26. nap

Dr. Patócs Attila

témavezető **intézményvezető**

p.h.

Genetic and epigenetic investigations in pituitary tumorigenesis

Patócs Attila[1], Butz Henriett[2], [3]Korbonits Márta, [4]Rácz Károly
[1]MTA-SE Molecular Medicine Group, [1]Semmelweis University Doctoral School, [3] Barts and The London Medical School, London, UK, [4]Semmelweis University II. Department of Medicine

We determined the microRNA profiles using Taqman TLDA cards (TLDA, Applied Biosystems). In total we measured three microRNA profiles. The first group consisted from normal pituitary tissues, the second group included growth hormone (GH) secreting pituitary tumors and the third group was formed from hormonally inactive, non-functioning (NFA) tumors. In total five (hsa-miR-128a, hsa-miR-93, hsa-miR-155, hsa-miR-20a és a hsa-miR-516a-3p) strongly overexpressed microRNAs were evaluated in 35 (10 normal, 7 GH-t producing, 18 NFA) tissues. These microRNAs were selected by bioinformatical anlysis using three target predictor algorithms (TargetScan, PicTar és a miRanda). The bioinformatical analysis identified the Wee1 protein which is involved in the regulation of the cell cycle. The five selected microRNAs were overexpressed in NFA tissues, while in the GH-producing tumors only the miR-155 and miR-93 was overexpressed. Using cell- and molecular biological (in vitro luciferase assay, measurement of Wee1 protein by western blot after in vitro overexpression of miRs) methods we proved that of the five microRNAs **miR-128, miR-155 és miR-516-3p target the Wee1 3'UTR region**[1].

We performed a novel microRNA profiling using 8 NFA and 4 normal tissues by a newer technique with TaqMan Low Density Array supplemented with preamplification (Life Techologies). Using this platform 678 different microRNAs can be evaluated simultaneously. Of these 194 miRs were not detected, while 5 miRs (miR-198, miR-299-5p, miR-497*, miR-548c-3p, miR-622) only in normal, and 3 miRNAs (miR-124*, miR-515-5p, miR-872) only in NFA samples were detected. Of 478 miRs expressed in both tissue types 92 were over- and 70 underexpressed by at least 2 fold in NFA tissues compared to normal samples. Five miRs (miR-424, miR-503, miR-542-3p, miR-629 és miR-214) showed a significant negative correlation with tumor size. The bioinformatical analysis (DIANA-mirPath software) revealed the **TGFβ signaling pathway** (with **205 miR-mRNA interactions invloving 51 genes and 39 miRs**) as the most affected pathway. Smad3 has a central role in regulation of this pathway. Using real time PCR quantification we found Smad3 underexpressed in tumor tissues compared to normal samples. Statistical analysis revealed that 74 microRNAs showed negative correlation with expression of Smad3 Further bioinformatical selection (DIANA-mirPath, TargetScan, PicTar, MicroCosm, microRNA.org) identified 20 microRNAs which potentially targets Smad3 3'UTR and their expression negatively correlated with Smad3 expression. Systematic evaluation of the expression of other members of the TGFβ signaling pathway showed that Smad6 Smad9 were underexpressed in tumors compared to normal tissues[2].

We published a review article in Molecular and Cellular Endocrinology about menin and its functional interactions potentially involved in pituitary tumorigenesis[3].

We were invited to write a review article in Hungarian Archive of Medicine about microRNA research including both basic and technological aspects [4]. Our research data were also published in three invited book chapters (one in Hungarian and two in English) [5-7].

We continued the evaluation of the regulation of G2/M checkpoint in pituitary tumors. Beside Wee1 we measured the expression of CDC25, another protein involved in regulation of G2/M checkpoint on mRNA and protein levels. Using individual Taqman expression cards we systematically determined the expression of all genes involved in direct regulation og G2/M phase of the cell cycle. Our preliminary results showed that in addition to regulation of Wee1 by overexpressed micrRNAs, regulation of CDC25 by underexpressed microRNAs may have a pathological role in pituitary tumorigenesis.

The recent progress and wide availability of technologies on large scale genomic evaluations made us possible to evaluate the microRNA profiles using next generation sequencing (NGS) technology (Life Technologies Solid methodology). We aimed to directly compare the outputs of different

platforms in order to select the most appropriate technology in microRNA profiling. We performed two comparisons (one between NFA and normal pituitary sample and another between fresh frozen and paraffin embedded pheochromocytoma tissues) using NGS. The results of these experiments were compared to those obtained with other whole genome profiling (microarray and TLDA) of the same samples. The bioinformatical evaluation and manuscript preparation is in progress.

In the end of 2011 we received an invitation from Trends in Phamacological Sciences to prepare a review article about cross-talk between microRNA and TGFb machinery.

A pályázathoz kapcsolódva megjelent:

a. Folyóirat cikkek:

1. Butz H, Likó I, Czirják S, Igaz P, Khan MM, Zivkovic V, Bálint K, Korbonits M, Rácz K, Patócs A: ***JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM*** 95:(10) pp. E181-E191. Paper PMID: 20668041. (2010) **IF: 6.202***
2. Butz H, Likó I, Czirják S, Igaz P, Korbonits M, Rácz K, Patócs A: ***PITUITARY*** 14(2):112-124, PMID: 21063788. (2010) **IF: 2.021***
3. Balogh K, Patócs A[a], Hunyady L, Rácz K: ***MOLECULAR AND CELLULAR ENDOCRINOLOGY*** 326:(1-2) pp. 80-84. (2010) **IF: 3.503*** 20399832
4. Butz H, Likó I, Boyle B, Lendvai N, Igaz P, Czirják S, Korbonits M, Rácz K, Patócs A: **Magyar Belorvosi Archívum** 2009 62(3): 355-362.

b. Könyvfejezetek:

5. Patócs Attila: Multiplex endokrin neoplasiák. In: Leövey András, Nagy V Endre, Paragh György, Rácz Károly (szerk.) **Endokrin és anyagcsere-betegségek gyakorlati kézikönyve**. Budapest: Medicina Könyvkiadó, 2010. pp. 447-464.
6. Butz H, Racz K, Patócs A: **Tumor Suppressor Genes**, Intech, 2012. ISBN 978-953-307-879-3
7. Butz H, Patocs A: Springer, **TUMORS OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM** editor E Hayat, megjelenés év: 2012, **elfogadott**).

c. Kongresszusi előadások (szerzők, cím, a kongresszus helye, ideje);

1. Butz H, Likó I, Boyle B, Czirják S, Igaz P, Rácz K, Patócs A: MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 61: p. 238. (2008) Magyar Endokrinológiai és Anyagcsere Társaság (MEAT) XXII. Kongresszusa Eger, 2008
2. Butz H, Likó I, Czirják S, Igaz P, Zivkovic V, Korbonits M, Rácz K, Patócs A: In: ENDO09 (Congress of the Endocrine Society). 13.*p. OR39-3. Paper OR39-3.*Washington, Amerikai Egyesült Államok, 2009.06.10-13.
3. Butz H, Likó I, Czirják S, Igaz P, Munayem Khan M, Zivkovic V, Bálint K, Korbonits M, Rácz K, Patócs A: MBA *63*: p. 204. (2010) Magyar Endokrinológiai és Anyagcsere Társaság (MEAT) XXIII. Kongresszusa, Visegrád, 2010 május 6-8.
4. Butz H, Likó I, Czirják S, Igaz P, Bekő G, Korbonits M, Rácz K, Patócs A: CLINICAL CHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE 49**:**(Spec. suppl.) *p. S416. Paper 0443.* (2011) IFCC – WorldLab – EuroMedLab, Berlin, 15-19 May 2011
5. Butz H, Likó I, Czirják S, Korbonits M, Rácz K, Patócs A: (European Scoiety for Clinical Investigators ESCI, Budapest, 2012 március 22-24)
6. Butz H, Likó I, Czirják S, Korbonits M, Rácz K, Patócs A: ICE-ECE, Firenze, 2012. május 5-9).

d. kongresszusi poszterek (szerzők, cím, a kongresszus helye, ideje);

1. Butz H, Likó I, Boyle B, Czirjak S, Igaz P, Patócs A, Rácz K: ENDOCRINE ABSTRACTS 20: p. *P566.* (2009) 11th European Congress of Endocrinology, Isztambul, May 7-11, 2009.

Budapest 2011. január hó 26. nap

Dr. Patócs Attila

témavezető **intézményvezető**

p.h.

Teljes támogatás: 4.200.000,- Ft

WNT FEHÉRJÉK ÉS WNT KÖTŐ FEHÉRJÉK KÖZÖTTI KÖLCSÖNHATÁS JELLEMZÉSE A WNT JELÁTVITELT GÁTLÓ VEGYÜLETEK KIFEJLESZTÉSE CÉLJÁBÓL

Patthy László, Bányai László, Trexler Mária, Nagy Ildikó
MTA Enzimolóhiai Intézet

Célkitűzés

Munkánk célja a Wnt fehérjék és antagonistáik közötti kölcsönhatás szerkezeti hátterének tisztázása. Ezek az ismeretek elvezethetnek olyan Wnt antagonisták kifejlesztéséhez, amelyek hatékonyan alkalmazhatóak tumorterápiás szerekként.

Elért eredmények:

1. A Wnt fehérjék és különböző receptoraik közötti kölcsönhatás jellemzése.

Felületi plazmon rezonancia mérésekkel kimutattuk, hogy a WNT5a fehérjét nagy affinitással köti az SFRP-1, a Frizzled 5 és a ROR1 FZ doménje, a ROR2 FZ-K fragmentje , és a WIF-1 fehérje WIF doménje. Annak eldöntésére, hogy a ROR2 FZ-K fehérjében mindkét domén, azaz a FZ és kringle domén is részt vesz-e a Wnt5a kötésében, vizsgáltuk a ROR2 kringle doménje és a Wnt 5a közötti kölcsönhatást. Eredményeink azt mutatják, hogy a ROR2 fehérje kringle doménje nem lép kölcsönhatásba a Wnt 5a fehérjével, tehát a ROR2 receptorban is elsősorban a FZ domén felelős a Wnt kötésért.

A Wnt3a fehérjét erősen köti az SFRP-1, a Frizzled 5 és a ROR1 FZ doménje valamint a WIF-1 WIF doménje, viszont a ROR2 FZ-K fragmentje és a Wnt3a között nem sikerült kölcsönhatást kimutatni. A vizsgált fehérjék közül a Wnt7a-hoz csak a WIF domén kötődött.

2. A Wnt fehérjéket kötő fehérjék kötőhelyeinek lokalizálása

A Wnt fehérjéket kötő receptorok illetve inhibitorok Wnt-kötő doménjein a kötőhelyek lokalizálása céljából a ROR1 receptor FZ- és a WIF-1 inhibitor fehérje WIF-doménjének mutáns változatait állítottuk elő. A mutagenezis során a fehérjék több pontján egy-egy aminosavat alaninra cseréltünk és a mutáns fehérjéket Pichia pastoris expressziós rendszerben expresszáltuk. Összesen 8 féle mutáns FZ és 9 féle mutáns WIF fehérjét vizsgáltunk. Az FZ mutánsok közül mindegyik, míg a WIF mutáns fehérjék közül 7 szekretálódott, azaz ezekben az esetekben a mutáció nem gátolta meg a fehérjék térszerkezetének kialakulását. Szerkezeti vizsgálatok (CD spektroszkópia, hődenaturáció) azt mutatták, hogy az aminosav csere egy WIF mutánst leszámítva nem okozott lényeges változásokat a fehérjék háromdimenziós szerkezetében és stabilitásában.

Wnt5a fehérjével végzett kölcsönhatás-vizsgálatok során kiderült, hogy a pontmutációk nem vezettek a fehérjék Wnt kötőképességének megszűnéséhez. A negatív eredmény egyik lehetséges magyarázata, hogy a Wnt-kötőhelyek kialakításában számos oldallánc vesz részt, ezért nem vezetett egy-egy pozíciónak a kisméretű alaninra történő cserélése a Wnt-kötés jelentősebb megváltozásához/megszűnéséhez. A továbbiakban olyan WIF-domén mutánsokat állítottunk elő, amelyekben a kiválasztott pozíciókban lévő aminosavakat argininre cseréltük ki.

Az arginin-scanning mutagenezistől azt vártuk, hogy a „drasztikusabb” változás jelentősebben befolyásolja a domén Wnt-kötő affinitását, mint az alanin-scanning mutagenezis esetén. Az előállított, tisztított és a vad típussal megegyező szerkezetű WIF-domén fehérjék funkcionális jellemzésére kompetíciós felületi plazmon rezonancia technikát választottuk. A kompetíciós módszer esetében az oldatfázis (az analit) a Wnt fehérje konstans koncentrációja mellett növekvő koncentrációban tartalmazza a vizsgálandó WIF-domént is. Igy szilárdfázisú kölcsönhatások helyett, oldatfázisú kölcsönhatásokat tudunk vizsgálni, és a fehérje-fehérje kölcsönhatások közötti különbségeket megbízhatóbban tudjuk kimutatni.

Ezekben a mérésekben a vad WIF-domént immobilizáltuk a chiphez és valamelyik WIF mutáns, illetve a vad WIF-domén (növekvő koncentrációjú) és a Wnt5A fehérje (konstans koncentrációjú) keverékét injektáltunk a chipre.

A mérési eredményeink szerint a vizsgált mutánsok nagyobb hányadánál a Wnt5A-kötő affinitás (IC50) nem különbözött jelentősen a vad WIF-doménre kapott értéktől. Három WIF-domén mutáns esetében azonban a drasztikus aminosavcsere a domén Wnt5A-kötő affinitásának szignifikáns csökkenését eredményezte. Ezzel szemben néhány mutáns esetében a Wnt5A affinitás nagyobb volt, mint a vad WIF-doménnél talált érték.

A kompetitív SPR méréseinket kiegészítettük direkt SPR mérésekkel is, hogy a kompetitív mérésekből nyert IC50 értékek mellett a kölcsönhatások pontos kinetikai paramétereit is megkaphassuk.

Az SPR mérések (kompetitív és direkt) eredményeit összefoglalva az új mutagenezises megközelítésnek (a kis oldallánccal rendelkező alanin helyett a nagy térigényű töltött oldalláncú arginin bevitele az adott pozíciókba) köszönhetően sikerült a WIF-doménen lokalizálnunk a Wnt5A-kötő felszín kialakításában résztvevő 6 aminosavat.

A kísérleti adataink megerősítik a WIF-domén 3D szerkezetének meghatározása során a kötőhely kialakításában résztvevő aminosavakra tett korábbi predikciónkat (Liepinsh és mtsai. J Mol Biol. 2006 31;357(3):942-50). A kötéserősség jelentős növekedése néhány mutánsnál azzal magyarázható, hogy a kötés kialakulásakor a Wnt5A valamelyik negatívan töltött oldallánca (egyik Wnt-fehérjének sem ismerjük a térszerkezetét) kölcsönhatásba léphet a vizsgált WIF-domén mutáns „bevitt” arginin-oldalláncával.

Eddigi eredményeinket összefoglalva: kísérletesen bizonyítottuk, hogy a korábbi vizsgálataink alapján prediktált hidrofób felszín valóban a domén Wnt-kötő felszíne, meghatároztuk, hogy a felszínt alkotó aminosavak közül melyek játszanak kulcsszerepet a kölcsönhatás kialakításában és a kötés jellegére is kaptunk információkat.

Az a tény, hogy néhány WIF-domén mutáns Wnt5A-kötő affinitása jelentősen nagyobb, mint a vad WIF-doménnél mért érték, azt jelenti, hogy ezek a mutánsok hatékonyabb inhibitorai lehetnek a Wnt5A jelátviteli útnak (a nem-kanonikus út). A mutáció okozta specifitás eltolódás felveti azt a lehetősége, hogy az egyes WIF-domén mutánsaink más-más affinitással kötik a különböző Wnt fehérjéket. Ezzel a feltételezéssel összhangban van az a tény, hogy amíg a metazoákban a Wnt inhibitorból (WIF-fehérje) csak egyet találunk, addig számos Wnt-fehérje paralogot (Wnt1, Wnt2, Wnt4, Wnt3A, Wnt5A, Wnt7A stb.) azonosítottak. Ismert, hogy a WIF-fehérje szinte valamennyi Wnt-fehérjét képes kötni (pl. Wnt3A, Wnt4, Wnt5A, Wnt7A, Wnt11), azok általános inhibitora, ezért a WIF-domén mutagenezisével elérhető, hogy egy WIF-domén mutáns valamelyik Wnt-fehérjét sokkal hatékonyabban kösse, mint a vad típus, ezzel párhuzamosan más Wnt-fehérjét pedig esetleg gyengébben. Elkezdtük a feltételezésünk kísérletes ellenőrzését. Direkt SPR technikával meghatároztuk három WIF-domén Wnt-fehérje kölcsönhatás kinetikai paramétereit. Eredményeink bizonyítani látszanak a fenti feltételezést: a Wnt5A-fehérjét a vadtípusnál erősebben kötő WIF-domén mutáns a vadtípusnál gyengébben köti a Wnt3a-t, míg a WNT5a-t a vadtípusnál erősebben kötő mutáns a vad típusú fehérjénél erősebb kölcsönhatást alakít ki a Wnt3a fehérjével.

2 cm

2 cm

2 cm

Budget: 4.200,000.- HUF

CHARACTERIZATION OF THE INTERACTION OF WNT PROTEINS WITH WNT BINDING PROTEINS IN ORDER TO DESIGN MOLECULES INHIBITING WNT SIGNAL TRANSDUCTION

László Patthy, László Bányai, Mária Trexler, Ildikó Nagy
Institute of Enzymology

The aim of the project

Characterization of the structural basis of the interaction of various Wnt proteins with different types of Wnt binding proteins and receptors.

Results

1. Characterization of the interaction of Wnt proteins with different types of receptors

By surface plasmon resonance measurements we have shown that the FZ domains of SFRP-1, Frizzled 5, ROR1and ROR2 receptors, and the WIF domain of WIF-1protein have high affinity for WNT5a. The FZ domain of SFRP-1, Frizzled 5 and ROR1 receptors, and the WIF domain of WIF-1protein also bind WNT3a, but we could not demostrate an interaction of ROR2 FZ protein with Wnt3a. Only the WIF domain of WIF-1 interacted with Wnt7a.

2. Definition of the Wnt binding sites of different Wnt-binding proteins

In order to localize the Wnt-binding sites on the two Wnt-binding domain types, the FZ and the WIF domains, we have produced mutant variants of the FZ domain of ROR1 receptor and the WIF domain of WIF-1 protein.

By site directed mutagenesis 8 amino acids of the FZ domain of ROR1 were changed to alanine and the proteins were expressed in *Pichia pastoris* cells. All the mutant variants were secreted into the medium and CD spectroscopy of the purified proteins proved that the mutation did not significantly alter the three dimensional structure and stability of the proteins. SPR protein interaction studies with Wnt5a showed that the point mutations did not affect the affinity of Ror1-FZ domain for Wnt5a.

Using the same site directed mutagenesis approach, we have constructed 9 mutant versions of WIF domain and expressed them in the *Pichia pastoris* expression system. 7 of the 9 mutant proteins were secreted into the Pichia medium, indicating that the mutations did not disturb protein folding. CD spectroscopy studies showed that only in one case did the amino acid change distort the three dimensional structure of the protein and decrease its stability. SPR studies with Wnt5a showed, that, similarly to the ROR1-FZ domain, point mutations of the WIF domain did not eliminate the interaction of the WIF proteins with Wnt5a.

A possible explanation of the negativ results may be that an extended protein surface might be involved in Wnt-binding and mutations at a single residue to a small alanine cause too small changes on the binding surface to be detectable. Accordingly we changed our mutagenesis strategy from alanine scanning mutagenesis to arginine scanning mutagenesis: we produced mutant WIF domain proteins in which we changed single residues to the bulky, charged amino acid, arginine.

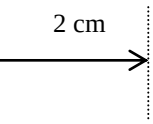
The interaction of the mutant proteins with Wnt5a was studied by a solution competition SPR assay: in solution phase constant concentrations of Wnt5a were incubated with increasing concentrations of wild type or mutant WIF domain proteins and these protein solutions were injected on the surface of SPR chips containing immobilized wild-type WIF protein. With this assay format small differences of binding affinity could be reliably detected.

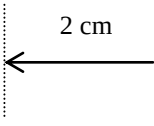
In most cases the affinity (IC50 value) of the mutant proteins for WNT5a did not differ significantly from the affinity of the wild type WIF domain. Mutations at three position decreased the affinity for Wnt5a, while in some cases the mutations increased the affinity of the WIF domain for Wnt5a.

In summary, our SPR measurements proved that the introduction of a large, charged residue caused detectable changes in the Wnt-binding surface and with arginine scanning mutagenesis we managed to identify six positions on the WIF domain that participate in Wnt binding. Our results are in harmony with our previous conclusion (Liepinsh et al., J Mol Biol. 2006 31;357(3):942-50) that the hydrophobic surface of the WIF domain participates in the interaction with Wnt proteins.

Some arginine-mutant proteins had higher affinity for Wnt5a than the wild type WIF domain. The most likely explanation for this observation is that the ’novel’ arginine side chain participates in a ’novel’ electrostatic interaction with some Wnt proteins. These arginine-mutant proteins are expected to be more efficient inhibitors of Wnt5a signaling than the wild type protein. This indicates that mutations may shift the specificity of the Wnt binding proteins: mutant WIF domains may bind different Wnts with different affinity.

In the metazoan lineage only one Wnt inhibitor protein (WIF-1protein) but several paralogs of Wnt proteins (Wnt1, Wnt2, Wnt4, Wnt3A, Wnt5A, Wnt7A stb.) were identified. It is also known that WIF-1protein is a general Wnt inhibitor, it inhibits the activity of several Wnts (e.g. Wnt3A, Wnt4, Wnt5A, Wnt7A, Wnt11). We assumed that mutagenesis of WIF domain may lead to proteins with an altered specificity spectrum for the various Wnt proteins. In accordance with this assumption we found that the WIF variant with the increased affinity for Wnt5a showed decreased affinity for Wnt3a, whereas the WIF mutant with the decreased affinity for Wnt5a showed increased affinity for Wnt3a.





3.300.000, - Ft

GYERMEK CT VIZSGÁLATOK SUGÁRTERHELÉSÉNEK FELMÉRÉSE ÉS INDOKOLTSÁGUK VIZSGÁLATA

Pellet Sándor[1], Harkányi Zoltán[2], Lombay Béla[3], Giczi Ferenc[4]
[1]Semmelweis Egyetem Népegészségtani Intézet, [2]Heim Pál Gyermekkórház, [3]Borsod-Abaúj-Zemplén Megyei Kórház, [4]Széchenyi István Egyetem

Az Egészségügyi Tudományos Tanács támogatásával, 2009-2011 között a gyermekeken végzett CT eljárások indokoltságát és optimáltságát vizsgáltuk két, a gyermekradiológia területén kiemelkedő jelentőséggel bíró radiológiai munkahelyen, ahol nagy számban végeznek CT vizsgálatot a fiatal, 15 év alatti korosztályon.

A Heim Pál Gyermekkórházban egy 2005-ben telepített 8 szeletes, GE LightSpeed Ultra típusú, Miskolcon pedig egy 2009-ben telepített 128 szeletes Siemens Definition AS+ típusú CT berendezésen végzik a vizsgálatokat. Mindkét készülék rendelkezik a legkorszerűbb páciensdózis csökkentő lehetőségekkel, külön gyermek protokollal és a páciens testvastagságától függő mA-automatikával.

A két munkahelyen 2011-ben 955, illetve 26422 CT vizsgálatot végeztek. Ebből 39, illetve 225 vizsgálatot a 10 év alatti korosztályon. A vizsgálatok teljes számában 2009-2011 között 16,6%-os, illetve 13,4%-os növekedés tapasztalható. Ugyanezen időszakban a 10 évalatti korosztályon végzett vizsgálatok száma az egyik munkahelyen jelentősen, 71%-kal, a másik munkahelyen mérsékelten, 8%-kal csökkent.

A vizsgálatunkban 107, illetve 90 esetben 15 évnél fiatalabb páciens CT vizsgálatának körülményeit és sugárterhelését hasonlítottuk össze test tájékonként.

Az értékeléshez az érintett test tájéknak megfelelően négy kategóriát: koponya, mellkas, has, medence, illetve a páciensek életkorának megfelelően: 1 évnél fiatalabb, 1 - 5 év, 5 – 10 év és 10 – 15 év kategóriákat alakítottunk ki.

A páciensdózisokban jelentős eltéréseket tapasztaltunk a két munkahely között, amelyet a koponya vizsgálatok DAP értékének korcsoportonkénti összehasonlításával illusztrálunk:

Kategória	DAP (1) mGycm	DAP(2) mGycm
1 évnél fiatalabb	366	761
1 – 5 év	349	860
5 – 10 év	517	1155
10 – 15 év	424	1256

Az eredményeinket kompetens nemzetközi szervezetek által elfogadott irányadó szintekkel nem tudjuk összevetni, mert ilyenek jelenleg nem léteznek. A szakirodalomban elvétve előforduló helyi irányadó szintek pedig értelemszerűen egy adott géptípusra vonatkoznak.

Megítélésünk szerint a dóziscsökkentési stratégiát minden munkahelyen egyedileg kell kidolgozni. Ennek a következő lépései lehetnek: az indokoltság kritériumának érvényesítése, a páciensdózisok folyamatos nyomon követése, elemzése és irányadó szintek meghatározása, a CTDI értékek csökkentése (addig, amíg az nem megy a klinikai értékelhetőség rovására), a vizsgálatok egyedi megtervezése, különös tekintettel a klinikai szempontból fontos testtájék határainak pontos meghatározása.

3.300.000 HUF

EVALUATION OF FREQUENCIES, PATIENT DOSES AND DOSE REDUCTION POSSIBILITIES OF PEDIATRIC CT PROCEDURES

Sándor Pellet[1], Zoltán Harkányi[2], Béla Lombay[3], Ferenc Giczi[4]
[1]Semmelweis University, Public Health Institute; [2] Heim Pál, Pediatric Hospital, Budapest; [3] Borsod-Abaúj-Zemplén County Hospital, Miskolc; [4]Széchenyi István University

The purpose of this study is to analyse the justification and optimisation of the CT procedures done between 2009-2011 on paediatric patients, below the age of 15 at two prominent radiological workplaces in Hungary, with the assistance of Medical Scientific Council.
The equipments under the study were: at Budapest „Heim Pál" Paediatric Hospital a GE LightSpeed Ultra (8 slices) CT installed in 2005, and at Miskolc Hospital a Siemens Definition AS+ CT (128 slices), installed in 2009. Both of these machines permit the use of dose reduction protocols for paediatric patients, with the application of automatic-mA control, which takes into account the thickness of the body.
In 2011 at the two mentioned workplaces the number of the CT examinations was: 955 and 26422 respectively, which comprises 39 and 225 examinations of patients below the age of 10.
Considering the total number of examinations between 2009 and 2011 an increase of 16,6 % and 13,4 % was perceived. During the same period, the number of examinations of children, aged below 10 was significantly decreased, by 71 % at one of the hospitals and by 8 % at the other one.
Our study also compared the circumstances of the examinations and the dose received by 107 and 90 patients from the different hospitals of the paediatric patients below 15, also taking into account the various anatomic regions.
For the evaluation of the acquired data, we have decided to split the data by age (below 1, between 1 and 5, between 5 and 10, between 10 and 15) and by the examined anatomic region (skull, thorax, abdomen and pelvis) into 4-4 groups.
We have experienced a remarkable difference between the two workplaces, comparing the DAP values for skull examinations, considering all of the age groups. As an example the table below illustrates our findings:

Age group	DAP (1) mGycm	DAP(2) mGycm
< 1 year	366	761
1 to 5 years	349	860
5 to 10 years	517	1155
10 to 15 years	424	1256

Our findings cannot be compared with internationally accepted diagnostic reference levels, because these are not available yet. The diagnostic reference levels which could be found in the literature are implicitly pertained to a given type of equipment, and to the diagnostic reference levels determined locally.
In our opinion, the strategy of the dose reduction should be elaborate uniquely, from workplace to workplace. The next steps of this strategy could be: the validation of the criteria of justification; the continuous follow-up of the patient doses; the definition and determination of the diagnostic reference levels; the decrease of CTDI values (until it won't degrade the quality of clinical evaluation); the planning of each examination, uniquely, with an emphasis on the determination of the borders of the examined anatomic region.

Teljes támogatás: 3.000,000,- Ft

IMMUNOLÓGIAI HÁTTERŰ VISSZATÉRŐ VETÉLÉS IMMUNTERÁPIÁJÁNAK OPTIMALIZÁLÁSA, AZ EGYÉNI ÉRZÉKENYSÉG ÉS A PROGNÓZIS MEGHATÁROZÁSA, A KEZELÉS HATÉKONYSÁGÁNAK MONITORIZÁLÁSA ÉS AZ INDIKÁCIÓ SZÜLÉSZETI-NŐGYÓGYÁSZATI ÉS IMMUNOLÓGIAI PONTOSÍTÁSA.

Petrányi Győző[1], Fülöp Vilmos[2], Sáfrány Beatrix[3], Droznyik István[3], Padányi Ágnes[1,] Simsa Péter[2]
1,Országos Vérellátó Szolgálat (OVSZ), 2,Állami Egészségügyi Központ (ÁEK), 3,Országos Vérellátó Szolgálat, Regionális Központ Pécs (OVSZ,RKP)

Előzmények: A korábbiakban végzett GVOP-AKF és ETT klinikai kutatások során az Intravénás Immunglobulin (IVIG) kezelés klinikai-, immunológiai-, transzfúziológiai követelmény rendszere kidolgozásra került. Jelen kutatás egyik feladata, az előző ETT kutatás során előkészített Partner Specifikus Transzfúziós (PST) kezelés optimalizálása a dózis, a beadások száma, az időintervallum vonatkozásában. Az IVIG kezelések folytatása, kombinált kezelések kidolgozása. Mindkét immunterápia (IVIG és PST) monitorizálására alkalmazott immunológiai funkcionális vizsgálatok továbbfejlesztése. A kutatási eredmények, transzlációs kutatásnak megfelelő klinikai előkészítése és bevezetése a legfontosabb cél.
Módszertani eredmények: Az immunterápia indikációját, az általános vizsgálatokat követően a több immunogenetikai, szerológiai és sejtközvetített immunreaktivitási vizsgálatok alapján állítottuk fel. Ezzel kapcsolatban egyrészt megállapítottuk azokat a módszereket, melyek eredménye nem nyújt megbízható információt az RSA alloimmun hátterének alátámasztásához (HLA-, TLX fenotípus, HLA antitest, CML vizsgálatok). Másrészt megerősítettük, hogy az immunterápia indikációjához, valamint a terápia monitorizálására az FcRγII (EAI) blokkoló ellenanyag, a Citotoxikus T Lymphocita prekurzor-sejt (CTLp) vizsgálatok a legmegfelelőbbek. Sajnálatos módon a személyi és laboratóriumi körülmények megváltozása miatt (haláleset, eltávozás és átszervezések) a kutatási periódus második részében az EAI, CTLp, vizsgálatokat nem tudtuk folytatni. A módszertani kutatások ezért új eljárások bevezetésére irányultak. Az idevonatkozó irodalmi adatokra támaszkodva három új módszert vezettünk be. Az EAI „blokkoló" antitest funkcionális vizsgálatot hármas jelzésű FACS módszerrel (T-, B- sejtekhez kötődő IgG) kombinálva a HLA- CDC keresztpróbával pótoltuk. A pécsi kollaboráló partnerrel együttműködve alkalmaztuk az általuk beállított PIBF (Progeszteron Inhibition Blocking Factor) részben az alloimmun állapot megítélésére, részben a PST monitorizálására. Előzetes adataink szerint az RSA esetek nagy részében a PIBF értékek alacsonyabbak a normál értékeknél és a PST immunterápiában részesült az esetek többségében emelkedtek. A komplex kevert lymphocyta kultúra (MLC) vizsgálat beállításával információt kaptunk a férj sejtjeivel szembeni reaktivitásra a beteg savójának MLC-t blokkoló hatására vonatkozóan. A kevés adat még nem teszi lehetővé, hogy ezen új módszerek értékét az alloimmun háttér igazolására való alkalmasságát értékeljük.
Az autoantitestek vizsgálata különösen a foszfolipid autoantitestek kizárása szempontjából szintén fontos feladat volt. A habituális vetélők csoportjában a pajzsmirigy specifikus TPO-t találtuk a leggyakoribb auto-antitestnek (15%), mely alátámasztja az irodalmi adatokat, miszerint az infertilitással küzdők, ill. sikertelen IFV-esek körében ez az auto-antitest fordul elő leggyakrabban (22-30%). Számos esetben találtuk pozitívnak az anti-nukleáris antitest, a HTG az SMA, és az APCA auto-antitesteket a vizsgált csoportban.
Klinikai eredmények: Ebben a kutatási periódusban 36 RSA terhes részesült IVIG terápiában. A sikertelen terápia esetében 6 esetben más, nem immunológiai esemény idézte elő a vetélést. Ezen esetek kizárásával az immunterápia hatékonysága hasonló volt a korábbiakban tapasztaltakkal, vagyis 90%-os volt (ld. mellékelt táblázat).
A PST kezelésre kiválasztott RSA párok esetében a transzfúziológiai kivizsgálás eredményeként, amennyiben a férj vércsoport inkompatibilitása miatt nem volt alkalmas donor, az OVSZ thrombozyta donor állományából választottunk kompatibilis donort. A donor specifikus thrombozyta sejt terápia céljára protokoll szerint előállított készítményt három alkalommal három hetes időközökben adtuk be intravénásan. Az egész kutatási időszakra vonatkozóan (2008-tól) 72 kezelésben részesült eset közül 27 szenzitizálódott, melyek közül 12-nél thrombozyta-, 15-nél HLA specifikus ellenanyagok jelentek meg. A transzfuziológiai előírások miatt ezekben az esetekben

nem lehetett folytatni a kezeléseket. Ennek megfelelő a PST immunterápia során így 21 asszony részesült 1, 13 eset 2, és 55 eset 3 kezelésben. A PST terápiában részesült esetek közül még csak 15 asszony esett teherbe, akik közül 13 szült egészséges gyermeket (2 vetélt, akik közül egy esetben a vetélésnek egyéb oka volt) az immunterápia hatékonysága 92,8 %-osnak itélhető. Az a következtetés azonban már levonható, hogy a tolerancia indukció HLA specifikus ellenanyagok megjelenése nélkül is bekövetkezik.

Az új kezelési protokoll kombinált terápia bevezetését jelentette, mely szerint 1-2 PST kezelést követően a terhesség 6. hetében 1 kiegészítő IVIG adagot (0,3-0,4 g/tskg) kapott a beteg. Kombinált kezelésben 2008-tól 15 eset részesült, melynek hatékonysága 82,3 %-os volt. A kevés eset és az egyedi betegszelekció miatt azért ezt az eredményt előzetesnek tekinthető.

Mivel a két ETT kutatási periódus alatt immunterápiában részesült összesen 138 RSA beteg esetében (20 kizárásra került az értékelésből egyéb szövődmények, és bizonytalan indikáció miatt) a kezelés hatékonysága 91,5 % volt, az immunterápia klinikai alkalmazása bizonyításon alapuló eljárásnak minősíthető.

Öszefoglalás: A Rekurrens Spontán Abortusz Immunológiai háttérrel rendelkező esetek kiszűrésére korábbiakban kidolgozott komplex diagnosztikus protokoll segítségével a klinikai kutatás 3 éves időszakában 58 esetnél indokolták az immunterápiát. Az alkalmazott humorális és sejtközvetített alloimmun vizsgálatok közül csak az komplex kevert lymphocyta kultúra vizsgálat és az FcR blokkoló ellenagyag meghatározás mutatott következetes eredményeket ezért továbbfejlesztették a módszertani repertoárt FACS és MLC blokkoló ellenanyag és a PIBF meghatározással. Autoantitest panel vizsgálatokkal meghatározták az RSA esetekben leggyakrabban előforduló autoantitesteket. A protektív immunreguláció helyreállítása céljából „partner specifikus thrombozyta sejtterápiát„ (PST) alkalmaztak 72 esetben. A sejtterápiát követően minden esetben kimutatható volt az FcR blokkoló ellenanyag termelés megindulása és random kiemelt eseteknél a magas sejtközvetített immunológiai reaktivitás normalizálódása. Az esetek kevesebb mint felében részben HLA részben thrombozyta specifikus szenzitizáció következett be, mely nem mutatott összefüggést a terápia hatékonyságával. A PST eljárással kezelt esetek közül 13 egészséges gyermeket szült és 1 vetélt (1 eset kizárásra került), mely 92,8%-os hatékonyságot jelentett. Új eljárásként kombinált terápiát (PST+IVIG) is alkalmaztak, mely 82,3%-ban volt eredményes.

A transzlációs kutatási célnak megfelelően igazolták, hogy az Immunológiai Abortusz esetében a partner specifikus thrombozyta-, és IVIG kezelés a protektiv immunreguláció helyreállításával bizonyításon alapuló eljárásnak tekinthető.

A kutatási témával kapcsolatos előadások és publikációk:

Petrányi Gy, Kotlán B, Padányi A, Fülöp V, Rajczy K, Simsa P, Gyódi É, Jakab J, Hoffer I, Toth A, Hriczko J: Monitoring the efficacy of allogeneic platelet therapy in Immunologic abortion. ASAETTA CONFERENCE, 2009. NEW DELHI, *abstract.*

Fülöp V, Padányi A, Simsa P, Kotlán B, Rajczy K, Jakab J, Hoffer I, Hriczko J, Toth A, Petrányi Gy: The significance of blocking antibodies in the monitoring of immunotherapy in Immune Abortions . ESRI CONFERENCE 2010,. BERLIN, GERMANY, *abstract.*

Szabó Zs, Petrányi Gy, Padányi, Simsa, Fülöp, Németh, Fűrész, Miklós K: Immunológiai vizsgálatok fertilitási zavarokban. MIT KONGRESSZUS, 2010. KECSKEMÉT, *poster.*

Padányi A, Pozsonyi E, Kotlán B , Fülöp V, Gyódi É, Miklós K, Németh J, Petrányi Gy, Rajczy K: Immunogenetic and immunopathologic factors involved in immunologic abortion, their relevance to monitoring immunotherapy. CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY. 2010. *submitted.*

Petrányi Gy: IVIG immunmodulációs hatásai. HUMAN BIOPLAZMA SYMPÓZIUS, 2010. HOTEL RAMADA, *abstract*

Petrányi Gy: Habituális abortusz immunológiája és immunterápiája. MAKIT KONGRESSZUS. 2011. BALATONALMÁDI, *invited speaker*

Petrányi Gy, Kotlán B, Padányi A, Fülöp V, Rajczy K, Simsa P, Gyódi É, Jakab J, Hoffer I, Toth A, Hriczko J, Miskovits E: Partner Specifikus Thrombozyta Immunterápia Habituális Immunológiai Abortuszban. MARIT KONFERENCIA 2012. BUDAPEST

Budget: 3.000,000,- Ft

IMMUNOTHERAPY OF RECURRENT SPONTANEOUS ABORTION WITH IMMUNOLOGIC BACKGROUND, DETERMINATION OF INDIVIDULA SENSITIVITY AMD PROGNOSIS, THE MONITORING OF EFFECTIVITY OF THERAPY, AND SPECIFYING GYNECOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL INDICATION.

Petrányi Győző[1], Fülöp Vilmos[2], Sáfrány Beatrix[3], Droznyik István[3], Padányi Ágnes[1,] Simsa Péter[2]
1,National Blood Service (OVSZ), 2,State Health Center (ÁEK), 3,National Blood Service, Regional Center Pécs (OVSZ,RKP)

Preliminaries: During previous clinical studies in the frame of GVOP-AKF and ETT the clinical-, hematological- and immunological general requirements of Intravenous Immunoglobulin (IVIG) therapy was established for the treatment of Recurrent Spontaneous Abortion (RSA). The task of the recent research project was to optimize the dose, schedules and timing of Partner Specific Transfusion (PST) therapy based on the preliminary activity of the previous ETT studies. Moreover the continuation of the IVIG therapy. The development of functional immunologic methods for the monitoring of both immunotherapy (PST, IVIG). The major aim was the clinical preparation and introduction of the results in the frame of translational research.

Methodological results: The indication of immunotherapy was established on immunogenetic-, serologic-, and cell mediated immunreactivity assays. On the one hand they clarified those methods which are not resulting adequate information to state the alloimmune background of Recurremt Spontaneous Abortion (RSA). Those were the HLA-, TLX phenotypes, the HLA antibodies and CML methods. On the other hand it was underlined that the most adequate methods to indicate and monitor the immunotherapy are the FcR (EAI) blocking antibody-, the cytotoxic T lymphocyite precursor cell (CTLp) investigation. It was regrettable that in the second part of the research periode was not possible to continue the use of EAI and CTLp tests because of personal and organizational reasons. Therefore the methodological research activity was directed to introduce new assays based on literature data. The functional EAI blocking antibody assay was substituted by tri-labeled FACS investigation for IgG bound on T- and B-cell in combination with HLA CDC cross match In collaboration with the partner in Pécs their PBIF (Progeszteron Inhibition Blocking Factor) test was introduced for the judgment of the presence of alloimmune background and for the monitoring of therapy. According of our preliminary results in the majority of the RSA cases the PIBF level was depressed in comparison of the normal level, and it was increased after PST therapy. The introduction of the complex mixed lymphocyte culture test (MLC) gave information from the reactivity against the husband cells and from the blocking activity of the sera. Because of the limited number of data it is not possible to evaluate the suitability of the tests to establish the presence of alloimmune background of RSA.

The autoantibody determination especially the phospholipid one was an other important task. In the case of RSA patients the most frequent autoantibody was thyreoid specific TPO (15%) was found, which supported the observations registered in the literature in the case of infertility and unsuccessfulness of in vitro fertilization. (22-23%). In the investigated groups the antinuclear-, the HTG, the SMA, and APCA auto-antibodies were found more frequent.

Clinical results: In the current research periode 36 RSA pregnant woman were treated with IVIG Ebben a kutatási periódusban 36 RSA terhes részesült IVIG terápiában. Excluding 6 case with non immunological failure the efficiency of the immunotherapy was similar as previously observed as 90%. (see enclosed table).

In the case of RSA pairs selected for PST treatment if the husband was incompatible in the ABO and HPI allotype third party donor was picked out from the thrombocyte donor pool. The thrombocyte product prepared according the protocol was infused three times in three weeks time shedule. During the whole research periode (from 2008) 72 patient received the PST therapy. Among them 27 become sensitized (12 against thrombocyte and 15 against HLA alloantigens). According the transfusiologic rules the PST therapy was ceased. According this side effect 55

patient received 3-, 13 patient 2- and 21 patient 1 transfusion. In the group of PST treated patients 15 become pregnant. One patient was excluded for other reason therefore the successful of the therapy was 92,8%. The conclusion was that the production of blocking antibody and tolerance induction was independent from the presence of HLA antibody.

According the new combined immunotherapy the patient got 1 dose of IVIG compound (0,3-0,4 g/bw) on the 6th week of pregnancy after 1-2 PST treatment. The efficiency of this protocol in the group of 15 patient was 82,3%. This evaluation is preliminary since the low number of cases and the non random selection.

In the frame of the last two ETT research period 138 RSA patient received immunotherapy. Twenty patients were excluded from the evaluation because of non immunological complications and inappropriate selection. Based on the overall 91,5% success of the treatment this therapy could be accepted as evidence based one.

Summary: During the 3 year research period based on complex diagnostical protocol they indicated by 58 case of RSA patient with immunological background the immunotherapy. Only the FcR blocking antibody determination and the MLC assay represented adequate methodology between the employed serologic and cell mediated investigations. Therefore they improved the repertoire with FACS and MLC blocking antibody and PIBF determinations. By means of autoantibody panel investigations they determined the most frequent autoantibodies in the case of RSA patients. Aiming the replacement of protective immune regulation they introduced the PST therapy in 72 cases. In the consequence of this cell therapy in all cases they observed the production of FcR blocking antibody and in random selected cases the n ormalization of high cell mediated immune parameters. They observed in less than half of the cases with PST therapy HLA and thrombocyte specific sensitization, however this side effect showed no relation with the efficiency of the therapy. The PST therapy resulted 92,8% efficiency in the group of treated cases (15 with 1case exclusion). They employed a new combined immune therapy (PST+IVIG) with 82,35 efficiency. According the aim of translational research project they proved that the treatment of RSA patients (immunologic abortion) with PST and IVIG turn up as an evidence based therapy.

Puiblications and papaers related to the project:

Petrányi Gy, Kotlán B, Padányi A, Fülöp V, Rajczy K, Simsa P, Gyódi É, Jakab J, Hoffer I, Toth A, Hriczko J: Monitoring the efficacy of allogeneic platelet therapy in Immunologic abortion. ASAETTA CONFERENCE, 2009. NEW DELHI, *abstract.*

Fülöp V, Padányi A, Simsa P, Kotlán B, Rajczy K, Jakab J, Hoffer I, Hriczko J, Toth A, Petrányi Gy: The significance of blocking antibodies in the monitoring of immunotherapy in Immune Abortions . ESRI CONFERENCE 2010,. BERLIN, GERMANY, *abstract.*

Szabó Zs, Petrányi Gy, Padányi, Simsa, Fülöp, Németh, Fűrész, Miklós K: Immunológiai vizsgálatok fertilitási zavarokban. MIT KONGRESSZUS, 2010. KECSKEMÉT, *poster.*

Padányi A, Pozsonyi E, Kotlán B , Fülöp V, Gyódi É, Miklós K, Németh J, Petrányi Gy, Rajczy K: Immunogenetic and immunopathologic factors involved in immunologic abortion, their relevance to monitoring immunotherapy. CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY. 2010. *submitted.*

Petrányi Gy: IVIG immunmodulációs hatásai. HUMAN BIOPLAZMA SYMPÓZIUS, 2010. HOTEL RAMADA, *abstract*

Petrányi Gy: Habituális abortusz immunológiája és immunterápiája. MAKIT KONGRESSZUS. 2011. BALATONALMÁDI, *invited speaker*

Petrányi Gy, Kotlán B, Padányi A, Fülöp V, Rajczy K, Simsa P, Gyódi É, Jakab J, Hoffer I, Toth A, Hriczko J, Miskovits E: Partner Specifikus Thrombozyta Immunterápia Habituális Immunológiai Abortuszban. MARIT KONFERENCIA 2012. BUDAPEST

2 cm

Teljes támogatás: 1.500.000,- Ft

DÉL-ALFÖLDI IFJÚSÁGKUTATÁS 2010: SERDÜLŐK EGÉSZSÉGE ÉS TÁRSAS HÁLÓJA

Pikó Bettina[1], Mikulán Rita[2], Kovács Eszter[1,3], Balázs Máté Ádám[1], Kriston Pálma[1,] Hamvai Csaba[1]
[1]SZTE ÁOK Magatartástudományi Intézet, [2]SZTE JGYPK Testnevelési és Sporttudományi Intézet, [3]Semmelweis Egyetem, Magatartástudományi Intézet, Budapest

A serdülőkor jelentős változást hoz a társas kapcsolati hálóban, ami megmutatkozik abban, hogy a fiatalok számára egyre fontosabbá válnak a kortárskapcsolatok, ugyanakkor a szülők szerepe is jelentősen átalakul. A szülő-serdülő kapcsolatban bekövetkezett változások igencsak jelentősek, amelyek visszavezethetők a kortárskapcsolatok térhódítására és a serdülők autonómiatörekvéseire. A serdülőkor olyan fejlődéstani szakasz, amelyben a fiatalok önálló döntési hatóköre ugyan megnő. A kutatások ugyanakkor azt igazolták, hogy mindent egybevetve a szülői kapcsolat átalakulása ellenére a szülők továbbra is fontos fejlődéstani szerepet töltenek be a serdülők számára az ún. biztonságos kötődés talaján, amely ugyanakkor sokkal ellentmondásosabb, olykor látensebb, mint a gyermekkorban, de mégis jelentős védőfaktor. A szülőkkel való kapcsolat meghatározó eleme a szülők nevelési stílusa, azaz a szülői bánásmód, amit általában kétféle dimenzióban mérnek empirikus vizsgálatokban: a kontroll (azaz amikor a szülők követelményeket támasztanak), és az elfogadás (a szülők reflektív viselkedése a gyermekük igényeire). A rugalmasan reagáló, de mértékletes kontrollal jellemezhető szülői bánásmódot mértékadó (*authoritative*) szülői stílusnak nevezzük.
szöveg
Kutatásunkban a szülői védőfaktorok szerepe jórészt megerősítést nyert; azonban a korral a prediktor struktúra némi változáson megy keresztül, ami a nemek vonatkozásában csak alig igazolható. A szülői kontrollt mindig is kiemelkedő védőfaktorként tartotta számon a szakirodalom; úgy tűnik azonban, hogy nem önmagában hatékony, hanem főként abban az esetben, ha a mértékadó szülő nevelési stílus részeként érvényesül, azaz jelen van a szigor mellett a szülők reflektáló, elfogadó attitűdje is a serdülők felé. Eredményeink megerősítik a szerfogyasztás mellett az ún. mértékadó szülői nevelési stílus védőfaktor jellegét a serdülőkori depressziós tünetekkel összefüggésben is. Különösen a lányok esetében erőteljes a védő hatás. Az ellenkező nemű szülő nevelési stílusa kiemelt hatást gyakorol a szocializációs folyamatra a mentális egészség megőrzése terén.

2 cm

Eredményeink szerint a belső/külső kontroll fontos szerepet játszik a serdülők szerfogyasztásának alakulásában: a külső kontroll esélynövelő, a belső kontroll pedig védőfaktor. A kontroll típusa ugyanis megszabja azt, hogy az egyén mennyire bízik saját képességeiben, azaz hogy képesnek érzi-e magát arra, hogy saját viselkedését kontrollálni tudja (belső kontroll) vagy pedig kiszolgáltatottnak érzi magát a külső körülményeknek (külső kontroll). Az egyes szertípustól függően vannak eltérések a kipróbálás és az aktuális szerfogyasztás kontrollfüggőségében; ezt a szer központi idegrendszeri hatásain kívül pszichikai és társadalmi tényezők is befolyásolják; a szer elterjedtsége és a társadalomnak a szer iránt tanúsított toleranciája vagy a kortárshatás erőteljessége. Mindezek azt mutatják, hogy a magatartáskontroll igen fontos lehet a szerfogyasztás serdülőkori megelőzésében.

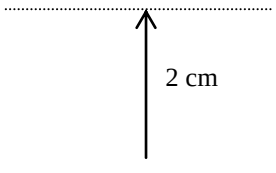
2 cm

A védőfaktorok között vizsgáltuk a vallás/spiritualitás szerepét is. A modern társadalomban a vallás jelentősen átalakult; nemcsak az intézményes háttere, hanem a hittartalmak, a valláshoz való viszonyulás, a vallásgyakorlás formái is. Míg korábban a vallás fogalma mindenki számára egyértelmű volt, manapság a hit, a spiritualitás és a vallásosság már nem fonódnak olyan szorosan össze. Serdülőkorban az egyéni életút és életcélok vonatkozásában, a világkép megalapozásában, az értékek és erkölcsi elvek integrálásában egyfajta útkeresés zajlik. Az identitáskeresés pedig szorosan összefügg a spirituális fejlődéssel. Saját mintánk vallási aktivitása nem tér el jelentősen sem az országos reprezentatív vizsgálatok eredményeitől, sem pedig más, hazai kutatások eredményeitől. Klaszteranalízis segítségével a fiatalok négy csoportját sikerült elkülöníteni a vallásoshoz/spiritualitáshoz való viszonyulásuk alapján: vallást elutasító nem hívők; vallásra/spiritualitásra nyitottak; vallásos/ spirituális hívők; misztika és vallás híján boldogulók. A

középiskolások vallásossága/spiritualitása tehát sokszínű és összefügg lelki egészségükkel, egészségmagatartásukkal.
Adataink azt mutatják, hogy az alkoholfogyasztásra kevésbé hajlamosak azok a fiatalok, akiknek a vallás fontos szerepet tölt be a mindennapi életükben, akik biztosak a hitükben, és akik gyakorolják is a vallásukat (pl. imádkozással, templomba járással). Úgy tűnik, hogy a szélesebb értelemben vett spiritualitáshoz képest a (tradicionális) vallásosság védőfaktor jellege erősebben érvényesül. Bár az aktív vallásgyakorlás a középiskolás fiatalok körében viszonylag alacsony a számszerű adatokat tekintve; azok számára, akiknek a vallás fontos a mindennapi életükben, a védelem megvalósulni látszik. A hagyományos életstílus és életfelfogás a szerfogyasztás és a deviáns viselkedés elutasításában is megnyilvánul.
Eredményeink megerősítik a hagyományos (család, vallás) védőfaktorok szerepét a középiskolás populációban. Erősítésük ezért kiemelten fontos a mentálhigiénés prevenció során.

ETT publikációk:

Pikó B, Hamvai Cs: Parent, school and peer-related correlates of adolescents' life satisfaction. CHILDREN AND YOUTH SERVICES REVIEW 32: pp. 1479-1482 (2010) IF: 1,130
Pikó B, Luszczynska A: Társadalmi egyenlőtlenségek a serdülőkori depresszióban: Mediátor tényező-e a társas támogatás és az optimizmus? PSYCHIATRIA HUNGARICA 25: pp. 233-242 (2010)
Pikó B, Balázs MÁ: Kontroll vagy részvétel? A szülői nevelési stílus összefüggése a serdülőkori depresszióval. PSYCHIATRIA HUNGARICA 25: pp. 538-544 (2010)
Pikó B, Kovács E, Kriston P: A belső/külső kontroll és a serdülőkori szerfogyasztás összefüggésének jelentősége a magatartásorvoslásban. ORVOSI HETILAP 152: pp. 331-337 (2011)
Pikó B, Kovács E, Kriston P: Spiritualitás – vallás – egészség: Fiatalok mentális egészsége a spirituális jóllét mutatóinak tükrében. MENTÁLHIGIÉNÉ ÉS PSZICHOSZOMATIKA 12: pp. 261-276 (2011)
Pikó B, Balázs MÁ: Authoritative parenting style and adolescent smoking and drinking. ADDICTIVE BEHAVIORS 37: pp. 353-358 (2012) IF: 2,133
Mikulán R, Pikó BF: High school students' body weight control: Differences between athletes and non-athletes. COLLEGIUM ANTROPOLOGICUM in press IF: 0,500
Pikó B, Balázs MÁ: A szülői nevelési stílus jelentősége a serdülők dohányzása és alkoholfogyasztása szempontjából. PSZICHOLÓGIA in press.
Pikó B, Kovács E, Kriston P: Ki mennyire hisz vagy ki mennyire vallásos? Spiritualitás, vallásosság és az alkoholfogyasztás összefüggései középiskolások körében. MAGYAR PSZICHOLÓGIAI SZEMLE in press.
Pikó B, Balázs MÁ: Control or involvement? Relationship between authoritative parenting style and adolescent depression. EUROPEAN CHILD AND ADOLESCENT PSYCHIATRY in press IF: 1,622



2 cm

Budget: 1.500.000,- HUF

SOUTHERN PLAIN REGION YOUTH STUDY 2010: ADOLESCENTS' HEALTH AND SOCIAL NETWORK

Pikó Bettina[1], Mikulán Rita[2], Kovács Eszter[1,3], Balázs Máté Ádám[1], Kriston Pálma[1,] Hamvai Csaba[1]
[1]Department of Behavioral Sciences, Faculty of Medicine, University of Szeged, [2]Institute of hysical Education and Sports Science, Juhasz Gyula Faculty of Pedagogy, [3]Institute of Behavioral Sciences, Semmelweis University, Budapest

Adolescence brings about significant changes in the social network that may appear in the fact that for youth peer relationships become increasingly important, whereas the role of parents is also restructuring. Changes in the parent-child relationship are also significant that may stem from an upsurge of peer relationships and adolescents' thriving for autonomy. Adolescence is a life period in which youth's autonomous decisions making coverage tends to increase. Studies, however, justified that all things taken together, despite the fact that the relationship with parents changed parents continued to play an important developmental role for adolescents based on prodiving a so called secure attachment for them. This relationship is, however, more controversial or latent as compared to childhood, but still it may act as a protective factor. Parenting style is a decisive element of the parent-child relationship, namely, the way of parents' child rearing practices, that may be measured along two dimensions in empirical research: controlling (when parents set demands for children's behavior) and acceptance (parents' reflective behavior to their children's needs). Authoritative parenting style is a type of child rearing practice characterized by adequate controlling (monitoring) and resilient reflection.

In our research, the role of parental protective factors were rather gained confirmation. However, with growing age the structure of predictors undergo a slight change, that may be hardly justified in terms of gender. Parental control was always mentioned in literature as an effective protective factor. As it appears now, it is not effective on its own but particularly as a part of the authoritative parenting style. This means that besides consistent treatment, parents' reflective, accepting attitude should be also present towards their children. Our results confirmed the protective role of authoritative parenting style in terms of both adolescent substance use and depression. The protective effect is particularly strong for girls. The parenting style of the opposite-sex parent provides a highlighted effect on the socialization process during adolescence in terms of maintaining mental health.

2 cm

According to our results, internal/external locus of control may be particularly important in adolescent substance use. External locus of control increased the risk, whereas internal locus of control acted as a protective factor for substance use. Actually, the locus of control determines how much the individual believes in his/her abilities, that is, whether he/she feels to be able to control over own behavior (internal locus of control) or he/she feels defenceless due to external environmental effects (external locus of control). The relative role of external/internal locus of control may be different according to the type of substance use and the prevalence values; this may be influenced by the effects of the substance on the Central Nervous System as well as by psychological and social factors, such as epidemiology of substance use, the tolerance of society towards the substance and the strength of peer group effects. All these findings suggest that behavioral control may be particularly important in prevention of adolescent substance use.

2 cm

Among protective factors, we also investigated the role of religion and spirituality. Religion has changed significantly in modern societies, not only its institutional background but also religious beliefs, attitudes towards religion and forms of religious activity. Whereas in earlier times the definition of religion was the same for everyone, today's faith, spirituality and religiosity do not overlap so strictly. During adolescence, there is a search for questing after determining individual life course, life purposes and life view, and integrating values and moral principles. Furthermore, quest for identity is strongly associated with spiritual development. Religious activity of the current sample did not alter significantly from research results of national representative studies and other

surveys. By means of cluster analysis, four groups of youth were identified based on their relation to religion/spirituality: those deny religion (non believers); those who are open to religion/spirituality; those who are believers, and those who are thriving without mystique/religion. These categories did not differ significantly from those described by Lambert. All in all, we may conclude that high school students' religiosity and spirituality are indeed multi-coloured and individual in which different faith beliefs get on well beside each other.

According to our findings, those youth are less likely to use alcohol for whom religiosity plays an important role in their everyday lives and who are certain in their belief and also practice their religion (e.g., attending religious services and/or praying). It seems that instead of the broad concept of spirituality, traditional religiosity may act as a protective factor to a greater extent. Despite the low level of active religious participation among the high school students (taking into account the data on frequencies), those for whom religiosity does count in their lives, the protection becomes a reality. The traditional lifestyle and life orientation also influence substance use through avoidance of deviant behaviors.

These findings confirm the role of traditional (familial, religious) protective factors in the population of high school students. Therefore, strengthening them is particularly relevant in mental health promotion.

ETT publications:

Pikó B, Hamvai Cs: Parent, school and peer-related correlates of adolescents' life satisfaction. CHILDREN AND YOUTH SERVICES REVIEW 32: pp. 1479-1482 (2010) IF: 1,130

Pikó B, Luszczynska A: Társadalmi egyenlőtlenségek a serdülőkori depresszióban: Mediátor tényező-e a társas támogatás és az optimizmus? PSYCHIATRIA HUNGARICA 25: pp. 233-242 (2010)

Pikó B, Balázs MÁ: Kontroll vagy részvétel? A szülői nevelési stílus összefüggése a serdülőkori depresszióval. PSYCHIATRIA HUNGARICA 25: pp. 538-544 (2010)

Pikó B, Kovács E, Kriston P: A belső/külső kontroll és a serdülőkori szerfogyasztás összefüggésének jelentősége a magatartásorvoslásban. ORVOSI HETILAP 152: pp. 331-337 (2011)

Pikó B, Kovács E, Kriston P: Spiritualitás – vallás – egészség: Fiatalok mentális egészsége a spirituális jóllét mutatóinak tükrében. MENTÁLHIGIÉNÉ ÉS PSZICHOSZOMATIKA 12: pp. 261-276 (2011)

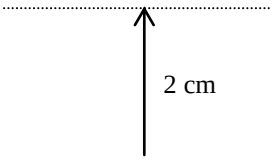
Pikó B, Balázs MÁ: Authoritative parenting style and adolescent smoking and drinking. ADDICTIVE BEHAVIORS 37: pp. 353-358 (2012) IF: 2,133

Mikulán R, Pikó BF: High school students' body weight control: Differences between athletes and non-athletes. COLLEGIUM ANTROPOLOGICUM in press IF: 0,500

Pikó B, Balázs MÁ: A szülői nevelési stílus jelentősége a serdülők dohányzása és alkoholfogyasztása szempontjából. PSZICHOLÓGIA in press.

Pikó B, Kovács E, Kriston P: Ki mennyire hisz vagy ki mennyire vallásos? Spiritualitás, vallásosság és az alkoholfogyasztás összefüggései középiskolások körében. MAGYAR PSZICHOLÓGIAI SZEMLE in press.

Pikó B, Balázs MÁ: Control or involvement? Relationship between authoritative parenting style and adolescent depression. EUROPEAN CHILD AND ADOLESCENT PSYCHIATRY in press IF: 1,622



Teljes támogatás: 5.400.000 Ft

A REENDOTHELISATIOS FOLYAMATOK ELEMZÉSE PERKUTÁN KORONÁRIA INTERVENCIÓT KÖVETŐEN: FÓKUSZBAN A STENT – THROMBOSIS

Dr. Préda István, Dr. Tóth- Zsámboki Emese, Dr. Kiss Róbet Gábor, Dr. Vargova Katarina, Dr. Molnár Andrea, Dr. Leé Sarolta, Dr. Gulácsi – Bárdos Petra, Dr. Horváth Zsófia
MTA- SE Immungenomikai és Gyullladásbiológiai Kutatócsoport, MH Honvédkórház, Kardiológiai osztály

Munkacsoportunk figyelme az utóbbi beszámolási időszakban az iszkémiás szívbetegség stabil formájában elvégzett invazív kardiológiai vizsgálat (perkután koronária intervenció, PCI), illetve e során implantált koronária stentek endothelre, illetve a regenerációs folyamatokra gyakorolt hatásaira irányult. Emellett, a PCI után obligát módon alkalmazandó kombinált trombocita-gátló kezelés hatékonyságát is vizsgáltuk. Nem utolsó sorban, munkacsoportunk típusos angina pectorisban szenvedő, de makroszkóposan ép koronáriákkal rendekező egyénekben további vizsgálatokat végzett az endothel funkció elemzése irányába.

Endothel funkció és regenerációs folyamatok elemzése sikeres perkután koronária intervención átesett stabil angina betegekben

A PCI és stent (gyógyszerkibocsátó -DES, ill. fémstent - BMS) implantáció után fellépett komplikációk (resztenózis, ill. stent trombózis) hátterében többek között az elégtelen lokális reendotelizáció állhat. Vizsgálataink során az implantált stentek hosszútávú endoteliális hatásait elemeztük, illetve arra kerestük a választ, hogy az implantált stent jellegétől (DES, BMS) függően milyen mértékű szisztémás regenerációs válasz lép fel. Elemzéseink során már korábban a kutatólaborunkban bevezetett és standardizált metodikával izolált keringő CD146+endotelsejtek számát (CEC) használtuk fel az endothel sérülés mértékének meghatározására. Emellett, azonos elven alapuló eljárással vizsgálatuk a CD34+progenitor sejtszámot is, amely a regenerációs folyamatok leírására szolgált. A regenerációs választ emellett plazma markerekkel (VEGF, PDGF) is elemeztük. Vizsgálatainkba stabil angina pectorisban szenvedő PCI-on átesett beteget vontunk be. Kontroll csoportot olyan betegek képezték, akiknél a koronarográfia negatív eredménnyel zárult (NK), illetve súlyos koszorúér betegséget igazolt, de PCI-ra nem került sor. Vérvételre a betegek felvételekor, majd PCI után 6, 24 órával, és 1, 3, 6 és 12 hónappal történt. A CD146+ endothelsejt, és CD34+ progenitorsejtszámot immunmágneses metodikával, a VEGF és a PDGF szinteket ELISA-val határoztuk meg. A PCI után csupán nem szignifikáns CEC szám emelkedést találtunk. A CEC szám BMS esetén tendenciájában a PCI után 1 hónappal, DES esetén 12 hónappal volt a legmagasabb. A CD34+ progenitor sejtszám az NK csoportban szignifikánsan magasabb volt az iszkémiás szívbetegekhez (ISZB) képest ($p=0.03$). Sem a PCI, sem a koronarográfia nem gyakorolt közvetlen hatást az EPC számra. A felvételi VEGF és PDGF plazma szint mindhárom csoportban hasonló volt, majd PCI után 6 órával szignifikáns VEGF ($p=0.043$) és PDGF ($p=0.04$) emelkedést találtunk. ISZB-ben alacsonyabb CD34+ progenitor sejtszámot figyeltünk meg, ami alátámasztja e betegekre jellemző csökkent regenerációs kapacitást. A perkután koronária intervenció direkt endothel károsító hatása csekély. Közvetlenül a PCI után észlelt szignifikáns VEGF és PDGF plazma szintemelkedés a regenerációs választ jelezheti. A BMS és DES implantáció után eltérő mértékű és kinetikájú endothel sérülést tapasztaltunk, amelynek szerepe lehetne a későbbi szövődmények kialakulásában. A 2011-es év során egy új témakör felé fordultunk, mely a trombocita – eredetű mikrovezikulumok aterotrombózisban betöltött szerepére világít rá. Eddigi eredményeink bíztatónak mutatkoztak.

Teljes támogatás: 5.400.000 Ft

Az endothel diszfunkció vizsgálata típusos angina pectorisban szenvedő, de makroszkóposan ép koronáriákkal rendekező betegpopulációban A típusos angina pectorissal felvételre kerülő betegek egy részében a koronarográfia nem mutat eltérést a koszorúereken. Munkánk során a negatív koronarográfiás betegcsoport (NK) eredményeit hasonlítottuk össze 2. típusú diabetes mellitusban szenvedő páciensek és egészséges önkéntes eredményeivel. A mikrovaszkuláris reaktivitást laser – Dopplerrel (post-okkluzív hyperaemia – PORH, and lokális melegítés), az artériás stiffnesst arteriográfiával (augmentációs index – AIX, és pulzushullám terjedési sebesség – PWV). A PORH teszt során kialakuló áramlásváltozás nagysága szignifikánsan csökkent mindkét betegcsoportban az egészégés kontroll csoporthoz képest, ami a mikrovaszkuláris reakciókészség csökkenésére utal. A lokális melegítés tesztek alapján az NK betegek 86%-ban eltérő súlyosságú autonóm neuropathiát észleltünk. Eredményeink alapján a típusos angina pectorissal kórházba bekerülő, de negatív koronarográfiás betegek esetében a 2. típusú diabetes mellitusban szenvedőkhöz hasonló mértékű mikrovaszkuláris funkciókárosodás mellett autonóm neuropathia is megfigyelhető.

Kettős trombocita-gátló kezelés (aszpirin, clopidogrel) hatékonyságának vizsgálata PCI után
Kettős trombocitagátló kezelés monitorozására a clopidogrel (CLO) válasz egyéni variabilitása miatt klinikai igény van. Vizsgálatunk célja a trombocita-gátló terápia hatékonyságának felmérése, non-reszponder betegek kiszűrése volt Born-aggregometria (LTA) és Multiplate módszer (MEA) segítségével. Vizsgálatunkban mikoardiális infarktuson átesett (MI, n=90), ill. stabil anginás (SA,n=44) betegekben a trombocita aggregációt (TAG) Born metodikával és félautomata Multiplate módszerrel mértük PCI után 24 és 72 órával, ill. 6 és 12 hónappal. 600 mg CLO telítés után a betegek 75 mg/nap (n=31) vagy 150 mg/nap (n=59) CLO kezelést kaptak az MI csoportban, ill. 75 mg/nap CLO-t az SA csoportban. A 75 mg CLO kezelésre non-responder (5ADP>50%) betegeknél a dózist dupláztuk és 5 nap után kontroll TAG mérést végeztünk. A 150 mg CLO-re responderré váló betegeket (5ADP<50%) pseudo non-respondereknek (PNR) definiáltuk. A 150 mg CLO-re (5ADP>50%) sem reagáló betegeket valódi non-respondereknek (VNR) neveztük el és náluk ticlopidint (TIC) vezettünk be**.** Az MI csoport kiinduló TAG értékei szignifikánsan magasabbak voltak az SA csoporthoz képest mindkét módszerrel (LTA:p=0.05; MEA:p=0.003). Az MI csoportban a VNR arány szignifikánsan magasabb volt az SA csoporthoz képest (p=0.017). A VNR csoportban TIC bevezetése után a TAG értékek szignifikáns csökkenését tapasztaltuk és a betegek 88.9% -ban hatékony trombocita gátlást értünk el. A PNR arány tendenciájában magasabb volt az MI csoportban (0.073). A MEA és az LTA eredményei között szignifikáns pozitív korrelációt találtunk (R=0.48, p<0.05). A magasabb VNR arány miatt az MI csoportban prospektív TAG mérés ajánlott. A PNR jelenség (ál non-reszponzió) miatt - amennyiben a TAG vizsgálat nem elérhető, vagy prasugrel nem adható - az MI betegekben indokoltnak tűnik kezdetben napi 150 mg clopidogrel alkalmazása. Egy másik multicentrikus tanulmány keretében - Born aggregometriás, és Multiplate módszer által mért TAG alapján - rámutattunk a clopidogrel generikumok megbízhatóságára.

Molnár Andrea Ágnes dr., Vargová Katarína dr., Tóth-Zsámboki Emese, Kiss Róbert Gábor dr., Préda István dr. Keringő endotheliális progenitorsejtek szerepe iszkémiás szívbetegségben. Metabolizmus 2009 VII. ÉVFOLYAM, 2. SZÁM, 72.

Leé Sarolta, Kiss Róbert Gábor Noori Ebrahim, Kiss Nóra. Vérlemezkegátlás a kardiológiában – új horizontok. Cardiologia Hungarica 2011; 41:34-40.

Leé Sarolta, Merkely Béla, Édes István Ferenc, Ungi Imre, Zimmermann Zsolt, Édes István, Lizanecz Erzsébet, Lupkovics Géza, Németh Zoltán, Kiss Róbert Gábor. Hazai multicentricus trombocitafunkciós vizsgálat eredményei stent- implantáción átesett koszorúérbetegekben – COGNITION – tanulmány. Cardiologia Hungarica 2011; 41: G1-G5.

Budget: : 5.400.000 Ft

EVALUATION OF REENDOTHELISATION AFTER PERCUTANOUES CORONARY INTERVENTION: FOCUS ON STENT – THROMBOSIS

István Préda, Emese Tóth – Zsámboki, Róbert Gábor Kiss, Katarina Vargová, Andrea Molnár, Sarolta Leé, Petra Gulácsi – Bárdos, Zsófia Horváth
Hungarian Academy of Sciences – Semmelweis University, Research Group for Inflammation Biology and Immunogenomics, Military Hospital, Department of Cardiology

Between the years 2009 – 2011 our attention focused on acute and long – term endothelial and regenerative response on percutaneous coronary intervention (PCI) and coronary stent implantation in patients with ischaemic heart disease. Moreover, in patients undergoing PCI and stent implantation we examined the efficancy of obligatory dual antiplatelet therapy. In individuals with typical anginal chest pain, but with negative coronarography results the endothelial reactivity was examined using non- invasive methods.

Direct and long-term endothelial and systemic effect of successful percutan coronary intervention in stable angina patients

Insufficient reendothelisation after percutaneous coronary intervention (PCI) and stent implantation (DES – drug-eluting stentm or BMS – bare metal stent) might play a role in post-PCI complications such restenosis, or stent- thrombosis. The aim of our study was to examine the direct and long-term endothelial effect of PCI and the systemic regenerative response according to the implanted stent type (BMS vs. DES). The circulating CD146+ endothelial cell count (CEC) (indicating endothelial injury) and the CD34+ progenitor cell count (indicating regenerative response) was determined by previously standardized method. Beside this, plasma VEGF and PDGF was measured. In our study we enrolled stable angina patients undergoing PCI. Patients with negative (NC) coronarography, or positive coronarography, but withot PCI (PC) served as controls. Blood was drawn on admission, than 6, 24 hours and 1,3,6, and 12 month thereafter. The CEC and CD34+ cell count was determined by immunomagnetic method VEGF and PDGF were measured by ELISA. The CEC count did not change significantly after PCI. Interestingly, the CEC count tended to be the highest at 1 month in BMS goup and at 12 month in the DES group. The baseline CD34+ cell count was significantly lower in ischeamic heart patients compared to the NK group ($p=0.03$). Nor the PCI, neither the coronarography itself affected the CD34+ progenitor cell count. The baseline VEGF és PDGF plasma levels were similar in all patient groups. 6 hours after PCI significant increase in VEGF ($p=0.043$) and PDGF ($p=0.04$) plasma levels was found. We found lower CD34+ progenitor cell count in patients with ischaemic heart disease indicating lower regenerative capacity. Percutanoeus coronary intervention did not cause significant endothelial injury, but evoked acute systemic regeneration response, demonstrated by elevated VEGF and PDGF plasma levels. BMS and DES implantation causes endothelial injury and regeneration response to different extent, which might be responible int he development of late complications (stent – thrombosis) after stent implantation. During the year 2011, we started a new project evaluating the role of platelet derived microvesicles in atherothrombosis; our results are promising.

Evaluation of endothelial function in stable angina patients with negative coronarography results

Smaller population of patients hospitalized with typical anginal chest pain shows negative coronarography results. During our studies we examined patients with negative coronarographa (NC) and compared the results with those in 2. type diabetes mellitus and healthy controls. The microvascular reactivity was examined by laser – Doppler method (post-occlusive hyperaemia – PORH, and local heating test), the arterial stiffness was determined by arteriography (augmentation

Budget: : 5.400.000 Ft

index – AIX, and pulse wave velocity – PWV). According to our results, the PORH was significantly decreased both in NC and 2. type diabetes group compared to healthy volunteers indicating decreased microvascular reactivity. Furthermore, in 86% of NC patients the local heating teste indicated the presence of autonom neuropathy. Our results showed, that in patients with typical angina but negative coronarography, beside microvascular dysfunction autonom neuropathy is present.

Screening of dual antiplatelet therapy (aspirin, clopidogrel) efficancy after percutaneous coronary intervention

High variability of individual clopidogrel (CLO) response raised need for monitoring the efficacy of dual antiplatelet therapy (DAPT). We aimed to identify clopidogrel non-responders after percutaneous coronary intervention (PCI) with the Born aggregometry (LTA) and with multiple electrode aggregometry (MEA). We enrolled patients with acute myocardial infarction (n=90) and stable angina (SA, n=44). Aggregation (AGGR) was determined with LTA and MEA 24 and 72 hours, 6 and 12 months after PCI. After 600 mg loading dose patients were given 75 mg (n=31) or 150 mg (n=59) CLO daily in MI group and 75 mg daily in SA group. In patients not responding to 75 mg CLO (5ADP >50%) the drug dose was doubled and control platelet function test was performed after 5 days. Based on its result, those responding to 150 mg CLO (5ADP<50%) were defined as pseudo non-responders (PNR), those not responding to 150 mg CLO (5ADP>50%) were considered as real non-responders (RNR). In RNR CLO was switched to ticlopidine (TIC). The AGGRs were significantly higher in the MI group compared to SA group with both methods (LTA:p=0.05;MEA:p=0.003). The ratio of RNR was significantly higher in the AMI group (p=0.017). In RNR, we found significant decrease of AGGRs (5ADP:p<0.05) after TIC induction and reached effective platelet inhibition in 88.9% of these patients. The ratio of PNR in MI tended to be higher (p=0.073). We found significant positive correlation (R=0.48, p<0.05) between the results of the LTA and MEA. In MI patients undergoing PCI it is useful to prospectively measure platelet function, because of much higher ratio of real non- responders. The phenomenon of pseudo non-responsiveness indicates, that in absence of possibility to perfom platelet function test or to give prasugrel it seems to be reasonable to give 150 mg clopidogrel in high risk acute patients. In another multicentric study – using Born aggregometry and Multiplate electrode aggregometry to assess platelet aggregation- we proved the efficancy of clopidogrel generics.

Molnár Andrea Ágnes dr., Vargová Katarína dr., Tóth-Zsámboki Emese, Kiss Róbert Gábor dr., Préda István dr. Circulating endothelial progenitor cells in ischaemic heart disease. Metabolizmus 2009 VII, 2, 72.

Leé Sarolta, Kiss Róbert Gábor Noori Ebrahim, Kiss Nóra. Antiplatelet therapy in cardiology – new horizonts. Cardiologia Hungarica 2011; 41:34-40.

Leé Sarolta, Merkely Béla, Édes István Ferenc, Ungi Imre, Zimmermann Zsolt, Édes István, Lizanecz Erzsébet, Lupkovics Géza, Németh Zoltán, Kiss Róbert Gábor. COGNITION study. Cardiologia Hungarica 2011; 41: G1-G5

Teljes támogatás: 900. 000.- Ft

AZ ÉLETMÓD SZEREPE A GENETIKAILAG MEGHATÁROZOTT MYOCARDIÁLIS DEFICITRE

Radák Zsolt, Bori Zoltán, Koltai Erika, Hart Nikolett, Sárga Linda, Molnár Judit, Marton Orsolya
Semmelweis Egyetem-TSK, Sporttudományi Kutatóintézet, Budapest

A genetikai kiválasztás, meghatározottság, nemcsak döntő mértékben meghatározhatja a sportteljesítményt, de jelentősen befolyásolja az egészségi állapotot is. Kiderült, hogy a futni nem akaró „lusta" (LCR) patkányok cukorbetegek lesznek és rendkívüli módon romlik mitokondriális működésük a szívizomban az „aktív" (HCR) állatokkal összehasonlítva. Vizsgálatunkban arra vagyunk kíváncsiak, hogy az életmód megváltoztatásával, testedzéssel és táplálkozással, milyen mértékben sikerül a genetikai meghatározottságot befolyásolni genetikailag szelektált „lusta" és „aktív" állatok esetében. Az állatok az USA-ból érkeztek, aerob edzést fognak végezni, és SRT501 táplálék kiegészítőt kapnak (Sirtris Co, USA), mely aktiválja a SIRT1 enzimet. A SIRT1 fontos szerepet játszik a sejtek metabolizmusában és számos fehérje post-transzkripciós szabályozásában. A hiszton fehérjék deacetilálásával pedig a sejt transzkripciós folyamatainak a „csendesítését" végzi. A SIRT1-nek az egyik célpontja a Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha (PGC-1α), aminek a deacetilálásával képes a sejtek mitokondriális biogenezisét és redox állapotát is modulálni. A testedzés és a táplálkozás hatásai érintik az egész rendszert, a test minden szervét. A pályázat segítségével megállapítottuk, hogy az LCR és HCR állatokra egészen másként hat az SRT501, és a mitokondriális biogenezis estében elsősorban az AMPK aktivitásánál mértünk jelentős különbségeket. A SIRT1 mennyiségében is találtunk különbséget az LCR és HCR csoportok között a testedzésre és SRT501-re adott válaszban. A mitokondriális fúzióért és fizióért felelős fehérjék is jelentős különbségeket mutattak az LCR és HCR állatoknál, melyet a testedzés csökkenteni tudott. Vizsgálataink bebizonyították, hogy a genetikai különbségek melyek a különböző aerob futási különbségből adódnak, jelentősen befolyásolják a mitokondriális biogenezist. Ezek a különbségek azonban életmódváltással (testedzés és táplálkozás) jelentősen csökkenthetők, legalább is patkányokon.

1. Radak Z, Bori Z, Koltai E, Fatouros IG, Jamurtas AZ, Douroudos II, Terzis G, Nikolaidis MG, Chatzinikolaou A, Sovatzidis A, Kumagai S, Naito H, Boldogh I: Age-dependent changes in 8-oxoguanine-DNA glycosylase activity are modulated by adaptive responses to physical exercise in human skeletal muscle. FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE 51:(2) pp. 417-423. (2011) IF: 5.707*

2. Radak Z, Zhao Z, Goto S, Koltai E: Age-associated neurodegeneration and oxidative damage to lipids, proteins and DNA. MOLECULAR ASPECTS OF MEDICINE 32:(4-6) pp. 305-315. (2011) IF: 10.552*

Teljes támogatás: 900. 000.- Ft

THE ROLE OF LIFE STYLE ON GENETICS DEPENDENT MYOCARDIAL DEFICIT

Zsolt Radak, Zoltan Bori, Erika Koltai, Nikolett Hart, Linda Sarga, Judit Molnar, Orsolya Marton
Semmelweis University, Research Institute of Sport Science, Budapest

Genetic plays a crucial role in exercise performance and health as well. It has been reported that low running capacity rats (LCR) have developed mitochondrial dysfunction in the cardio muscle compared to high running capacity rats (HCR). In the present project we tested the hypothesis that by the help of regular exercise and targeted nutrition we can narrow the difference between LCR and HCR rats. We have received the animals from Michigan (USA) and we have supplemented SRT501, which is a powerful mimic of resveratrol, and believed to be a potent inducer of SIRT1. SIRT1 has a key role in cellular metabolism with posttranslational modifications of wide range of proteins. By the deacetylation of histone lysine residues it can alter chromatin structure and silence transcriptions. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha (PGC-1α) is one of the target proteins of SIRT1 and by the deacetylation of PGC-1 α it can modify mitochondrial biogenesis and redox signaling. The effects of exercise and nutrition are systemic, affecting the whole body. We have observed that the effects of SIRT501 are very different in LCR and HCR rats, especially on AMPK activity which closely related to mitochondrial biogenesis. In addition, the content of SIRT1 was also different in LCR and HCR rats and differently effected by exercise training and SRT501. We have studied the main proteins that are responsible to mitochondrial fusion and fission and found differences between LCR and HCR rats on the response of exercise and nutritional intervention. Our data revealed, that the genetic difference which is due to the different aerobic running capacity, has an impact on mitochondrial biogenesis. Moreover, our data further suggest that the difference in mitochondrial biogenesis in these groups can be attenuated by regular exercise and nutritional intervention, emphasizing the significant role of life style on the biogenesis of mitochondria.

1. Radak Z, Bori Z, Koltai E, Fatouros IG, Jamurtas AZ, Douroudos II, Terzis G, Nikolaidis MG, Chatzinikolaou A, Sovatzidis A, Kumagai S, Naito H, Boldogh I: Age-dependent changes in 8-oxoguanine-DNA glycosylase activity are modulated by adaptive responses to physical exercise in human skeletal muscle. FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE 51:(2) pp. 417-423. (2011) IF: 5.707*

2. Radak Z, Zhao Z, Goto S, Koltai E: Age-associated neurodegeneration and oxidative damage to lipids, proteins and DNA. MOLECULAR ASPECTS OF MEDICINE 32:(4-6) pp. 305-315. (2011) IF: 10.552*

Teljes támogatás: 2.400.000,-Ft

AZ ABO VÉRCSOPORT ANTIGÉNEK ÉS A SZEKRETOR STÁTUSZ HATÁSA A FOGSZUVASODÁSRA

Zoltán Rakonczay[1], Katalin Nagy[2], Kinga Turzó[1], Krisztina Kárpáti[1], Anett Stájer[1], Tivadar Zelles[3], József Toldi[4]

SZTE, Fogorvostudományi Kar, Fogpótlástani és Orális Biológiai Tanszék[1], Szájsebészeti Tanszék[2], SE, Fogorvostudományi Kar, Orálbiológiai Tanszék[3], Országos Vérellátó Szolgálat Szegedi Regionális Vérellátó Központ[4]

Az ABO vércsoportot meghatározó antigének a normál populáció közel 80%-ában számos testváladékból kimutatható. Ilyen testváladék például a nyál, a könny és a gyomorváladék. Azoknál az embereknél, akiknél ezek az antigének kimutathatóak szekretoroknak nevezzük. Számos kutató csoport mutatott ki összefüggést a genetikailag determinált szekretor státusz és a különböző betegségekre való hajlam között (például ischémiás szívbetegség, duodenális fekély, stb). Továbbá, azt is kimutatták, hogy a vércsoport antigének mucosa epitélsejteken való megjelenése befolyásolja a mikrobiális fertőzésekkel szembeni ellenállást. Ezen tapasztalatok alapján feltételezhető, hogy az ABO antigének nyálba történő szekretálása befolyásolja a mikroorganizmusok és a nyálban található glycoproteinek között zajló specifikus kölcsönhatásokat és így egyes fertőző szájbetegségek kialakulásának kedvez, más betegségek kialakulását viszont megakadályozza. Mindezek felvetik annak lehetőségét, hogy az ABO vércsoport, illetve a fogszuvasodás előfordulásának gyakorisága között is van összefüggés. 130 gyermekektől (6-18 éves kor) gyűjtöttünk nyálmintát. A gyermekeket két csoportba osztottuk fogazat alapján (tej-, és kevert fogazat). Meghatároztuk a szekretor-, illetve a DMF-T- (maradó fogak számából kivonva a szuvas, hiányzó és a tömött fogak számát), dmf-t- (hasonló, mint az előbb, de tejfogakra számolva), valamint a szájhigiéne (OHI-S) státuszokat. Megvizsgáltuk, hogy van-e korreláció a szekretor státusz a DMF-T, dmf-t és az OHI-S státuszok között. Szignifikánsan kisebb volt a dmf-t érték a kevert fogazatnál a szekretoros csoportban (2,1 ± 0,52), mint a nem szekretorosban (4,1 ± 1,00). Nem volt korreláció a szekretor státusz, a DMF-T és az OHI-S státusz között. Eredményeink szerint az ABO antigének nyálba történő szekréciójának védő hatása van a fogakra kevert fogazatban gyermekeknél.

Publikációk

Rakonczay Z, Nagy K: Stem cells: regeneration and repair of dental structures. ACTA PHYSIOLOGICA HUNGARICA 97: pp. 469-470 (2010) IF: 1,226

Ungvári K, Pelsőczi KI, Kormos B, Oszkó A, Rakonczay Z, Radnai M, Kemény L, Nagy K, Fazekas A, Turzó K: Dekontamináló anyagok hatása a titánfelszín biointegrációs tulajdonságaira: in vitro humán epithel sejtkultúra vizsgálatok. FOGORVOSI SZEMLE 104: pp. 9-18 (2010) IF: -

Kárpáti K, Toldi, J, Virág K, Turzo, K, Rakonczay Z, Nagy K: Effect of ABO antigenes' expression into saliva on childhood caries. 45th Meeting of the Continental European Division of the International Association for Dental Research (CED-IADR) with the Scandinavion Division, Budapest, Hungary, August 31-September 3, 2011. JOURNAL OF DENTAL RESEARCH 90: spec. Iss B 0108. (2011) IF: 3,773

Stájer A, Urbán E, Pelsőczi KI, Mihalik E, Rakonczay Z, Nagy K, Turzó K, Radnai M: Effect of caries preventive products on the growth of bacterial biofilm on titanium surface. ACTA MICROBIOLOGICA HUNGARICA (in press, 2012) IF: 0,625

2.400.000,- Ft

THE EFFECT OF ABO BLOOD TYPE ANTIGENS AND SECRETOR STATUS ON DENTAL CARIES IN CHILDREN

Zoltán Rakonczay[1], Katalin Nagy[2], Kinga Turzó[1], Krisztina Kárpáti[1], Anett Stájer[1], Tivadar Zelles[3], József Toldi[4]

University of Szeged, Faculty of Dentistry, Department of Prosthodontics and Oral Biology[1], Department of Oral Surgery[2], Semmelweis University, Faculty of Dentistry, Department of Oralbiology[3], Regional Transfusion Centre of the NBTS, Szeged, Hungary[4]

The ABO blood group antigens are detectable from the body fluids (such as in the saliva, in the tear and in the gastric juice, etc.) in the 80% of the normal population. Those people where the blood group antigens are detectable e.g. in the saliva are called secretors. Numerous studies showed connection between the secretor status and several diseases like ischemic heart disease, duodenal ulcer etc. Therefore, we can assume that the expression of ABO antigens in the saliva might alter the specific interactions between microorganisms and their salivary glycoprotein receptors. These secreted antigens may influence the development and/or prevention of oral infectious diseases. Based on the previously mentioned finding there could be a possible connection among the secretor status, the ABO blood group antigens and the caries frequency in human. The total number of participants (n = 130, aged between 6-18 years) were divided into two groups (mixed-, and permanent dentitions). ABO blood group substances were determined from saliva by hemagglutination-inhibition test with appropriate antiserum with a plate-method. DMF-T (detrimental, missing, filled permanent teeth) and dmf-t (same as before but milky teeth) indexes were measured. Oral health hygiene index-simplified plaque index (OHI-S) has been recorded. In mixed dentition the mean dmf-t values (2.1 ± 0.52) were significantly lower ($p < 0.022$) in the secretor group comparing to the non-secretor group (4.1 ± 1.00). However, no significant difference has been observed among the secretor and non-secretor groups (mixed and permanent dentitions), in relation with ABO blood groups, *vs.* OHI-S and the DMF-T (permanent dentition) in childhood.

Publications

Rakonczay Z, Nagy K: Stem cells: regeneration and repair of dental structures. ACTA PHYSIOLOGICA HUNGARICA 97: pp. 469-470 (2010) IF: 1.226

Ungvári K, Pelsőczi KI, Kormos B, Oszkó A, Rakonczay Z, Radnai M, Kemény L, Nagy K, Fazekas A, Turzó K: Impact of decontaminating solutions on titanium surface: an epithel cell culture study. FOGORVOSI SZEMLE 104: pp. 9-18 (2010) (In Hungarian), IF: -

Kárpáti K, Toldi, J, Virág K, Turzo, K, Rakonczay Z, Nagy K: Effect of ABO antigenes' expression into saliva on childhood caries. 45th Meeting of the Continental European Division of the International Association for Dental Research (CED-IADR) with the Scandinavian Division, Budapest, Hungary, August 31-September 3, 2011. JOURNAL OF DENTAL RESEARCH 90: spec. Iss B 0108. (2011) IF: 3,773

Stájer A, Urbán E, Pelsőczi KI, Mihalik E, Rakonczay Z, Nagy K, Turzó K, Radnai M: Effect of caries preventive products on the growth of bacterial biofilm on titanium surface. ACTA MICROBIOLOGICA HUNGARICA (in press, 2012) IF: 0.625

Budget: 4,500,000.- HUF

POZITÍV ÉS NEGATÍV KÖRNYEZETI INGEREK HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA IDEGRENDSZERI LÉZIÓK REGENERÁCIÓJÁRA FELNŐTTKORBAN, IN VIVO ÁLLATKÍSÉRLETES MODELLEKBEN

Reglődi Dóra[1], Kiss Péter[1], Atlasz Tamás[2], Gaszner Balázs[1], Rácz Boglárka[3], Farkas József[1], Czeiter Endre[1], Horváth Gábor[1]
[1]PTE ÁOK Anatómiai Intézet, [2]PTE TTK Sportbiológiai Intézet, [3]PTE ÁOK Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet

Az ETT 278/2009 sz. pályázat fő témája az idegrendszeri sérülések kivédési lehetőségeinek vizsgálata volt állatkísérletes modellekben. A pályázat segítségével és a pályázati forrás feltüntetésével összesen 40 közlemény született, melyek összesített impakt faktora 110.671, emellett számos hazai és nemzetközi konferencián mutattuk be eredményeinket. Leírtuk az ingergazdag környezet védő hatását retinális károsodásban, és kombinált ingergazdag környezet és védő faktorok hatását. Retina modellekben vizsgáltuk a PACAP nevű neuropeptid védő szerepét, annak hatását a környezeti stressz faktorok által előidézett változásokra, és hogy a PACAP endogén hiánya érzékenyebbé teszi a szervezetet a legkülönbözőbb károsító ingerekre. Leírtuk, hogy a PACAP fontos szerepet játszik a memória folyamatokban, különböző biológiai váladékokban való előfordulását feltérképeztük, vizsgáltuk előfordulását anyatejben és különböző sejtekben kifejtett védő hatását. A környezeti hibernációs folyamatot és regenerációs folyamatokat alacsonyabbrendűekben tanulmányoztuk. Több összefoglaló tanulmányt írtunk, többek között a PACAP vesében játszott szerepéről, az idegrendszeri degenerációkban mint pl. Parkinson és Alzheimer kórokban kifejtett védő hatásáról, és retinális károsodások kivédésének lehetőségeiről. Az ingerszegény környezet és idegrendszeri károsodásokkal kapcsolatban pedig megfigyeltük, hogy ingerszegény környezetben tartott állatok érzékenyebben reagálnak retinális károsító ingerekre, szemben az ingergazdag környezettel, ami pedig védő hatású. Az ingerszegény környezetnél nemi különbséget is megfigyeltünk, nőstény állatok érzékenyebbek az ingerszegény környezetre. A pályázat segítségével született közlemények listája:

1. Gaszner B et al. *Neuroscience* 2012 in press (IF: 3.215).
2. Markovics A et al. *Neurobiol Dis* 2012; 45: 633-644. (IF: 5.121).
3. Szabadfi K et al. *Neurotox Res* 2012; 21: 41-48. (IF: 3,015)
4. Tamas A et al. *Neurotox Res* in press (IF: 3.015)
5. Tuka B et al. *Peptides* in press (IF: 2.654).
6. Atlasz T et al. *J Mol Neurosci* 2011; 43: 51-57. (IF. 2.922)
7. Brubel R et al. *J Mass Spectr* 2011; 46: 189-194. (IF: 3.289)
8. Brubel R et al. *Transplant Proc* 2011; 43: 1297-1299. (IF: 0.993).
9. Czegledi L et al. *Gen Comp Endocrinol* 2011; 172: 115-119 (IF: 3.108)
10. Elekes K et al. *Peptides* 2011; 32: 1439-1446. (IF: 2.654)
11. Horvath G et al. *J Mol Neurosci* 2011; 43: 67-75. (IF. 2.922)
12. Kiss P et al. *Neurosci Lett* 2011; 487: 400-405 (IF: 2.055).
13. Mester L et al. *J Mol Neurosci* 2011; 43: 35-43. (IF. 2.922)
14. Reglodi D et al. *Curr Pharm Des* 2011; 17: 962-972 (IF: 4.774)
15. Reglodi D et al. *Neuropeptides* in press (IF: 1.917)
16. Szakaly P et al. *Neuropeptides* 2011; 45: 113-121 (IF: 1,917)
17. Varga B et al. *J Mol Neurosci* 2011; 43: 44-50. (IF. 2.922)
18. Vincze A et al. *Int J Dev Neurosci* 2011; 29: 923-935. (IF: 1,938)
19. Atlasz T et al. *Brain Res Bull* 2010; 81: 497-504. (IF:2.498)
20. Atlasz T et al. *Ann NY Acad Sci* 2010; 1200: 128-139 (IF: 2.847)
21. Boros A et al. *Cell Tissue Res* 2010; 339: 649-653. (IF: 2.804)
22. Brubel R et al. *J Mol Neurosci* 2010; 42:450-458 (IF. 2.922)
23. Ferencz A et al. *J Mol Neurosci* 2010; 42: 435-442 (IF: 2.922)

24. Ferencz A et al. *J Mol Neurosci* 2010; 42: 428-434 (IF: 2.922)
25. Ferencz A et al. *Transplant Proc* 2010; 42: 2290-2292 (IF: 0.993)
26. Horvath G et al. *Neurosci Lett* 2010; 484: 148-152 (IF: 2,055)
27. Horvath G et al. *Neurosci Lett* 2010; 469: 70-74 (IF: 2,055).
28. Horvath G et al. *J Mol Neurosci* 2010; 42: 411-418 (IF: 2.922).
29. Horvath G et al. *Transplant Proc* 2010; 42: 2293-2295. (IF: 0.993)
30. Kemeny A et al. *J Mol Neurosci* 2010; 42: 443-449 (IF. 2.922)
31. Lakatos A et al. *Neurobiol Aging* 2010; 31: 1355-1363 (IF: 6,634).
32. Pirger Z et al. *J Mol Neurosci* 2010; 42: 464-471 (IF: 2.922)
33. Pirger Z et al. *Neuropeptides* 2010; 44: 475-483 (IF:1,917)
34. Pirger Z et al. *J Neurosci* 2010; 30: 13766-13773 (IF: 7.271)
35. Racz B et al. *J Mol Neurosci* 2010; 42: 419-427 (IF: 2.922)
36. Racz B et al. *Regul Pept* 2010; 160: 91-98. (IF: 2.473)
37. Reglodi D et al. *J Endocrinol Invest* 2010; 33: 443-445. (IF: 1.476)
38. Sandor K et al. *Neuropeptides* 2010; 44: 363-371. (IF: 1,917)
39. Szabadfi K et al. *Int J Mol Sci* 2010; 11: 544-561 (IF: 1.938).
40. Szakaly P et al. *Transplant Proc* 2010; 42: 2283-2286. (IF: 0.993)

Budget: 4,500,000.- HUF

EFFECTS OF POSITIVE AND NEGATIVE ENVIRONMENTAL SETTINGS ON THE REGENERATION OF NERVOUS SYSTEM LESIONS IN ADULTS, IN VIVO ANIMAL EXPERIMENTAL MODELS

Reglődi Dóra[1], Kiss Péter[1], Atlasz Tamás[2], Gaszner Balázs[1], Rácz Boglárka[3], Farkas József[1], Czeiter Endre[1], Horváth Gábor[1]
[1]Department of Anatomy, [2]Department of Sportbiology, Sportbiológiai Intézet, [3]Department of Biochemistry and Medical Chemistry, University of Pecs

The main topic of the project ETT 278/2009 was to study the protective effects of different environmental and other strategies in animal models of neuronal injuries. With the help of the project, 40 peer-reviewed articles were published, with an impact factor of 110.671. In addition, we presented our results at numerous national and international conferences. We described the protective effects of enriched environment in retinal lesions, and the combined effects of enriched environment and protective chemical agents. We studied the protective effects of PACAP, a trophic neuropeptide in the retina, in environmental stress conditions, and we showed that the lack of endogenous PACAP makes the organs more vulnerable to different environmental stress factors. We have described that PACAP is a very important factor in memory formation and consolidation, we studied its presence in biological fluids in humans and animals, we detected high concentrations of PACAP in milk and we studied the protective effects of this peptide in several cell lines. We also studied the alterations in body fluids upon environmental hibernation processes and the effects of PACAP in regeneration processes in lower animals. We published several review papers on the effects of PACAP in the kidney, the protective effects of PACAP in neurodegenerative diseases, like Parkinson`s disease and Alzheimer`s disease, and the effects of different retinoprotective strategies. Considering the effects of impoverished environment, we observed that animals kept in impoverished environment react to retinal injury with a higher degree of degeneration, in contrast to enriched environment, which has protective effects. In this model, we also observed that reactions to impoverished environment show gender dependence: females react to impoverished environment with more severe degeneration.

List os publications:

1. Gaszner B et al. *Neuroscience* 2012 in press (IF: 3.215).
2. Markovics A et al. *Neurobiol Dis* 2012; 45: 633-644. (IF: 5.121).
3. Szabadfi K et al. *Neurotox Res* 2012; 21: 41-48. (IF: 3,015)
4. Tamas A et al. *Neurotox Res* in press (IF: 3.015)
5. Tuka B et al. *Peptides* in press (IF: 2.654).
6. Atlasz T et al. *J Mol Neurosci* 2011; 43: 51-57. (IF. 2.922)
7. Brubel R et al. *J Mass Spectr* 2011; 46: 189-194. (IF: 3.289)
8. Brubel R et al. *Transplant Proc* 2011; 43: 1297-1299. (IF: 0.993).
9. Czegledi L et al. *Gen Comp Endocrinol* 2011; 172: 115-119 (IF: 3.108)
10. Elekes K et al. *Peptides* 2011; 32: 1439-1446. (IF: 2.654)
11. Horvath G et al. *J Mol Neurosci* 2011; 43: 67-75. (IF. 2.922)
12. Kiss P et al. *Neurosci Lett* 2011; 487: 400-405 (IF: 2.055).
13. Mester L et al. *J Mol Neurosci* 2011; 43: 35-43. (IF. 2.922)
14. Reglodi D et al. *Curr Pharm Des* 2011; 17: 962-972 (IF: 4.774)
15. Reglodi D et al. *Neuropeptides* in press (IF: 1.917)
16. Szakaly P et al. *Neuropeptides* 2011; 45: 113-121 (IF: 1,917)
17. Varga B et al. *J Mol Neurosci* 2011; 43: 44-50. (IF. 2.922)
18. Vincze A et al. *Int J Dev Neurosci* 2011; 29: 923-935. (IF: 1,938)
19. Atlasz T et al. *Brain Res Bull* 2010; 81: 497-504. (IF:2.498)

20. Atlasz T et al. *Ann NY Acad Sci* 2010; 1200: 128-139 (IF: 2.847)
21. Boros A et al. *Cell Tissue Res* 2010; 339: 649-653. (IF: 2.804)
22. Brubel R et al. *J Mol Neurosci* 2010; 42:450-458 (IF. 2.922)
23. Ferencz A et al. *J Mol Neurosci* 2010; 42: 435-442 (IF: 2.922)
24. Ferencz A et al. *J Mol Neurosci* 2010; 42: 428-434 (IF: 2.922)
25. Ferencz A et al. *Transplant Proc* 2010; 42: 2290-2292 (IF: 0.993)
26. Horvath G et al. *Neurosci Lett* 2010; 484: 148-152 (IF: 2,055)
27. Horvath G et al. *Neurosci Lett* 2010; 469: 70-74 (IF: 2,055).
28. Horvath G et al. *J Mol Neurosci* 2010; 42: 411-418 (IF: 2.922).
29. Horvath G et al. *Transplant Proc* 2010; 42: 2293-2295. (IF: 0.993)
30. Kemeny A et al. *J Mol Neurosci* 2010; 42: 443-449 (IF. 2.922)
31. Lakatos A et al. *Neurobiol Aging* 2010; 31: 1355-1363 (IF: 6,634).
32. Pirger Z et al. *J Mol Neurosci* 2010; 42: 464-471 (IF: 2.922)
33. Pirger Z et al. *Neuropeptides* 2010; 44: 475-483 (IF:1,917)
34. Pirger Z et al. *J Neurosci* 2010; 30: 13766-13773 (IF: 7.271)
35. Racz B et al. *J Mol Neurosci* 2010; 42: 419-427 (IF: 2.922)
36. Racz B et al. *Regul Pept* 2010; 160: 91-98. (IF: 2.473)
37. Reglodi D et al. *J Endocrinol Invest* 2010; 33: 443-445. (IF: 1.476)
38. Sandor K et al. *Neuropeptides* 2010; 44: 363-371. (IF: 1,917)
39. Szabadfi K et al. *Int J Mol Sci* 2010; 11: 544-561 (IF: 1.938).
40. Szakaly P et al. *Transplant Proc* 2010; 42: 2283-2286. (IF: 0.993)

Teljes támogatás: 4.500.000 Ft

A PROGRESSZIÓ ÉS A KARDIOVASZKULÁRIS SZÖVŐDMÉNYEK MEGHATÁROZÓ TÉNYEZŐI KRÓNIKUS GYERMEKKORI VESEBETEGSÉGEKBEN

Reusz György[1], Szabó Attila[1], Vannay Ádám[1], Tory Kálmán[1], Cseprekál Orsolya[1], Kis Éva[1], Ferenczi Dóra[1]
[1]Semmelweis Egyeteme, I. Sz. Gyermekgyógyászati Klinika

Klinikai és kísérletes vizsgálatainkban a krónikus veseelégtelenség progressziójának és a társuló szív-érrendszeri szövődmények okait és mechanizmusait vizsgáltuk.

Klinikai vizsgálatok: A centrális pulzushullám terjedési sebesség (PWV) és az intima-média távolság (IMT) a kardiovaszkuláris szövődmények független előrejelzője felnőttekben, gyermekben azonban nem állnak rendelkezésre adatok. Első lépésben kialakítottunk egy gyermek- és fiatal felnőtteket (6-21 év) magában foglaló normálérték adatbázist, mely vonatkoztatási alapul szolgálhat minden további, gyermekeken végzendő követéses vizsgálathoz. Egyúttal elvégeztük a három, gyermekkorban használatos, PWV meghatározásra szolgáló készülék validálását és összehasonlítását. Ennek alapján lehetőség nyílik a különböző készülékekkel történő vizsgálatok adatainak egybevetésére.

Veseelégtelen gyermekeket vizsgálva emelkedett PWV értéket találtunk, ami csökkent érfalrugalmasságra utal. Veseátültetést követően a PWV csökken, és alacsonyabb, mint dializált betegeken, ami az érrendszeri eltérések visszafordíthatóságára utal. A PWV-t meghatározó tényező a veseátültetést megelőző emelkedett CaxP szorzat és az alkalmazott calcitriol kumulatív dózisa volt. A fetuin-A (mint a meszesedés hatékony gátlószere) szintje, továbbá a CaxP/fetuin hányados emelkedett volt végállapotú veseelégtelenségben. A CaxP/Fetuin hányados jelezte legérzékenyebben a meszesedés veszélyét a veszélyeztetett csoportokban. Követéses vizsgálatban a veseátültetés után 4.5 évvel még jelen voltak a strukturális (IMT) és funkcionális (PWV) érfali eltérések.

Kísérletes rész: A vesekárosodás molekuláris hátterét vizsgáltuk uréter obstrukciós (UO) és isémia/reperfúziós (I/R) állatmodellen

Az obstruktív uropátia a gyermekkori idült veseelégtelenség leggyakoribb oki tényezője. A kiváltó októl függetlenül a nefron pusztuláshoz és a veseműködés elvesztéséhez vezető végső mechanizmus a fibrózis. Az immunrendszer meghatározó szerepet játszik a fibrózis kialakulásában. Célunk a fibrózis mechanizmusában kulcsszerepet játszó folyamatok tanulmányozása és esetleges potenciális terápiás célpont azonosítása volt. Korábbi vizsgálatunkban azt találtuk, hogy újszülött, obstruktív uropátiával született gyermekek vizeletében az IL-17 szint a normális háromszorosa. Állatkísérletes UO modellben az IL-17 termelő immunsejtek lokálisan szignifikánsan felszaporodtak. IL-17 génkiütött (KO) modellben pedig az infiltráló miofibroblasztok száma a vad típushoz képest lényegesen csökkent. Ennek alapján az IL-17-nek fontos szerepe lehet modellünkben az UO-t követő fibrózis kialakulásában.

Az I/R modellünkben az erithropoietin (EPO) hatását vizsgáltuk a vesekárosodás mértékére és progressziójára. Azt találtuk, hogy EPO kezelés csökkenti a nemi különbséget a postisémiás károsodás mértékét, csökkentve a hím patkányok esendőségét. Ez a hatás a HSP 72 hősokk fehérje tubuláris Na/K ATP-a expressziójára és transzlokációjára kifejtett hatásával magyarázható.

Budget: 4.500.000 HUF

Ismertetett eredményeket bemutató eredeti közlemények jegyzéke

Kis E, Cseprekál O, Kerti A, Salvi P, Benetos A, Tisler A, Szabó A, Tulassay T, ReuszGS: Measurement of pulse wave velocity in children and young adults: a comparative study using three different devices. HYPERTENS RES 34: pp. 1197-1202 (2011) IF: 2.353

Prókai A, Fekete A, Bánki NF, Müller V, Vér A, Degrell P, Rusai K, Wagner L, Vannay A, Rosta M, Heemann U, Langer RM, Tulassay T, Reusz G, Szabó AJ: Renoprotective effect of erythropoietin in rats subjected to ischemia/reperfusion injury: gender differences. SURGERY 150: pp. 39-47 (2011) IF: 3.406

Reusz GS, Cseprekal O, Temmar M, Kis E, Cherif AB, Thaleb A, Fekete A, Szabó AJ, Benetos A, Salvi P: Reference values of pulse wave velocity in healthy children and teenagers. HYPERTENSION 56: pp. 217-224 (2010) IF: 6.908

Kis E, Cseprekál O, Bíró E, Kelen K, Ferenczi D, Kerti A, Szabó AJ, Szabó A, Reusz GS: Effects of bone and mineral metabolism on arterial elasticity in chronic renal failure. PEDIATR NEPHROL. 24: pp. 2413-2420 (2009) IF: 2.425

Kis E, Cseprekal O, Kerti O, Horvath T, Kollai M, Szabo AJ, Reusz GS: Pulse Wave Velocity and Intima-Media Thickness in Renal Transplant Children. PEDIATR NEPHROL 25: pp. 1957 (2010) IF: 2.183 - abstract

Himer L, Szebeni B, Sziksz E, Shinobu S, Kis E, Prokai A, Bánki NF, Degrell P, Fekete A, Reusz Gy, Tulassay T, Vannay A: Az interleukin-17 szerepe a vesefibrózis patomechanizmusában. HYPERTONIA ÉS NEPHROLOGIA 15 (S): pp. S27-S28 (2011) IF: 0 - abstract

Budget: 4.500.000 HUF

MECHANISM OF PROGRESSION AND OF CARDIOVASCULAR COMPLICATIONS OF CHRONIC PEDIATRIC RENAL DISEASE

György S Reusz György[1], Attila Szabó [1], Ádám Vannay [1], Kálmán Tory [1], Orsolya Cseprekál [1], Éva Kis [1], Dóra Ferenczi[1]

[1]Semmelweis University, 1st Department of Pediatrics

We studied the etiology, pathomechanism and cardiovascular consequences of chronic renal disease in clinical and in experimental settings.

Clinical studies: Carotid-femoral pulse wave velocity (PWV) and intima-media thickness (IMT) are established surrogate markers of cardiovascular risk in adults, however pediatric data are missing. First we studied healthy children and young adults (aged 6-21) to provide age and height matched reference values for PWV. Our newly established database provides a suitable tool for longitudinal clinical studies to evaluate arterial stiffness in subgroups of children at long-term risk of cardiovascular disease. We also validated and compared the three currently used devices in pediatrics, which allows extrapolating data between our established normal PWV values for children and forthcoming pediatric cardiovascular studies.

Our study on renal transplant children confirmed elevated arterial stiffness. After successful transplantation PWV is found to be lower than that in dialyzed patients, which suggests, that vascular changes in children are reversible. Determinants of PWV were the elevated CaxP product and the cumulative dose of calcitriol administered prior to dialysis. Fetuin-A levels (a potent inhibitor of calcification) and the CaxP/fetuin-A ratio were elevated in end stage renal disease. The CaxP/ fetuin-A ratio proved to be the most sensible indicator to identify patients at increased risk for development of vascular calcifications. On follow-up structural (IMT) and functional (PWV) vascular alterations are present 4.5 years after transplantation.

Experimental studies:

Evaluation of the molecular background of renal damage using the the obstructive uropathy (UO) and the ischemic/ reperfusion (I/R) injury models.

Obstructive uropathy is the leading cause of chronic renal insufficiency in children. Independently of the triggering mechanism the final pathway leading to the loss of nephron mass and kidney function is fibrosis. The immune system plays a determinant role in the pathomechanism of fibrosis. Our aim was to evaluate the mechanisms involved in the development of fibrosis, and to establish potential targets for therapeutic intervention. We found previously, that the urinary IL-17 level of children born with ureteric obstruction was elevated three fold compared to the normal value. In the animal model of UO the number of IL-17 producing cells increased. In IL-17 KO mice the number of newly formed myofibroblasts was significantly lower compared to the wild type animals. We conclude that IL-17 plays a determinant role in the pathogenesis of fibrosis following UO.

In our renal I/R injury model we studied the effect of erythropoietin (EPO) on the extent and progression of the kidney damage. We found that EPO diminishes gender difference in the susceptibility to renal post-ischemic injury and reduces post-ischemic structural damage while preserving kidney function, particularly in males. This additional protection may be associated with a heat-shock protein 72-mediated effect on Na(+)/K(+)ATPase-α1 expression and translocation.

Budget: 4.500.000 HUF

Publication list – original articles

Kis E, Cseprekál O, Kerti A, Salvi P, Benetos A, Tisler A, Szabó A, Tulassay T, ReuszGS: Measurement of pulse wave velocity in children and young adults: a comparative study using three different devices. HYPERTENS RES 34: pp. 1197-1202 (2011) IF: 2.353

Prókai A, Fekete A, Bánki NF, Müller V, Vér A, Degrell P, Rusai K, Wagner L, Vannay A, Rosta M, Heemann U, Langer RM, Tulassay T, Reusz G, Szabó AJ: Renoprotective effect of erythropoietin in rats subjected to ischemia/reperfusion injury: gender differences. SURGERY 150: pp. 39-47 (2011) IF: 3.406

Reusz GS, Cseprekal O, Temmar M, Kis E, Cherif AB, Thaleb A, Fekete A, Szabó AJ, Benetos A, Salvi P: Reference values of pulse wave velocity in healthy children and teenagers. HYPERTENSION 56: pp. 217-224 (2010) IF: 6.908

Kis E, Cseprekál O, Bíró E, Kelen K, Ferenczi D, Kerti A, Szabó AJ, Szabó A, Reusz GS: Effects of bone and mineral metabolism on arterial elasticity in chronic renal failure. PEDIATR NEPHROL. 24: pp. 2413-2420 (2009) IF: 2.425

Kis E, Cseprekal O, Kerti O, Horvath T, Kollai M, Szabo AJ, Reusz GS: Pulse Wave Velocity and Intima-Media Thickness in Renal Transplant Children. PEDIATR NEPHROL 25: pp. 1957 (2010) IF: 2.183- abstract

Himer L, Szebeni B, Sziksz E, Shinobu S, Kis E, Prokai A, Bánki NF, Degrell P, Fekete A, Reusz Gy, Tulassay T, Vannay A: Az interleukin-17 szerepe a vesefibrózis patomechanizmusában. HYPERTONIA ÉS NEPHROLOGIA 15 (S): pp. S27-S28 (2011) IF: 0 - abstract

Budget: 3.000,000.- HUF

MU ÉS DELTA OPIOID RECEPTOR INTERAKCIÓK SZEREPE AZ OPIOID TOLERANCIA KIALAKULÁSÁBAN

Riba Pál, Fürst Zsuzsanna, Timár Júlia, Al-Khrasani Mahmoud, Király Kornél
Semmelweis Egyetem, Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet

Jelen pályázat fő célja a μ és δ opioid receptorok egymás közötti kölcsönhatásainak vizsgálata egérben és patkányban, spinális és szupraspinális szinten, morfintolerancia kialakulása során, valamint a μδ heterodimerek létezésének in vivo valószínűsítése, és a tolerancia kifejlődésében játszott szerepének tisztázása volt.

A különböző opioid receptorok egymással kölcsönhatásba léphetnek. A lokális, helyi kölcsönhatásért azonos idegsejten lokalizált receptorok felelősek lehetnek, fölmerül a receptorok fizikai asszociációjának lehetősége is. Az opioid tolerancia kialakulásában opioid receptor interakciók is szerepet játszhatnak. Az interakcióra egyrészt az utal, hogy δ antagonisták együttadása morfinnal csökkentette a morfin antinociceptív hatásához kialakuló toleranciát, másrészt a nem toleráns állatokban, a μ agonista peptid DAMGO és a δ agonista peptid DPDPE között megfigyelt gerincvelői potencírozó szinergizmus morfinkezelés hatására megszűnt.

A tervezett kísérletekkel az alábbi hipotézisünket kívántuk alátámasztani vagy elvetni:
Mivel krónikus morfinkezelés során a δ receptorok száma a gerincvelőben megnő, rövid távon (5 napon belül) pedig a μ receptor denzitás nem csökken, így lehetőség van arra, hogy a μ és δ receptorok a nem toleráns állapothoz képest nagyobb számban összekapcsolódhassanak. Az önálló μ receptorok száma csökken, úgymond virtuális down-reguláció zajlik le. Ha a szelektív μ agonista DAMGO affinitása (receptor kötésének erőssége) vagy efficacy-ja (receptor aktiválási képessége) a μδ komplexen lényegesen kisebb, mint az önálló μ receptoron, akkor az antinociceptív ED_{50} érték növekedését kell megfigyelnünk. A ligandok kötődése a velük kapcsolódott receptorok konformációját megváltoztatja. Így lehetséges, hogy egy adott ligand olyan komformációváltozást okoz, amely elősegíti a μδ komplex kialakulását, más δ-ligandok épp ellenkezőleg, a meglévő komplexeket szétkapcsolhatják. Ennek alapján egy δ ligand a μδ komplex szempontjából (1) fokozhatja a komplexek létrejöttét, (2) nem hat a kialakult receptoreloszlásra, (3) szétkapcsolja a komplexet.
A pályázat időtartama alatt az alábbi eredményekről tudunk beszámolni:

1. Vizsgáltuk szelektív δ-ligandok (agonisták: DPDPE, deltorphin II, $Ile^{5,6}$-deltorphin II, antagonisták: TIPP, TIPPψ, TICPψ) hatását a μ agonista DAMGO spinális és szupraspinális antinociceptív hatására naív és morfintoleráns egerekben, illetve a fenti anyagok spinális hatásait naív és morfintoleráns patkányokban, tail-flick antinociceptív teszten.
2. Egér vas deferens bioassay rendszerben megmértük a δ antagonista TICPψ és a μ antagonista CTAP receptoraffinitási értékeit az in vivo adatok megfelelő interpretálása érdekében.

Módszerek:

1. Egér vas deferens (MVD) bioassay: A TICPψ δ, és a CTAP μ receptor iránti affinitását mértük.
2. Morfintolerancia létrehozása patkányban: 150-200g súlyú hím Wistar patkányokat 4 napig kezeltünk emelkedő dózisú szubkután morfin injekciókkal 4 napig, naponta kétszer (1. nap: 2x50μmol/kg, 2. nap: 2x100μmol/kg, 3-4. nap 2x200μmol/kg).
3. Morfintolerancia létrehozása egérben: 20-25g súlyú hím NMRI egereket 3 napig kezeltünk szubkután morfin injekciókkal 3 napig, naponta kétszer (2x200μmol/kg).
4. Antinociceptív teszt: tail-flick.
5. Anyagok adása a kísérlet során: mind a nemtoleráns, mind a toleráns egerek és patkányok intrathecalisan (i.t.) és intracerebroventricularisan (i.c.v.) referencia μ agonistát, DAMGO-t kaptak, az antinociceptív hatást 20 perc elteltével határoztuk meg. Az ED_{50} értékeket és 95%-os konfidencia intervallumukat a GraphPad Prism programjának curve-fit funkciójával határoztuk meg minimum három dózis segítségével. Több mint három, azonos kísérleti felállásban kapott

DAMGO ED_{50} értékek átlagát és az átlag szórását is kiszámoltuk. Az interakciókat fix dózisú δ ligandok hozzáadásával tanulmányoztuk

Eredmények:

1. Szelektív, i.t. adott δ ligandok hatása az i.t. adott DAMGO antinociceptív hatására naív és morfintoleráns egérben:
   a. Naív állatokban sem potencírozást, sem antagonizmust nem tudtunk kimutatni, egyik δ ligand sem befolyásolta a hatást (DAMGO ED_{50}: 0,044 ± 0,006 nmol/egér n=15)
   b. Morfintoleráns állatokban 1nmol/egér deltorphin II nem befolyásolta (0,194 [0,147-0,256] vs. 0,182 [0,119-0,279]nmol/egér), 0,5nmol/egér DPDPE gátolta (maximális DAMGO hatás 20-40%), míg 1nmol/egér TIPP és 1nmol/egér TICPψ potencírozta a DAMGO hatását (0,141 [0,085-0,227] vs. 0,028 [0,016-0,051]). 1nmol/egér TICPψ gátolta a DPDPE gátló hatását, a naív és toleráns egérben mért DAMGO görbék közé eső DAMGO dózis-hatás görbe jött létre.
2. Szelektív, i.c.v. adott δ ligandok hatása az i.c.v. adott DAMGO antinociceptív hatására naív és morfintoleráns egérben:
   a. Naív állatokban sem potencírozást, sem antagonizmust nem tudtunk kimutatni.
   b. Morfintoleráns egérben 1nmol/egér DPDPE szignifikánsan (DAMGO ED_{50}: 0,097nmol/egér [0,078-0,119] vs. 0,054nmol/egér [0,045-0,065]), míg 1nmol/egér TIPPψ nem szignifikánsan, de tendenciaszerűen potencírozta a DAMGO hatását (DAMGO ED_{50}: 0,107nmol/egér [0,091-0,125] vs. 0,071nmol/egér [0,054-0,094]). A DPDPE hatása lényegesen eltér a morfintoleráns egér gerincvelőjében mértektől, szupraspinálisan a DPDPE is potencírozza a DAMGO hatását.
3. Szelektív, i.t. adott δ ligandok hatása az i.t. adott DAMGO antinociceptív hatására naív és morfintoleráns patkányban:
   A tolerancia mértéke, hasonlóan az egérben mérthez, átlagosan 3,5-szeres volt (DAMGO ED_{50} naív: 0,041±0,006nmol/patkány, toleráns: 0,14±0,023nmol/patkány). Mind naív, mind morfintoleráns patkányban hasonló mértékű potencírozást mértünk. A DPDPE, TICPψ és az $Ile^{5,6}$-deltorphin II a DAMGO ED_{50} értékét naív állatban 0,008-0,02nmol/patkány, toleráns állatban 0,033-0,07nmol/patkány értékre csökkentette, ez utóbbi megfelel a naív állatokban, δ ligand hozzáadása nélkül mért értékeknek, tehát a spinális toleranciát megszűntették. 0,1nmol/patkány TICPψ-nek nem volt potencírozó hatása, ez a δ ligandok hatásának dózisfüggésére utal.
4. Megmértük a TICPψ δ receptor iránti affinitását MVD preparátumon (0,15 ± 0,02nM). Mivel ez a δ receptor affinitás két nagyságrenddel nagyobb a μ antagonista CTAP μ affinitásánál (34,25 ± 8,59nM) feltételezhető, hogy tiszta δ receptor aktivitást in vivo sem gátolna gyengébben, mint a CTAP a DAMGO hatását. A CTAP pA_2 értéke DAMGO ellen spinálisan adva 10,6, amely azt jelenti, hogy 25pmol/állat CTAP már kétszeresére növeli a DAMGO ED_{50} értékét. Ezért a potencírozáshoz szükséges 1nmol/állat TICPψ feltűnően nagy dózis ahhoz, hogy hatását pusztán δ receptoron fejtené ki.

Következtetések:

1. A δ ligandok potencírozó vagy gátló hatása nem függ eredeti, agonista vagy antagonista δ profiljuktól. Ez arra utal, hogy hatásukat a δ receptortól eltérő receptorstruktúrán hozzák létre.
2. A δ receptortól eltérő struktúrára utal, hogy a DAMGO hatás potencírozásához vagy gátlásához szükséges δ ligand dózisok feltűnően nagyok, amely az in vitro bioassay alapján kapott eredményekkel nincs összhangban. Patkányban, spinálisan, dózisfüggést is sikerült kimutatni.
3. A δ receptorok jelenlétére azonban egyértelműen utal a TICPψ DPDPE hatást gátló hatása morfintoleráns egérben.
4. Hipotézisünk szerint a morfintolerancia kialakulás során létrejövő μδ komplexeken a δ ligandok receptorkinetikai paraméterei eltérnek a δ receptoron mérhetőktől, és a μδ komplexek létrejötte az irodalomban közölt felvetésekkel szemben nem potencírozó, hanem gátló hatást eredményez a szelektív μ agonista DAMGO antinociceptív hatására.

Budget: 3.000,000.- HUF

THE ROLE OF INTERACTIONS BETWEEN MU AND DELTA OPIOID RECEPTORS IN THE DEVELOPMENT OF OPIOID RECEPTORS

Pál Riba, Susanna Fürst, Júlia Timár, Mahmoud Al-Khrasani, Kornél Király
Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, Semmelweis University

In this project we studied the interactions between μ and δ opioid receptors in mice and rats at spinal and supraspinal levels during the development of tolerance to morphine. We also wanted to further clarify the role of μδ heterodimers in the development of opioid tolerance.

Different opioid receptors may interact with each other. Receptors located on the same neuron may be responsible for local interactions and the physical association of these receptors cannot be ruled out. The opioid receptor interactions may play a role in the development of opioid tolerance. There are several findings that proves the interactions, e.g. co-administration of δ antagonists with morphine decreased the tolerance level developing against the antinociceptive effect of morphine or the potentiating synergism between the μ agonist peptide DAMGO and the δ agonist peptide DPDPE observed in naïve animals disappeared by morphine treatment.

With the planned experiments we intended to prove or discard the following hypothesis: Chronic morphine treatment increases the number of δ receptors in the mouse spinal cord and the μ receptor density does not decrease within 5 days. That may increase the possibility of the physical association of μ and δ receptors forming dimers in a higher extent than in non-tolerant animals. The number of μ receptor monomers may decrease providing a virtual down-regulation. If the affinity (the strength of receptor binding) or the efficacy (the capability of receptor activation) of the selective μ agonist DAMGO on a μδ complex are significantly lower than on μ receptor monomers then higher antinociceptive ED_{50} value should be observed. Binding of the ligands changes the conformation of the ligand-coupled receptors so a given ligand may change the conformation that favors the formation of μδ complexes; other δ ligands, on the contrary, may disrupt the already existing complexes. Based on this hypothesis a δ ligand (1) may stimulate the formation of the μδ complexes, (2) has no effect on the receptor density, (3) disconnect the complex.

During the project the following results have been obtained:

1. We have studied the effects of selective δ ligands (agonists: DPDPE, deltorphin II, $Ile^{5,6}$-deltorphin II; antagonists: TIPP, TIPPψ, TICPψ) on the spinal and supraspinal antinociceptive effect of the μ agonist DAMGO in naïve and morphine-tolerant mice as well as the spinal effects of δ ligands in naïve and morphine-tolerant rats by the tail-flick test.
2. In mouse vas deferens (MVD) bioassay system we have measured the affinities of the δ antagonist TICPψ and the μ antagonist CTAP in order to properly interpret the data obtained from in vivo experiments.

Methods:

1. MVD bioassay: We measured the affinities of TICPψ and CTAP for δ and μ receptors.
2. Tolerance development in rats: male Wistar rats weighing 150-200g were treated for 4 days by incrementing doses of twice daily subcutaneous morphine injections (1st day: 2x50μmol/kg, 2nd day: 2x100μmol/kg, 3rd and 4th day: 2x200μmol/kg).
3. Tolerance development in mice: male NMRI mice weighing 20-25g were treated for 3 days by twice daily fix dose subcutaneous morphine injections (2x200μmol/kg).
4. Antinociceptive test: tail-flick.
5. Administration of the materials during the experiments: both non-tolerant and tolerant mice and rats received the reference μ agonist DAMGO intrathecally (i.t.) or intracerebroventricularly (i.c.v.). The antinociceptive effect was determined 20 minutes after the injection. ED_{50} values and the 95% confidence intervals were determined by the curve-fit method of GraphPad Prism 3.0 applying minimum 3 doses of DAMGO. We also calculated the average ED_{50} values and their standard errors if there were 3 or more experiments of the same setting. Interactions were studied by adding fix dose δ ligands the respective (either i.t. or i.c.v.) way.

Results:

1. The effect of selective, i.t. given δ ligands on the antinociceptive effect of the i.t. given DAMGO in naïve and morphine-tolerant mice:
   a. In naïve animals neither potentiation nor antagonism could be observed; none of the δ ligands influenced the effect of DAMGO (ED_{50}: 0.044±0.006 nmol/mouse n=15)
   b. In morphin-tolerant animals 1nmol/mouse deltorphin II did not influenced (0.194 [0.147-0.256] vs. 0.182 [0.119-0.279]nmol/mouse), 0.5nmol/mouse DPDPE inhibited (maximal DAMGO effect 20-40%), 1nmol/mouse TIPP or 1nmol/mouse TICPψ potentiated the effect of DAMGO (0.141 [0.085-0.227] vs. 0.028 [0.016-0.051]nmol/mouse). 1nmol/mouse TICPψ inhibited the inhibitory effect of DPDPE; the DAMGO dose-effect curve fell between those of obtained in naïve and morphine-tolerant mice.
2. The effect of selective, i.c.v. given δ ligands on the antinociceptive effect of the i.c.v. given DAMGO in naïve and morphine-tolerant mice:
   a. In naïve animals neither potentiation nor antagonism could be observed.
   b. In morphin-tolerant mice 1nmol/mouse DPDPE significantly (DAMGO ED_{50}: 0.097 [0.078-0.119]nmol/mouse vs. 0.054 [0.045-0.065]nmol/mouse), while 1nmol/mouse TIPPψ not significantly but showing a tendency potentiated the effect of DAMGO (DAMGO ED_{50}: 0.107 [0.091-0.125]nmol/mouse vs. 0.071 [0.054-0.094]nmol/mouse). The effect of DPDPE is the opposite to that observed in the spinal cord of morphine-tolerant mice; supraspinally DPDPE also potentiated the effect of DAMGO.
3. The effect of selective, i.t. given δ ligands on the antinociceptive effect of the i.t. given DAMGO in naïve and morphine-tolerant rats:
   The average level of tolerance was 3.5-fold, similarly to the mice. (DAMGO ED_{50} naïve: 0.041±0.006nmol/rat; tolerant: 0.14±0.023nmol/rat). Both in naïve and tolerant rats similar level of potentiation could be measured. DPDPE, TICPψ and $Ile^{5,6}$-deltorphin II decreased the DAMGO ED_{50} to 0.008-0.02nmol/rat in naïve animals, to 0.033-0.07nmol/rat in tolerant rats; the latter is the same that was measured in naïve rats without adding a δ ligand; the spinal tolerance was eliminated. 0.1nmol/rat TICPψ had no potentiating effect that may indicate the dose-dependent effect of the δ ligands.
4. We have measured the affinity of TICPψ for δ receptor in MVD bioassay (0.15±0.02nM). Since this δ receptor affinity is two orders of magnitude higher than the affinity of the μ antagonist CTAP for μ receptor (34.25±8.59nM) it may be assumed that TICPψ would not inhibit any "pure" δ receptor activity in vivo weaker than CTAP would inhibit the effect of DAMGO. The pA_2 value of CTAP against DAMGO given i.t. is 10.6 meaning that 25pmol/animal CTAP could double the ED_{50} value of DAMGO. Therefore 1nmol/animal TICPψ needed for potentiation is a very high dose to act on sole δ receptors only.

Conclusions:

1. The potentiating or inhibitory effects of δ ligands do not depend on their original, agonist or antagonist δ profiles. That raises the possibility that their effects are exerted on receptor structures different from δ receptors.
2. The receptor structure different from δ receptors is further supported by the doses of δ ligands necessary to inhibit or potentiate the effect of DAMGO. These doses are way too high from those someone would estimate based on the data obtained by the in vitro bioassay experiments. In rat spinal cord we could even show dose-dependence.
3. The presence of δ receptors is indicated though by the inhibitory effect of TICPψ on the effect of DPDPE in morphine-tolerant mice.
4. According to our hypothesis the receptorkinetic parameters of the δ ligands are different from those measured on δ receptors and the formation of μδ complexes does not have – contrary to the assumptions written in the scientific literature –a potentiating but a inhibitory effect on the antinociceptive action of the selective μ agonist DAMGO.

Teljes támogatás: 3 000 000 Ft

A SNAP25 GÉN POLIMORFIZMUSÁNAK MOLEKULÁRIS VIZSGÁLATA ÉS LEHETSÉGES SZEREPE KÉT NÉPBETEGSÉG, A DIABETES MELLITUS ÉS A MAJOR DEPRESSZIÓ HÁTTERÉBEN

Rónai Zsolt[1]
[1] Semmelweis Egyetem, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet

A SNAP25 alapvető szerepet játszik a vezikuláris exocitózis során, így a központi idegrendszer egyik nélkülözhetetlen fehérjéje, de emellett más sejttípusokban is kimutatható (inzulint szekretáló és inzulin érzékeny szövetek). Ezért merül föl, hogy a *SNAP25* gén polimorfizmusai számos népbetegség: pszichiátriai zavarok, metabolikus szindróma illetve cukorbetegség rizikófaktorai lehetnek.
A kutatómunka egyik fő célpontja a gén 3' UTR szakaszában lévő két polimorfizmus – rs3746544 G/T („*Mnl* I") és rs1051312 C/T („*Dde* I") – elemzése volt. Ezek biológiai szerepét azért tételeztük fel, mert *in silico* szekvencia analízis alapján a régió 2 mikroRNS (miR), a miR-510 és a miR-641 kötőhelyéül szolgál. A két SNP egyidejű elemzésére ill. haplotípusának meghatározására real-time PCR alkalmazásán alapuló eljárást dolgoztunk ki. A két polimorfizmus speciális kapcsoltságát figyeltük meg. Noha az allél gyakoriság értékek alapján mind a négy haplotípus előfordulása várható volt, az általunk vizsgált egészséges populációban (N = 482) a G–C haplotípus nem volt kimutatható. A két SNP között ugyanakkor nincs teljes kapcsoltság, mivel a másik három haplotípus megtalálható a vizsgált csoportban. Az általunk kidolgozott TaqMan próbák alkalmazásán alapuló haplotipizáló módszert a *Dde* I, *Mnl* I ill. a G–C haplotípusra specifikus *Sau*96 I PCR–RFLP technikával ellenőriztük. A technika megbízhatóságát irányított mutagenezissel előállított DNS-konstrukciók segítségével is megerősítettük, és így bizonyítottuk, hogy a G–C haplotípus valóban nem fordul elő az általunk vizsgált populációban.
A kidolgozott módszer alkalmazásával eset–kontroll vizsgálat keretében elemeztük, hogy kimutatható-e asszociáció a két SNP és a depresszió között. 341 egészséges és 252 depresszióban szenvedő beteg genotípusát határoztuk meg, és χ^2-statisztikával elemeztük a genotpíus ill. haplotípus gyakoriságok eloszlását. Megállapítottuk, hogy T–C haplotípus szignifikánsan (p = 0,024) gyakrabban fordul elő a betegek körében, mint a kontroll csoportban. A klinikai diagnosztikus kategóriák sok esetben összetettek, és genetikai hátterük nehezebben meghatározható, ezért az asszociáció vizsgálatok során előnyös a jobban definiált, pontosan mérhető ún. endofenotípusok elemzése. 624 személy vizsgálata során szignifikáns asszociációt (ANOVA: p = 0,013) mutattunk ki a két SNP által alkotott haplotípus kategóriák ill. a Barratt-skálával mért impulzivitás között.
Az asszociáció vizsgálatok illetve az *in silico* eredmények alapján a két SNP mikro-RNS kötődésre kifejtett funkcionális hatását *in vitro* sejtes rendszerben vizsgáltuk. Ennek elemzéséhez pGL3-Control ill. pMIR-REPORT vektorokba klónoztuk a SNAP25 gén teljes 3' UTR szakaszát, és „Quick Change" irányított mutagenezissel létrehoztuk a négy – elméletileg – lehetséges változatot. A tranziens transzfekciós kísérleteket HEK293 humán embrionális vese sejtvonalban végeztük el, miR-641-t valamint belső kontrollként β-galaktozidázt expresszáló konstrukciót kotranszfektáltunk. A miR-641 seed szekvenciájának felismerő helye T–T haplotípus esetén jelenik meg tökéletesen a gén 3' UTR szakaszában. A kötőhelyet mindkét polimorfizmus érinti: a C–T és a T–G haplotípus egy-egy pozícióban, míg a G–C haplotípus 2 helyen változtatja meg ezt a szakaszt. Kontrollként elkészítettük az ún. „seed mutáns" konstrukciót is, melyben a miR-641 hét nukleotid hosszúságú felismerőhelyének mindegyik nukleotidját megváltoztattuk, valamint egy olyan konstrukciót is alkalmaztunk, amely a *SNAP*25 3' UTR régiója helyett egy azonos hosszúságú, de teljesen független DNS-szakaszt tartalmaz a luciferáz gén mögött. Legalacsonyabb relatív luciferáz aktivitást T–T haplotípus esetén mértünk, a C–T és T–G haplotípusokhoz tartozó érték ugyan ennél 1,8 ill. 2,1-szer magasabb volt, ez a különbség nem bizonyult szignifikánsnak (ANOVA: p > 0,05). A miR-641 kötődést két pozícióban elrontó változat relatív aktivitás értéke 4,6-szer magasabb volt a T–T haplotípushoz képest, ez az eltérés a statisztikai analízis során szignifikánsnak mutatkozott (ANOVA: p < 0,001), és lényegében megegyezett a kontroll konstrukciókkal mérhető értékekkel. A

sejtes rendszerben végzett kísérletek tehát megerősítették az *in silico* elemzés megfigyeléseit, miszerint az rs3746544 és rs1051312 SNP-k befolyásolják a miR-641 kötődésének hatékonyságát.
A *SNAP25* genetikai elemzését kiterjesztettük a gén 5' szabályozó és kódoló szakaszaira is. Az 5' régióban irodalmi források valamint az Ensembl, a HapMap és az NCBI SNP adatbázisok alapján a –2228. pozícióban lévő rs6077690 A/T valamint a kódoló szakaszoz közelebb (–523.) elhelyezkedő rs6039769 A/C SNP-t vizsgáltuk. Az rs6077690 SNP elemzésére *Tsp*509 I restrikciós endonukleáz alkalmazásával PCR-RFLP-t dolgoztunk ki, és gélelektroforézis segítségével elemeztük a hasítási mintázatot. Az rs6039769 polimorfizmust TaqMan próbák alkalmazásával elemeztük (Applied Biosystems C__29497348_10). Cukorbeteg (T2DM – 2-es típusú diabetes mellitus) és egészséges személyek (N = 422) elemzésével végzett asszociációvizsgálat során nem találtunk szignifikáns asszociációt a genotípusok eloszlása között az egészséges ill. a cukorbeteg populációban.
A fehérjét kódoló szakasz aminosav cserét okozó polimorf variánsai ritkábbak, mivel a fehérje elsődleges szerkezetének megváltozása sok esetben jelentős funkcióromláshoz vezet. A fent említett források alapján az rs1051268 G/A (p.D65N) SNP-t vizsgáltuk, mely a fehérje 65. aminosavát aszparaginsavról aszparaginra változtatja. Eredményeink alapján azonban a gén ezen pontja nem bizonyult polimorf variánsnak az általunk vizsgált populációban.
A SNAP25 variációihoz genetikai polimorfizmusai mellett az is hozzájárul, hogy génjéről – alternatív splicing útján – két eltérő transzkripciós variáns keletkezhet. A képződő fehérjék 9 aminosavban különböznek, ami a fehérjék működésében is megnyilvánul. Irodalmi adatok alapján két variáns eltérő expressziója figyelhető meg az embriogenezis során ill. születés után, valamint azt is kimutatták, hogy az rs6039769 SNP CC genotípusa megnövekedett SNAP25 2. variáns expresszióhoz vezet. A két transzkripciós variáns expressziójának elemzésére két független eljárást, egy real-time PCR-en illetve egy PCR-en és azt követő elektroforetikus elemzésen alapuló technikát dolgoztunk ki. A real-time PCR-en alapuló eljárás során a detektáláshoz SybrGreen fluoreszcens festéket alkalmaztunk, és a primereket úgy terveztük meg, hogy azok 3' végén lévő két vagy három egymás mellett lévő nukleotidja specifikusan csak a megfelelő transzkripciós variánssal legyen komplementer. A másik eljárás során a primereket ezzel szemben olyan régióra terveztük, amelyek mindkét variánsban azonosak, a képződő terméket pedig *Dde* I restrikciós endonukleázzal emésztettük. Ez az enzim csak az 1-es variánsról képződő terméket hasítja (371 bp + 160 bp), míg a 2-es variáns esetén nem történik emésztés (531 bp), így a hasított és hasítatlan termékek mennyiségének meghatározása alapján a 2 forma aránya megállapítható. A két eljárás segítségével kimutattuk, hogy a fehérje legnagyobb mennyiségben a központi idegrendszerben van jelen, és itt a 2. variáns szintje magasabb. A perifériás szervek közül viszonylag magas expresszió (a központi idegrendszerinek kb. 1%-a) mutatható ki a májban, és ennél további egy-két nagyságrenddel alacsonyabb kifejeződés figyelhető meg a lépben, vesében, szív- és vázizom rendszerben. Ezen szövetekben viszont az 1. forma expressziója bizonyult magasabbnak. Kísérleteink alapján a két eljárás hatékonyan alkalmazható az egyes transzkripciós variánsok expressziójának nyomon követésére.

Tudományos folyóiratban megjelent közlemények:
Elek Z, Brauswetter D, Kovács-Nagy R, Nagy G, Székely A, Somogyi A, Rónai Z, Sasvári-Székely M. MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 2: pp. 99-104. (2010) IF: 0
Kovacs-Nagy R, Sarkozy P, Hu J, Guttman A, Sasvari-Szekely M, Ronai Z. ELECTROPHORESIS 32:(15) pp. 2013-20. (2011) IF: 3,569
Kongresszusi poszterek:
Németh N, Rónai Z, Sasvári-Székely M. XIV. Magyar Neuropszichofarmakológiai Kongresszus. Tihany, 2011. október 6–8. NEUROPSYCHOPHARMACOLOGIA HUNGARICA: XIII. Suppl 2. (2011) IF: 0
Nagy R, Nagy G, Hu J, Sasvári-Székely M, Somogyi A. Magyar Diabetes Társaság XX. Jubileumi Kongresszusa. Tihany, 2010. április 22–25.
Kovács-Nagy R, Nagy G, Hu J, Rónai Z, Somogyi A, Sasvári-Szélely M. Magyar Biokémiai Egyesület 2010. évi Vándorgyűlése, Budapest, 2010. augusztus 25–28.

Budget: 3 000 000 Ft

MOLECULAR ANALYSIS OF SNAP25 GENE POLYMORPHISMS AND THEIR PUTATIVE ROLE IN TWO COMMON DISEASES, DIABETES MELLITUS AND MAJOR DEPRESSION

Zsolt Rónai[1]
[1] Semmelweis University, Department of Medical Chemistry, Molecular Biology and Pathobiochemistry

SNAP25 plays a crucial role during vesicular exocytosis, consequently it plays a significant role in neuronal processes, however the protein can be detected in other cell types, such as insulin secreting and insulin dependent tissues as well. This concludes to the possibility that polymorphisms of *SNAP25* gene might be the genetic risk factors of several complex diseases, such as psychiatric disorders, metabolic syndrome and diabetes mellitus.

One of the major aims of the project was the investigation of two SNPs, rs3746555 G/T ("*Mnl* I") and rs1051312 C/T ("*Dde* I") in the 3' UTR of the gene. Putative biological significance of these polymorphisms was suggested by *in silico* sequence analysis, which demonstrated that the flanking region of the two SNPs is the binding site of micro-RNA (miR) 510 and miR-641. Real-time PCR based method was elaborated for the simultaneous genotype and haplotype analysis of the 2 SNPs. An unusual linkage of the two polymorphisms was observed. Although the occurrence of all 4 haplotype combinations was expectable based on allele frequency values, interestingly the G–C haplotype could not be detected in our population. On the other hand there was no complete linkage disequilibrium between the two loci, as the other three combinations could be demonstrated. The elaborated real-time PCR based technique was verified using *Dde* I, *Mnl* I and *Sau*96 I PCR–RFLP methods, the latter one is specific for the G–C haplotype. Moreover DNA-constructs with the four variants were generated by site directed mutagenesis, and it was conformed that the G–C haplotype is completely missing in our population.

The novel method was employed to investigate the putative association between the 2 SNPs and bipolar depression. 341 controls and 252 patients were analyzed, genotype distribution in the two groups was determined by χ^2-statistics. It was observed that the T–C haplotype is more frequent in the patient group ($p = 0.024$). Diagnostic categories used in the clinical practice are however often too complex, and their genetic background can not be identified, consequently the analysis endophenotypes can be more favorable, as they are more precisely defined and easier to be measured. 624 healthy patients were included in this analysis and it was shown that a significant association can be detected between the haplotype categories and the impulsivity endophenotype characterized by the Barratt-scale (ANOVA: $p = 0.013$).

In vitro studies employing cell cultures were carried out to investigate the effect of the two SNPs on miR binding. The complete 3' UTR region of *SNAP25* was cloned in pGL3-Control and pMIR-REPORT luciferase constructs, and Quick Change mutagenesis was applied to generate the 4 – theoretical – haplotype combinations. HEK293 cell line was used for transient transfection, β-galactosidase as internal control, as well as miR-641 were co-transfected. Recognition site of the seed sequence of miR-641 is present in the 3' UTR in case of T–T haplotype. Both polymorphisms are included in the binding region: The C–T and the T–G haplotype destroys this site in a single position, whereas two nucleotides are altered in the presence of the G–C haplotype. The "seed mutant" vector was employed as a control, which contains a completely modified binding site (all 7 nucleotide of the seed sequence are changed). Moreover another construct was also used as reference, which contained an independent DNA-sequence with identical length behind the coding sequence of luciferase. The lowest relative luciferase activity could be measured in case of the T–T haplotype (perfect binding). C–T and T–G haplotypes resulted in 1.8 and 2.1 times higher activities, respectively, this difference was however not significant (ANOVA: $p > 0.05$). G–C variant destroyes the binding site at two nucleotides, its activity was 4.6× higher than that of the T–T form, and this difference was statistically significant (ANOVA: $p < 0.001$). The activity of the G–C construct was comparable with that of the control constructs resulting in no miR-641 binding. In con-

clusion, experiments using cell cultures confirmed the suggestion of the *in silico* analysis that rs3746544 and rs1051312 SNPs contribute to the binding off miR-641.

Genetic analysis of *SNAP25* was extended to the coding and 5' regulatory regions of the gene as well. Literature data and databases (Ensembl, HapMap, NCBI dbSNP) were used for SNP selection, we focused on rs6077690 A/T SNP localized at position –2228, and on rs6039769 A/C polymorphism at locus –523. PCR-RFLP technique employing *Tsp*509 I restriction endonuclease was elaborated for the genotype analysis of rs6077690, fragment pattern was analyzed by traditional gel electrophoresis after amplification and digestion. The rs6039769 polymorphism was analyzed by real-time PCR using TaqMan probes (Applied Biosystems C__294973478_10 kit). Patients with type II diabetes mellitus and controls (N = 422) were investigated, however no difference was observed in the genotype distribution of the two sample groups.

Missense polymorphisms of coding regions are less frequent, as they result in the modification of the primary structure of the proteins, which might cause loss of function. Based on considerations and sources mentioned above, thers1051268 G/A (p:D56N) SNP was investigated, which leads to the change of the 65th aminoacid of SNAP25 (aspartate to asparagine). In our population this locus proved not to be polymorphic.

Besides the genetic polymorphisms, two transcript variants generated by alternative splicing also contribute to the variants of SNAP25. These two mRNAs include two distinct regions as exon 5, conseqeuntly the two proteins differ in 9 amino acids, which results in a slightly different protein function. Recent studies have demonstrated the altered expression of the two forms can be shown during embryogenesis and after birth, and it was also shown that the rs6039769 SNP CC genotype caused an elevation of SNAP25 form 2 expression. Two independent techniques were elaborated for the analysis of the expression of the two variants. The real-time PCR based method employed Sybr Green fluorescent dye, and primers were designed in that manner that their 2 or 3 nucleotides at the 3' end were sequence specific for variant 1 or 2, respectively. On the other hand the other method used primers applicable for the amplification of both forms, the obtained product was however digested with *Dde* I endonuclease. This enzyme can digest the amplicons of variant 1 only (371 bp + 160 bp), whereas no digestion occurs in case of form 2 (531 bp), thus the semi-quantitative analysis of the digested and undigested fragments provide information about the ratio of the two SNAP25 mRNAs. Employing the two methods it was demonstrated that the highest expression of SNAP25 can be observed in the central nervous system, expression of variant 2 is more significant. Relatively high expression can be observed in the liver (approximately 1% of the expression measured in the brain), spleen, kidney, heart and muscles showed even lower expression of 1–2 orders of magnitude. In the peripheral tissues the expression of variant 1 proved to be higher. Our experiments suggested that the two methods are readily applicable for the analysis of expression of the two SNAP25 transcription variants.

Scientific publications:

Elek Z, Brauswetter D, Kovács-Nagy R, Nagy G, Székely A, Somogyi A, Rónai Z, Sasvári-Székely M. MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 2: pp. 99-104. (2010) IF: 0

Kovacs-Nagy R, Sarkozy P, Hu J, Guttman A, Sasvari-Szekely M, Ronai Z. ELECTROPHORESIS 32:(15) pp. 2013-20. (2011) IF: 3,569

Poster presentations:

Németh N, Rónai Z, Sasvári-Székely M. XIV. Hungarian Conference on Neuropsychopharmacology. Tihany, October 6–8th 2011. NEUROPSYCHOPHARMACOLOGIA HUNGARICA: XIII. Suppl 2. (2011) IF: 0

Nagy R, Nagy G, Hu J, Sasvári-Székely M, Somogyi A. 20th Congress of the Hungarian Diabetes Society. Tihany, April 22–25th 2010.

Kovács-Nagy R, Nagy G, Hu J, Rónai Z, Somogyi A, Sasvári-Szélely M. Conference of the Hungarian Biochemistry Society, Budapest, August 25–28th 2010.

Teljes támogatás: 2.400.000,- Ft

A MAGYARORSZÁGI RITKA BETEGSÉGEK EPIDEMIOLÓGIAI ÉRTÉKLEÉSE

Sándor János[1], Brunner Péter[2], Bödecs Tamás[3]
[1]Debreceni Egyetem Biostatisztikai és Epidemiológiai Tanszék, [2]Országos Szakfelügyeleti Módszertani Központ, [3]Pécsi Tudományegyetem Egészségtudományi Kar Szülésznő Tanszék

A ritka betegségek (RB) népegészségügyi jelentősége nem jól ismert. Kevés epidemiológiai adat áll rendelkezésünkre, és a RB kontroll hatékonysága sem jól ismeret, ami a hatékony beavatkozások megalapozását hátráltatja. A RB szakpolitikai fejlesztésnek alapját a megbízható indikátorokra épülő egészségi állapot monitorozás jelenthetné. Vizsgálataink során mortalitási, morbiditási, ellátás-szervezési és életminőségi adatokat dolgoztunk fel. Az adatgyűjtési technikák megbízhatóságának értékelését, a vizsgálati végpontok népegészségügyi indikátorként való használatának értékelését tűztük ki célul.

1) A Központi Statisztikai Hivatal teljes országot lefedő 1980-2006 közti időszakra vonatkozó haláloki adatbázisa jelentette a mortalitási feldolgozás alapját. A Ritka Betegségek definiálására a spanyol REpIER által kidolgozott klasszifikációt használtuk. Összesen 44775 esetet és 47 betegségcsoportot elemeztünk.
A 80-as és 90-es években tapasztalható folyamatos javulás miatt a vizsgált periódusban 208/millióról 142/millióra csökkent a RB okozta standardizált halálozás. Az 1996-os BNO9-BNO10 váltás nem okozott változást a regisztrált RB halálozásban. Viszont a 2005-ben bevezetett automatikus haláloki kódolás szignifikáns mértékben (30%-kal) emelte a regisztrált halálozást. A RB halálozás későbbi életkorra tolódott. A csecsemőkori halálozás a kezdeti 615/millióról (a ritka betegségek okozta halálozás 28,3%-a következett be 1 éves kor alatt) 147/millióra csökkent (2005-2006-ban az RB halálesetek 9%-át regisztrálták 1 éves kor alatt), a halálozás átlagos életkora pedig 37,3 évről 57,7 évre emelkedett. A 80-as évek elején évente megfigyelt 66120 RB-hez kapcsolódó potenciális életév veszteség 2006-ra 21900-re csökkent.
A javuló ellátásnak köszönhetően hosszabb élettartam miatt a RB, mint társadalmi jelenség átalakult, amire a szociális ellátás, az oktatás, a munkaügy rendszereinek reagálni kell.

2) A Gyógyszerészeti és Egészségügyi Minőség- és Szervezetfejlesztési Intézet által rendelkezésünkre bocsátott járó- és fekvőbeteg szakellátás teljesítmény-elszámolás során 2004-2010-ban keletkezett adatbázis segítségével értékeltük az E70-90, G10-13, G70-73, Q00-99; és 18 év alatti betegek esetén a C00-D48 BNO10-es kódú betegségcsoportok ellátási specifikumait.
Az elemzett betegségek közül sok esetben találtuk a regisztrált prevalenciát a nemzetközi referencia értékekhez képest alacsonynak (sclerosis tuberosa, Marfan-szindróma, von Recklinghausen kór). Ezek a kórképek csak korlátozott megbízhatósággal vizsgálhatók a teljesítmény-elszámolás rendszerén keresztül. Más betegségeknél viszont az epidemiológiai jellemzők is jól tanulmányozhatók így, mert a kórképek regisztrált prevalenciája a várható tartományban volt. (epidermolysis bullosa, fibrosis cystica, myasthenia gravis, Down-szindróma, gyerekek agytumora, gyermekkori limfoid leukémiák) A RB-ek 50%-a 25 szakellátó központban kapott ellátást, amihez a betegek 80%-ának 50 km-nél nem kellett többet utaznia. Az intézményekben alkalmazott beavatkozások spektruma, az ellátás igénybevételének gyakorisága, az egy betegre jutó finanszírozás jelentős változékonyságot mutatott. A centrumoktól távolabb lakók életkilátásai rosszabbak voltak, mint a centrumhoz közel lakóké. (myasthenia gravis esetén 6 évvel, fibrosis cystica esetén 19 évvel fiatalabb korban haltak meg a betegek, ha 100 km-rel távolabb laktak az ellátó intézménytől)
Adataink szerint az ellátás centrumszerűen zajlik, de a centrumokkal szembeni minőségi követelmények érvényesítése nélkül. Az akkreditációs rendszer kiépítése szükséges és részben a teljesítmény-elszámolás rendszerén keresztül monitorozható lenne.

Teljes támogatás: 2.400.000,- Ft

3) Az Eurordis által indított EurordisCare2 vizsgálat célja a diagnosztikus késedelem és helyes diagnózishoz vezető út körülményeinek leírása volt az európai országokban. A hazai felmérés 5 indikátor betegség (fibrosis cystica, sclerosis tuberosa, Williams szindróma, retinitis pigmentosa, Duchenne muscularis dystrophia) bevonásával valósult meg. Az adatok feldolgozása az európai vizsgálat szerint történt, leíró statisztikai módszerekkel (528 betegből 252 vett részt a felmérésben; 47,7%-os válaszadási arány)
A betegek 50%-ának 490 napot (min:155, max: 1825), míg 75%-uknak már 1795 napot (406-6205) kellett várniuk a helyes diagnózisra. (Európai referencia tartomány, EUR: 45-5040, illetve 450-10080) A betegek 79,7%-a nem kapott korai diagnózist. Közülük 62-nek (30,8%) téves volt az első diagnózisa. (EUR: 41%) A betegek 19,9%-a (40 fő) költött sokat a helyes diagnózis keresése során. (EUR: 10%) A betegek 34,8%-ának (70 fő) kellett lakóhelyén kívüli régióba utaznia. (EUR: 26%.) Hazánkban a betegek 27,4%-a (69 fő) találta összességében nem megfelelőnek a diagnózis közlésének körülményeit. (EUR: 35%.)
A vizsgálatunk során kapott hazai eredmények nem különböznek jelentősen az európai eredményektől, azaz Magyarországon (ugyanúgy, mint Európában) szükséges a RB-ben szenvedők ellátásának javítása, a jól szervezett betegutak kialakítása.

Közlemények:

1. Péntek E, Tigyi Zné, Máté O, Sándor J. Egészségügyi Gazdasági Szemle 47: 8-14, 2009.
2. Bödecs T, Cser K, Sándor J, Horváth B. Mentálhigiéné és Pszichoszomatika 10: 63-76, 2009.
3. Bödecs T, Horváth B, Kovács L, Diffellné Németh Marietta, Sándor J. Orvosi Hetilap 150: 1888-1896, 2009.
4. Bödecs T, Horváth B, Kovács L, Diffellné Németh M, Sándor J. Egészségfejlesztés, 5-6: 33-40, 2009.
5. Ádány R, Boncz I, Dózsa Cs, Kozmann Gy, Nagymajtényi L, Sándor J, Repa I, Tompa A, Kovács A. Népegészségügy 87: 284-290, 2009.
6. Karpati K, Sandor J. International Journal of Technology Assessment in Health Care, 25 (4): 596-597, 2009. IF: 1,439
7. M. Banati, J. Sandor, A. Mike, E. Illes, L. Bors, A. Feldmann, R. Herold, Z. Illes. European Journal of Neurology, 17: 426-433, 2009. IF: 3,765
8. Bödecs T, Horváth B, Szilágyi E, Sándor J. Orvosi Hetilap, 151: 494-500, 2010.
9. Bödecs T, Horváth B, Szilágyi E, Diffelné Németh M, Sándor J. Mentálhigiéné és Pszichoszomatika 11: 17-30, 2010.
10. Harjánné Brantmüller É, Máté O, Sándor J. Védőnő, 20: 13-17, 2010.
11. Harjánné Brantmüller É, Máté O, Sándor J. Képzés és Gyakorlat, 8: 37-46, 2010.
12. Harjánné Brantmüller É, Nagy I, Petőné Csima M, Sándor J. Védőnő, 23: 7-15, 2010.
13. Bödecs T, Máté O, Horváth B, Kovács L, Rihmer Z, Sándor J. International Journal of Psychiatry in Clinical Practice, 14: 102-108, 2010. IF: 0,327
14. S. Funke, E. Flach, J. Sándor, G. Vida, T. Ertl. Early Human Development, 86: 547-550, 2010. IF: 1,587
15. A Csomos, Sz Varga, G Bertolini, C Hibbert, J Sandor, M Capuzzo, B Guidet. Intensive Care Medicine, 36: 1759-1764, 2010. IF: 4,996
16. Bödecs T, Horváth B, Szilágyi E, Gonda X, Rihmer Z, Sándor J. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 154: 45-50, 2010. IF: 1,764
17. Posada de la Paz M, Villaverde-Hueso A, Alonso V, Janos S, Zurriaga O and Abaitua-Borda. Advances in Experimental Medicine and Biology, 686:17-39, 2010. IF: 2,020
18. Bödecs T; Horváth B; Szilágyi E; Diffellné Németh M; Sándor J. Maternal and Child Health Journal, DOI 10.1007/s10995-010-0698-0, 2010. IF: 2,133
19. Hajas A, Sandor J, Csathy L, Csipo I, Barath S, Paragh G, Seres I, Szegedi G, Shoenfeld Y, Bodolay E. Autoimmunity Reviews, 10: 317-324, 2010. IF: 6,556

Budget: 2,400,000.- HUF

EPIDEMIOLOGICAL EVALUATION OF THE RARE DISEASES IN HUNGARY

János Sándor[1], Péter Brunner[2], Tamás Bödecs[3]
[1]University of Debrecen, Department of Biostatistics and Epidemiology, [2]National Centre for Healthcare Audit and Inspection, [3]University of Pecs, Faculty of Health Sciences, Department of Midwifery

The public health importance of rare diseases (RD) is not known properly. Their epidemiological characteristics are hardly described and the RD control effectiveness is also not well understood. The rational interventions' establishment is constrained due to this lack of knowledge. The RD health policy should be based on the regular monitoring of reliable indicators. Our investigations processed mortality, morbidity, health service operation and life quality data in order to evaluate the opportunities of RD indicator development, and their possible usage in public health monitoring.

1) The Hungarian Central Statistical Office provided the cause specific mortality database of the period of 1980-2006 which covered the whole country. The ICD based RD definition of REpIER had been applied. Altogether, 44775 cases of 47 disease groups had been analyzed.
Due to the steady improvement during the study period the standardized RD death rate has been decreased from 208/million to 142/million. The replacing of the ICD9 with ICD10 in 1996 had not elicited discontinuation in mortality trends. But, the introduction of the automated cause of death coding in 2005 (replacing the former manual coding) had significantly increased (30%) the registered RD mortality. The RD caused death had been postponed. The infants' RD mortality decreased from 615/million in 1980 (28.3% of RD death had been registered among infants) to 147/million in 2005-2006 (9% of RD death had been registered among infants). The average age at death had been decreased from 37.3 year to 57.7 year, as well. The lost years by premature death reduced form 66120 year in 1980 to 21900 in 2006.
The mortality trends clearly demonstrated that the life expectancy of RD patients improved due to the development of health services. The nature of RD as social phenomenon had transformed and the social services, educational institutions and labour organizations should react to this alteration.

2) National Institute for Quality- and Organizational Development in Healthcare and Medicines provided the hospital and outpatient centre discharge records for 2004-2010 years covering the whole country. The records containing ICD10 codes of E70-90, G10-13, G70-73, Q00-99, and C00-D48 for children (≤18) had been analyzed. The pathways, the applied interventions had been evaluated primarily.
Calculating the registered prevalence, a lot of disease showed lower occurrence than international reference level (tuberous sclerosis, Marfan syndrome, von Recklinghausen syndrome). The indicators produced for these syndromes have limited reliability, and their interpretation has to be careful. On the other hand, there were diseases with registered prevalence corresponding to the reference values (epidermolysis bullosa, cystic fibrosis, myasthenia gravis, Down syndrome, childhood brain tumours, childhood lymphoid leukaemia). The indicators for these disorders seem to be fairly reliable. Not more than 25 institutions provided the care for 50% of RD patients, and the distance between the institution and residential place was not longer than 50 km for 80% of RD patients. The spectrum of applied interventions, the frequency of health care usage and the per capita financing showed wide variability. The life expectancy of patients living fare from the institutions proved to be significantly shorter (average age at death decreased by 6 and 19 years for myasthenia gravis and cystic fibrosis, respectively, for 100 km distance increase).
On the basis of our study, the Hungarian RD care is highly centralized, but the centres are not obliged to meet quality criteria. The setup of an accreditation system is required. This system could be at least partly monitored by the discharge records based indicators.

3) The European survey of EurordisCare2 on the diagnostic delay and on the difficulties faced the patients during looking for the RD diagnosis had been managed by the Eurordis. The Hungarian survey involved 5 disorders (cystic fibrosis, tuberous sclerosis, Williams' syndrome, retinitis pigmentosa, Duchenne muscular dystrophy). The data processing followed the European survey's protocol, and applied descriptive statistics. The response rate was 47.7% (252 responded of the 528 targeted patients).
The diagnostic delay in Hungary was 490 (range: 155-1825) and 1795 (range: 406-6205) days for 50% and 75%, respectively. The corresponding European reference ranges (EUR) were 45-5040 and 450-10080 days. The diagnosis was late for 79.7% of cases, and the first diagnosis proved to be mistake for 62 of them (30.8%). (EUR: 41%) The financial burden was extreme according to the opinion of 40 Hungarian patients (19.9%) during delay. (EUR=10%) The regional border had to be crossed by the 34.8% (N=70) of cases to get diagnosis. (EUR=26%) The communication method was unacceptable according to the 27.4% (N=69) of Hungarian patients. (EUR=35%)
The Hungarian diagnostic delay related indicators showed similar pattern as the European indicators did. Consequently, the Hungarian RD care has to be improved as the European. The elaboration of very complex RD diagnostic processes can not be avoided.

References:

1. Péntek E, Tigyi Zné, Máté O, Sándor J. Egészségügyi Gazdasági Szemle 47: 8-14, 2009.
2. Bödecs T, Cser K, Sándor J, Horváth B. Mentálhigiéné és Pszichoszomatika 10: 63-76, 2009.
3. Bödecs T, Horváth B, Kovács L, Diffellné Németh Marietta, Sándor J. Orvosi Hetilap 150: 1888-1896, 2009.
4. Bödecs T, Horváth B, Kovács L, Diffellné Németh M, Sándor J. Egészségfejlesztés, 5-6: 33-40, 2009.
5. Ádány R, Boncz I, Dózsa Cs, Kozmann Gy, Nagymajtényi L, Sándor J, Repa I, Tompa A, Kovács A. Népegészségügy 87: 284-290, 2009.
6. Karpati K, Sandor J. International Journal of Technology Assessment in Health Care, 25 (4): 596-597, 2009. IF: 1,439
7. M. Banati, J. Sandor, A. Mike, E. Illes, L. Bors, A. Feldmann, R. Herold, Z. Illes. European Journal of Neurology, 17: 426-433, 2009. IF: 3,765
8. Bödecs T, Horváth B, Szilágyi E, Sándor J. Orvosi Hetilap, 151: 494-500, 2010.
9. Bödecs T, Horváth B, Szilágyi E, Diffelné Németh M, Sándor J. Mentálhigiéné és Pszichoszomatika 11: 17-30, 2010.
10. Harjánné Brantmüller É, Máté O, Sándor J. Védőnő, 20: 13-17, 2010.
11. Harjánné Brantmüller É, Máté O, Sándor J. Képzés és Gyakorlat, 8: 37-46, 2010.
12. Harjánné Brantmüller É, Nagy I, Petőné Csima M, Sándor J. Védőnő, 23: 7-15, 2010.
13. Bödecs T, Máté O, Horváth B, Kovács L, Rihmer Z, Sándor J. International Journal of Psychiatry in Clinical Practice, 14: 102-108, 2010. IF: 0,327
14. S. Funke, E. Flach, J. Sándor, G. Vida, T. Ertl. Early Human Development, 86: 547-550, 2010. IF: 1,587
15. A Csomos, Sz Varga, G Bertolini, C Hibbert, J Sandor, M Capuzzo, B Guidet. Intensive Care Medicine, 36: 1759-1764, 2010. IF: 4,996
16. Bödecs T, Horváth B, Szilágyi E, Gonda X, Rihmer Z, Sándor J. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 154: 45-50, 2010. IF: 1,764
17. Posada de la Paz M, Villaverde-Hueso A, Alonso V, Janos S, Zurriaga O and Abaitua-Borda. Advances in Experimental Medicine and Biology, 686:17-39, 2010. IF: 2,020
18. Bödecs T; Horváth B; Szilágyi E; Diffellné Németh M; Sándor J. Maternal and Child Health Journal, DOI 10.1007/s10995-010-0698-0, 2010. IF: 2,133
19. Hajas A, Sandor J, Csathy L, Csipo I, Barath S, Paragh G, Seres I, Szegedi G, Shoenfeld Y, Bodolay E. Autoimmunity Reviews, 10: 317-324, 2010. IF: 6,556

Teljes támogatás: 6.000.000,- Ft

AZ ABC TRANSZPORTER FEHÉRJÉK SZEREPE AZ ŐSSEJTEK VÉDELMÉBEN KÖRNYEZETI KÁROSÍTÓ TÉNYEZŐKKEL SZEMBEN

Apáti Ágota, Orbán Tamás, Sarkadi Balázs
Magyar Tudományos Akadémia, Támogatott Kutatóhelyek Irodája

Pályázati munkánkban a xenobiotikumokkal szembeni védelem kulcsfontosságú szereplőit, az ABC multidrog transzporter fehérjéket vizsgáltuk őssejtekben. A projektben részletesen elemeztük az ABCG2 transzporter fehérje jelenlétét és szerepét emberi nem-differenciálódott pluripotens őssejtekben, majd tovább vizsgáltuk ezt a szerepet szöveti és tumor őssejtekben. Az általunk vizsgált pluripotens sejtvonalakban az ABCG2 mRNS mennyisége összemérhető volt a fehérjét ismerten, endogénen kifejező májsejtekben mérhető szinttel. Immunfluoreszcens módszerekkel (FACS és konfokális mikroszkópia) kimutattuk, hogy a fehérje a pluripotens sejtek nagy többségében megtalálható a plazmamembránban, de olyan mennyiségben, amelyet csak az általunk korábban kidolgozott, gátlószer hozzáadásával érzékenyített antitestes jelöléssel sikerült kimutatni *(Sarkadi és mtsai, 2010).*

Részletesen vizsgáltuk az ABCG2 mRNS szintjének változását pluripotens őssejtek differenciálódása során. Taqman array segítségével feltérképeztük, hogy a 48 humán ABC fehérje közül melyek expresszálódnak a pluripotens állapotú őssejtekben illetve azok kevéssé differenciált és végdifferenciált (mezenchimális) származékaiban (*Varga és mtsai, 2011*). Ugyancsak több szempontból vizsgáltuk a képződött mezenchimális sejtek immunológiai és differenciálódási sajátságait, elsősorban immunszuppresszív sajátosságait. A sejtfelszíni fehérje mintázatok elemzése során megállapítottuk, hogy az ABCG2 elsősorban a pluripotens állapotban a meghatározó multidrog transzporter.

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk az ABCG2 multidrog transzporter működését, modulátorait, az általa eltávolított vegyületeket és a fehérje sejten belüli processzálását humán őssejtekben, olyan pluripotens sejtvonalakat hoztunk létre, amelyek magas szinten kifejezik az ABCG2 fehérjét. Azt az általunk kifejlesztett új technikát alkalmaztuk, amelyben az ABCG2 zöld fluoreszcens fehérjével (GFP) fúzionált formáját transzpozonos génbeültetési módsze segítségével fejeztetjük ki *(Kolacsek és mtsai 2011).* A fehérje működését és lokalizációját együttesen vizsgáltuk konfokális mikroszkópos módszerek segítségével. A funkcionális mérések érzékenyebbé tételéhez kidolgoztunk egy új módszert, amelyben áramlási citométer segítségével folyamatosan követjük fluoreszcens vegyületek felvételét, ill. kiáramlását. Az ABC transzporterek steressz elleni védekezésben játszott szerepének tisztázása érdekében a pluripotens őssejteket UV fény illetve citosztatikus vegyületek hatásának tettük ki. Ezek a hatások a sejtek jelentős pusztulását okozzák, de mindkét esetben megfigyelhető volt, hogy az ABCG2 transzporter kifejező sejtek nagyobb

arányban élték túl a beavatkozást. Ugyanakkor az ABCG2 működésének specifikus gátlásával ez a védő mechanizmus kikapcsolható volt (*Erdei és mtsai, közlés alatt*).

Az emberi őssejtek fontos modell-rendszert jelentenek a daganat-őssejtek tanulmányozásához is. A jelátviteli utak gátlása a daganat-őssejtek elpusztítását célzó terápiák egyik fő támadási pontja, ugyanakkor az ABCG2 fehérje jelenléte a terápiára alkalmazott specifikus kináz gátlók bejutását is gátolhatja. Ezért részletesen elemeztük az ABC transzporterek kölcsönhatásait különböző jelátviteli folyamatokat gátló vegyületekkel (*Hegedűs és mtsai, 2009, Hegedűs és mtsai, közlésre beküldve.)* Egyre jobban elfogadott tapasztalat, hogy a daganat-őssejtekben a terápiás hatású kináz-gátló vegyületek aktiválhatják az ABC multidrog transzporterek kifejeződését. Így a célzott terápiák esetében ezt a komplex, ellenirányú hatást is figyelembe kell venni (*Brózik és mtsai, 2011*). Gyakorlati szempontból is komoly előrelépést jelentett az őssejtekben és a daganat őssejtekben az ABC multidrog transzporterek és a klinikumban is releváns protein tirozin kináz gátlók kölcsönhatásainak pontosabb megismerése.

Az ABCG2 transzkripcionális szabályozását vizsgálva korábban kimutattuk, hogy az őssejtekben a gén átírása egy alternatív promóterről (exon 1A promóter) is indulhat, amely variáns expressziója drogokkal szelektált tumor-sejtekben is megnövekszik. Ez a megfigyelés alátámaszthatja az alternatív promóter használat, és ezen belül is az 1A promóter szerepét olyan (stressz) körülmények között, amikor az ABCG2 fokozott expressziójára van szükség. Emberi daganatsejt-vonalakat különböző toxikus vegyületekkel kezelve kimutattuk, hogy bizonyos jelátviteli pályák eltérő módon szabályozzák az ABCG2 promóterek aktivitását, ami tovább erősíti azt az elképzelést, hogy a transzkripcionális szintű szabályozás fontos regulációs mechanizmust képvisel ezen multidrog transzporter fehérje esetében is (*Orbán és mtsai, közlés alatt*).

Közlemények jegyzéke 2009-2011

1. Varga N, Veréb Z, Rajnavölgyi E, Német K, Uher F, Sarkadi B, Apáti A. BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN. 414(3): pp. 474-80 (2011) IF: 2,595
2. Apáti A, Pászty K, Erdei Z, Szebényi K, Homolya L, Sarkadi B. MOL CELL ENDOCRINOL. [Epub ahead of print] (2011) IF: 4,119
3. Szebényi K, Erdei Z, Péntek A, Sebe A, Orbán TI, Sarkadi B and Apáti A.: PERSONALIZED MEDICINE. 8(3): pp. 347-364 (2011) IF: 0.783
4. Kolacsek O, Krízsik V, Schamberger A, Erdei Z, Apáti A, Várady G, Mátés L, Izsvák Z, Ivics Z, Sarkadi B, Orbán TI. MOB DNA.;2(1): 5 (2011)
5. Brózik A, Hegedüs C, Erdei Z, Hegedus T, Özvegy-Laczka C, Szakács G, Sarkadi B. EXPERT OPIN DRUG METAB TOXICOL.; 7(5): pp.623-42 (2011) IF: 3.374
6. Sarkadi B., Orban T.I., Szakacs G., Varady G., Schamberger A., Erdei Z., Szebenyi K., Homolya L., Apati A. STEM CELLS 28(1): pp.174-176 (2010) IF: 7.741
7. Orban T.I., Apati A., Nemeth A., Varga N., Krizsik V., Schamberger A., Szebenyi K., Erdei Z., Varady G., Karaszi E., Homolya L., Nemet K., Gocza E., Miskey C., Mates L., Ivics Z., Izsvak Z., Sarkadi B. STEM CELLS 27(5): pp. 1077-1087 (2009) IF: 7.920
8. Hegedus C., Ozvegy-Laczka C., Apati A., Magocsi M., Nemet K., Orfi L., Keri G., Katona M., Takats Z., Varadi A., Szakacs G., Sarkadi B.: BR. J. PHARMACOL. 158(4): pp. 1153-1164 (2009) IF: 4.920

Budget: 6.000,000.- HUF

THE ROLE OF ABC TRANSPORTER PROTEINS IN STEM CELL PROTECTION AGAINST HARMFUL ENVIRONMENTAL AGENTS

Ágota Apáti, Tamás Orbán, Balázs Sarkadi
Hungarian Academy of Sciences, Office of Research Groups

In our project we have investigated the ABC multidrug transporters, playing a key role in the defense aginst xenobiotics, in stem cells. We have analysed the expression and function of the ABCG2 transporter protein in human undifferentiated, pluripotent stem cells, as well as in tissue-derived and tumor stem cells. We found that the mRNA coding for ABCG2 in the pluripotent cells was comparable to that in hepatocytes, expressing this protein endogenously. By using flow cytometry and microscopic immunofluorescent methods we documented that the ABCG2 protein is present in the plasmamembrane of the pluripotent stem cells but for its visulaization we have to use a highly sensitive assay method developed by us previously *(Sarkadi et al., 2010).*

We have studied in detail the changes in the ABCG2 mRNA levels during stem cell differentiation. By using a Taqman array we have shown the particular expression pattern of the 48 human ABC proteins in the undifferentiated or partially differentiated stem cells, as well as in the fully differentiated mesenchymal type cells. We have also studies in detail the differentiation and immunosuppressive features of the mesenchymal stem cells (*Varga et al., 2011*). By determining the cell surface expression patterns we found that the key multidrug transporter of the pluripotent stem cells is the ABCG2 protein.

In order to be able to study the function, modulation, transporter substrates and intracellular localization of the ABCG2 multidrug transporter, we have generated pluripotent human cell lines overexpressing the ABCG2 protein. In this work we have used the technique developed by us, which allows the stable expression of a GFP-ABCG2 fusion protein with a transposon-based technology *(Kolacsek et al., 2011).* We have performed parallel studies for the function and localization of this protein by using confocal microscopy. For making the functional studies more sensitive we have developed methods to follow the uptake and release of fluorescent substrates of the transporter by flow cytometry.

In order to clarify the potential role of the ABC multidrug transporter in a defense against cellular stress, we have examined the effects of UV light exposure and cytostatic molecules in the pluripotent human stem cells. These exposures induced a large amount of cell death, but the stem cells expressing higher levels of ABC transporter expression had a major advantage in stress survival. By selectively inhibiting the function of ABCG2 this survival advantage was abolished (*Erdei et al, under publication*).

The human pluripotent stem cells provide important models for studying the tumor stem cells as well. The inhibition of signal transduction pathways is a key method for inhibition of cancer growth and killing the tumor cells. The ABCG2 transporter has been shown to be present in the cancer stem cells and may affect the cellular entry of the kinase inhibitors applied in cancer therapy. In order to clarify the role of ABCG2 in signal transporter inhibitors we have studied the interactions of such inhibitor with this drug transporter (*Hegedűs et al., 2009, Hegedűs et al., submitted for publication).* In addition to a direct interaction, signal inhibitors in the tumor stem cells may significantly induce the expression of ABC multidrug transporters. Therefore this complex effect has to be considered in therapeutic applications (*Brózik et al., 2011*). Therefore the better understanding of the interactions between clinically relevant signal transporter inhibitors and the ABC multidrug transporters has a major importance in treating cancer patients.

When examining the transcriptional regulation of the ABCG2 multidrug transporters we found in our previous studies that in pluripotent stem cells the transcription of this protein can start from an alternative promoter (promoter in exon 1A). This mRNA variant is also increasing in tumor cells selected by anticancer drugs. This observation may support the functional role of this alternative promoter 1A especially during stress conditions, requiring the increased expression of ABCG2. By exposing human tumor cells to toxic molecules we documented the role of selected signal transduction pathway in modulating the use of ABCG2 promoters. These findings further support the potential regulatory role of complex mechanisms in the transcription of the ABCG2 protein (*Orbánet al., submitted for publication*).

List of Publications, 2009-2011

1. Varga N, Veréb Z, Rajnavölgyi E, Német K, Uher F, Sarkadi B, Apáti A. BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN. 414(3): pp. 474-80 (2011) IF: 2,595
2. Apáti A, Pászty K, Erdei Z, Szebényi K, Homolya L, Sarkadi B. MOL CELL ENDOCRINOL. [Epub ahead of print] (2011) IF: 4,119
3. Szebényi K, Erdei Z, Péntek A, Sebe A, Orbán TI, Sarkadi B and Apáti A.: PERSONALIZED MEDICINE. 8(3): pp. 347-364 (2011) IF: 0.783
4. Kolacsek O, Krízsik V, Schamberger A, Erdei Z, Apáti A, Várady G, Mátés L, Izsvák Z, Ivics Z, Sarkadi B, Orbán TI. MOB DNA.;2(1): 5 (2011)
5. Brózik A, Hegedüs C, Erdei Z, Hegedus T, Özvegy-Laczka C, Szakács G, Sarkadi B. EXPERT OPIN DRUG METAB TOXICOL.; 7(5): pp.623-42 (2011) IF: 3.374
6. Sarkadi B., Orban T.I., Szakacs G., Varady G., Schamberger A., Erdei Z., Szebenyi K., Homolya L., Apati A. STEM CELLS 28(1): pp.174-176 (2010) IF: 7.741
7. Orban T.I., Apati A., Nemeth A., Varga N., Krizsik V., Schamberger A., Szebenyi K., Erdei Z., Varady G., Karaszi E., Homolya L., Nemet K., Gocza E., Miskey C., Mates L., Ivics Z., Izsvak Z., Sarkadi B. STEM CELLS 27(5): pp. 1077-1087 (2009) IF: 7.920
8. Hegedus C., Ozvegy-Laczka C., Apati A., Magocsi M., Nemet K., Orfi L., Keri G., Katona M., Takats Z., Varadi A., Szakacs G., Sarkadi B.: BR. J. PHARMACOL. 158(4): pp. 1153-1164 (2009) IF: 4.920

Teljes támogatás: 3.900.000,- Ft

A MIKRORNS KÖTŐHELYEK POLIMORFIZMUSAI MINT EGYES NÉPBETEGSÉGEK GENETIKAI RIZIKÓFAKTORAI

Sasvári-Székely Mária[1], Székely Anna[2], Faludi Gábor[3], Gonda Xénia[3], Lazáry Judit[3], Kótyuk Eszter[2], Elek Zsuzsa[1]
[1]Semmelweis Egyetem, Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet, Budapest; [2]ELTE Pszichológiai Intézet, Budapest; [3]Semmelweis Egyetem, Kútvölgyi Klinikai Tömb, Klinikai és Kutatási Mentálhigiénés Osztály, Budapest.

A népbetegségek kialakulásának hátterében a környezeti tényezők (például életmód, stresszhelyzetek, stb.) mellett jelentős szerepet játszanak az öröklött rizikófaktorok is. A komplex öröklődésű pszichológiai jellegek (pl. impulzivitás) és rendellenességek (pl. depresszió, nikotinfüggőség) genetikai rizikófaktorainak azonosítása nagy intenzitással folyik világszerte, ismereteink mégis hiányosak. Humángenetikai kutatásunk fő célja ezen ismeretek bővítése volt a pszichológia és a pszichiátria területén. Ennek megvalósításához egy új irányvonalat alakítottunk ki: a közelmúltban felfedezett mikroRNS-ek kötőhelyének variációit vizsgálva kívántunk új kandidáns géneket azonosítani.

A komplex öröklődésű rizikófaktorok azonosításához igen fontos a megfelelő mintaszám, ezért a munka során több mint 1000 kontroll és 250 major depressziós betegből származó DNS mintát használtunk fel. Valamennyi résztvevő írásban hozzájárult az ETT-TUKEB által engedélyezett vizsgálatoz. A DNS mintavétel a szájnyálkahártya vattapálcával való törlésével, majd a DNS megfelelő kinyerésével történt. A genetikai analízis során hosszúság-polimorfizmusokat (szerotonin transzporter promoter polimorfizmusa (5HTTLPR), dopamin D4-es receptor polimorfizmusa (DRD4 VNTR)), illetve egypontos nukleotid polimorfizmusokat (SNP) határoztunk meg. Az SNP vizsgálatok OpenArray (nyitott SNP chip) rendszerben történtek, az eredmények validálásához valós idejű PCR-t használtunk fel. A mikroRNS kötés variabilitásának vizsgálatához olyan, in silico adatbázisokat elemeztünk, melyek valószínűsítették azt, hogy az adott SNP valóban megváltoztatja a mikroRNS kötődési erősségét. Ezt a feltevést molekuláris biológiai (riporter gén) vizsgálatokkal támasztottuk alá.

A résztvevők pszichológiai jellemzése kérdőíves vizsgálattal történt. Ez a felmérés kiterjedt az impulzivitás, a hangulati zavarok, a dohányzási szokások és a nikotin addikció legfontosabb paramétereinek felvételére. A genetikai és a pszichológiai adatok feldolgozása és tárolása egymástól független adatbázisokban történt. A genetikai asszociációvizsgálatokhoz az egyesített adatbázisokat használtuk fel. A kiértékeléshez egyváltozós és többváltozós statisztikai módszereket használtunk fel.

A vizsgált kandidáns gének magukban foglalták a klasszikusnak számító dopamin-szerotonin rendszer elemeit is (Nemoda és mtsai., 2011). Közismert, hogy a pszichiátriai betegek jelentős része erős dohányos. A major depressziós csoport dohányzási szokásait vizsgálva kimutattuk a dopamin D4-es receptor -521 CT promoter polimorfizmusának asszociációját a dohányzás előfordulásával (Kótyuk és mtsai, 2009). A szerotonin rendszer vonatkozásában kimutattuk, hogy az egyik jól ismert depresszió rizikó-gén (szerotonin transzporter 5-HTTLPR polimorfizmusa) a dohányzás rizikófaktora is lehet. Ezek az eredmények megerősítették a dohányzás „öngyógyítási elméletét” molekuláris genetikai szinten.

A hatásmechanizmus szempontjából rendkívül érdekes mikroRNS kötőhely polimorfizmusok vizsgálatát nagyhatékonyságú SNP-chip vizsgálatokkal közelítettük meg, melynek eredményei feldolgozás alatt vannak. Az egyik, érdekes eredmény a szerotonin receptor gén mikroRNS kötőhely polimorfizmusa és az impulzivitás között kimutatott összefüggés (Varga és mtsai, 2012). Az ismert kandidáns gének mellett azonban olyan, új target géneket is sikerült azonosítanunk, mint

például a WFS1 (wolframin). Jól ismert, hogy a WFS1 gén mutációi súlyos neuropszichológiai zavarokhoz vezetnek, ezek a mutációk azonban nagyon ritkák. Az általunk vizsgált polimorfizmusok előfordulási gyakorisága jóval nagyobb, így bizonyos pszichológiai jellegekre vagy pszichiátriai rendellenességekre hajlamosító hatásuk népegészségügyi szempontból fontos lehet. Vizsgálatainkban kimutattuk, hogy a WFS1 gén egyik mikroRNS kötőhely polimorfizmusa a dohányzás lehetséges rizikófaktora. Ezen – hamarosan közlésre kerülő - eredményünk teljesen új biológiai mechanizmust valószínűsít a nikotin addikció hátterében, egyben új target molekulákat szolgáltatva a leszokás kémiai segítéséhez.

Eredményeink alapján a mikroRNS kötőhely polimorfizmusok jelentős módon befolyásolhatják az adott fehérjeszintézis mértékét, és ezen keresztül a biológiai választ. Ezért a mikroRNS kötőhely polimorfizmusok vizsgálata alkalmas arra, hogy új targeteket fedezzünk fel a pszichofarmakológia számára. Mai tudásunk szerint ugyan még nehéz elképzelni, hogy hogyan tudnánk befolyásolni a mikroRNS szabályozási rendszert, de eredményeink az egyénre szabott terápiában mindenképpen alkalmazhatónak látszanak, és hozzásegíthetnek a nikotin addikció megszüntetését célzó, hatékony kezelések kialakításához is.

KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

1. Nemoda Z, Szekely A, Sasvari-Szekely M: Psychopathological aspects of dopaminergic gene polymorphisms in adolescence and young adulthood. NEUROSCIENCE & BIOBEHAVIORAL REVIEWS. 35(8): pp.1665-86 (2011). IF: 9,015

2. Varga G, Szekely A, Antal P, Sarkozy P, Nemoda Z, Demetrovics Z, Sasvari-Szekely M: Independent effects of serotonergic and dopaminergic polymorphisms on trait impulsivity. AMERICAN JOURNAL OF MEDICAL GENETICS PART B: NEUROPSYCHIATRIC GENETICS Jan 18. doi: 10.1002/ajmg.b.32025. (2012) IF: 4,156.

3. Kótyuk E, Kovács-Nagy R, Faludi G Urbán R, Rónai Z, Sasvári-Székely M, Székely A: A nikotin dependencia és a dopamin D4-es receptor -521 CT promoter polimorfizmusának asszociációja major depressziós betegcsoportban. NEUROPSYCHOPHARMACOLOGIA HUNGARICA XI/2: pp59-67 (2009).

Budget: 900,000.- HUF

MICRORNA BINDING SITE POLYMORPHISMS AS POSSIBLE RISK FACTORS OF COMMON DISEASES

Sasvári-Székely Mária[1], Székely Anna[2], Faludi Gábor[3], Gonda Xénia[3], Lazáry Judit[3], Kótyuk Eszter[2], Elek Zsuzsa[1]
[1]Institute of Medical Chemistry, Molecular Biology and Pathobiochemistry, Semmelweis University, Budapest [2]EInstitute of Psychology, Eotvos Lorand University, Budapest, [3]Department of Clinical and Theoretical Mental Health, Kutvolgyi Clinical Center, Semmelweis University, Budapest, Hungary.

PUBLICATIONS

4. Nemoda Z, Szekely A, Sasvari-Szekely M: Psychopathological aspects of dopaminergic gene polymorphisms in adolescence and young adulthood. NEUROSCIENCE & BIOBEHAVIORAL REVIEWS. 35(8): pp.1665-86 (2011). IF: 9,015

5. Varga G, Szekely A, Antal P, Sarkozy P, Nemoda Z, Demetrovics Z, Sasvari-Szekely M: Independent effects of serotonergic and dopaminergic polymorphisms on trait impulsivity. AMERICAN JOURNAL OF MEDICAL GENETICS PART B: NEUROPSYCHIATRIC GENETICS Jan 18. doi: 10.1002/ajmg.b.32025. (2012) IF: 4,156.

6. Kótyuk E, Kovács-Nagy R, Faludi G Urbán R, Rónai Z, Sasvári-Székely M, Székely A: A nikotin dependencia és a dopamin D4-es receptor -521 CT promoter polimorfizmusának asszociációja major depressziós betegcsoportban. NEUROPSYCHOPHARMACOLOGIA HUNGARICA XI/2: pp59-67 (2009).

Budget: 900,000.- HUF

MICRORNA BINDING SITE POLYMORPHISMS AS POSSIBLE RISK FACTORS OF COMMON DISEASES

Sasvári-Székely Mária[1], Székely Anna[2], Faludi Gábor[3], Gonda Xénia[3], Lazáry Judit[3], Kótyuk Eszter[2], Elek Zsuzsa[1]
[1]Institute of Medical Chemistry, Molecular Biology and Pathobiochemistry, Semmelweis University, Budapest [2]EInstitute of Psychology, Eotvos Lorand University, Budapest, [3]Department of Clinical and Theoretical Mental Health, Kutvolgyi Clinical Center, Semmelweis University, Budapest, Hungary.

Certain inherited risk factors play important role in the evolvement of common diseases besides the well known environmental causes (e.g. lifestyle, stress situations, etc.). Considerable world-wide research efforts have been put in investigating genetic risk factors in the background of certain psychological traits (e.g. impulsivity), psychiatric disorders (e.g. depression) and addictive behaviors (e.g. nicotine addiction). Despite these efforts, our knowledge of their polygenic background is still not complete. The main goal of our human genetic research was to investigate inherited components of certain psychological and psychiatric traits utilizing a novel approach: We identified new candidate genes based on the investigation of polymorphic micro RNA binding sites.

Data from a sufficient number of participants is crucial for the identification of risk factors in the background of traits with complex inheritance patterns. Fro this reason we used DNA samples from over 1000 control and 250 psychiatric patients with major depression. Participants signed informed consents to the study approved by the National Ethical Committee (ETT-TUKEB). DNA samples were obtained by isolation of DNA from buccal swabs. Genetic analyses involved two variable number of tandem repeats: the serotonin transporter polymorphism (5HTTLPR) and the dopamine D4 receptor polymorphism (DRD4 VNTR). Single nucleotide variations were investigated using a novel OpenArray chip technology (these results were validated using real time PCR technology). In order to study variability of micro RNA binding sites we searched in-silico databases for putative micro RNA binding site polymorphisms. As a next step we investigated capability of selected SNPs to change strength of micro RNA binding using molecular biological methods (reporter genes systems).

Self-report methods were used for the assessment of psychological characteristics. Questionnaires involved scales for impulsivity, mood disorders, smoking behavior and nicotine addiction. Genetic and psychological profiles were stored in separate databases, later merged for psychogenetic association analyses. Statistic evaluation was done using uni- and multivariate methods.

Candidate genes used in the analyses included elements of the well established dopaminergic-serotonergic system (Nemoda et al., 2011). It is a well known fact that most of the psychiatric patients are heavy smokers. We justified association of the -521 CT promoter polymorphism of the dopamine D4 receptor and smoking behavior in patients with major depression (Kótyuk et al., 2009). With relation to the serotonergic system we proved that a well known genetic risk factor of depression (the serotonin transporter polymorphism 5HTTLPR) is also a risk factor of smoking. These results provide molecular genetic evidence that underline the “self-medication theory” of smoking behavior.

High throughput DNA chip technology was used for investigation of the microRNA binding site polymorphisms, results are underway. One of the most interesting new results is the association of impulsivity and a micro RNA binding site of a serotonergic receptor (Varga et al., 2012). Besides previously established candidate genes we also identified new target genes, such as the WFS1 (wolframin). Evidence from several studies in the literature supports that mutations of the WFS1

gene cause severe neuropsychiatric disorders, however, these mutations are quite rare. Polymorphisms, on the other hand investigated by our research group are much more frequent, thus their possible role in the development of certain psychological characteristics or psychiatric disorders could be of great importance in human health and well-being. Our results confirm that a micro RNA binding site of the WFS1 gene is a possible risk factor of smoking behavior. Publication of these results are in progress, suggesting a novel biological mechanism in the background of nicotine addiction, as well as providing new target molecules for chemical support of cessation.

Our results suggests that the micro RNA binding site polymorphisms play a vital role in a specific protein synthesis, and thus changing biological functioning of the human body. Investigation of the micro RNA binding site polymorphisms could provide new target genes for psychopharmacology. Based on our knowledge to date it is difficult to provide techniques for direct manipulation of microRNA binding, however, these results could certainly be used in the development of self-tailored therapy and successful medications for terminating nicotine addiction.

PUBLICATIONS

1. Nemoda Z, Szekely A, Sasvari-Szekely M: Psychopathological aspects of dopaminergic gene polymorphisms in adolescence and young adulthood. NEUROSCIENCE & BIOBEHAVIORAL REVIEWS. 35(8): pp.1665-86 (2011). IF: 9,015

2. Varga G, Szekely A, Antal P, Sarkozy P, Nemoda Z, Demetrovics Z, Sasvari-Szekely M: Independent effects of serotonergic and dopaminergic polymorphisms on trait impulsivity. AMERICAN JOURNAL OF MEDICAL GENETICS PART B: NEUROPSYCHIATRIC GENETICS Jan 18. doi: 10.1002/ajmg.b.32025. (2012) IF: 4,156.

3. Kótyuk E, Kovács-Nagy R, Faludi G Urbán R, Rónai Z, Sasvári-Székely M, Székely A: A nikotin dependencia és a dopamin D4-es receptor -521 CT promoter polimorfizmusának asszociációja major depressziós betegcsoportban. NEUROPSYCHOPHARMACOLOGIA HUNGARICA XI/2: pp59-67 (2009).

Teljes támogatás: 6.000.000,- Ft

ÚJ DIAGNOSZTIKUS ÉS PRODIAGNOSZTIKUS MARKEREK VIZSGÁLATA RÁKELŐTTI ÉS DAGANATOS ELVÁLTOZÁSOKBAN. A SEJTKAPCSOLATOK VÁLTOZÁSA A KARCINOGENEZISBEN ÉS DAGANATOS PROGRESSZIÓBAN

Schaff Zsuzsa[1], Lotz Gábor[1], Patonai Attila[2], Tátrai Péter[3], Korompay Anna[4], Somorácz Áron[1], Borka Katalin[1], Sobel Gábor[5]
[1]Semmelweis Egyetem, II. Pathológiai Intézet, [2]Semmelweis Egyetem, Transzplantációs és Sebészeti Klinika, [3]Országos Vérellátó Szolgálat, Kísérletes Génterápiás Laboratórium, [4]Semmelweis Egyetem, Radiológiai Klinika, [5]Semmelweis Egyetem, II. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika

A daganatok kialakulásának és progressziójának fontos történése a sejtkapcsolatok, sejtkapcsoló struktúrák, főleg az u.n. tight junction (TJ) megváltozása. Az egyes protein összetevők mintázata jellemzi a szöveteket, sejteket, valamint az ezekből kiinduló daganatokat, így azok diagnosztikus és prognosztikus markerként is felhasználhatók. Korábbi munkánk folytatásaként egyes, kiemelten máj és pancreas eredetű daganatokban vizsgáltuk a TJ komponensek, elsősorban a claudinok és az újonnan felfedezett tricellulin változását. Megállapítottuk, hogy az emberi májdaganatok speciális típusa, az u.n. fibrolamellaris carcinoma jellegzetes claudin mintázatot mutat, mely eltér egyéb májdaganatokétól. A tricellulin expresszióját elsőként írtuk le ezen daganatban. Emberi exokrin és endokrin pancreas daganatokat jellemeztünk a claudin és a tricellulin mintázat alapján. Megállapítottuk, hogy a tricellulin expresszió változása összefügg a túléléssel ductalis pancreas carcinomában.

Eredeti közlemények jegyzéke:

Korompay A, Borka K, Lotz G, Somorácz Á, Törzsök P, Erdélyi-Belle B, Kenessey I, Baranyai Zs, Zsoldos F, Kupcsulik P, Bodoky Gy, Schaff Zs, Kiss A: Tricellulin expression in normal and tumorous human pancreas. HISTOPATHOLOGY Accepted for publication: October (2011) IF: 3,569

Lendvai G, Kiss A, Kovalszky I, Schaff Zs: Eltérések a májbetegségek mikro-RNS-expressziós mintázatában. ORVOSI HETILAP 151: pp. 1843-1853 (2010)

Patonai A, Erdélyi-Belle B, Korompay A, Somorácz Á, Straub BK, Schirmacher P, Kovalszky I, Lotz G, Kiss A, Schaff Zs: Claudins and tricellulin in fibrolamellar hepatocellular carcinoma. VIRCHOWS ARCHIV 458: pp. 679-688 (2011) IF: 2,336

Patonai A, Erdélyi-Belle B, Korompay A, Somorácz Á, Törzsök P, Kovalszky I, Barbai T, Rásó E, Lotz G, Schaff Zs, Kiss A: Molecular characteristics of fibrolamellar hepatocellular carcinoma. PATHOLOGY & ONCOLOGY RESEARCH Submitted: December (2011) IF: 1,483

Schaff Zs, Kovalszky I, Lotz G, Kiss A: A hepatocellularis carcinoma - a makroszkópiától a molekuláris patológiáig. ORVOSI HETILAP 151: pp. 982-989 (2010) és In: Hepatocellularis carcinoma. Orvosi Hetilap Kiskönyvtára 3, Fehér J, Lengyel G (szerk). Akadémiai Kiadó, Budapest, pp. 55-70, 2010

Budget: 6.000,000.- HUF

NOVEL DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC MARKERS IN PREMALIGNANT LESIONS AND CANCER. CHANGES OF CELL ADHESION DURING CARCINOGENESIS AND TUMOR PROGRESSZION

Schaff Zsuzsa[1], Gábor Lotz[1], Attila Patonai[2], Péter Tátrai[3], Anna Korompay[4], Áron Somorácz[1], Katalin Borka[1], Gábor Sobel[5]
[1]Department of Pathology, Semmelweis University; [2]Department of Transplantation and Surgery, Semmelweis University; [3]Department of Experimental Gene Therapy, Hungarian National Blood Transfusion Service, [4]Department of Radiology, Semmelweis University; [5]Department of Obstetrics and Gynecology, Semmelweis University

Important events in tumor development and progression are the alterations of cell contacts, cell adhesion structures, and mainly the changes in tight junctions (TJ). The tissues and cells, the tumors deriving from them are all characterized by the pattern of the various TJ protein components, thus they may also prove useful as diagnostic and prognostic markers. In continuation to our earlier research, we studied the changes of TJ components - primarily claudins and the newly discovered tricellulin - in certain, mainly hepatic and pancreatic tumors. We found that a specific type of human liver tumors, the so-called fibrolamellar carcinoma shows a typical claudin pattern dissimilar to other hepatic tumors. Ours was the first report describing the expression of tricellulin in this tumor type. Further, we differentiated human exocrine-endocrine tumors of the pancreas on the basis of the expressed claudin and tricellulin patterns. We found that the changes in tricellulin expression are associated with survival in case of pancreatic ductal carcinoma.

List of publications:

Korompay A, Borka K, Lotz G, Somorácz Á, Törzsök P, Erdélyi-Belle B, Kenessey I, Baranyai Zs, Zsoldos F, Kupcsulik P, Bodoky Gy, Schaff Zs, Kiss A: Tricellulin expression in normal and tumorous human pancreas. HISTOPATHOLOGY Accepted for publication: October (2011) IF: 3,569

Lendvai G, Kiss A, Kovalszky I, Schaff Zs: Alterations in microRNA expression patterns in liver diseases. ORVOSI HETILAP 151: pp. 1843-1853 (2010)

Patonai A, Erdélyi-Belle B, Korompay A, Somorácz Á, Straub BK, Schirmacher P, Kovalszky I, Lotz G, Kiss A, Schaff Zs: Claudins and tricellulin in fibrolamellar hepatocellular carcinoma. VIRCHOWS ARCHIV 458: pp. 679-688 (2011) IF: 2,336

Patonai A, Erdélyi-Belle B, Korompay A, Somorácz Á, Törzsök P, Kovalszky I, Barbai T, Rásó E, Lotz G, Schaff Zs, Kiss A: Molecular characteristics of fibrolamellar hepatocellular carcinoma. PATHOLOGY & ONCOLOGY RESEARCH Submitted: December (2011) IF: 1,483

Schaff Zs, Kovalszky I, Lotz G, Kiss A: Hepatocellularis carcinoma - from macroscopy to molecular pathology. ORVOSI HETILAP 151: pp. 982-989 (2010) and In: Hepatocellularis carcinoma. Orvosi Hetilap Kiskönyvtára 3, Fehér J, Lengyel G (eds). Akadémiai Kiadó, Budapest, pp. 55-70, 2010

3400000,- Ft

A 2009-tól 2011-ig elvégzett munka és az elért eredmények rövid ismertetése:

A téma címe: 1-es és 2-es típusú cukorbetegségre és szövődményeire hajlamosító kandidáns gének azonosítása és funkcionális vizsgálata.

A projekt során 15, a diabetes létrejöttében elméletileg szerepet játszó gén, és 30 egypontos nucleotid polymorfizmus (SNP) vizsgálata történt. A vizsgálat során összesen több mint 370 2-es típusú diabetes mellitussal (DM-el), 166 1-es típusú DM-el diagnosztizált beteg és 350 egészséges kontrol részletes klinikai, fizikális, laboratóriumi és genetikai vizsgálatát végeztük. A betegektől részletes anamnézist vettünk fel (diabétesz kezdete, szövődményei, kezelés stb.). A makro (iszkémiás szívbetegség, akut miokardiális infarktus, obliteratív verőérbetegség, iszkémiás stroke) és mikroangiopátiás (retino-, neuro- és nefropátia) szövődmények esetleges fenállását és azok súlyosságát rögzítettük azért, hogy a diabéteszes komplikációkra hajlamosító kandidáns géneket is vizsgálni tudjuk. Alapos orvosi vizsgálat és kérdőívek segítségével rögzítetük mindazon fizikális, laboratóriumi és életvitelbeli paramétereket melyek inzulinrezisztenciával kapcsolatosak (testsúly, testtömeg index, derék körfogat, csípő körfogat, fizikai aktivitás, és stresszes életesemények).
A genetikai vizsgálatokhoz nem-invazív (száj nyálkahártya) mintavétel szolgáltatta a biológiai mintát. A vizsgált gén polimorfizmusának funkcionális hatását in vitro molekuláris biológiai módszerekkel, valamint a human mintáink célzott laboratóriumi paramétereinek meghatározásával vizsgáltuk. A vizsgálat során DNS izolálás a kandidáns gének genotipizálása, valamint a microRNS kötő régiók molekuláris-funkcionális vizsgálata a Semmelweis Egyetem Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Pathobiokémia Intézet Molekuláris Genetikai Laboratóriumában történt. A klinikai háttér (fizikális és rutin laboratóriumi paraméterek), a Semmelweis Egyetem II.sz. Belklinikáján volt biztosítva. A betegek fizikális és rutin laboratóriumi paramétereket a klinikai gyakorlatban használt módszerekkel határozzuk meg. A szérum VEGF koncentrációt ELISA módszerrel határoztuk meg. Eredményeinket egyrészt eset-kontrol vizsgálataink során, másrészt a diabéteszes minták diabéteszre és szövődményeire specifikus laboratóriumi vizsgálatai során valamint a vizsgált polymorfizmusok asszociációs vizsgálata során értékeltük.

Az elvégzett vizsgálatok alapján következtetéseink a következőek voltak:
1. A Hypoxia indukábilis faktor-1 alfa (HIF1a) exon polymorfizmusa (Pro582Ser; C/T) és a diabetes mellitus (DM) asszociáció analízise során a következő eredményeket kaptuk:

- A CC genotípus szignifikánsan gyakrabban fordul elő kaukázusi 2-es típusú diabetes betegekben az egészséges kaukázusi populációhoz képest. A ritka T allél hordozása védő hatású 2-es típusú cukorbetegség kialakulásával szemben.
- Hasonló genetikai hatást kaptunk az 1-es típusú cukorbetegek vonatkozásában is. Ez nemcsak egy új példája az eddig két különböző kóroktanúnak tartott betegség közös genetikai hátterének, hanem felhíja a figyelmet a HIF1-a szerepére diabetes mellitusban.
- A HIF1-α gén Pro582Ser polimorfizmusa 2-es típusú diabetesben nem befolyásolja szignifikánsan a szérum VEGF szinteket, így a polimorfizmus feltehetően más úton fejti ki védő hatását.

2. A WFS1 (wolframin) gén rs 9457 sz. SNP-je is szignifikáns asszociációt mutatott a diabetesz vonatkozásában. Mivel ez az SNP a gén 3' nem-transzlálódó régiójában található, megvizsgáltuk, hogy a polimorfizmus hatással van-e valamilyen mikroRNS kötő régióra. In silico és molekulári biológiai vizshálatokkal igazoltuk, hogy ez az SNP hatással van a mikroRNS kötésre, és ezzel szabályozhatja az expresszió mértékét.

3. Szignifikáns asszociációt találtunk a FABP2 (fatty acid binding protein 2, intestinal) gén egyik SNP-je (rs 2964) és a 2-es típusú diabetes előfordulása között. Korábban ennek a génnek a mutációit összefüggésbe hozták az obesitással és a metabolikus szindromaval. Vizsgálatainkban kimutattuk, hogy az ismert exonmutációk mellett a mikroRNS kötőhelyet érintő rs 2964 SNP fontos szerepet tölthet be a 2-es típusú diabetesz kialakulásában.

Eredményeinket közlemény, előadás és absztraktok formájában mutattuk be:

A pályázathoz szorosan kapcsolódó publikációink:

Nagy G, Kovács-Nagy R, Keresztúri E, Somogyi A, Székely A, Németh N, Hosszúfalusi N, Pánczél P, Rónai Z, Sasvári-Székely M: Association of hypoxia inducible factor-1 alpha gene polymorphism with both type 1 and type 2 diabetes in a Caucasian (Hungarian) sample. BMC Med Genet. 10(1):79, 2009.

Kovács-Nagy, R., G. Nagy, A. Somogyi, Z. Rónai, A. Székely, and M. Sasvári-Székely: A 2-es típusú diabetes mellitus lehetséges új genetikai rizikófaktora. Magyar Belorvosi Archivum, 2010. 63: p. 91-98.

Elek Zsuzsanna, Brauswetter Diána, Kovács-Nagy Réka, Nagy Géza, Székely Anna, Somogyi Anikó, Rónai Zsolt, Sasvári-Székely Mária. 2. Mikro-RNS kötőhelyek genetikai variabilitása és a diabetes mellitus. Magyar Belorvosi Archivum, 2010. 63. 99-103.

Nagy G, Herold M, Herold Z, Szémán B, Nagy R, Firneisz G, Varga T, Sasvári-Székely M, Somogyi A. :Hypoxia inducible factor-1 alpha (HIF1a) polymorphisms and serum VEGF levels in type 2 diabetic patients. IDF world congress 2011. dec. 5-8 Dubai D-0771

Nagy G,: A diabetes és a komorbid depresszió genetikai vonatkozásai PhD értekezés Semmelweis egyetem Doktori Iskola 2011.

A pályázathoz részlegesen kapcsolódó munkákból származó publikációk

Keszler Gergely, Abdul Rahman Omar, Rosta Klára, Somogyi Anikó és Sasvári-Székely Mária. 1. A galanin neuropeptid agyi expresszióváltozása 2-es típusú diabétesz patkánymodelljén. Magyar Belorvosi Archivum, 2010. 63. 87-90.

Nagy, G., K. Rosta, B. Szeman, M. Sasvari-Szekely, and A. Somogyi: Clinical aspects of the link between diabetes and depression]. Orv Hetil. 152(13): p. 498-504.

Varga, T., G. Firneisz, G. Nagy, and A. Somogyi,: Elevated serum dipeptidyl peptidase-4 activity in type 1 diabetes mellitus: a direct comparison. Orv Hetil. 151(22): p. 899-902.

Varga, T., A. Somogyi, G. Barna, B. Wichmann, G. Nagy, K. Racz, L. Selmeci, and G. Firneisz,: Higher serum DPP-4 enzyme activity and decreased lymphocyte CD26 expression in type 1 diabetes. Pathol Oncol Res. 17(4): p. 925-30. IF: 1,483

Vastagh, I., T. Horvath, G. Nagy, T. Varga, E. Juhasz, V. Juhasz, M. Kollai, D. Bereczki, and A. Somogyi, Evolution and predictors of morphological and functional arterial changes in the course of type 1 diabetes mellitus: Diabetes Metab Res Rev. 26(8): p. 646-55. IF: 3.094

Based on our findings, our conclusions are:

1. Association analysis of exon polymorphism (Pro582Ser; C/T) in the hypoxia inducible factor -1 alfa gene and diabetes mellitus yielded the following results:

   - The CC genotype was significantly more frequently found in the type 2 diabetic Caucasian population compared to healthy individuals. The rare T allele has a protective effect against T2DM.

   - Similar results were found in type 1 diabetes. This result is not just another example of the common genetic background of 1TDM 2TDM of, but points out that hypoxia-induced factor may be important in understanding the pathogenesis of diabetes.

   - The HIF1-a gene polymorphism dose not alter serum VEGF levels thus it seems that it's protective effect is not VEGF dependent.

2. Significant associations were found between the rs9457 SNP of the WFS1 (wolframin) gene and type 2 diabetes. Since this SNP is located in the 3' non coding region of the gene, it has been examined wether the SNP changes microRNA binding sites. Via in silico and molecular genetic methods it has been proven that the SNP alters microRNA binding in the region witch might influence gene expression.

3. Significant association was found between the rs 2964 SNP of the FABP2 (fatty acid binding protein 2, intestinal) gene and type 2 diabetes. Previously mutations in this gene have been shown to be associated with obesity and the metabolic syndrome. The present study proved that not only exon mutations, but also the rs 2964 SNP in the microRNA binding site of the FABP2 gene might play a role in type 2 diabetes

Publications directly related to present grant:

Nagy G, Kovács-Nagy R, Keresztúri E, Somogyi A, Székely A, Németh N, Hosszúfalusi N, Pánczél P, Rónai Z, Sasvári-Székely M: Association of hypoxia inducible factor-1 alpha gene polymorphism with both type 1 and type 2 diabetes in a Caucasian (Hungarian) sample. BMC Med Genet. 10(1):79, 2009.

Kovács-Nagy, R., G. Nagy, A. Somogyi, Z. Rónai, A. Székely, and M. Sasvári-Székely: A 2-es típusú diabetes mellitus lehetséges új genetikai rizikófaktora. Magyar Belorvosi Archivum, 2010. 63: p. 91-98.

Elek Zsuzsanna, Brauswetter Diána, Kovács-Nagy Réka, Nagy Géza, Székely Anna, Somogyi Anikó, Rónai Zsolt, Sasvári-Székely Mária. 2. Mikro-RNS kötőhelyek genetikai variabilitása és a diabetes mellitus. Magyar Belorvosi Archivum, 2010. 63. 99-103.

Nagy G, Herold M, Herold Z, Szémán B, Nagy R, Firneisz G, Varga T, Sasvári-Székely M, Somogyi A. :Hypoxia inducible factor-1 alpha (HIF1a) polymorphisms and serum VEGF levels in type 2 diabetic patients. IDF world congress 2011. dec. 5-8 Dubai D-0771

Nagy G,: A diabetes és a komorbid depresszió genetikai vonatkozásai PhD értekezés Semmelweis egyetem Doktori Iskola 2011.

A pályázathoz részlegesen kapcsolódó munkákból származó publikációk
Keszler Gergely, Abdul Rahman Omar, Rosta Klára, Somogyi Anikó és Sasvári-Székely Mária. 1. A galanin neuropeptid agyi expresszióváltozása 2-es típusú diabétesz patkánymodelljén. Magyar Belorvosi Archivum, 2010. 63. 87-90.

Nagy, G., K. Rosta, B. Szeman, M. Sasvari-Szekely, and A. Somogyi: Clinical aspects of the link between diabetes and depression]. Orv Hetil. 152(13): p. 498-504.

Varga, T., G. Firneisz, G. Nagy, and A. Somogyi,: Elevated serum dipeptidyl peptidase-4 activity in type 1 diabetes mellitus: a direct comparison. Orv Hetil. 151(22): p. 899-902.

Varga, T., A. Somogyi, G. Barna, B. Wichmann, G. Nagy, K. Racz, L. Selmeci, and G. Firneisz,: Higher serum DPP-4 enzyme activity and decreased lymphocyte CD26 expression in type 1 diabetes. Pathol Oncol Res. 17(4): p. 925-30.

Vastagh, I., T. Horvath, G. Nagy, T. Varga, E. Juhasz, V. Juhasz, M. Kollai, D. Bereczki, and A. Somogyi, Evolution and predictors of morphological and functional arterial changes in the course of type 1 diabetes mellitus: Diabetes Metab Res Rev. 26(8): p. 646-55.

Teljes támogatás: 5.400.000.- HUF

RENDKÍVÜLI HALÁLOZÁS BUDAPESTEN 1945-2010

Dunay György[1], Keller Éva[1], Törő Klára, Sótonyi Péter[2]
[1]Országos Igazságügyi Orvostani Intézet, [2]Semmelweis Egyetem, Igazságügyi és Biztosítás-orvostani Intézet

Magyarországon a rendkívüli módon bekövetkezett halálesetekről egységes összefoglaló adatok nem állnak rendelkezésre. Mind a mai napig egységes nyilvántartási rendszer nem alakult ki. A Semmelweis Egyetem Igazságügyi és Biztosítás-orvostani Intézete jellegénél fogva az ország legnagyobb intézete. Egyéb feladatai mellett végzi a Budapesten végzett rendkívüli halálesetek boncolását. Az itt történt hatósági boncolások száma, európai mércével is jelentősnek mondható, részletes statisztikai értékelésük eddig nem történt meg. Az Intézetben 1945-2010 között 190013 olyan hatósági boncolás történt, amely teljeskörű statisztikai feldolgozásra alkalmas. Eseteink közül természetes kórokú halál 107948, 54,2 %, baleseti eredetű halál 46.365 (23,3 %), öngyilkosság 40681 (20,4 %), emberölés 3292 (1,7 %), egyéb okok miatt 724 (0,4 %) került boncolásra. A feldolgozhat esetek nagy száma lehetővé teszi, hogy ezen boncolási anyag alapján a rendkívüli halálozás egészére, illetőleg az egyes haláleseti formákra vonatkozóan következtetéseket lehessen levonni.
A feldolgozás adatközlő jellegéből alkalmas volt a számítógépes feldolgozásra, matematikai analízisre a kiértékelés során nem volt szükség. Az eredményeket táblázatos formában jelenítettük meg, a legfontosabb legjellemzőbb összefüggéseket grafikonon igyekeztünk a szemléletesség érdekében ábrázolni.
A rendkívüli halál eseteit 4 nagy csoportba: természetes okú halálesetek, balesetek, öngyilkosság és emberölések fő csoportba osztályoztuk, azon belül további alcsoportokat vizsgáltunk.

Összefoglalóan az 1945-2010 közötti budapesti rendkívüli halálozásra jellemzőnek mondható, hogy az össze esetszám 1970-1989 években volt a legmagasabb. Onnan kezdve erőteljes csökkenést mutat. A rendkívüli halálesetek több mint 50 %-át a természetes kórokú halálozás adta, ezen belül is meghatározó jelentősége volt a keringési rendszer betegségeinek. Lényegében az 1970-1989 közötti össz esetszám növekedését is ez a körülmény magyarázza. A balesetek száma ingadozást mutat az utóbbi 20 évben szintén csökkenő tendenciával. Az öngyilkosságok száma kiemelkedően magas volt az 1970-99 közötti években. Ebben a kategóriában is az utolsó 20 évben csökkenő tendenciát lehet megfigyelni. Az emberölések számában jelentős eltérés nem mutatkozott. Mindenképpen említést érdemel, hogy a rendkívüli halálozás döntő része a fiatal felnőtt kortól emelkedik meg, jellemzően a férfiak körében és az életkor előrehaladtával egyre nagyobb számú az előfordulása. Az idős korosztályban, főleg a 70 év fölöttieknél fordul meg az arány és itt már magasabb a nők részesedése. Ezek a jelenségek a lakosság fokozatos elöregedése mellett elsősorban a rendkívüli halál jogi megítélésével és az ehhez kapcsolódóan kialakult joggyakorlattal hozható összefüggésbe. Egyéb egészségügyi vagy gazdasági körülmény hatása nem volt bizonyítható.
Az eredményeket 354 ábrán és 380 táblázatban foglaltuk össze.

Teljes támogatás: 5.400.000.- HUF

ÖSSZEFOGLALÓ

A Semmelweis Egyetem Igazságügyi és Biztosítás Orvostani Intézetében 1945-2010 között 190013 olyan hatósági boncolás történt, amely statisztikai feldolgozásra alkalmas volt. Eseteink közül természetes kórokú halál 107948 (54,2 %), baleseti eredetű halál 46365 (23,3 %), öngyilkosság 40681 (20,4 %), emberölés 3292 (1,7 %), egyéb ok miatt 724 (0,4 %) került boncolásra. A feldolgozható esetek nagy száma lehetővé teszi, hogy ezen boncolási anyag alapján a rendkívüli halálozás egészére, illetőleg az egyes haláleseti formákra, körülményeire vonatkozóan következtetéseket lehessen levonni. A feldolgozás adatközlő jellegéből, alkalmas volt a számítógépes feldolgozásra. A kiértékelés összegzését 354 ábrán és 380 táblázatban foglaltuk össze.

Összefoglalóan az 1945-2010 közötti budapesti rendkívüli halálozásra jellemzőnek mondható, hogy az össz esetszám 1970-1989 években volt a legmagasabb. Onnan kezdve erőteljes csökkenést mutat. A rendkívüli halálesetek több mint 50 %-át a természetes kórokú halálozás adta, ezen belül is meghatározó jelentősége volt a keringési rendszer betegségeinek. Lényegében az 1970-1989 közötti össz esetszám növekedését is ez a körülmény magyarázza. A balesetek száma ingadozást mutat, az utóbbi 20 évben szintén csökkenő tendenciával. Az öngyilkosságok száma kiemelkedően magas volt az 1970-99 közötti években. Ebben a kategóriában is az utolsó 20 évben csökkenő tendenciát lehet megfigyelni. Az emberölések számában jelentős eltérés nem mutatkozott. Mindenképpen említést érdemel, hogy a rendkívüli halálozás döntő része a fiatal felnőtt kortól emelkedik meg, jellemzően a férfiak körében és az életkor előrehaladtával egyre nagyobb számú az előfordulása. Az idős korosztályban, főleg a 70 év fölöttieknél fordul meg az arány és itt már magasabb a nők részesedése. Ezek a jelenségek a lakosság fokozatos elöregedése mellett, elsősorban a rendkívüli halál jogi megítélésével és az ehhez kapcsolódóan kialakult joggyakorlattal hozható összefüggésbe. Egyéb egészségügyi vagy gazdasági körülmény hatása nem volt bizonyítható.

2 cm

2 cm

Teljes támogatás: 5.400.000.- HUF

UNUSUAL DEATHS IN BUDAPEST BETWEEN 1945-2010

György Dunay[1], Éva Keller[1], Péter Sótonyi[2]
[1]National Institute of Forensic Medicine, [2]Semmelweis University, Institute of Legal and Insurance Medicine

There are no standard summary data on the extraordinary death cases occurring in Hungary. To date, a uniform system of registration is not available. The Institute of Legal and Insurance Medicine of the Semmelweis University is by its nature the largest institute in the country. Besides its other tasks, the Institute performs the autopsies of unusual death cases in Budapest, with the number of official autopsies being significant even by European standards. No detailed statistical evaluations of these autopsies have been performed so far. Between 1945-2010 a total of 190013 official autopsies were performed at the Institute all of which were suitable for overall statistical analysis. Among the autopsy cases were 107948 (54.2%) deaths of natural aetiology, 46365 (23.3%) deaths caused by accidents, 40681 (20.4%) suicides, 3292 (1.7%) murder cases and 724 (0.4%) deaths due to other causes.
The large number of autopsy cases suitable for evaluation allowed for conclusions to be drawn regarding both unusual deaths as a whole, and the various forms of death. The evaluations were suitable for computer processing, there was no need for mathematical analysis. The obtained results were displayed in the form of tables, with the most important, most characteristic connections illustrated on diagrams. The unusual death cases were classified into 4 main groups, namely deaths of natural causes, accidents, suicides and murders, then further subgroups were examined.

In summary, the unusual deaths occurring in Budapest between 1945-2010 were characterized by the fact that the highest number of cases occurred between 1970 and 1989. In the following years a marked decline was notable. Over 50% of the unusual death cases were caused by deaths of natural aetiology, with cardiovascular diseases showing marked significance. Basically, the high total case number between 1970-1989 could also be explained by this circumstance. The number of accidents has shown fluctuation in the past 20 years, also with decreasing tendency. The number of suicides was strikingly high in the years between 1970-99, with a decreasing tendency observable in this category as well within the past 20 years. No significant differences were detectable in regard to the number of murders. It is worthy of note that there is an increasing trend in the majority of unusual deaths from young adulthood, with the number of occurrences increasing typically among men and with age progression. The ratio is reversed in the older age group, mainly above the age of 70 in which case the proportion of women becomes higher. Besides the gradual aging of the population, these phenomena can primarily be associated with the legal judgement of unusual deaths and the legal practice that has developed in this context.
The effect of other health or economic conditions could not be verified.
The obtained results were summarized on 354 figures and 380 tables.

Teljes támogatás: 5.400.000.- HUF

SUMMARY

Between 1945-2010 a total of 190013 official autopsies were performed at the Institute of Legal and Insurance Medicine of the Semmelweis University, all of which were suitable for overall statistical analysis. Among the autopsy cases were 107948 (54.2%) deaths of natural aetiology, 46365 (23.3%) deaths caused by accidents, 40681 (20.4%) suicides, 3292 (1.7%) murder cases and 724 (0.4%) deaths due to other causes. The large number of autopsy cases suitable for evaluation allowed for conclusions to be drawn regarding both unusual deaths as a whole, and the various forms of death. The evaluations, due to their informant nature, were suitable for computer processing. The obtained results were summarized on 354 figures and 380 tables.

In summary, the unusual deaths occurring in Budapest between 1945-2010 were characterized by the fact that the highest number of cases occurred between 1970 and 1989. In the following years a marked decline was notable. Over 50% of the unusual death cases were caused by deaths of natural aetiology, with cardiovascular diseases showing marked significance. Basically, the high total case number between 1970-1989 could also be explained by this circumstance. The number of accidents has shown fluctuation in the past 20 years, also with decreasing tendency. The number of suicides was strikingly high in the years between 1970-99, with a decreasing tendency observable in this category as well within the past 20 years. No significant differences were detectable in regard to the number of murders. It is worthy of note that there is an increasing trend in the majority of unusual deaths from young adulthood, with the number of occurrences increasing typically among men and with age progression. The ratio is reversed in the older age group, mainly above the age of 70 in which case the proportion of women becomes higher. Besides the gradual aging of the population, these phenomena can primarily be associated with the legal judgement of unusual deaths and the legal practice that has developed in this context.

The effect of other health or economic conditions could not be verified.

Teljes támogatás: 6 000.000,- Ft

A MITOKONDRIUM KALCIUM ANYAGCSERÉJÉNEK SZABÁLYOZÁSA

Spät András[1], Szanda Gergő[1], Fülöp László[1], Rajki Anikó[2]
[1]Semmelweis Egyetem ÁOK Élettani Intézet, [2]MTA-SE Neurobiokémiai és Molekuláris Élettani Kutatócsoport

Kalcium-mobilizáló hormonok és neurotranszmitterek hatására a citoszolban Ca^{2+} jel képződik, s e jel a mitokondriumba áttevődik. A mitokondrium Ca^{2+} felvételének messzemenő hatásai vannak a sejt anyagcseréjére és specifikus biológiai válaszára is. Kutatásaink célja kettős volt: vizsgáltuk a mitokondrium Ca^{2+} felvételének szabályozását, valamint jelentőségét a hormon elválasztás serkentésében.

H295R adrenokortikális sejtben végzett korábbi kísérleteinkben kimutattuk, hogy az angiotenzin II hatására aktiválódó p38 MAPK és egy új típusú protein kináz C (nPKC) gyengíti az agonista-indukált mitokondriális Ca^{2+} jelet. A beszámolási periódusban permeabilizált sejtben vizsgáltuk a gátlás mechanizmusát. Megállapítottuk, hogy 1) a kinázok nem a mitokondriális membrán potenciál változtatásával fejtik ki hatásukat; 2) kináz aktiválás növeli a félmaximális Ca^{2+} felvételi sebességhez szükséges $[Ca^{2+}]$ –t; 3) a mitokondrium külső membránjának ozmotikus shockkal vagy tBid-del létrehozott permeabilizálása után a kinázok gátló hatása elmarad; 4) kináz aktiválás hatására már alacsony citoszol $[Ca^{2+}]$ (2 μM) esetén is csökken a mitokondrium Ca^{2+} felvétele. E megfigyelések összessége arra utal, hogy mitokondrium külső membránjának Ca^{2+} áteresztő képessége korlátozott; továbbá a külső membránon keresztül történő Ca^{2+} transzport sebességét és ennek következtében a belső membránban lévő Ca^{2+} transzporter Ca^{2+} -kínálatát a p38 MAPK és az nPKC aktiválódás csökkenti.

A mitokondrium belső membránjához kötött és az intermembrán térbe belógó dinamin-rokon GTPáz fehérje, az OPA1 esszenciális szerepet játszik a mitokondriumok fúziójában. Mutációja a látóideg autoszóm domináns atrófiájának leggyakoribb oka. Ez a fehérje szabályozza a belső membrán kriszta-nyílásainak (junkcióinak) átmérőjét és a citokróm c átjutását e nyílásokon keresztül. A mitokondrium Ca^{2+} felvételét végző transzporterek (a csatornaként működő mitokondriális Ca^{2+} uniporter, továbbá két antiporter) a belső membránban helyezkednek el. Nem ismert azonban, hogy e molekulák az u.n. határoló membránban vagy a kriszta membránjában helyezkednek-e el. Feltételeztük, hogy amennyiben jelentős a Ca^{2+} felvétel a kriszta lumenéből a matrixba, az *OPA1* csökkent expressziója esetén könnyebben diffundál Ca^{2+} a kriszta lumenbe és ennek következtében fokozódik a mitokondrium Ca^{2+} felvétele. A hipotézist konfokális lézer pásztázó mikroszkópiával és fluoreszcens mikroszkóppal végzett FRET méréssel vizsgáltuk. A H295R adrenokortikális sejtben K^+ -mal, ill. HeLa sejtben hisztaminnal kiváltott citoszol Ca^{2+} jel áttevődött a mitokondriumba. Az *OPA1* leütését követően (mind intakt sejthez, mint mitofuzin1 siRNS-sel kezelt sejthez hasonlítva) a mitokondriális $[Ca^{2+}]$ emelkedés sebessége és amplitudója

egyaránt fokozódott. A fokozott Ca^{2+} felvétel csökkent mitokondriális membrán potenciál ellenére jött létre. Permeabilizált sejtben, *OPA1* csendesítés után a depolarizált mitokondrium Ca^{2+} felvétele szintén gyorsult. Ez utóbbi esetben a Na^{+}/Ca^{2+} és H^{+}/Ca^{2+} cseremechanizmusok szállították befelé a Ca^{2+} -ot. Eredményeik arra utalnak, hogy a kriszta membránon át jelentős Ca^{2+} felvétel történik és az OPA1 e felvétel szabályozásában szerepet játszhat.

1992-ben közöltük, hogy glomerulóza sejtben angiotenzin II hatására a mitokondrium NAD(P)H szintje - Ca^{2+}-függő módon – emelkedik, s posztuláltuk, hogy e hatás hozzájárul a szteroid szekréció fokozódásához. A mitokondriális Ca^{2+} jel szerepét a hormon termelés fokozásában most molekuláris biológiai technika felhasználásával sikerült bizonyítani. A mitokondrium matrixba irányított nagyaffinitású Ca^{2+} kötő fehérje (mt-S100G) heterológ expressziójával H295R sejtben sikerült az angiotenzin II–vel kiváltott mitokondriális Ca^{2+} jelet és NAD(P)H választ - a citoszol Ca^{2+} jel gátlása nélkül - jelentősen csökkenteni. E gátlással egyidejűleg az aldoszteron termelés is jelentősen csökkent. Az mt-S100G az INS-1E sejtek glukózzal kiváltott fenntartott inzulin szekrécióját hasonlóképpen gátolta.

A *p38 MAPK* gén csendesítését követően az angiotenzin II által kiváltott mitokondriális Ca^{2+} jel növekszik, jóllehet a citoszol Ca^{2+} jel nem mutat szignifikáns változást (l. fent). Ilyen körülmények között az angiotenzin II aldoszteron elválasztást serkentő hatásai is fokozódik. Hasonlóan, az *OPA1* leütést követő mitokondriális Ca^{2+} jelnövekedést szintén az aldoszteron termelés fokozódása kiséri. A mt-S100G expressziójával, valamint a *p38 MAPK* és az *OPA1* csendesítésével nyert eredményeink egybehangzóan bizonyítják a matrix [Ca^{2+}] és valószínűsíti a NADPH képződés fokozódásának fontosságát az aldoszteron és inzulin elválasztás szabályozásában.

Közlemények

1) Koncz P, Szanda G, Fülöp L, Rajki A, Spät A: CELL CALCIUM 46, pp. 122-129. (2009)
2) Korzeniowski MK, Szanda G, Balla T, Spät A: CELL CALCIUM 46: pp. 49-55. (2009)
3) Spät A, Fülöp L, Koncz P, Szanda G: ACTA PHYSIOLOGICA (Oxf) 195. pp. 139-147. (2009)
4) Szanda G, Rajki A, Gallego-Sandín S, Garcia-Sancho J, Spät A: PFLÜGERS ARCHIV – EUROPEAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY 457. pp. 941-954. (2009)
5) Szanda G, Halász E, Spät A: CELL CALCIUM 48. pp. 168-175. (2010)
6) Fülöp L, Szanda G, Enyedi B, Várnai P, Spät A: PLOS ONE (2011) http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0025199
7) Szanda G, Rajki A, Spät A: MOLECULAR AND CELLULAR ENDOCRINOLOGY (2011) (published on line: doi: 10.1016/j.mce.2011.08.042)
8) Wiederkehr A, Szanda G, Akhmedov D, Mataki C, Heizmann CV, Schoonjans K, Pozzan T, Spät A, Wollheim CB: CELL METABOLISM 13. pp. 601-611. (2011)

Teljes támogatás: 6 000.000,- Ft

CONTROL OF MITOCHONDRIAL Ca^{2+} METABOLISM

András Spät[1], Gergő Szanda[1], László Fülöp[1], Anikó Rajki[2]
[1]Department of Physiology, Semmelweis University; [2]Laboratory of Neurobiochemistry and Molecular Physiology, Hungarian Academy of Sciences

Calcium mobilizing hormones and neurotransmitters induce the formation of cytosolic Ca^{2+} signal and this signal is transferred into the mitochondrial matrix. Ca^{2+} accumulation by mitochondria has far-reaching effects on the metabolism and specific biological response of the cell. With the help of this grant we examined the control of mitochondrial Ca^{2+} uptake and the significance of this process.

Previously we described that p38 MAPK and a novel-type protein kinase C (nPKC), both activated by angiotensin II, attenuate the agonist-induced mitochondrial Ca^{2+} signal in H295R adrenocortical cells. In the period here reported we investigated the mechanism of this inhibition in permeabilised cells. We found that 1) the kinases inhibit Ca^{2+} uptake without reducing mitochondrial membrane potential; 2) kinase activation is followed by an increase in $[Ca^{2+}]$ required for half-maximal Ca^{2+} uptake rate; 3) after permeabilisation of the outer mitochondrial membrane with osmotic shock or t-Bid the kinases do not inhibit Ca^{2+} uptake any more; 4) activation of the kinases results in reduced Ca^{2+} uptake even at low cytosolic $[Ca^{2+}]$ (2 μM). These observations indicate that Ca^{2+} diffusion through the outer mitochondrial membrane is limited, moreover, the rate of Ca^{2+} transport through this membrane and, consequently, the Ca^{2+} supply of the mitochondrial Ca^{2+} uniporter within the inner membrane, is inhibited by p38 MAPK and nPKC.

The protein OPA1, located in the intermembrane space but attached to the inner mitochondrial membrane, is required for the fusion of mitochondria. Its mutation is the most frequent cause of dominant hereditary atrophy of the optic nerve. The diameter of the orifice of the cristae of the inner membrane as well as the diffusion of cytochrome c through this orifice are increased after knockdown of OPA1. The proteins participating in mitochondrial Ca^{2+} transport (Mitochondrial Ca^{2+} Uniporter and two antiporters) are located in the inner membrane, however, whether they are in the boundary or the crista membrane, has not been clarified. We presumed that knockdown of OPA1 would enhance the diffusion of Ca^{2+} into the lumen and mitochondrial Ca^{2+} uptake, provided a significant fraction of the uptake occurs in the crista membrane. This hypothesis has been supported by studies with confocal laser scanning microscopy and FRET technique. The Ca^{2+} signal evoked with K^+ and histamine in H295R and HeLa cells, resp., was transferred into the mitochondrial matrix. Knockdown of *OPA1* brought about increased rate and amplitude of mitochondrial Ca^{2+} uptake rate (as compared either with intact controls or with cells in which

Mitofusin 1 has been silenced). This response took place despite diminished mitochondrial membrane potential. In permeabilized cells Ca^{2+} uptake also by depolarized mitochondria was enhanced by knockdown of *OPA1*. Under the latter conditions the Na^{+}/Ca^{2+} and H^{+}/Ca^{2+} antiporters were responsible for Ca^{2+} uptake. These data indicate that significant Ca^{2+} uptake occurs through the crista membrane and OPA1 may play a role in the control of this transport mechanism.

We published in 1992 that angiotensin II evokes a Ca^{2+} -dependent formation of mitochondrial NAD(P)H in glomerulosa cells and we also proposed that this effect may contribute to the stimulation of aldosterone secretion. Now, applying molecular biological techniques, we have been successful in providing evidence for the role of mitochondrial Ca^{2+} signal in the enhancement of hormone production. Targeting of S100G, a high Ca^{2+}-affinity binding protein into the mitochondrial matrix of H295R cells, attenuated the angiotensin-induced mitochondrial Ca^{2+} and NAD(P)H signal, without modifying the cytosolic Ca^{2+} signal. Concomitantly aldosterone production was significantly reduced. The mitochondrially targeted S100G similarly inhibited the sustained phase of insulin secretion by glucose-stimulated INS-1E cells.

After silencing *p38 MAPK* the angiotensin-induced mitochondrial Ca^{2+} signal and aldosterone production are enhanced, although there is no significant change in the cytosolic Ca^{2+} signal. Similarly, knockdown of *OPA1* is followed by both increased mitochondrial Ca^{2+} signal and aldosterone production. These data, together with the effect of mt-S100G overexpression provide evidence for the significance of matrix $[Ca^{2+}]$ and most probably also of mitochondrial NADPH in the increased secretion of aldosterone ad insulin.

Publications

1) Koncz P, Szanda G, Fülöp L, Rajki A, Spät A: CELL CALCIUM 46, pp. 122-129. (2009)
2) Korzeniowski MK, Szanda G, Balla T, Spät A: CELL CALCIUM 46: pp. 49-55. (2009)
3) Spät A, Fülöp L, Koncz P, Szanda G: ACTA PHYSIOLOGICA (Oxf) 195. pp. 139-147. (2009)
4) Szanda G, Rajki A, Gallego-Sandín S, Garcia-Sancho J, Spät A: PFLÜGERS ARCHIV – EUROPEAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY 457. pp. 941-954. (2009)
5) Szanda G, Halász E, Spät A: CELL CALCIUM 48. pp. 168-175. (2010)
6) Fülöp L, Szanda G, Enyedi B, Várnai P, Spät A: PLOS ONE (2011) http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0025199
7) Szanda G, Rajki A, Spät A: MOLECULAR AND CELLULAR ENDOCRINOLOGY (2011) (published on line: doi: 10.1016/j.mce.2011.08.042)
8) Wiederkehr A, Szanda G, Akhmedov D, Mataki C, Heizmann CV, Schoonjans K, Pozzan T, Spät A, Wollheim CB: CELL METABOLISM 13. pp. 601-611. (2011)

Teljes támogatás: 4 800.000,- Ft

A P2X7 RECEPTOR SZEREPE A DEPRESSZIÓBAN: EGY GENETIKAI POLIMORFIZMUSON ALAPÚLÓ ÚJ GYÓGYSZERCÉLPONT ÁLLATKÍSÉRLETES VALIDÁCIÓJA

Csölle Cecilia[1], Andó D. Rómeó[1], Kittel Ágnes[1], Gölöncsér Flóra[1], Baranyi Mária[1], Hracskó Zsuzsanna[1], Soproni Krisztina[2], Zelena Dóra[2], Haller József [2], Németh Tamás[3], Mócsai Attila[3], Sperlágh Beáta[1]
[1]Molekuláris Farmakológiai kutatócsoport, [2]Magatartás és Stressz kutatócsoport, MTA Kísérleti Orvostudományi Kutató Intézet, Budapest, [3]Élettani Intézet, Semmelweis Egyetem, Budapest

A homo-oligomer P2X7 receptor (P2rx7) az extracelluláris ATP hatásait közvetítő P2 receptorcsalád tagja, melynek ionotróp P2X (P2X1-7) és metabotróp P2Y (P2Y1, 2,4,6,11,12,13,14) alcsaládjai ismertek. A P2X receptorok ligand aktivált nem-szelektív kationcsatornák, melyek aktivációja befelé irányuló kationáramot, illetve Ca^{2+} választ vált ki. A P2X7 receptorok kifejeződnek számos szervben és szövetben, így pl. az immunrendszer sejtes elemein, de az idegrendszerben is, a neuronokon, asztrocitákon és a mikroglia sejteken. Ennek megfelelően a P2X7 receptor a sejtes és humorális immunválasz számos aspektusát, többek között a proinflammatorikus citokin IL-1β perifériás termelődését befolyásolja, de centrális hatásai is vannak, mint pl. a neurotranszmitter felszabadulás szabályozása. Az elmúlt években végzett gén polimorfizmus kutatások mutattak rá arra, hogy a humán P2X7 receptort kódoló génen (P2RX7) azonosított nem-szinonim egyedi nukleotid polimorfizmusok (SNP) szignifikáns asszociációt mutatnak mind a major depresszió (MDD), mind pedig a bipoláris betegség (BPD) előfordulásával. Kísérletsorozatainkban a következő kérdésekre kerestük a választ: (1) Hogyan befolyásolja állatkísérletes modellekben a depresszió, illetve mánia szerű magatartást a P2rx7 hiánya, illetve farmakológiai blokádja? (2) Milyen sejtek, jelátviteli pályák, mechanizmusok részvételével befolyásolja a P2rx7 a hangulattal kapcsolatos magtartásokat? (3) Hogyan befolyásolja a P2rx7 aktivációja az IL-1β produkciót az agyban? (4) Milyen egyéb központi idegrendszeri kórállapotokban lehet jelentősége a P2rx7-nek, mint terápiás gyógyszercélpont?

(1) A kísérleteket P2X7 receptor vad típusú (P2rx7+/+) és génkiütött (P2rx7-/-) egereken végeztük, és a következő magatartásteszteket végeztük: Porsolt-féle kényszeres úszás teszt (FST), farokfelfüggesztési teszt (TST), open field (OF), megemelt keresztpalló (EPM), amfetamin-indukált hiperaktivitás (AH), ezenkívül ACTH és kortikoszteron szinteket mértünk a plazmában és a hipofízisben immobilizációs (restraint) stresszt követően. A P2X7 receptor génkiütés szignifikánsan csökkentette a "behavioral despair" jelenség kialakulását, illetve az immobilitást az FST és TST tesztekben, valamint gátolta az amfetamin által kiváltott hiperaktivitást, míg az OF és EPM tesztekben nem találtunk különbséget a kétféle genotípusú állatok között. Az FST és TST tesztekben a bakteriális endotoxin (LPS) által kiváltott depresszív magatartást is vizsgáltuk; az intraperitoneális LPS depresszív magatartást idézett elő mindkét tesztben a vad típusú egerekben, amely elmaradt a P2rx7 génkiütött egereken. A génkiütés által okozott magatartási hatásokat reprodukálni tudtuk a szelektív P2rx7 antagonista Brilliant Blue G (BBG, 50 mg/kg i.p.) szubakut adagolásával a P2rx7+/+ egereken, míg az antagonista hatástalan maradt a P2rx7-/- egereken. Összességében véve tehát a P2X7 receptor hiánya, vagy gátlása hangulatstabilizáló fenotípust eredményezett. A restraint stressz P2rx7 +/+ egereken a várakozásnak megfelelően ACTH és kortikoszteron emelkedést okozott a plazmában; P2X7 receptor génkiütött egerekben ez az emelkedés mérséklődött, vagyis az állatok csökkent stressz reaktivitást mutattak.

(2) Első lépésben arra kerestük a választ, hogy a fent leírt, P2rx7 hiányában tapasztalt hangulatstabilizáló fenotípus a csontvelő eredetű vagy egyéb sejteken kifejeződő P2rx7 hiányával áll összefüggésben. E célból csontvelő kiméra egereket hoztunk létre vad típusú és P2rx7-/- egerek csontvelejének recipiens (CD45.1) egerekbe történő transzplantációjával, így a létrejövő kimérák vagy az összes sejten (CD45.1/ P2rx7+/+) vagy csak a nem-hematopoietikus sejteken (CD45.1/ P2rx7-/-) expresszálják a P2rx7-t. A donor sejtek rekonstitúcióját flow-cytometer analízissel és

P2rx7 immunfestéssel ellenőriztük a perifériás immunsejteken, illetve a mikroglia sejteken. A csontvelő kiméra állatokban nem különbözött szignifikánsan a magtartási fenotípus, ami arra mutat, hogy a tapasztalt viselkedésbeli változásokért nem a csontvelő eredetű sejteken expresszálódó P2X7 receptorok, hanem feltehetően a központi idegrendszer intrinsic sejtjein kifejeződő P2X7 receptorok hiánya felelős. Ezt követően feltérképeztük a P2rx7 hiánya esetén tapasztalható globális génexpresszió változásokat só és LPS kezelt egerek amygdala mintáin. A real-time PCR vizsgálattal validált teljes genom microarray analízis eredménye alapján a P2X7 receptoroknak jelentős génexpresszióra gyakorolt hatásuk van a limbikus rendszerben, és a felül / alulregulálódó gének között kiemelkedő számban találtunk a szinaptikus transzmisszióhoz, illetve a neuroplaszticitáshoz köthető géneket, ezen belül a glutamáterg transzmisszióhoz kapcsolható géneket (pl. AMPA2, AMPA4, Grin2b). További vizsgálatainkban kimutattuk, hogy a P2X7 receptor aktiváció koncentrációfüggően fokozza a tríciált és endogén glutamát kiáramlást egér hippokampusz szeleteken. Az antidepresszánsok hatásában kiemelten fontos, neuroplaszticitást fokozó növekedési faktor, a BDNF protein szint alapállapotban magasabb volt a P2X7 receptor hiánya esetén a hippokampuszban, míg a P2X7 receptor agonista BzATP csökkentette a BDNF produkciót. Ez a hatás kivédhető volt a NMDA receptor NR2B alegységre szelektív antagonistájával, a Ro256981-el, és a fokozott BDNF produkcióval egybevágóan, a BrdU inkorporáció, vagyis a neurogenezis is fokozódott a hippokampusz gyrus dentatus szubgranuláris rétegében a P2rx7-/- egerekben. Ezek a vizsgálati eredmények arra mutatnak, hogy a P2X7 receptor endogén stimulációja a hippokampuszban fokozott glutamát felszabadulás előidézésével, majd azt követően a az NR2B alegység-összetételű NMDA receptorok aktivációjával gátolja a BDNF fehérje expresszióját és annak neuroplaszticitást fokozó hatásait és ezáltal lehet pro-depresszáns hatású. A fenti folyamatok következménye, de azzal párhuzamos jelátviteli lánc is lehet a monoaminerg transzmisszióra gyakorolt hatás, amelynek diszregulációját ugyancsak detektáltuk a hippokampuszban és az amigdalában a P2X7 receptor génkiütött állatokban.

(3) Farmakológiai analízis, valamint P2X7 receptor génkiütött egerek segítségével kimutattuk, hogy a P2X7 receptorok részt vesznek a szisztémás LPS kezelés által indukált IL-1β válasz kiváltásában a hippokampuszban és az amigdalában, míg a bazális citokin produkció szabályozásában nem vesznek részt. A P2X7 és P2X4 receptorokat kódoló mRNS expressziója fokozódiott a hippokampuszban a gyulladásos endotoxin stimulust követően. Megállapítottuk ugyanakkor, hogy a hippokampális IL-β produkció nagyobbik része alapállapotban és i.p. LPS kezelést követően is perifériás eredetű, és a citokin válasz kiváltásában részt vevő P2X7 receptorok is a periférián, feltehetően a keringő immunsejteken vannak.

(4) A P2rx7 szerepét a pszichiátriai kórképek mellett neuropathiás és gyulladásos fájdalomban, valamint a Parkinson-kór sejtes és állatkísérletes modelljeiben is vizsgáltuk. A P2X7 receptor antagonista BBG fájdalomcsillapító hatást fejtett ki a fenti vizsgálatokban, míg a Parkinson modellekben a P2X7 receptorok hiányának nem volt számottevő protektív hatása.

Összességében eredményeink bizonyítékot szolgáltatnak a centrális P2X7 receptorok szerepére a hangulat-kedélyállapottal kapcsolatos magatartások előidézésében és alátámasztják a P2X7 receptor antagonisták potenciális alkalmazását hangulatzavarokkal járó pszichiátriai betegségekben (depresszió, bipoláris betegség).

Ando RD, Mehesz B, Gyires K, Illes P, Sperlagh B, BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY 159:(5) pp. 1106-1117. (2010) IF: 4.925
Csolle C, Sperlagh B, JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY 219:(1-2) pp. 38-46. (2010) IF: 2.901
Csolle C, Ando RD, Kittel A, Goloncser F, Baranyi M, Soproni K, Zelena D, Haller J, Nemeth T, Mocsai A, Sperlagh B INTERNATIONAL JOURNAL OF NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY 16: pp. 1-21. (2012) IF: 4.699
Hracsko Z, Baranyi M, Csolle C, Goloncser F, Madarasz E, Kittel A, Sperlagh B, MOLECULAR NEURODEGENERATION 6:(1) p. 28. (2011) IF: 5.361

Budget: 4 800 000, - HUF

THE ROLE OF P2X7 RECEPTORS IN DEPRESSION: EXPERIMENTAL VALIDATION OF A NEW THERAPEUTIC TARGET BASED ON GENE POLYMORPHISM

Cecilia Csölle[1], Rómeó D. Andó[1], Ágnes Kittel[1], Flóra Gölöncsér[1], Mária Baranyi[1], Zsuzsanna Hracskó[1], Krisztina Soproni[2], Dóra Zelena[2], József Haller[2], Tamás Németh[3], Attila Mócsai[3], Beáta Sperlágh[1]
[1]Laboratory of Molecular Pharmacology, [2]Laboratory of Behavioral and Stress Studies, Institute of Experimental Medicine, Hungarian Academy of Sciences (IEM HAS), Budapest, Hungary, [3]Department of Physiology, Semmelweis University School of Medicine, Budapest, Hungary

The homo-oligomeric P2X7 receptors (P2rx7) belong to the family of P2 receptors that are sensitive to ATP and consists of ionotropic P2X (P2X1-7) and metabotropic P2Y (P2Y1,2,4,6,11,12,13,14) receptor subfamilies. P2X receptors are ligand activated non-selective cationic channels and their activation elicits inward current and Ca^{2+} signal. P2rx7s are widely distributed in different cells, including cells of immune system, but also in the nervous system, on neurons, astrocytes and microglia. Accordingly, P2rx7s are involved in the regulation of different aspects of the immune response, including the production of the proinflammatory cytokine IL-1β in peripheral immune cells, whereas the primary role of P2rx7s in the brain is the modulation of neurotransmitter release. Recent gene polymorphism studies have revealed that non-synonymous single nucleotide polymorphisms (SNPs) identified in the human P2X7 gene (P2RX7) are associated with both major depressive disorder (MDD) and bipolar disorder (BP).
In our studies we have addressed the following questions: (1) How genetic deletion and pharmacological antagonism of the P2X7 receptor alter depression- and mania-like behavior in animal models of mood disorders? (2) Which cells, signaling pathways, mechanisms are responsible for the action of P2rx7 to regulate mood-related behavior? (3) What is the effect of P2rx7 activation on central IL-1β production? (4) What is the potential role of P2rx7s in other CNS diseases as a therapeutic target?

(1) In our experiments we applied the following behavior tests using wild-type (P2rx7 +/+) and P2rx7-deficient (P2rx7-/-) mice: the Porsolt's forced swim test (FST), tail suspension test (TST), open field (OF), elevated plus maze (EPM) and amphetamine induced hyperlocomotion (AH) tests. In addition, adrenocorticotropic hormone (ACTH) and corticosterone levels were measured in the plasma and pituitary after restraint stress. In the absence of P2rx7s decreased behavioral despair in the FST, reduced immobility in the TST, and attenuated amphetamine induced hyperactivity were detected, whereas no difference was found between the two genotypes in the OF and EPM tests. We have also examined how genetic deletion of P2rx7 affects depressive behavior elicited by bacterial endotoxin (LPS) in the FST and TST tests. Intraperitoneal LPS injection elicited depressive behavior in both tests in wild-type animals, which was absent in mice genetically deficient in P2rx7. Behavioral effects detected in the absence of P2rx7 could be reproduced by systemic, subacute treatment with the P2rx7 selective antagonist Brilliant Blue G (50 mg/kg i.p.) in P2rx7 +/+, but not P2rx7-/- mice. In summary, genetic deletion and pharmacological blockade of P2rx7 resulted in a mood-stabilizing phenotype. Restraint stress, as expected, elevated ACTH and corticosterone levels in the plasma. These responses were significantly alleviated in P2rx7-/- mice, i.e. they displayed decreased stress reactivity.

(2) As a first step, bone marrow chimeric mice were generated by transplantation of bone marrow of P2rx7 +/+ and P2rx7-/- mice into CD45.1 positive recipient mice, and the resultant chimeric mice either expressed P2rx7 on all cells (CD45.1/ P2rx7+/+) or only non-hematopoietic cells (CD45.1/P2rx7-/-). The reconstitution of donor cells among peripheral immune cells and microglia was verified by flow-cytometric analysis and P2rx7 immunocytochemistry, respectively. No change in behavioral phenotype was observed in chimeras lacking the P2rx7 in their hematopoietic compartment, indicating that the lack of P2rx7 expressed on peripheral immune cells is not responsible for the behavioral phenotype found in P2rx7-/- mice; instead the lack of P2rx7s

expressed on intrinsic cells of the central nervous system could be responsible for the alterations detected. Next, we have explored how the absence of P2rx7 alters global gene expression in amygdala samples collected from saline and LPS treated mice. Our whole genome microarray analysis with real-time PCR validation revealed that P2rx7 activation has robust impact on gene expression in the limbic system and a widespread up- and downregulation of genes crucial for synaptic function and neuroplasticity by genetic deletion was detected, including genes related to glutamatergic neurotransmission (eg. AMPA2, AMPA4, Grin2b). In subsequent studies we showed that activation of P2rx7 results in a concentration-dependent [^{3}H]glutamate and endogenous glutamate release in hippocampal slices of P2rx7+/+ but not P2rx7-/- mice. The basal level of brain derived neurotrophic factor (BDNF) protein, a crucial factor in neuroplasticity and in the effect of antidepressants, was higher in P2rx7-/- mice than in wild-type counterparts, and the P2rx7 agonist benzoylbenzyol ATP (BzATP) decreased BDNF production. This effect depended on the activation of NR2B type NMDA receptors, as the NR2B receptor antagonist Ro256981 counteracted the effect of BzATP. Consistently with elevated BDNF level, an increased BrdU incorporation, i.e. increased neurogenesis was also observed in the subgranular layer of the dentate gyrus of the hippocampus derived from P2rx7-/- mice. These data implies that endogenous activation of P2rx7 in the hippocampus elicits increased glutamate release and subsequent activation of NR2B containing NMDA receptors and thereby elicits inhibition of BDNF production, which is known to be pro-depressant. We have also detected a dysregulation of monoaminergic transmission in the hippocampus and amygdala of P2rx7-/- mice, which could be either the consequence of the above events or an independent signaling pathway leading to alterations in mood related behavior.

(3) Using pharmacological analyses and P2rx7-/- mice, we showed that P2rx7s participate in the regulation of central IL-1β production in response to systemic LPS injection in the hippocampus and amygdala, whereas the basal IL-1β production is not subject to regulation by P2X7 receptors. mRNA encoding P2X4 and P2X7 receptors were increased in the hippocampus after endotoxin challenge. On the other hand, the hippocampal IL-1β production has substantially alleviated when contamination of circulating blood cells was excluded by transcardial perfusion, indicating the peripheral origin of hippocampal IL-1β elevation. These results point to the key role of the endogenous activation of peripheral P2rx7 in the regulation of the IL-1β level in rodent hippocampus under systemic bacterial endotoxin challenge.

(4) In addition to psychiatric disorders, we have also examined the role of P2rx7s in cellular and animal models of neuropathic and inflammatory pain and of Parkinson's disease. The P2rx7 antagonist BBG had analgesic action in inflammatory pain, whereas no substantial protective effect was detected in animal models of Parkinson’s disease.

In summary our results provide evidence on the role of central P2X7 receptors in the regulation of mood related behavior and suggest a therapeutic potential of P2rx7 antagonists for the treatment of mood disorders.

Ando RD, Mehesz B, Gyires K, Illes P, Sperlagh B, BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY 159:(5) pp. 1106-1117. (2010) IF: 4.925
Csolle C, Sperlagh B, JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY 219:(1-2) pp. 38-46. (2010) IF: 2.901
Csolle C, Ando RD, Kittel A, Goloncser F, Baranyi M, Soproni K, Zelena D, Haller J, Nemeth T, Mocsai A, Sperlagh B INTERNATIONAL JOURNAL OF NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY 16: pp. 1-21. (2012) IF: 4.699
Hracsko Z, Baranyi M, Csolle C, Goloncser F, Madarasz E, Kittel A, Sperlagh B, MOLECULAR NEURODEGENERATION 6:(1) p. 28. (2011) IF: 5.361

Teljes támogatás: 3.000.000,- Ft

A POLI-ADP-RIBÓZ POLIMERÁZ (PARP-1) SZEREPE KARDIOVASZKULÁRIS REGENERÁCIÓBAN

Sümegi Balázs, Berente Zoltán, Kovács Krisztina, Rácz Boglárka, Debreceni Balázs, Radnai Balázs, Tucsek Zsuzsanna, Veres Balázs Bognár Eszter – Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Biokémiai és Orvosi Kémiai Intézet

A vérnyomás megemelkedésére a szív a bal kamra megnagyobbodásával (ventrikuláris hipertrófia) válaszol, mely gyakran az első lépés a szívelégedetlenség kialakulásához. A hipertóniás szívbetegség gyakran a szív struktúrájának és funkciójának a megváltozásával jár, beleértve a miociták hipertrófiáját, intersticiális fibrózis kialakulását, ami végül a miokardium teljesítményének és hemodinamikájának a károsodásához vezethet ezért igen fontos lenne megismerni a károsodott szövet regenerációs mechanizmusát. Az ismert, hogy a MAP kinázok, MAP kináz foszfatáz-1 és HSP-k fontos szerepet játszanak a kardióvaszkulár regenerációban (FASEB J. 2010 Aug;24(8):2985-97, Circ Res. 2011 Apr 15;108(8):960-70). Ebben a pályázatban megvizsgáltuk a PARP inhibítorok hatását a regenerációs folyamatokban. Ismert tény, hogy a magas vérnyomással és öregedéssel kapcsolatos szívbetegségek kialakulásában a szív minden része, beleértve a miociták és nem-miocitikus sejtek, úgymint fibroblasztok, endothel sejtek, az extracelluláris mátrix fehérjék, fibrillárlis kollagén és szív erei is érintett. A hipertónia oxidatív stresszt indukál, azonban nem ismert minden reaktív oxigén gyök (ROS) eredete, ezért felmerül a lehetősége a NADPH oxidáz, nitrogén-monoxid szintáz, lipooxigenáz, ciklo-oxigenáz, xanthinoxidáz, és citokróm P450 enzimek valamint a mitokondriális légzési lánc fontos szerepének a szabadgyökök termelésében. Oxidatív stressz által indukált kedvezőtlen folyamatok; mint DNS károsodás és változások a jelátviteli útvonalakban jelentős mértékben hozzájárul a szív átalakulásának folyamatához és a negatívan befolyásolja a regenerációban fontos kináz kaszkádok és transzkripciós faktorok szabályozását, mely változások negatívan hathatnak a szöveti regenerációra (Mol Biol Rep. 2011 Jan;38(1):9-16). A DNS károsodás indukálja a nukleáris poli(ADP)ribóz-polimeráz 1 (PARP1) aktivációját ami csökkenti a sejt NAD+ és ATP készletét, és indukálhat nemkívánatos változásokat a kináz kaszkádokban, ami apoptopikus vagy nekrotikus sejt halálhoz vezethet. PARP aktivációja bizonyított az ischemiás szív modellekben és HF emberek biopsziás mintáiból.

Számos kísérleti adat bizonyítja, hogy a PARP gátlók védik a szívet ischemia-repefúzió által okozott károsodásoktól. Nincs még adat azonban a PARP gátlók potenciális védelmi hatásáról hipertóniás patkányoknál, akik a HF valamelyik stádiumában vannak.

Korábbi munkáink során kimutattuk, hogy a PARP inhibitorok pozitív hatással vannak a stressz hatására kialakuló jelátviteli útvonalak változásaira, mint például: ERK1/2, p38 MAP kináz, JNK és PI-3-kináz-Akt-GSK-3β útvonalak, amik kritikus szerepet játszanak a szív hipertóniás növekedése során.

A spontán hipertóniás patkány (SHR) egy kísérleti modell, ami a hosszú távú magas vérnyomás és konzekvens hipertóniás kardiomiopátia és HF közötti kapcsolatot tanulmányozza. Elért eredményeink alapján elmondható, hogy a PARP gátlása kedvező hatással van a szív átalakulására a kardiomiopátiás/HF modellben. Először bizonyítottuk, hogy a PARP enzim krónikus gátlása (L2286) a szív maladaptív átrendeződét a különféle kináz kaszkádok kedvező befolyásával akadályozza meg.

Eredmények: Kísérletünk kezdetén a kontroll (CFY) és magas vérnyomású (SHR) állatok vérnyomása között nem találtunk különbséget. A spontán hipertenzív állatoknál, melyek nem kaptak kezelést a kísérletsorozat végére, ekcentrikus balkamra hipertrófiát és csökkent bal kamra funkciót (LV) mutattak, míg ugyanezen csoport (SHR), aki PARP gátló kezelést kapott megőrizte a kezdeti szisztolés

bal kamra funkcióját. Az L2286 nevű PARP gátlóval történt kezelés a túlélési arányt is szignifikáns mértékben javította ($p<0.01$). A PARP gátló kezelés nem befolyásolta a magas vérnyomást a spontán hipertenzív állatcsoportban, azonban csökkentette a plazma BNP-szintet($p<0.01$) és ugyancsak kedvezően befolyásolta a mért gravimetriás paramétereket ($p<0.05$) illetve a fibrózis kiterjedésének a nagyságát ($p<0.05$). A PARP gátlás esetében megnövekedett Akt-1/GSK-3 beta($p<0.01$), ERK ½ ($p<0.01$) és PKC epszilon ($p<0.01$) foszforilációt és csökkent JNK ($p<0.05$), p-38MAPK ($p<0.01$), PKC pan beta II és PKC zeta/lambda ($p<0.01$), PKC alfa/betaII és delta foszforilációt tudtunk kimutatni. Eredményeink alapján elmondható, hogy a PARP gátlás a különféle kináz kaszkádok modulálása révén csökkenti az NF-kappaB transzkripciós faktor aktivációját, melynek elsődleges szerepe van a remodelling folyamata során. Az utóbbi időben kimutattuk, hogy a PARP gátlás jelentősen növeli a c-Kit(CD117) expresszióját oxidatív stresszben, melynek fontos szerepe lehet a progenitor sejtek szabályozásában (Circ Res. 2011 Oct 14;109(9):1044-54.). Hosszan tartó PARP gátló kezelés esetén a legfontosabb oxidatív stressz során befolyásolt jelátviteli útvonalak hosszú-távú és kedvező változásai figyelhetők meg. A PARP gátlása megakadályozza a remodelling folyamatát, megőrzi a szisztolés funkciót és késlelteti a szívelégtelenség kialakulását hipertenzív kardiomiopátia során.

Ismert tény, hogy az egyik kemoterápiás gyógyszerünk- a Doxorubicin- alkalmazásának egyik legsúlyosabb szövődménye a kardiomiopátia kialakulása. A különféle reaktív oxigén gyökök (ROS) megemelkedett mennyisége és különféle patológiás jelátviteli kaszkádok aktiválódása fontos szerepet játszik a kardiomiopátia kialakulásában. Megvizsgáltuk a PARP gátló, L2286 vegyület, és egy szuperoxid-dizmutáz-hatású vegyület, a Tempol, szerepét Doxorubicin indukálta szívelégtelenség modellben. H9C2 sejtvonalon-patkány kardiomiociták- a PARP gátló L2286 koncentráció-függő módon csökkentette a Doxorubinin-indukálta sejtkárosodás mértékét. In vitro kísérleteink során az egerek 1 hétig L2286 illetve Tempol kezelést kaptak a Doxorubicin alkalmazását megelőzően. Mindkét alkalmazott vegyület fokozta a citoprotektív jelátviteli útvonalak, úgymint Akt, foszfo-specifikus protein kináz Cζ/λ aktivitását, és csökkentették a sejthalált indukáló útvonalak aktivitását, úgymint GSK3-beta, JNK, p38 MAPK útvonalak. A PARP gátló kezelés hatása kifejezettebb volt, és a túlélést is kedvezőbben befolyásolta. Az L2286 kezelés megnövelte a proapoptotikus FKHR1 transzkripciós faktor foszforilációját és fokozta a Hsp72 és Hsp90 expresszióját. Ezen eredményeink alapján azt feltételezzük, hogy a PARP gátlása a hő-sokk-faktor-1 (Hsf1) aktivitását növeli. A PARP gátlás citoprotektív hatása nemcsak a különféle jelátviteli útvonalak kedvező befolyásolásával, de a hő-sokk fehérjék expressziós szintjének kedvező befolyásolásával jár. A PARP gátlás a Creb, FKHR1 és Hsf1 transzkripciós faktorok aktivációját okozza.

Ezek az adatok mutatják, hogy PARP modulálja azokat a jelátviteli utakat, melyek jelentősek lehetnek a szöveti regenerációban.

Teljes támogatás: 3.000.000,- Ft

ROLE OF POLY-ADP-RIBOSE POLYMERASE (PARP-1) IN CARDIOVASCULAR REGENERATION

Balazs Sumegi, Zoltan Berente, Krisztina Kovacs, Boglarka Racz, Balazs Debreceni, Balazs Radnai, Zsuzsanna Tucsek, Balazs Veres, Eszter Bognar - University of Pecs Medical School Department of Biochemistry and Medical chemistry

The development of left ventricular hypertrophy (LVH) is an adaptive response to pressure overload and often is an initial step in the process to congestive heart failure (HF). Hypertensive heart disease involves alterations in cardiac structure and function, including hypertrophy of myocytes, ischemia, and interstitial fibrosis, leading eventually to impaired myocardial performance and apoptosis. It is well documented that MAP kinases, MAP kinase phosphatase-1 and heat shock proteins play and important roles in cardiovascular regeneration (FASEB J. 2010 Aug;24(8):2985-97, Circ Res. 2011 Apr 15;108(8):960-70). In this study we investigated the effect of PARP inhibitors in the regulation these proteins and try to reveal their role in the regeneration processes. DNA damage activates the nuclear enzyme poly(ADP-ribose)polymerase-1 (PARP) which can induce necrotic and apoptotic cell death, and can induce unfavorable changes in kinase cascades promoting changes in the activation of transcription factors which can negatively affect tissue regereration (Mol Biol Rep. 2011 Jan;38(1):9-16). These changes in the activation of transcription factor can contribute to the cardiac remodeling.

It was suggested that the release of nuclearly formed ADP-ribose polymers or ADP-ribosylated proteins could be responsible for the cytosolic and mitochondrial effects of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)-1 activation in oxidative stress. In this report, we provide a novel alternative mechanism. We found that reactive oxygen species-activated PARP-1 regulated the activation of JNK and p38 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) because inhibition of PARP-1 by pharmacons, small interfering RNA silencing of PARP-1 expression, or the transdominant expression of enzymatically inactive PARP-1 resulted in the inactivation of these MAPKs. This regulation was achieved by increased expression and enlarged cytoplasmic localization of MAPK phosphatase-1 (MKP-1) upon PARP-1 inhibition in oxidative stress because changes in MKP-1 expression were reflected in the phosphorylation states of JNK and p38. Furthermore, we found that in MKP-1-silenced cells, PARP inhibition was unable to exert its protective effect, indicating the pivotal roles of JNK and p38 in mediating the oxidative-stress-induced cell death as well as that of increased MKP-1 expression in mediating the protective effect of PARP inhibition. We suggest that regulation of a protein that can directly influence cytoplasmic signaling cascades at the expression level represents a novel mechanism for the cytoplasmic action of PARP-1 inhibition. Most recent data showed that PARP inhibition induced the activation of PI-3-kinase-Akt pathway, and this pathway can activates Creb transcription factors, and we showed that PARP inhibition by activating Akt activates Creb2 transcription factor which is responsible for the activation of MKP-1 expression.

Oxidative stress followed by abnormal signaling can play a critical role in the development of long-term, high blood pressure-induced cardiac remodeling in heart failure (HF). Since oxidative stress-induced poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) activation and cell death have been observed in several experimental models, we investigated the possibility that inhibition of nuclear PARP improves cardiac performance and delays transition from hypertensive cardiopathy to HF in a spontaneously hypertensive rat (SHR) model of HF. At the beginning of the study, systolic function was similar in both CFY and SHR groups. In the SHR-C group at the end of the study, eccentric hypertrophy with poor left ventricular (LV) systolic function was observed, while PARP inhibitor treatment preserved systolic LV function. Due to these favorably changes, the survival rate of SHRs was significantly improved ($P < 0.01$) by the administration of the PARP inhibitor (L-2286). The PARP inhibitor used

did not affect the elevated blood pressure of SHR rats, but moderated the level of plasma-BNP ($P < 0.01$) and favorably influenced all the measured gravimetric parameters ($P < 0.05$) and the extent of myocardial fibrosis ($P < 0.05$). The inhibition of PARP increased the phosporylation of Akt-1/GSK-3beta ($P < 0.01$), ERK 1/2 ($P < 0.01$), and PKC epsilon ($P < 0.01$), and decreased the phosphorylation of JNK ($P < 0.05$), p-38 MAPK ($P < 0.01$), PKC pan betaII and PKC zeta/lambda ($P < 0.01$), and PKC alpha/betaII and delta ($P < 0.05$). These data show that PARP inhibitor though the modulation of kinase cascades attenuated the activation of NF-kappaB transcription factor which which is a significant extent responsible for the remodeling processes. Most recently we showed that under oxidative strees PARP inhibition significantly increase the expression of c-Kit(CD117) which is a significant regulator in progenitor cells (Circ Res. 2011 Oct 14;109(9):1044-54.). That is, chronic inhibition of PARP induces long-term favorable changes in the most important signaling pathways related to oxidative stress. PARP inhibition also prevents remodeling, preserves systolic function, and delays transition of hypertensive cardiopathy to HF in SHRs.

It is well known that cardiomyopathy is one of the most severe side effects of the chemotherapeutic agent doxorubicin (DOX). The formation of reactive oxygen species plays a critical role in the development of cardiomyopathies, and the pathophysiological cascade activates nuclear enzyme poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), and kinase pathways. We characterized the effects of the PARP-inhibitor and kinase-modulator compound L-2286 in DOX-induced cardiac injury models. We studied the effect of the established superoxide dismutase-mimic Tempol and compared the effects of this agent with those of the PARP inhibitor. In the rat H9C2 cardiomyocytes, in which DOX-induced poly(ADP-ribosyl)ation, L-2286 protected them from the DOX-induced injury in a concentration-dependent manner. In the in vivo studies, mice were pretreated (for 1 week) with L-2286 or Tempol before the DOX treatment. Both the agents improved the activation of cytoprotective kinases, Akt, phospho-specific protein kinase Cζ/λ and suppressed the activity of cell death promoting kinases glycogen synthase kinase-3β, JNK, and p38 mitogen-activated protein kinase, but the effect of PARP inhibitor was more pronounced and improved the survival as well. L-2286 activated the phosphorylation of proapoptotic transcription factor FKHR1 and promoted the expression of Hsp72 and Hsp90 which suggest that PARP inhibition can activates heat shock factor-1 (Hsf1). These data suggest that the mode of the cytoprotective action of the PARP inhibitor may include the modulation of kinase pathways and heat shock protein expression.

These data show that inhibition of PARP can modulates signaling pathway and the activation of transcription factors like Creb, FKHR1 and Hsf1 which is favourable for tissue regeneration.

Teljes támogatás: 3,300,000.- HUF

A NIKOTIN ÉS EGYÉB ADDIKCIÓT OKOZÓ SZEREK (MORFIN, ALKOHOL) KÖLCSÖNHATÁSÁNAK VIZSGÁLATA

Szabó Gyula, Babits Anikó, Bagosi Zsolt, Csabafi Krisztina, Mácsai Mónika, Mezei Zsófia, Lipták Nándor, Szakács Júlia
Kórélettani Intézet, Általános Orvostudományi Kar, Szegedi Tudományegyetem, Szeged

A jelen pályázatban vázolt kísérletek arra a kérdésre keresnek választ rágcsálókban megfigyelt magatartási adatok alapján, hogy az agy-gastrointestinalis rendszerhez köthető neuropeptidek milyen hatással vannak a nikotin és egyéb addikciót okozó szerek hatásmechanizmusára.

Akut nikotin kezelés dózisfüggő módon fejti ki hatását rágcsálókban a spontán lokomócióra. Alacsonyabb nikotin dózisoknak serkentik, míg magasabb dózisok gátolják az állatok mozgási aktivitását. Ismételt kezelés hatására azonban a stimuláló hatással szembeni szenzitizációt és a gátló hatás mérséklődését figyeltünk meg.

A ghrelin kezelés eredményeként fokozódott a nikotin előzőekben bemutatott bifázisos serkentő-gátló hatása. A ghrelin szignifikánsan fokozta a nikotin anxiogén hatását is; a ghrelin kezelésben részesült egerek jelentősen több időt töltöttek az open-field perifériás régióiban (1).
Jelenleg is folyó vizsgálataink eredményei közül kiemelendő, hogy a pro-ghrelin peptidből származó obestatin és az obestatin-morfin kezelés eredményei megerősítik a peptidcsalád anxiogén jellegét.

In vitro kísérleteinkben a nikotin és a ghrelin fokozta a striatum és az amygdala dopamin felszabadulását, a striatumban a peptid kezelés eredményeként további additív hatást tapasztaltunk. A két struktúra, mint ismeretes fontos szerepet játszik a mozgási aktivitás és a jutalmazó-megerősítő magatartás mediálásában és így kapcsolatban állhatnak a vizsgált magatartási paraméterekkel (1).

A krónikus nikotin kezelés tolerancia kialakulását, elhagyása megvonási tüneteket okoz. A tolerancia kialakulása már 8 nappal a kezelés megkezdése után kimutatható, de optimálisan két hét után vizsgálható. A ghrelin krónikusan alkalmazva ugyan nem hat a tolerancia kialakulására, de a nikotin kezelés elhagyása után fellépő elvonási tüneteket azonban jelentősen mérsékli (1).

A krónikus nikotin kezelés hatására az állatok verticalis és horizontalis aktivitása fokozódik és az általuk megtett út is növekszik. Ezzel párhuzamosan *in vitro* szuperfúziós kísérletekben a striatalis dopamin és az amygdalaris GABA szint is nő. A krónikus nikotin kezelés hatására emelkedik a plazma kortikoszteron szint is. Ezeket a változásokat a CRF-1 receptor szelektív antagonista antalarmin szignifikánsan csökkentette. Az észlelt hatások magyarázata az lehet, hogy az antalarmin a krónikus nikotin kezeléskor az amygdala-beli CRF-1 receptorok gátlása révén csökkentette az anxiogenezist, és a nigro-striatalis rendszer CRF-1 receptorainak gátlása által hatott lokomócióra is. A hypothalamicus CRF-1 receptorok gátlása viszont csökkentette a stressz tengely aktivitását is, tehát a plazma kortikoszteron szint csökkenése ezzel magyarázható.

A nikotin megvonás következtében a verticalis és horizontalis aktivitás, a megtett út, a plazma kortikoszteron szint egyaránt jelentősen csökkent, de antalarmin kezelés hatására szignifikánsan növekedtek, ugyanakkor a striatalis dopamin, illetve amygdalaris GABA szintje nem változott. Az antalarmin nikotin megvonáskor megfigyelt mozgásaktivitást csökkentő hatásának az lehet a magyarázata, hogy a CRF-1 receptor gátlása miatt a magatartási hatás a CRF-2 receptoron keresztül mediálódik és a CRF-2 receptoron ható urokortinok - extrahypothalamicus struktúrákon hatva - csökkentik az aktivitást. Az antalarmin a hippocampus-on keresztül anxiolysis-t vált ki és csökkenti a hypothalamus tónusos GABAerg gátlását, ezáltal növeli a stressz tengely aktivitását: a lokomóciót és a plazma kortikoszteron szintet is. Tisztázásra vár egy alternatív magyarázat lehetősége is, hogy a

lokomóció fokozódásáért a jutalmazó-megerősítő központokon keresztül mediálódó fokozott drogkereső magatartás tehető felelőssé.

A fentiekkel összefüggésben új megfigyeléseket tettünk kokain hatását illetően is. Az akut kokainkezelés-indukálta fokozott lokomócióra az antalarmin kezelés ugyan nem hatott, de szignifikánsan megnövelte a kísérleti állatok által az open-field centrális terében eltöltött időt, ami anxiolytikus hatásként értékelhető. Az antalarmin kezelés azonban hatékonyan gátolta a krónikus kokainkezelés után megfigyelt fokozott mozgásaktivitást és 24 órával az utolsó kokain dózis után adott CRF-1 antagonista csökkentette az akut megvonás által okozott hypoaktivitást is. Az eredmények felhívják a figyelmet a CRF-1 receptorok szerepére a krónikus kokain kezelés következtében kialakult viselkedési mintázatok kialakulásában is.

Kombinált alkohol és nikotin kezelés magatartásra kifejtett hatásának vizsgálata során kapott eredményeink további pontosításokat igényelnek, mivel a várt anxiolytikus hatással szemben a kombinált alkohol+nikotin kezelés ellenkező hatást mutatott.

Egy kollaborációs vizsgálatban a gasztrointesztinális peptidek szerepét kóros körülmények között is tisztázni kívántuk. A japán táncoló egerek ismétlődő (elsősorban körkörös) mozgás zavart mutatnak így viselkedésük több mentális/neurológiai betegség tüneteit szimulálják. Kollaborációs kutatás keretében kimutattuk, hogy secretin kezelés képes csökkenteni az állatok sztereotíp mozgását, elősegíti a normális (horizontális) mozgást és növeli a bejárt terület nagyságát is, de nem hat az exploratív magatartásra (ágaskodás, ugrás) (2).

A peptid család egy másik tagját a hypophysis adenilát-cikláz aktiváló polypeptidet vizsgálva megállapítottuk, hogy a morfin megvonás során anxiolytikus hatása van és képes a megvonást kísérő szomatikus tünetek mérséklésére is (3).

Korábbi *in vitro* vizsgálataink során az akut nikotin kezelés csökkentette az izolált aorta értágító és anti-aggregáló hatású prosztaciklin szintézisét, de nem befolyásolta a vérlemezkék fő arachidonsav metabolitjának, az érszűkítő és vérlemezke aggregáló hatású tromboxánnak a képzését. Az addiktív folyamatok mellett a kardiovaszkuláris megbetegedések pathomechanizmusában is nagy jelentőséget tulajdonítanak a nikotin hatásának és a vérlemezkék aktiválódásának. Kísérleteinkben arra kerestük a választ, hogy az *in vivo* krónikus kezelés képes-e, és milyen módon befolyásolni a vérlemezkék eikozanoid szintézisét.
A krónikus nikotin kezelés szignifikánsan csökkentette a vérlemezkék tromboxán szintézisét. Nikotin megvonást követően a csökkenés tovább fokozódott. A vérlemezke arachidonsav metabolizmusának csökkenését, a maradék arachidonsav mennyiségének növekedése is jelzi.
Vizsgálataink alapján a jelen kísérleti eredményeink magyarázata az lehet, hogy az *in vivo* adott nikotin csökkenti az ér endotél prosztaciklin szintézisét aktiválhatja a keringő vérlemezkéket. Az in vivo aktivált vérlemezkék szekréciós tevékenységük fokozódása eredményeként elveszítik vezikulumaik tartalmát, ezért az általunk *in vitro* vizsgált trombociták aktivitása csökkent. A nikotin megvonás a hypothalamus-hypophysis-mellékvesekéreg tengelyt aktiválva tovább fokozhatja a vérlemezkék *in vivo* aktivitását. Mind emellett, a felszabaduló glükokortikoid gátló hatást fejthet ki a szabad arachidonsav kialakulásában kulcsfontosságú szerepet játszó enzimre, a foszfolipázra.

1. Dochnal R, et al (in prep)
2. Köves K, et al. *Journal of Molecular Neuroscience* 43, 109-114, (2011).
3. Lipták N, et al *Neuropeptides 46,* 11-17, (2012).

Teljes támogatás: 3,300,000.- HUF

INTERACTION OF NICOTINE WITH OTHER ADDICTION PRODUCING DRUGS (MORPHINE AND ALCOHOL)

Gyula Szabó, Anikó Babits, Zsolt Bagosi, Krisztina Csabafi, Mónika Mácsai, Zsófia Mezei, Nándor Lipták, Júlia Szakács
Department of Pathophysiology, Medical Faculty, University of Szeged; Szeged, Hungary

The present study aims at investigating the effects of brain-gut neuropeptides on the effects of nicotine and other addictive drugs on behavioral effects of rodents.

Acute nicotine treatment affects spontaneous locomotion of rodents in a dose-related manner. Lower doses of nicotine display stimulatory, while higher doses inhibit motor activity of the animals. Repeated treatment however results in sensitization to the stimulatory effect and diminishing of the inhibitory action.

Ghrelin treatment enhances this stimulatory-inhibitory action. Furthermore, ghrelin significantly increased the anxiogenic effects of nicotine, since ghrelin-treated animals tend to spend more time in the peripheral region of the open-field test, which is considered consistent with the above behavior (1).
Our present studies obtained with obestatin, which peptide is deriving from the same pro-ghrelin family like ghrelin may further strengthen the anxiogenic role of these peptides.

In an *in vitro* study nicotine and ghrelin stimulated the dopamine release in striatum and amygdala and upon peptide treatment further additive effect was observed in the striatum. These brain structures are important in mediating the locomotor and brain reward system and such they can influence the behavioral parameters (1).

Chronic nicotine treatment results in development of tolerance and cessation of nicotine administration leads to development of withdrawal sigs. The first signs of tolerance can be observed after 8 days and fully develops by the end of the second week. Ghrelin administered chronically does not influence the development of tolerance; however it is able to ameliorate the withdrawal signs (1).

Chronic nicotine treatment enhances locomotor activity of animals (vertical, horizontal and total ambulation). In parallel with this, in an *in vitro* brain tissue superfusion experiment the striatal dopamine and amygdalar GABA level was increased. The plasma corticosterone level was increased. These changes were diminished by CRF-1 receptor selective antagonist antalarmin. It is possible that antalarmin is able decrease anxiogenesis by blocking CRF-1 receptors in the amygdale and by blocking CRF-1 receptors in the nigro-striatal region facilitates locomotor activity. The reduction of plasma corticosterone level can be the result of hypothalamic CRF-1 receptor block.

Nicotine withdrawal shows opposite effects in terms of locomotion and plasma corticosterone level compared to chronic nicotine treatment. This effect was antagonized by antalarmin. There was no significant change in the *in vitro* data.
It is supposed that during withdrawal the behavioral effects are mediated through CRF-2 receptors and urocortins as ligands to these receptors can be implicated. This effect is supposedly mediated by extrahypothalamic structures, however further studies are needed to elucidate this mechanism. On the other hand, antalarmin can induce anxiolytic effect and can decrease the tonic GABA-ergic inhibition of the hypothalamus as well thereby enhancing stress activity along with locomotion and elevated plasma corticosterone level. As an alternative, which needs to be elucidated, increased locomotor activity can be result of an increased drug-seeking behavior as well and central reward pathways are responsible for this effect.

In regard to the above observations with antalarmin, we have observed that acute cocaine administration itself increased the locomotor activity; antalarmin treatment does not influence the enhanced activity, but increased the time spent in the middle of the open filed box. This observation is consistent with an anxiolytic effect. Furthermore, antalarmin treatment effectively blocked the hyperactivity induced by chronic cocaine treatment and 24 hr after cessation of cocaine treatment CRF-1 antagonist alleviated the withdrawal induced hypoactivity. The results highlight the importance of CRF-1 receptors in development of behavioral patterns after chronic cocaine treatment.

Our data obtained from combined alcohol and nicotine treatment require further clarifications as – contrary to our expectations – anxiogenic effects were detected

In a collaborative study we elucidated the effects of gastrointestinal peptides under pathologic conditions. Japanese walzing mice exhibit stereotypic circular movements, which can simulate symptoms of several neurologic/mental disorders. It was found that secretin treatment can decrease the stereotype movement of animals and improve the horizontal movement indicated by the normalization of ambulation time and distance; however, it did not influence explorative behavior (2).

Another member of the peptide superfamily, adenylate cyclase-activating polypeptide exerts anxiolytic effect during morphine withdrawal and alleviates the somatic symptoms of withdrawal as well (3).

In our previous *in vitro* study acute nicotine administration decreased the amount of prostacyclin synthesis in isolated aortic strip, but did not affect the generation of thromboxanes. As still there is an important role of nicotine besides addiction in the development of cardiovascular diseases in the present experiments we examined the effects of chronic nicotine treatment on the arachidonate metabolism in platelets.
Chronic nicotine treatment significantly decreased the thromboxane synthesis in platelets and nicotine withdrawal further decreased the synthesis *in vivo*. Decreased arachidonate metabolism is reflected by an increase in the amount of total arachidonic acids. We suppose that *in vivo* administration of nicotine impairs prostacycline synthesis in endothelial cells and also stimulates circulating platelets. Thrombocytes will lose the content of their secretory vesicles *in vivo* and we measure a decreased platelet activity. During withdrawal, the activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis further enhances the activity of platelets *in vivo* and the increased amount of glucocorticods can impair the activity of phospholipase, the key enzyme of arachidonic acid generation.

1. Dochnal R, Manczinger M, Szakács J, Bagosi Z, Csabafi K, Lipták N, Tóth G, Szabó G.The effect of ghrelin on nicotine-induced acute behavioral effects and withdrawal signs.
(in prep)

2. Köves K, Kiss G, Heinzlmann A, Dochnal R, Manczinger M, Pál A, Sípos I, Szabó G.
Secretin attenuates the hereditary repetitive hyperactive movements in a mouse model. *Journal of Molecular Neuroscience* 43, 109-114, (2011).

3. Lipták N, Dochnal R, Babits A, Csabafi K, Szakács J, Tóth G, Szabó G. The effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on elevated plus maze behavior and hypothermia induced by morphine withdrawal. *Neuropeptides 46*, 11-17, (2012).

Teljes támogatás: 3.900.000 Ft

Asztma genomikai vizsgálata humán minták és állatmodellek segítségével

Szalai Csaba[1], Losonczy György[2], Horváth Ildikó[2], Molnár Viktor[3], Antal Péter[4], Nagy Adrienne[1], Kiszel Petra[3], Komlósi Zsolt István[2]
[1]Heim Pál Kórház, [2] Semmelweis Egyetem Pulmonológiai Klinika, [3]Semmelweis Egyetem Genetikai Sejt- és Immunbiológiai Intézet, [4] Budapesti Műszaki Egyetem Méréstechnika és információs rendszerek tanszék

A gyeremekkori asztma-allergia-kontroll biobankunkat folyamatosan fejlesztve, jelenleg Magyarország legnagyobb ilyen típusú gyűjteménye áll rendelkezésre, több mint 1200 mintával, és a hozzá kapcsolódó laboratóriumi és klinikai adattal. Ezen a biobankon először az asztma kialakulásában vélhetően szerepet játszó 11q13 és 14q22 genomterületek SNP-szűrését végeztük el 144 SNP genotipizálásával.
Genetikai asszociációs vizsgálatok elemzésére kifejlesztettük a BN BMLA (Bayesian network based Bayesian multilevel analysis of relevance) új rendszerbiológiai, hálózatelemzésre alkalmas statisztikai módszerünket. A kifejlesztett módszerrel 7 SNP, illetve 6 gén (*FRMD6, PTGER2, PTGDR, PRPF19, MS4A2, AHNAK*) szerepét sikerült igazolni asztma pathomechanizmusában a vizsgált genomrégiókban. A módszerrel számos gén-gén kölcsönhatást mutattunk ki. A gén-gén kölcsönhatásokban kiemelt szerepe volt az *FRMD6* gén rs3751464 SNP-jének, melynek ritkább allélja minden kölcsönhatásban növelte az asztma kockázatot, a gyakoribb allélja csökkentette. A BN BMLA elemzés alkalmas arra, hogy viszonylag kevés adatból a gének szerepét egyszerre több célváltozóra is vizsgáljuk, illetve azt tanulmányozzuk, hogy a betegségre való hajlammal közvetlenül, vagy közvetve asszociál. Ez alapján az *AHNAK* gén egyik variációja allergiás rhinitisre hajlamosít, és ezen keresztül, azaz közvetve hajlamosít asztmára. Hasonlóan, az *MS4A2* gén, amely a nagy affinitású IgE receptor béta alegységét kódolja, csak akkor asszociált asztmával, ha az IgE és az eozinofil értékeket is bevettük az elemzésbe. Ezzel szemben az FRMD6, a PTGER2, a PTGDR és a PRPF19 gének egyes variációi közvetlenül asszocáltak asztmával. Az eredményeket a PlosOne újságban tervezzük közölni. A beküldött cikk jelenleg minor revision státuszban van.
Asztma biobankunkon a hisztamin receptor 4 (*HRH4)* génben 21 SNP-t genotipizálva megállapítottuk, hogy a génben található egyes SNP-khez tartozó genotípusok és haplotípusok befolyásolják az infekció-indukálta asztmára való hajlamot.
Gén-környezet kölcsönhatás vizsgálatában asztmás és kontroll gyermekek lakóhely adataiból származó légszennyezettségi értékeket (NO_2 szint) és az oxidatív stressz válaszban résztvevő két gén (*NFE2L2 és KEAP1*) 12 variációjának szerepét vizsgáltuk asztma kockázatára. 12 SNP vizsgálatával megállapítottuk, hogy az *NFE2L2* gén szabályozó régiójában található két variáció és egy haplotípus légszennyezettségtől függően befolyásolják az asztma kockázatát. Az *NFE2L2* gén két SNP-je légszennyezettségtől függetlenül is befolyásolta a fertőzés-indukálta asztma kockázatát.

A vizsgálatok másik típusát a microarray alapú nagyfelbontású génexpressziós mérések alkották. Asztma egérmodellben, átfogó bioinformatikai elemzések segítségével sikerült az összes vizsgálati időpontokban tapasztalt rendkívül intenzív génexpressziós változásokat biológiai útvonalakhoz és génontológiai kategóriákhoz kötni. MikroRNS microarray vizsgálatok során megfigyeltük az immunrendszer működésének szabályozásában résztvevő miR-155 megnövekedett expresszióját az „asztmás" állatok tüdejében. Sikeresen azonosítottunk egy eddig asztma szempontjából még nem vizsgált gént, az antioxidatív hatású paraoxonáz-1 enzimet kódoló *PON1*-t, mely nagymértékben csökkent expressziót mutatott az asztmatikus progresszió során a vizsgált egér allergiás asztma modellben. Súlyos akut asztmás betegek esetében sikerült összefüggést kimutatni az asztmatikus tünetek súlyossága és a szérum PON1 aktivitásának csökkenése között.
A fent leírt kísérletek eredményei a fejlesztett bioinformatikai eszközökkel is kiértékelésre kerültek. Az itt kijött eredmények, illetve irodalmi kutatások alapján 6 gén kiválasztása történt meg további elemzésre: *Derlin3, Calpain 9, AIF1, BIRC5 LY9, FRMD6*. Ezek közül a konzervált Hippo útvonalon található *FRMD6* és *BIRC5* szintje szignifikánsan emelkedett egér asztma modellben az

állatok tüdőszövetében és humán asztmások indukált köpet mintájában. Mindkét gén bizonyos SNP-éi fokozzák az asztma hajlamot magyar gyermekekben, és a *BIRC5* gén egyik SNP-je korrelált szérum eozinofil szinttel asztmásokban. Eredményeink alapján a konzervált Hippo útvonal fontos szerepet játszik asztmában, így az útvonalon található gének, illetve maga az útvonal potenciális gyógyszer, illetve terápiás támadáspont.

Eredeti közlemények (kiemelve az ETT projekt résztvevői)

1. **Szalai Cs**. Genomika a mai modern gyógyszerkutatásban I. rész. Gyógyszerészet 53: pp. 331-337 (2009).
2. **Szalai Cs**. Genomika a mai modern gyógyszerkutatásban II. rész. Gyógyszerészet 53: pp. 391-396 (2009).
3. Hullám G, **Antal P**, **Szalai C**, Falus A: Evaluation of methods in GA studies: yet another case for Bayesian network, Machine Learning in System Biology 2009 (MLSB09), Proc. of the Third International Workshop, pp. 35-44 (2009).
4. **Szalai C.** Az asztma genomikai háttere. Lege Artis Medicine 20(12): pp. 835-841 (2010).
5. **Szalai C**. Teljes genom asszociációs vizsgálat. Orvostovábbképző szemle. 9: pp. 64-72 (2011).
6. Csoma Z, Antus B, Barta I, **Szalai C**, Strausz J, Kovács G, Herjavecz I. A súlyos asztma hazai előfordulása és klinikai fenotipizálása. Medicina Thoracalis. LXIV (5): pp. 299-311 (2011).
7. Ungvári I, Hadadi É, Virág V, **Nagy A**, Kiss A, Kalmár Á, Zsigmond G, Semsei ÁF, Falus A, **Szalai C**. Relationship between air pollution, NFE2L2 gene polymorphisms and childhood asthma in a Hungarian population. J Community Genet. 3(1): pp. 25-33 (2012). IF.: 1,538
8. Simon T, Semsei ÁF, Ungvári I, Hadadi É, Virág V, **Nagy A,** Vángor MS, László V, **Szalai C**, Falus A. Asthma endophenotypes and polymorphisms in the histamine receptor HRH4 gene. International Archives of Allergy and Immunology, accepted, IF.: 2,54
9. Ungvári I, Hadadi É, Virág V, Bikov A, **Nagy A**, F. Semsei ÁF, Gálffy G, Tamási L, **Horváth I**, **Szalai C**. Implication of BIRC5 in asthma pathogenesis. Int Immunol, accepted, IF.: 3,301

Teljes támogatás: 3.900.000 Ft

Genomic investigation of asthma in human samples and animal models

Szalai Csaba[1], Losonczy György[2], Horváth Ildikó[2], Molnár Viktor[3], Antal Péter[4], Nagy Adrienne[1], Kiszel Petra[3], Komlósi Zsolt István[2]
[1]Heim Pál Hospital, [2] Semmelweis University Department of Pulmonology, [3]Semmelweis University Department of Genetic, Cell and Immunobiology, [4] Technical University of Budapest Department of Measurement and Information Systems

In the last ten years we have been collecting samples and clinical data for our asthma-allergy and control biobank. Presently, we have more than 1200 samples, which is largest in Hungary. Based on earlier linkage analyses we selected the 11q13 and 14q22 asthma susceptibility regions, for which we designed a partial genome screening study using 144 SNPs in 1201 individuals (436 asthmatic children and 765 controls). The results were evaluated with traditional frequentist methods and we applied a new statistical method, called Bayesian network based Bayesian multilevel analysis of relevance (BN-BMLA). This method uses Bayesian network representation to provide detailed characterization of the relevance of factors, such as joint significance, the type of dependency, and multi-target aspects. We estimated posteriors for these relations within the Bayesian statistical framework, in order to estimate the posteriors whether a variable is directly relevant or its association is only mediated. In the BN-BMLA analysis altogether 5 SNPs in 4 genes were found relevant in connection with asthma phenotype: *PRPF19* on chromosome 11, and *FRMD6*, *PTGER2* and *PTGDR* on chromosome 14. In a subsequent step a partial dataset containing rhinitis and further clinical parameters was used, which allowed the analysis of relevance of SNPs for asthma and multiple targets. These analyses suggested that SNPs in the *AHNAK* and *MS4A2* genes were indirectly associated with asthma. The possible role of the *FRMD6* gene in asthma was also confirmed in an animal model and human asthmatics.

Twenty-one SNPs of *HRH4* gene were genotyped in asthmatic patients and controls. Genotype distribution of three *HRH4* SNPs, namely rs17187619, rs527790 and rs487202 differed significantly between patients with or without infection-induced asthma. Haplotypes, which included rs4800573 - rs527790 CC allele combination were found to be associated with infection-induced asthma. The rs487202 - rs574913 CA haplotype was more frequent among patients with infection-induced asthma. Our results suggest that genetic variation in *HRH4* gene might influence the pathogenesis of infection-induced asthma.

Air pollution and subsequent increased oxidative stress have long been recognized as contributing factors for asthma phenotypes. Individual susceptibility to oxidative stress is determined by genetic variations of the antioxidant defense system. We analyzed the association between environmental nitrogen dioxide (NO_2) exposure and single nucleotide polymorphisms (SNP) in *NFE2L2* and *KEAP1* genes and their common impact on asthma risk. We genotyped 12 SNPs in a case-control study and NO_2 concentration was collected from the period preceding the development of asthma symptoms. Our data showed that genotypes of rs2588882 and rs6721961 in the regulatory regions of *NFE2L2* gene were inversely associated with infection-induced. Furthermore, case-only analyses revealed significant differences for these SNPs between asthma patients that lived in modestly or highly polluted environment. In conclusion, our results throw some new light upon the impact of *NFE2L2* polymorphisms on the infection-induced asthma risk and their effect in gene-environment interactions.

The other types of studies involved whole genome gene expression measurements in an animal (mouse) model of asthma. In these studies we found several genes expressed differently in different status of asthma. For a more detailed study, we selected *PON1*. In human asthmatic patients we found that serum PON1 activity was reduced at exacerbation, but increased parallel with improving asthma symptoms. Increased expression of a microRNA, the miR-155 was also observed in the lung of asthmatic animals. This microRNA has a role in the regulation of the immune system.

With the help of our bioinformatic methods we selected further genes for more detailed investigation: *Derlin3, Calpain 9, AIF1, BIRC5 LY9, FRMD6. BIRC5* (also known as survivin) is

an important anti-apoptotic protein that has been implicated in many cancer types, and recent studies provide evidence for its role in controlling inflammatory disorders as well. We found that induced sputum samples of patients with bronchial asthma contained elevated levels of *BIRC5* mRNA compared to healthy subjects and its level was in correlation with sputum eosinophil percentages. Furthermore, in a case-control study examining single nucleotide polymorphisms in the BIRC5 regulatory regions, the minor alleles of rs8073903 and rs8073069 were found to be significantly associated with asthma and especially non-allergic asthma phenotypes, which associations were more prominent among women. Two marker haplotype analyses further strengthen the impact of these two polymorphisms on both asthma and non-allergic asthma. In the female cohort, rs1508147 was also significantly associated with increased risk of non-allergic asthma. Additionally, with linear regression analysis we showed that rs9904341 was significantly correlated with both absolute and relative serum eosinophil levels. In conclusion, our results suggest that possibly by inhibition of the eosinophil apoptosis, BIRC5 might be an important regulator of the asthmatic processes and we provide some evidence that its effect might be affected by single nucleotide polymorphisms located in the gene regulatory regions. As both *FRMD6* and *BIRC5* are part of the conserved Hippo pathway, this pathway might play a role in the asthmatic pathogenesis, and might be a useful target for future therapy of asthma.

Related original papers

10. **Szalai Cs**. Genomika a mai modern gyógyszerkutatásban I. rész. Gyógyszerészet 53: pp. 331-337 (2009).
11. **Szalai Cs**. Genomika a mai modern gyógyszerkutatásban II. rész. Gyógyszerészet 53: pp. 391-396 (2009).
12. Hullám G, **Antal P**, **Szalai C**, Falus A: Evaluation of methods in GA studies: yet another case for Bayesian network, Machine Learning in System Biology 2009 (MLSB09), Proc. of the Third International Workshop, 2009: 35-44.
13. **Szalai C.** Az asztma genomikai háttere. Lege Artis Medicine 20(12): pp. 835-841 (2010).
14. **Szalai C**. Teljes genom asszociációs vizsgálat. Orvostovábbképző szemle. 9: pp. 64-72 (2011).
15. Csoma Z, Antus B, Barta I, **Szalai C**, Strausz J, Kovács G, Herjavecz I. A súlyos asztma hazai előfordulása és klinikai fenotipizálása. Medicina Thoracalis. LXIV (5): pp. 299-311 (2011).
16. Ungvári I, Hadadi É, Virág V, Nagy A, Kiss A, Kalmár Á, Zsigmond G, Semsei ÁF, Falus A, **Szalai C**. Relationship between air pollution, NFE2L2 gene polymorphisms and childhood asthma in a Hungarian population. J Community Genet. 3(1): pp. 25-33 (2012). IF.: 1,538
17. Simon T, Semsei ÁF, Ungvári I, Hadadi É, Virág V, **Nagy A,** Vángor MS, László V, **Szalai C**, Falus A. Asthma endophenotypes and polymorphisms in the histamine receptor HRH4 gene. International Archives of Allergy and Immunology, accepted, IF.: 2,54
18. Ungvári I, Hadadi É, Virág V, Bikov A, **Nagy A**, F. Semsei ÁF, Gálffy G, Tamási L, **Horváth I**, **Szalai C**. Implication of BIRC5 in asthma pathogenesis. Int Immunol, accepted, IF.: 3,301

Teljes támogatás: 6.000.000,-Ft

ALKOHOLOS ÉS NEM-ALKOHOLOS IDÜLT MÁJBETEGSÉGEK ÉS SZÖVŐDMÉNYEIK PATHOGENEZISE

Szalay Ferenc
Semmelweis Egyetem I. sz. Belgyógyászati Klinika

Krónikus C hepatitises (HCV) betegekben az autonóm idegrendszer diszfunkcióját mutattuk ki nem invazív módszerekkel.
Kezeletlen HCV-s betegekben a spontán baroreflex szenzitivitás (BRS) és a szívfrekvencia variabilitás indexet szignifikánsan ($p<0,01$) alacsonyabbnak találtuk az egészséges kontrollokhoz képest. Az autonóm károsodás összefüggést mutatott az alanin aminotranszferáz enzimemelkedéssel, de nem volt összefüggésben a HCV RNS szinttel és a krioglobulinok jelenlétével.

Liver International 2009;29:1473-1478. IF:2,987

Kimutattuk, hogy krónikus C hepatitises betegek pegylált interferon plusz ribavirin kombinált kezelése közben az autonóm kardiovaszkuláris funkció átmenetileg rosszabbodik.
Az antivirális kezelés első 12 hetében az autonóm funkció, a várakozással ellentétben, nem javult, hanem szignifikánsan rosszabbodott. Később a tendencia megfordult, a 24. héten javulás volt megfigyelhető, és a kezelés 48. hetében már nem volt különbség a kiindulási értékekhez képest. A jelenség oka nem ismert. Adataink szerint az autonóm funkció átmeneti károsodása miatt nem szükséges a kezelést felfüggeszteni.

Hepatitis Monthly, 2011;11:114-118. IF:0,793

Nemzetközi munkacsoport tagjaként végzett vizsgálataink során kimutattuk, hogy autoimmun hepatitisben a budenosid hatékonyabban indukált remissziót a prednisolonhoz képest.
Azatioprinnel kombinált budenosid kezelés a betegek 47%-ában, a prednisolon kezelés a betegek 18.4%-ában eredményezett teljes biokémiai remissziót ($P<0,001$). A budenosiddal kezelt csoportban a szteroid indukálta mellékhatások aránya lényegesen kisebb volt. Azokban a betegekben, akik a korábban alkalmazott prednisolon helyett budesonidot kaptak, a szteroid-specifikus mellékhatások 40%-os csökkenését figyeltük meg.

Gastroenterology 2010;139:1198-1206 IF:12,899

Magyarországi multicentrikus vizsgálatban kimutattuk, hogy a mannóz-kötő lectin (MBL) deficiencia májcirrhosisos betegekben a bakteriális infekció nagyobb kockázatával jár.
A mannóz-deficiens májcirrhosisos betegeket összehasonlítva a nem dificens májcirrhosisos betegekkel, az infekció kockázata 50,0% vs. 31,8 % volt ($P<0,039$). Logisztikus regressziós analízis szerint az MBL deficiencia az infekció független rizikófaktorának bizonyult. Az első bakteriális infekció kialakulásának átlagos ideje az MBL deficiens betegekben 579 nap volt, szemben a nem-deficiens betegben megfigyelt 944 nappal szemben.

J Hepatol 2010;53:484-491. IF:7,818

Multicentrikus vizsgálatban kimutattuk, hogy az anti-mikróbás antitestek gyakrabban fordulnak elő májcirrhosisos betegek szérumában, mint az egészséges kontroll egyénekben.
A Saccharomyces cerevisiae antitestek (ASCA) és bél baktérium multiplex bakteriális antigénje elleni IgA antitestek (anti-OMP Plus ^{TM}, Inova Diagnostics) előfordulását májcirrhosisos betegek szérumában 38,5% és 62,6%-ban mutattuk ki, míg az egészséges kontroll egyénekben csak 16% és 20%-ban (P<0,001).
Adataink arra utalnak, hogy májcirrhosisban a szisztémásan megjelenő mikróba ellenes reaktivitásban, az anti-mikróbás antitestek megjelenésében a mucosális immunitás károsodásának, továbbá a bakteriális transzlokációnak szerepe lehet.

PLos One 2010;5/9:e12957. IF:4,351

Neurológiai tüneteket mutató Wilson kóros betegekben kimutattuk, hogy a mozgást követő EEG béta szinkronizáció latenciája és nagysága eltér az egészségesekétől .
A Wilson kóros betegek jelentős hányadában neurológiai tünetek mutathatók ki. Az egyik leggyakoribb mozgászavar a tremor. Sok esetben a betegséget sokáig tévesen Parkinson-kórnak vagy esszenciális tremornak diagnosztizálják. Adataink szerint a mozgást követő béta szinkronizáció latenciája nagyobb, nagysága pedig kisebb, mint az egészségeseké.

Neurosci Lett 2011;494:240-4. IF:2,055

János Osztovits, Tamás Horváth, Margit Abonyi, Tamás Tóth, Zsolt Visnyei, Gabriella Bekő, Timea Csák, Péter lászló lakatos, Levente Littvay, János Fehér, Péter Kempler, Márk kollai, **Ferenc Szalay :**
Chronic hepaitis C virus infection associated with autonomic dysfunction
Liver International 2009;10: 1473-78.

Osztovits J, Horváth E, Tax J, Csihi L, Horváth T, Littvay L, Tóth T, Abonyi M, Lakatos PL, Kollai M, Fehér J, **Szalay F**, Blum HE:
Reversible autonomic dysfunction during antiviral treatment in patients with chronic hepatitis C virus infection.
Hepat Mon 2011; 11(2): 114-8.

Manns MP, Woynarowski M, Kreisel W, Lurie Y, Zuckermann E, Bahr MJ, Günther R, Hultcrantz RW, Spengler U, Lohse AW, **Szalay F**, Färkkilä M, Pröls M, Strassburg CP, European AIH-BUC-STUDY GROUP
Budenoside induces remission more effectively than prednison in controlled trial of patients with autoimmune hepatitis
Gastroenterology 2010;139:1198-1206.

AltorjayI, Vitalis Z, Tornai I, Palatka K, Kacsa S, Farkas Gy, Udvardy M, Harsfalvi J, Dinya T, Orosz P, Lombay B, Pár G, Pár A, Csák T, Osztovits J, **Szalay F,** Csepregi A, Lakatos PL, Papo M:
Mannose-binding lectin deficiency convers risk for bacterial infections in a large Hungarian cohort of patients with liver cirrhosis
J Hepatol 2010;53:484-491.

Papp M, Norman GL, Vitalis Z, Tornai I, Altorjay I, Foldi I, Udvardy M, Shums Z, Dinya T, Orosz P, Lombay B Jr, Par G, Veres G, Csak T, Osztovits J, **Szalay F,** Lakatos PL:
Presence of anti-microbal antibodies in liver lirrhosis – a tell-tale sign of compromised immunity?
PLoS One 2010;Sep:5(9):e12957

Tamás G, Raethien J, Muthuraman M, Folhoffer A, Deutschl G, **Szalay F**, Takáts A, Kamondi A:
Disturbed post-movement beta synchronization in Wilson's disease with neurological manifestation
Neurosci Lett 2011;494:240-4.

Budget: 6.000.000- HUF

PATHOGENESIS OF ALCOHOLIC AND NON-ALCOHOLIC CHRONIC LIVER DISEASES AND THEIR COMPLICATIONS

Dr. Szalay Ferenc
1st Department of Internal Medicine of Semmelweis University

We detected autonomic dysfunction using non-invasive tests in chronic hepatitis C infected patients.
Spontaneous baroreflex sensitivity (BRS) and heart rate variability (HVR) time and frequency domain indices were found lower in treatment naive hepatitis C virus (HCV) infected patients compared to the healthy controls. Autonomic dysfunction in HCV-infected patients correlated with elevated alanine aminotransferase levels but was not associated with serum HCV RNA levels and cryoglobulins.

Liver International 2009;29:1473-1478. IF:2,987

Reversible autonomic dysfunction was found during antiviral treatment in patients with chronic hepatitis C virus infection
Cardiovagal autonomic function was assessed in a prospective study at the beginning of treatment and 12, 24 and 48 weeks of pegylated interferon alfa2a and ribavirin antiviral therapy in patients with chronic C hepatitis. Both HRV and BRS time and frequency domain indices decreased after 12 weeks of therapy compared to the pre-treatment values; then the mean ±SD values increased significantly by week 24 and continued to improve by week 48 of therapy. These changes were independent from the presence of cryoglobulins and from virologic response.

Hepatitis Monthly, 2011;11:114-118. IF:0,793

As a member of international working group we found that budesonide induces remission more effectively than prednisolone in a controlled trial of patients with autoimmune hepatitis.
Complete biochemical remission was achieved in 47% of patients treated with budesonide versus 18.4% of patients treated with prednisolone. 72.0% of those in budenoside group did not develop steroid-specific side effects versus 46.6% in the prednisolone group ($p<0.001$).

Gastroenterology 2010;139:1198-1206 IF:12,899

We proved that mannose-binding lectin deficiency confers risk for bacterial infections in a large Hungarian cohort of patients with liver cirrhosis.
Mannose-binding lectin (MBL) is a serum lectin synthesized by the liver and involved in innate host defense. Sera of 929 patients with various chronic liver diseases were investigated. In cirrhotic patients, the risk for infection was significantly higher among MBL deficient subjects as compared to non-deficient ones. In a logistic regression analysis MBL deficiency was an independent risk factor for infections. MBL deficiency is associated with a higher probability and shorter time of developing infection in liver cirrhosis.

J Hepatol 2010;53:484-491. IF:7,818

Presence of anti-microbal antibodies was found more common in patients with liver cirrhosis than in healthy control subjects in a multicenter study.
Bacterial translocation plays important role in the complications of liver cirrhosis. Sera 676 of patients with various liver diseases and 100 healthy control subjects were investigated. Antibodies to Saccharomyces cerevisiae (ASCA) and to antigens derived from two intestinal bacterial isolates

were present in 38.5 and 62.6% in patients with cirrhosis and 16% and 20% of controls, respectively ($p<0.001$). Our study suggests that systemic reactivity to microbal components reflects compromised mucosal immunity in patients with liver cirrhosis, further supporting the possible role of bacterial translocation in the formation of anti-microbal antibodies.

PLos One 2010;5/9:e12957. IF:4,351

We have found disturbed post-movement beta-syncronization (PMBS) was found in Wilson's disease with neurologic manifestation.

Wilson disease is a rare autosomal recessive inherited disorder of copper metabolism commonly characterized by neurological symptoms as tremor, Parkinsonism, dystonia, ataxia, chorea, dysarthria. In many cases Wilson disease is misdiagnosed as Parkinson disease or essential tremor disease. According to our findings the power of PMBS is lower and the latency of that was longer in patients with neurologic Wilson disease patients than in healthy controls.

Neurosci Lett 2011;494:240-4. IF:2,055

János Osztovits, Tamás Horváth, Margit Abonyi, Tamás Tóth, Zsolt Visnyei, Gabriella Bekő, Timea Csák, Péter lászló lakatos, Levente Littvay, János Fehér, Péter Kempler, Márk kollai, **Ferenc Szalay :**
Chronic hepaitis C virus infection associated with autonomic dysfunction
Liver International 2009;10: 1473-78.

Osztovits J**,** Horváth E, Tax J, Csihi L, Horváth T, Littvay L, Tóth T, Abonyi M, Lakatos PL, Kollai M, Fehér J, **Szalay F,** Blum HE:
Reversible autonomic dysfunction during antiviral treatment in patients with chronic hepatitis C virus infection.
Hepat Mon 2011; 11(2): 114-8.

Manns MP, Woynarowski M, Kreisel W, Lurie Y, Zuckermann E, Bahr MJ, Günther R, Hultcrantz RW, Spengler U, Lohse AW, **Szalay F**, Färkkilä M, Pröls M, Strassburg CP, European AIH-BUC-STUDY GROUP
Budenoside induces remission more effectively than prednison in controlled trial of patients with autoimmune hepatitis
Gastroenterology 2010;139:1198-1206.

AltorjayI, Vitalis Z, Tornai I, Palatka K, Kacsa S, Farkas Gy, Udvardy M, Harsfalvi J, Dinya T, Orosz P, Lombay B, Pár G, Pár A, Csák T, Osztovits J, **Szalay F,** Csepregi A, Lakatos PL, Papo M:
Mannose-binding lectin deficiency convers risk for bacterial infections in a large Hungarian cohort of patients with liver cirrhosis
J Hepatol 2010;53:484-491.

Papp M, Norman GL, Vitalis Z, Tornai I, Altorjay I, Foldi I, Udvardy M, Shums Z, Dinya T, Orosz P, Lombay B Jr, Par G, Veres G, Csak T, Osztovits J, **Szalay F,** Lakatos PL:
Presence of anti-microbal antibodies in liver lirrhosis – a tell-tale sign of compromised immunity?
PLoS One 2010;Sep:5(9):e12957

Tamás G, Raethien J, Muthuraman M, Folhoffer A, Deutschl G, **Szalay F**, Takáts A, Kamondi A:
Disturbed post-movement beta synchronization in Wilson's disease with neurological manifestation
Neurosci Lett 2011;494:240-4.

Teljes támogatás: 2.400.000,- Ft

EFFEKTOR ÉS REGULATÓRIKUS T SEJT ALOSZTÁLYOK VIZSGÁLATA ATOPIÁS DERMATITISBEN – AZ ELTÉRŐ SÚLYOSSÁGÚ KLINIKAI FORMÁK HÁTTERÉBEN KIMUTATHATÓ-E AZ IMMUNREGULÁCIÓ KÜLÖNBÖZŐ MÉRTÉKŰ VAGY IRÁNYÚ KÁROSODÁSA?

Szegedi Andrea[1], Hunyadi János[1], Nagy Georgina[1], Irinyi Beatrix[1], Gáspár Krisztián[1], Szegedi Gyula[2], Sipka Sándor[2], Baráth Sándor[2], Gyimesi Edit[2]
[1]Debreceni Egyetem OEC, Bőrgyógyászati Klinika, Bőrgyógyászati Allergológiai Tanszék,
[2]Debreceni Egyetem OEC, Belgyógyászati Intézet, III. sz. Belgyógyászati Klinika

Az atopiás dermatitis (AD) igen gyakori, krónikus gyulladással járó, immun-mediált bőrgyógyászati kórkép, mely a gyermekek 15-20%-át érinti, felnőtt korban is 1%-os a prevalenciája. A betegség kialakulásának egyik okaként a szerzett immunválasz károsodása már korábban leírásra került, elsősorban a helper T (Th) sejtek különféle alosztályai között fennálló egyensúly megbomlása és a Th2 alosztály fokozott működése jellemző. Saját vizsgálatainkban arra kerestünk választ, hogy az említett adaptív immunválaszi eltérések hátterében regulatórikus T sejtek károsodása kimutatható-e illetve, hogy egyéb effektor T sejtek működési zavara fenn áll-e. Ugyancsak elemeztük ezen immunológiai károsodások mértékének összefüggését a klinikai súlyossággal.

A regulatórikus T sejteknek ma már több csoportját leírták, részletesen azonban 3 fő típusát tanulmányozta eddig az irodalom, a CD4+/CD25+/Foxp3+ nTreg sejteket, valamint a periférián képződő Th3 és Tr1 sejteket. AD-ben kevés irodalmi adat ismert a regulatórikus T sejtek számát, vagy funkcióját illetően. Saját vizsgálatainkban súlyos AD-ben szenvedő betegektől nyert vérből határoztuk meg áramlási citometriával a Tr1 és nTreg sejtek százalékos arányát és abszolút sejtszámát. Megállapítottuk, hogy mind a Tr1, mind az nTreg sejtek száma szignifikánsan emelkedett AD-ben a kontrollok értékeihez mérten. Ugyancsak magasabb volt a CLA+, vagyis a bőrbe vándorló nTreg sejtek száma és a sejtszám emelkedés mértéke összefüggött a betegség súlyosságát jelző aktivitási pontokkal (SCORAD). Ezt követően az nTreg sejtek funkcióját vizsgáltuk regulatórikus T sejteket és effektor T sejteket tartalmazó kevert limfocita kultúra segítségével. Megállapítottuk, hogy a betegektől származó regulatórikus T sejtek funkciója primeren nem károsodott, azonban Staphylococcus Enterotoxin B (SEB) jelenlétében, mely a gyakorlatban szinte 100%-ban kimutatható az ilyen bőrön, a sejtek elveszítik reguláló hatásukat. Eredményeink alapján meg tudtuk állapítani, hogy AD-ben a perifériás vérben sem az nTreg sejtek száma, sem funkciója nem mutat primeren károsodást, azonban a bőrbarrier ismert eltérései miatt állandóan jelenlévő SEB szekunder funkciókárosodást okoz. A Tr1 sejtek száma szintén szignifikánsan emelkedett, mely elsősorban kompenzatórikus változásnak és nem a patogenezisben szerepet játszó kiváltó tényezőnek tűnik.

Az effektor T sejtek közül elsősorban az invariáns NKT (iNKT) sejtek kutatására helyeztük a hangsúlyt, mivel kevés és ellentmondásos adat ismert ezen sejtek számáról és funkciójáról AD-ben.

Ennek során a teljes iNKT sejtpopuláció, valamint alcsoportjai százalékos arányát és abszolút számát mértük a betegek perifériás vérében, valamint igyekeztünk a sejtek funkcionális kapacitásáról is adatokat nyerni. A 6B11+CD3+ iNKT sejtek százalékos arányát és abszolút számát szignifikánsan alacsonyabbnak találtuk AD-s betegekben egészséges kontrollokhoz képest. Az iNKT sejtek négy alcsoportjának vizsgálata során mind az abszolút szám, mind a százalékos arány szignifikáns csökkenést mutatott valamennyi alcsoportban, azonban a legerősebb korrelációt a teljes iNKT populáció adataival a dupla negatív (DN, CD4-/CD8-) alcsoport mutatta. A sejtszámok nem mutattak összefüggést a betegség súlyosságát jelző klinikai vagy laboratóriumi értékekkel.

A teljes iNKT populációt vizsgálva az IFN-γ intracelluláris szintje csökkent volt, míg az IL-4 szintjét emelkedettnek találtuk AD-ben, bár az eltérés nem volt szignifikáns. A DN iNKT alcsoport a funkcionális tesztek esetén is kiemelkedő fontosságúnak tűnt, mivel ebben a sejtcsoportban az intracelluláris IFN-γ szintje szignifikánsan alacsonyabb, az IL-4 szintje szignifikánsan magasabb volt. Eredményeink, más irodalmi adatokkal összecsengően arra utalnak, hogy az AD patogenezisében az iNKT sejtek fontos szerepet játszanak.

Az iNKT sejtek azonosításán túl foglalkoztunk az IL-16 molekulának az AD patogenezisében betöltött szerepének tisztázásával is. Jól ismert kemotaktikus tulajdonsága mellett, az IL-16 felerősíti a gyulladásos folyamatokat, hozzájárul a T sejtek aktiválásához, és az utóbbi években immunregulátor tulajdonságait is leírták. Mértük az IL-16 szérum szintjét AD-ben szenvedő betegekben, továbbá, vizsgáltuk az összefüggést a szérum IL-16 szint és a betegség súlyossága illetve az allergiás szenzitizáció mértéke között. Az IL-16 szérum szintjét szignifikánsan magasabbnak találtuk AD-ben egészséges kontrollokhoz vagy psoriasisos betegekhez viszonyítva. Ugyanakkor kimutattuk, hogy a betegség súlyosságával és az allergiás szenzitizáció mértékével csak kis fokban korrelál a szérum IL-16 szint.

Vizsgálatokat végeztünk egy másik, igen gyakori gyulladásos bőrbetegségben is. Psoriasis vulgarisban génexpressziós vizsgálatokkal a gyulladásos bélbetegségekhez és a rheumatoid arthritishez hasonló, valamint a psoriasisra specifikus jelátviteli útvonalakat is sikerült azonosítanunk.

Megjelent közlemények:

1. Meskó B, Póliska Sz, Szegedi A, Szekanecz Z, Palatka K, Papp M, Nagy L: BMC MEDICAL GENOMICS 3.15. (2010) IF: 4,206
2. Baráth S, Tarr T, Bodolay E, Papp G, Illés Á, Soltész P, Szegedi A, Zeher M, Sipka S: MAGYAR BELORV ARCH. 64, 99-103 (2011)
3. Gyimesi E, Nagy G, Remenyik É, Sipka S, Zeher M, Bíró T, Szegedi A: J CLIN IMMUNOL 31:5. 864-72 (2011) IF: 3,326
4. Nagy G, Gárpár K, Irinyi B, Gál M, Tumpek J, Gyimesi E, Sipka S, Remenyik É, Szodoray P, Szegedi A: INT ARCH ALLERGY IMMUNOL. 156:1. 69-74 (2011) IF: 2,235

Teljes támogatás: 2.400.000,- Ft

INVESTIGATION OF EFFECTOR AND REGULATORY T CELL SUBCLASSES IN ATOPIC DERMATITIS – CAN THE DEGREE AND TENDENCY OF IMPAIRMENT OF IMMUNOREGULATORY MECHANISMS BE DEMONSTRATED IN THE DIFFERENT CLINICAL MANIFESTATIONS OF ATOPIC DERMATITIS?

Szegedi Andrea[1], Hunyadi János[1], Nagy Georgina[1], Irinyi Beatrix[1], Gáspár Krisztián[1], Szegedi Gyula[2], Sipka Sándor[2], Baráth Sándor[2], Gyimesi Edit[2]
[1]University of Debrecen, Medical Health and Science Centre, Department of Dermatology, Department of Dermatological Allergology,
[2] University of Debrecen, Medical Health and Science Centre, 3rd Department of Internal Medicine

Atopic dermatitis (AD) is one of the most frequent immune mediated chronic inflammatory skin diseases, affecting 15-20% of children and also 1% of adult population. Dysfunction of the adaptive immune response, as one of the main reasons leading to the development of AD, was previously described. Well known characteristic features amongst others are the imbalance of helper T cell subpopulations and the increased activity of Th2 cells.

The aims of our experiments were to investigate whether the impairment of regulatory T cells or the dysfunction of other effector T cell types could be demonstrated in the background of the mentioned adaptive immune response alterations. We also analyzed the connections between the degree of immunological impairments and clinical severity.

At this point, certain T cell populations with regulatory functions have been described in the literature. The best characterized three main types are thymus-derived CD4+CD25^{bright}FOXP3+ nTregs, and peripherally induced Th3 and Tr1 cells. Sparse data about numeral and functional characteristics of regulatory T cells are published in AD. In our experiments the frequency and the absolute number of Tr1 and nTreg cells were determined in the blood of severe AD patients. The numbers of both regulatory cell types were significantly elevated in the patient population. The numbers of skin homing, CLA+ nTreg were also significantly increased and showed correlation with the degree of clinical severity (SCORAD).

In the next step we investigated the functional characteristics of nTreg cells with the help of mixed lymphocyte cultures. We assessed that nTreg function was not primarily altered. In AD patients neither the number nor the functional activity of nTregs were altered primarily, although the nearly continuous presence of Staphylococcal Enterotoxin B (SEB) could trigger an acquired functional impairment. The number of Tr1 cells was also significantly elevated, although it seemed to be a compensatory change and not a real pathogenic event.

From the effector T cell types we mainly investigated invariant NKT (iNKT) cells, since there are only a few and conflicting results published on iNKT cell frequencies and functions in AD. In these experiments we determined the percentage and absolute number of total iNKT cells and their subpopulations, and we also aimed to have data about the functional capacity of these cells. The frequency and the absolute number of CD3+6B11+ iNKT cells were significantly reduced in AD

patients compared to healthy controls. The frequency and the absolute count of all iNKT subpopulations were also significantly diminished. There was positive correlation between the percentage of total iNKT cells and the frequency of their subsets in AD patients, and this correlation was the most pronounced in case of the double negative (DN, CD4-/CD8-) cells. We found no correlation between the number of iNKT cells and the disease severity measured by clinical and laboratory parameters.

In functional tests the intracellular IFNγ expression was found to be decreased, whereas that of IL-4 increased in the total iNKT cells in AD patient. The DN iNKT subgroup seemed to have outstanding importance again, since this subset exhibited significantly lower IFNγ level and significantly increased IL-4 level in AD compared to healthy individuals. In conclusion**,** our results suggest in good agreement with previous studies that these cells may play an important role in the pathogenesis of AD.

We also investigated the serum level of IL-16, in order to get data about its pathogenic role in AD, and also to develop new laboratory test for the measurement of clinical severity. Besides its well-known chemotactic properties, IL-16 can increase inflammatory processes, and also influences T cell activation and evolve immune regulatory functions. Serum IL-16 level was measured in AD patients, and also the connection between serum IL-16 level, clinical severity and the degree of allergic sensitization was detected. Significantly elevated serum IL-16 levels were found in the patient population compared to healthy controls or patients suffering from psoriasis. On the other hand, the correlation between IL-16 level and clinical severity or allergic sensitization was weak.

We also performed experiments in another frequent inflammatory skin disease. In psoriasis vulgaris using gene expression assays we identified signaling pathways identical with inflammatory bowel disease and rheumatoid arthritis and pathways specific for this skin disease.

Published articles:

1. Meskó B, Póliska Sz, Szegedi A, Szekanecz Z, Palatka K, Papp M, Nagy L: Peripheral blood gene expression patterns discriminate among chronic inflammatory diseases and healthy controls and identify novel targets. BMC MEDICAL GENOMICS 3.15. (2010) IF: 4,206

2. Baráth S, Tarr T, Bodolay E, Papp G, Illés Á, Soltész P, Szegedi A, Zeher M, Sipka S: A $CD3^{+}25^{+}FOXP3^{+}$ regulációs T-lymphocyták vizsgálata immunológiai és immunhematológiai kórképekben. MAGYAR BELORV ARCH. 64, 99-103 (2011)

3. Gyimesi E, Nagy G, Remenyik É, Sipka S, Zeher M, Bíró T, Szegedi A: Altered Peripheral Invariant Natural Killer T Cells in Atopic Dermatitis. J CLIN IMMUNOL 31:5. 864-72 (2011) IF: 3,326

4. Nagy G, Gárpár K, Irinyi B, Gál M, Tumpek J, Gyimesi E, Sipka S, Remenyik É, Szodoray P, Szegedi A: Association between Serum IL-16 Levels and the Degree of Sensitization in Patients with Atopic Dermatitis. INT ARCH ALLERGY IMMUNOL. 156:1. 69-74 (2011) IF: 2,235

Budget: 4,200,000.- HUF

AZ ARTHRITISEKKEL ÖSSZEFÜGGŐ FOKOZOTT CARDIOVASCULARIS MORBIDITÁS ÉS MORTALITÁS GENETIKAI, IMMUNOLÓGIAI ÉS ÉLETMÓDI ÖSSZEFÜGGÉSEI

Szekanecz Zoltán[1], Szűcs Gabriella[1], Szántó Sándor[1], Szabó Zoltán[1], Szamosi Szilvia[1], Váncsa Andrea[1], Bodnár Nóra[1]
[1]DEOEC Belgyógyászati Intézet, Reumatológiai Tanszék, Debrecen

A gyulladásos reumatológiai kórképekben (arthritisek), így rheumatoid arthritisben (RA) és spondylitis ankylopoeticában (Bechterew-kór, SPA) elsősorban a szisztémás gyulladásból adódóan, felfokozott atherosclerosis figyelhető meg. Ennek következtében az arthritises betegek várható élettartama akár 3-6 évvel is rövidebb lehet az átlagpopulációénál. A cardiovascularis (CV) halálozás az arthritises betegek össz-halálozásának 30-50%-áért felelős. Vizsgálatainkban az arthritisszel összefüggő CV morbiditás hátterében levő érfiziológiai eltéréseket valamint a használatos antireumatikus kezelés, elsősorban a biológiai terápia vascularis hatásait kutattuk (1, 2).

Non-invaziv ultrahangos vizsgálati módszerekkel korán felmérhető a rizikó, amit korábban RA-ban meg is tettünk. SPA-ban is ultrahanggal vizsgáltuk a flow-mediált vasodilatatiot (FMD), mely az endothel functiora jellemző, a carotis communis intima-media vastagságot (ccIMT), mely a manifeszt atherosclerosist jelzi. Arteriográffal határoztuk mag az aorta merevségét (stiffness) és az erre jellemző pulzushullám terjedési sebességet (pulse-wave velocity, PWV). Vizsgálatunkba 43 SPA-s beteget és 40 illesztett egészséges kontrollt vontunk be, akiknek nem volt klinikai vascularis betegségük. A mérések során csökkent FMD-t (6.85±2.98 versus 8.30±3.96 %; p=0.005), fokozott ccIMT-t (0.65±0.15 versus 0.54±0.15 mm; p=0.01) és fokozott stiffnesst (PWV; 8.64± 2.44 versus 8.00±1.46 m/s; p=0.03) észleltünk SPA-s betegekben a kontrollokhoz képest. A carotis atherosclerosis foka negativ korrelációt mutatott az FMD-vel (r=-0.563; p=0.0001) és pozitivan korrelákt a stiffnessel (r=0.374; p=0.018). Mind a ccIMT, mind a PWV korrelált a betegségtartammal (r=0.559; p=0.013 versus r=0.520; p=0.022), a BASFI funkcionális indexszel (r=0.691; p=0.003 és r=0.654; p=0.006), a csökkent mellkaskitéréssel (r=-0.502; p=0.047 vs r=-0.613; p=0.012). Összegzésül tehát az SPA-ban korai endothel dysfunctio észlelhető, ennek következtében atherosclerosis és fokozott aortamerevség alakul ki (3).

SPA-ban az atherosclerosis lehetséges biomarkereit kutattuk. Ismeretes, hogy a citrullinált fehérjék elleni antitestek (ACPA), közülük is az anti-mutált citrullinált vimentin (anti-MCV) szerepet játszanak az RA kialakulásában. Szerepük SPA-ban kevéssé ismert. Mind az ACPA, mind a hősokkfehérjék elleni antitestek (anti-hsp) szerepet játszhatnak az atherosclerosisban. Ezért a fent leírt SPA-s betegekben és kontrollokban ELISA vizsgálattal mértük az anti-MCV és anti-hsp65 szintjét. Az SPA-s betegeknek szignifikánsan magasabb anti-MCV szintje volt (17.3 U/ml, medián: 8.3-31.5 U/ml) a kontrollokhoz képest (8.9 U/ml, medián: 5.4-13.3 U/ml) (p<0.01). Ugyanígy az anti-hsp65 szint is magasabb volt SPA-ban (124.8 AU/ml versus 51.8 AU/ml; p<0.001). Az anti-MCV és anti-hsp65 szintje pozitiv korrelációt mutatott egymással (r=0,553; p=0.021). Az anti-MCV és anti-hsp65 tehát az SPA és az atherosclerosis biomarkere is lehet (4).

Az aszimmetrikus dimetilarginin (ADMA) az atherosclerosis és a vascularis betegségek rizikófaktora. Magunk jelen munkánkban SPA-ban fokozott ADMA termelést találtunk arthrosishoz képest (0.95±0.17 μM versus 0.70±0.25 μM; p<0.001). Nem találtunk különbséget az arginin és a szimmetrikus dimetilarginin (SDMA) vonatkozásában. A szérum ADMA szintek pozitivan korreláltak a korral (R=0.258; p=0.043), testtömegindexszel (BMI) (R=0.368; p=0.003), vérsejtsüllyedéssel (R=0.329; p=0.009). Az emelkedett ADMA szintek csökkent metrikus mutatókkal jártak együtt, így csökkent mellkaskitéréssel (R=-0.251; p=0.04) és lumbalis gerinc mobilitással(R=-0.256; p=0.04). Úgy gondoljuk, hogy az ADMA fontos gyulladásos és vascularis biomarker lehet SPA-ban (5).

A fokozott CV rizikó hagyományos vasculoprotektív gyógyszerekkel (aszpirin, ACE gátló) csökkenthető. Mivel azonban arthritisekben a szisztémás gyulladás vezérli az akcelerált atherosclerosist, logikusnak látszik, hogy az alapbetegség gyulladásos aktivitásának visszaszorításával ez a rizikó is csökkenthető lenne. A biológiai terápia, elsősorban a TNF gátlók és

a rituximab, javíthatják a vascularis funkciót és csökkenthetik az infarctus kockázatát. Ennek irodalmát magunk is áttekintettük (6). Vizsgálatunkban az anti-TNF adalimumab vascularis hatásait vizsgáltuk korai RA-ben. Az adalimumab kezelés sikeresen csökkentette az RA aktivitását, mind a CRP-t ($p=0.04$) mind a DAS28 betegségaktivitási indexet ($p<0.0001$). Az FMD már 6 hetes kezelés után is javult ($p<0.05$). A ccIMT 24 hét után átlagosan 11.9%-kal csökkent. Az endothel-aktivációra jellemző keringő von Willebrand faktor (vWF) szint is csökkent 12 hét után. Az adalimumab tehát a várható klinikai hatékonyság mellett javította a vascularis paramétereket (7).

Összességében tehát a non-invazív vizsgálatok és a biomarkerek alkalmasak arthritisekben a CV rizikó felmérésére. Az alapbetegség kezelése biológiai terápiával jól hat a vascularis funkciókra.

Irodalom

1. Szekanecz Z, Soltész P, Kerekes Gy, Szücs G, Szántó S, Timár O et al. Akcelerált atherosclerosis és vasculopathiák reumatológiai betegségekben. Immunol Szemle. 2010;2(2):4-14.
2. Soltesz P, Kerekes G, Der H, Szucs G, Szanto S, Kiss E, et al. Comparative assessment of vascular function in autoimmune rheumatic diseases: considerations of prevention and treatment. Autoimmun Rev.2011;10(7):416-25.
3. Bodnar N, Kerekes G, Seres I, Paragh G, Kappelmayer J, Nemethne ZG, et al. Assessment of subclinical vascular disease associated with ankylosing spondylitis. J Rheumatol. 2011;38(4):723-9.
4. Bodnar N, Szekanecz Z, Prohaszka Z, Kemeny-Beke A, Nemethne-Gyurcsik Z, Gulyas K, et al. Anti-mutated citrullinated vimentin (anti-MCV) and anti-65kDa heat shock protein (anti-hsp65): New biomarkers in ankylosing spondylitis. Joint Bone Spine. 2011;79(1):63-6.
5. Kemeny-Beke A, Gesztelyi R, Bodnar N, Zsuga J, Kerekes G, Zsuga M, et al. Increased production of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in ankylosing spondylitis: Association with other clinical and laboratory parameters. Joint Bone Spine 2011;78:184-7..
6. Szekanecz Z, Szanto S, Szabo Z, Vancsa A, Szamosi S, Bodnar N, et al. Biologics - beyond the joints. Autoimmun Rev. 2010;9(12):820-4.
7. Kerekes G, Soltesz P, Szucs G, Szamosi S, Der H, Szabo Z, et al. Effects of adalimumab treatment on vascular disease associated with early rheumatoid arthritis. Isr Med Assoc J. 2011;13(3):147-52.

Budget: 4,200,000.- HUF

INCREASED ARTHRITIS-ASSOCIATED CARDIOVASCULAR MORBIDITY AND MORTALITY: GENETIC, AUTOIMMUNE AND ENVIRONMENTAL ASPECTS

Zoltán Szekanecz[1], Gabriella Szűcs[1], Sándor Szántó[1], Zoltán Szabó[1], Szilvia Szamosi[1], Andrea Váncsa[1], Nóra Bodnár[1]
[1]University of Debrecen Medical and Health Sciences Center, Institute of Medicine, Department of Rheumatology, Debrecen

Inflammatory rheumatic diseases (arthritides) including rheumatoid arthritis (RA) and ankylosing spondylitis (AS) have been associated with accelerated atherosclerosis primarily due to systemic inflammation. Thus, life expectancy of arthritis patients may be 3-6 years less than in the general population. Cardiovascular (CV) mortality may account for 30-50% of total mortality in arthritis. In our study, we assessed vascular pathophysiology underlying CV morbidity as well as the vascular effects of biological therapy (1, 2).

Non-invasive ultrasound-based techniques are available in order to assess CV risk. We had performed such studies in RA and now we assessed flow-mediated vasodilation (FMD) indicating endothelial function, as well as common carotid intima-media thickness (ccIMT), an indicator of overt atherosclerosis. Arterial stiffness was assessed by an arteriograph. Stiffness is indicated by pulse-wave velocity (PWV). Altogether 43 AS patients and 40 healthy controls were included in the study. The patients did not have known clinical vascular disease. Impaired FMD (6.85±2.98 versus 8.30±3.96 %; p=0.005), increased ccIMT (0.65±0.15 versus 0.54±0.15 mm; p=0.01) and increased arterial stiffness (PWV; 8.64± 2.44 versus 8.00±1.46 m/s; p=0.03) were observed in AS patients compared to controls. The extent of carotid atherosclerosis showed negative correlation with FMD (r=-0.563; p=0.0001) and positive correlation with stiffness (r=0.374; p=0.018). Both ccIMT and PWV correlated with disease duration (r=0.559; p=0.013 versus r=0.520; p=0.022), the BASFI functional index (r=0.691; p=0.003 vs r=0.654; p=0.006) and decreased chest expansion (r=-0.502; p=0.047 vs r=-0.613; p=0.012). Thus, AS has been associated with early endothwlial dysfunction and, as a consequence, atherosclerosis and increased stiffness (3).

We wished to assess candidate biomarkers for AS and atherosclerosis. It has been known that anti-citrullinated protein antibodies (ACPA), such as anti-mutated citrullinated vimentin (anti-MCV) are involved in the pathogenesis of RA. Their role in AS is not fully known. Both ACPA and anti-heat shock protein (anti-hsp) antibodies have also been implicated in atherosclerosis. Thus, AS patients and controls described above were tested for anti-MCV and anti-hsp65 levels using ELISA. As patients exerted significantly higher anti-MCV levels (17.3 U/ml, range: 8.3-31.5 U/ml) compared to controls (8.9 U/ml, range: 5.4-13.3 U/ml) ($p<0.01$). Similarly, anti-hsp65 levels were also elevated in AS (124.8 AU/ml versus 51.8 AU/ml; $p<0.001$). The levels of anti-MCV and anti-hsp65 positively correlated with each other (r=0,553; p=0.021). Thus, az anti-MCV and anti-hsp65 may be useful biomarkers of AS, as well as atherosclerosis (4).

Asymmetric dimethylarginine (ADMA) is also a risk factor for atherosclerosis and vascular diseases. In this study, we found increased levels of ADMA in AS compared to healthy volunteers (0.95±0.17 μM versus 0.70±0.25 μM; $p<0.001$). There were no differences in arginine or symmetric dimethylarginine (SDMA) production. Serum ADMA levels positively correlated with age (R=0.258; p=0.043), body mass index (BMI) (R=0.368; p=0.003), and erythrocyte sedimentation rate (R=0.329; p=0.009). Increased ADMA production was associated with decreased chest expansion (R=-0.251; p=0.04) and lumbar spine mobility (R=-0.256; p=0.04). ADMA may be an inflammatory and vascular biomarker in AS (5).

CV risk may be lowered by traditional vasculoprotective agents, such as aspirin or ACE inhibitors. However, as systemic inflammation is a key player in accelerated atherosclerosis, suppression of arthritic disease activity may also decrease CV risk. Biologics, such as TNF blockers and rituximab have been shown to improve vascular dófunction and may decrease the risk of myocardial infarction. We have recently reviewed this issue (6). We assessed the vascular effects of the anti-TNF adalimumab in early RA. Adalimumab treatment suppressed CRP ($p=0.04$), as well as RA disease activity indicated by the DAS28 disease activity index ($p<0.0001$). FMD improved as early as after 6 weeks of treatment ($p<0.05$), while ccIMT decreased after 24 weeks by 11.9%. Circulating von Willebrand faktor (vWF) levels, marker of endothelial activation, drecreased after 12 weeks. Thus, adalimumab may improve vascular function in RA (7).

In conclusion, non-invasive ultrasound-based imaging techniques and laboratory biomarkers may be useful to assess CV risk in arthritides. Disease control by biologics may also have beneficial effects ont he vasculature.

References

1. Szekanecz Z, Soltész P, Kerekes Gy, Szücs G, Szántó S, Timár O et al. Accelerated atherosclerosis and vasculopathies in rheumatic diseases (Hungarian). Immunol Quarterly 2010;2(2):4-14.
2. Soltesz P, Kerekes G, Der H, Szucs G, Szanto S, Kiss E, et al. Comparative assessment of vascular function in autoimmune rheumatic diseases: considerations of prevention and treatment. Autoimmun Rev.2011;10(7):416-25.
3. Bodnar N, Kerekes G, Seres I, Paragh G, Kappelmayer J, Nemethne ZG, et al. Assessment of subclinical vascular disease associated with ankylosing spondylitis. J Rheumatol. 2011;38(4):723-9.
4. Bodnar N, Szekanecz Z, Prohaszka Z, Kemeny-Beke A, Nemethne-Gyurcsik Z, Gulyas K, et al. Anti-mutated citrullinated vimentin (anti-MCV) and anti-65kDa heat shock protein (anti-hsp65): New biomarkers in ankylosing spondylitis. Joint Bone Spine. 2011;79(1):63-6.
5. Kemeny-Beke A, Gesztelyi R, Bodnar N, Zsuga J, Kerekes G, Zsuga M, et al. Increased production of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in ankylosing spondylitis: Association with other clinical and laboratory parameters. Joint Bone Spine. 2011;78:184-187.
6. Szekanecz Z, Szanto S, Szabo Z, Vancsa A, Szamosi S, Bodnar N, et al. Biologics - beyond the joints. Autoimmun Rev. 2010;9(12):820-4.
7. Kerekes G, Soltesz P, Szucs G, Szamosi S, Der H, Szabo Z, et al. Effects of adalimumab treatment on vascular disease associated with early rheumatoid arthritis. Isr Med Assoc J. 2011;13(3):147-52.

A pályázat célja két, a foetomaternalis tolerancia kialakításában szerepet játszó faktor, a galectin-1 (Gal-1), és a progeszteron indukált blokkoló faktor (PIBF) kölcsönhatásainak vizsgálata. Mind a Gal-1, mind a PIBF gén aktivációját a progesteron szabályozza, és in vivo Gal-1 kezelés jelentősen fokozza a PIBF termelését. Kérdéses, hogy a progesteron direkt módon, vagy a Gal-1 gén előzetes aktiválásán keresztül fejti ki hatását a PIBF termelésre.

Korábban kimutattuk, hogy a Gal-1 fehérje jelen van terhesek perifériás mononukleális sejtjeiben, és PIBF pozitív trophoblaston. A sejtek 3 h progeszteron kezelését követően mind a Gal-1, mind a PIBF izoformák mennyisége megnő, 24 h progesteron kezelés után pedig csökken, ami az aktív szekréció következménye. Terhesek perifériás lymphocytáiban a progesteronreceptorok blokkolása gátolja a Gal-1 és a PIBF termelődését, ugyanakkor PIBF deficiens sejtekben fokozódik a a Gal-1 szintje, ami arra utal, hogy bár mind a PIBF, mind a Gal-1 indukció első lépése a progesteronreceptor aktiválódása, a két út a továbbiakban különválik.

A továbbiakban összehasonlítottuk progesteron kezelés hatását a PIBF expresszióra perifériás lymphocytákban, trophoblast és tumorsejtvonalon, továbbá Gal-1 kezelés a PIBF és PIBFR expresszióra kifejtett hatását az említett sejtféleségekben. Progesteron kezelés serkenti a trophoblast PIBF termelését. Nem terhesek perifériás lymphocytáiban, ill. tumorsejtvonalon nem sikerült ilyen hatást kimutatnunk. Gal-1 kezelés nem befolyásolta lényegesen a trophoblast PIBF termelését, lymphocytákban, ill tumorsejtekben Gal-1 kezelés hatására enyhén nőtt a PIBF expresszió. Ezzel szemben 20 min és 6 óra Gal-1 kezelés kifejezetten fokozta a PIBF receptor expresszióját tumorsejtekben és trophoblaston. A fentiek arra utalnak, hogy a Gal-1 mind a tumor-, mind a trophoblast sejtvonal PIBF érzékenységét szabályozza.

We aimed at investigating the interactions between two galectin-1 (Gal-1) and the Progesterone-induced blocking factor (PIBF) Both of these molecules are progesterone-regulated and both have been shown to play a role in the establishment of feto-maternal tolerance. Furthermore, treatment of mice with Gal-1 signifiantly increases PIBF production. Whether progesterone directly affects PIBF production, or acts via Gla-1 induction - remains to be answered. Earlier we demonstrated Gal-1 is expression in peripheral pregnancy lymphocytes as well as in PIBF positive trophoblast cells.
Three hours progesterone treatment resulted in increased Gal-1 production, together with an increased expression of all PIBF isoforms. Progesterone treatment for 24 h exerted an opposite effect, suggesting an active secretion. Blocking of progesterone receptors in peripheral pregnancy lymphocyets inhibited Gal-1 and PIBF production, whereas Gal-1 expression was increased in PIBF deficient cells. These data suggest, that though activation of the progesterone receptor is required for both PIBF- and Gal-1 induction, from this step on distinct patways are used by the two molecules.

The effect of progesterone or Gal-1 treatment on PIBF and PIBF receptor expression was investigated in peripheral pregnancy lymphocytes, as well a sin trophoblast and tumor cell lines. Progesterone-treatment induced PIBF in pregnancy lymphocytes, but not in non-pregnancy lymphocytes or tumor cells.

Gal-1 treatment of trophoblast cells had no significant effect on PIBF expression, while a moderate increase of PIBF expression was observed on lymphocytes and tumor cells. Ont he other hand, PIBF receptor expression was significantly increased in lymphocytes and tumor cells upon 20 min and 6 h incubation of Gal-1, suggesting that Gal-1 regulates PIBF sensitivity in these cell types.

Teljes támogatás: 3.000.000,- Ft

A MELANOCITA PROLIFERÁCIÓ ÉS DIFFERENCIÁCIÓ SZABÁLYOZÁSÁNAK ÉS A MELANOMA PATHOGENEZISÉNEK VIZSGÁLATA

Széll Márta[1], Bata-Csörgő Zsuzsanna[2], Oláh Judit[2], Varga Erika[2], Kormos Bernadett[1]
[1]MTA SZTE Dermatológiai Kutatócsoport, [2]SZTE ÁOK Bőrgyógyászati és Allergológiai Klinika

Munkánk célja a melanociták proliferációjának, differenciációjának vizsgálata, valamint a melanoma pathogenezisében szerepet játszó környezeti és genetikai tényezők azonosítása.

Korábbi munkánkban leírtuk és jellemeztük azt a tenyésztő folyadékot (Mel-mix), amelyben a felnőtt humán epidermiszből izolált melanociták kolera toxin és PMA adalékok nélkül tenyészthetők. Ebben a tenyésztő folyadékban a melanociták bipoláris morfológiát vesznek fel, elvesztik pigment tartalmukat és aktívan proliferálnak. A sejtek további jellemzése kimutatta, hogy ezek a sejtek nem expresszálják a c-Kit és TRP-1 fehérjéket, viszont kifejezik a nestin fehérjét, amely arra utal, hogy a melanociták dedifferenciálódnak ebben az in vitro kultúrában. A kolera toxin és a PMA képesek voltak a c-Kit and TRP-1 fehérjék expressziójának indukciójára a dedifferenciált sejtekben. Kimutattuk azt is, hogy a TRP-1 mRNS expressziója UV-B besugarazott keratinociták felülúszójával indukálható volt, ugyanakkor a melanociták direkt UV-B besugarazása csökkentette a sejtek TRP-1 expresszióját. Ezek a dedifferenciált, könnyen tenyészthető sejtek jó modellrendszert biztosítanak a melanocita differenciáció, valamint esetlegesen a transzdifferenciáció tanulmányozásához. Mivel a melanociták a Mel-mix tenyésztő elegyben mesterséges adalékanyagok nélkül, saját humán szérum jelenlétében is jól tenyészthetők, a rendszer igen ígéretes autológ transzplantációk céljára is.

Az újszülöttkori kékfénykezelést széles körben és sikeresen használják a plazma bilirubin szint csökkentésére és az icterus kialakulásának megakadályozására. Mindeddig azonban kevés és ellentmondó adat áll a rendelkezésünkre azzal kapcsolatosan, hogy a kezelés milyen hatással van a melanocitás anyajegyek kialakulására. Célunk az volt, hogy egy gén-környezeti hatásokat feltáró ikertanulmány végrehajtásával adatokat gyűjtsünk a fenti kérdés megválaszolására. Ötvenkilenc olyan ikerpár bevonásával végeztük a vizsgálatokat, ahol az egyik kapott, míg a másik nem kapott újszülöttkori kékfény kezelést. Bőrgyógyász ill. szemész által végzett felméréssel megállapítottuk a bőr és a szem melanocitás lézióinak számát, valamint egy részletes kérdőív segítségével adatokat gyűjtöttünk az ikerpárok életmódbeli sajátságairól, amelyek elsősorban a bőrük napfény expozícióját mérte fel. Az esetleges gén-környezet kölcsönhatások felmérésére a melanokortin 1 receptor gén polimorfizmusait és hisztidin ammonia-liáz gén I439V polimorfizmusait vizsgáltuk. Eredményeink statisztikai feldolgozása szerint az újszülöttkori kékfény kezelés szignifikáns hatással bír mind a bőr, mind az uvea pigmentált lézióinak kialakulására, a vizsgált polimorfizmusoknak viszont ebben a populációban nem volt hatása a léziók kialakulására. Eredményeink arra utalnak, hogy az újszülöttkori kékfény kezelés valóban kockázati tényezője a melanoma-predisponáló pigmentált anyajegyek kialakulásának. További in vitro és in vivo viszgálatok szükségesek annak felmérésére, hogy ennek a rendkívül hasznos és széles körben alkalmazott kezelési eljárásnak milyen hosszútávú mellékhatásai vannak.

2006-ban Klinikánkon egy olyan szűrési programot indítottunk, amelynek keretében a familiáris melanomában szenvedő betegeink és családtagjaik genetikai szűrését végezzük. Ezen betegpopulációban a melanoma-predisponáló CDKN2A gén direkt szekvenálsát végezzük el. A következő két fejezetben az ezekkel vizsgálatokkal kapcsolatos eredményeinkről számolok be.

Klinikánkon egy 33 éves fiatal nőbeteg jelentkezett pT2b stádiumú, lassan progrediáló melanomával, belszervi áttét nélkül. A melanoma eltávolítását és az utókezelést követően két év múlva Grade III besorolású emlődaganatot diagnósztizáltak a betegnél. Ugyanekkor egy PET CT, majd az azt követő laparoszkópos vizsgálat egy, a hasnyálmirigy caudalis régiójában jelen lévő

közepesen differenciált adenocarcinoma meglétét is feltárta. A daganatok eltávolítását követő immunhisztokémiai vizsgálatok eredménye szerint a melanoma, az emlődaganat és a hasnyálmirigy adenocarcinoma három primer malignus daganat képződés eredményeként alakultak ki. A családi anamnézis feltárta, hogy a fiatal nőbeteg édesapja is többes primer daganatban szenved, valamint hogy édesapjának leánytestvérét igen fiatal korában vesztették el emlődaganat miatt. A nőbeteg fiatal kora és a családi anamnézis genetikai predispozíciót sugallt, ezért a nőbeteg és édesapja esetében elvégeztük a ciklin-dependens kináz inhibitor 2A (CDKN2A) és a „breast cancer 1 és 2" (BRCA1 and BRCA2) gének szűrését. Genetikai vizsgálataink eredménye szerint mind a fiatal nőbeteg, mind édesapja hordozza a korábban már melanoma-predisponáló CDKN2A mutációnak leírt R24P variánst, ugyanakkor nem detaktáltunk egyet sem a közép-európai populációra jellemző 15 BRCA mutáció közül. Eredményünk alapján feltételezzük, hogy a detektált R24P CDKN2A mutáció önmagában is hajlamosító tényező lehet a többes primer tumorok kialakulására. Az erre vonatkozó irodalmi adatok szintén alátámasztották ezt a feltételezésünket. Saját eredményeinket, valamint az eddig a témában megjelent irodalmi adatokat egy könyvfejezetben foglaltuk össze.

A melanomára való hajlam genetikai predispozíciója több faktoros és heterogén. Ismert, hogy a familiáris melanomás esetek nagy többségében a humán 9. kromoszómán lokalizált CDKN2A gén mutációi a felelősek, mégis mindössze az esetek 20-40%-ában lehetséges kóroki kódoló mutáció detektálása a génen. Célunk az volt, hogy egy familiáris melanomában szenvedő magyar család genetikai vizsgálata során azonosított CDKN2A introni mutációról (IVS1+37 G/C) kimutassuk, hogy vajon ez a gén variáció okoz-e eltérést a CDKN2A elsődleges mRNS érési folyamataiban. In vitro minigén kísérleteket végeztünk, ahol a vektorokba a vad típusú és az introni mutációt hordozó variációkat építettük be. A konstrukciókkal HeLa sejteket transzfektáltunk, majd totál RNS-t izoláltunl. cDNS-sé való átírásukat követően polimeráz láncreakcióval szaporítottuk fel, majd gélelektroforézissel elemeztük a termékeket. Eredményeink igazolták, hogy az introni mutáció megléte aberráns mRNS érési terméket eredményez, ami alapján feltételezzük, hogy a mutációnak kóroki szerepe lehet a melanoma pathogenezisében. Vizsgálataink arra mutatnak rá, hogy a CDKN2A gén introni mutáció valóban szerepet játszhatnak a betegség kialakulásában, és magyarázatul szolgálhatnak arra is, hogy a kódoló mutációk azonosításával miért csak 20-40 százaléka fedhető le a familiáris melanomás eseteknek. Az eredményeinket összefoglaló közleményt revíziót követően 2011. decemberben küldtük vissza a The British Journal of Dermatology c. lapba.

Befejezettnek tekintjük a PRINS nem kódoló RNS in situ detektálásának optimalizálását. A közeljövőben tervezzük elvégezni azokat az in situ vizsgálatokat, amelyekhez melanoma és anyajegy mintákat tartalmazó szöveti array-ket fogunk felhasználni. Valós idejű RT-PCR eredményeinket alapul véve azt feltételezzük, hogy az anyajegyekhez képest a melanoma mintákban csökkent PRINS expressziót fogunk detektálni. A valós idejű RT-PCR-ral valamint az in situ hibridizációval kapott eredményeinket a közeljövőben tervezzük összegezni és publikálni.

Kormos B, Belső N, Bebes A, Szabad G, Bacsa S, Széll M, Kemény L, Bata-Csörgő Zs: In Vitro Dedifferentiation of Melanocytes from Adult Epidermis Plos One 6:13, 2011. IF: 4,411

Csoma Z, Tóth-Molnár E, Balogh K, Polyánka H, Orvos H, Ócsai H, Kemény L, Széll M, Oláh J. Neonatal blue light phototherapy and melanocytic nevi: a twin study. Pediatrics. 128 :e856-64, 2011. IF:5,391

Klára Balogh, Edina Nemes, Gabriella Uhercsák, Zsuzsanna Kahán, György Lázár, Gyula Farkas, Hilda Polyánka, Erika Kiss, Rolland, Gyulai, Erika Varga, Erika Keresztné Határvölgyi, Kaizer László, Lajos Haracska, László Tiszlavicz, Lajos Kemény, Judit Oláh, Márta Széll: Melanoma-predisposing CDKN2A mutations in association with breast cancer: a case-study and a meta-analysis. In: Melanoma in the Clinic - Diagnosis, Management and Complications of Malignancy (Ed: Mandi Murph), Rijeka, 2011, InTech, 211-224. p. (ISBN 978-953-307-571-6)

Teljes támogatás: 3.000.000,- Ft

STUDIES ON THE REGULATION OF MELANOCYTE PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION AND MELANOMA PATHOGENESIS

Márta Széll[1], Zsuzsanna Bata-Csörgő[2], Judit Oláh[2], Erika Varga[2], Bernadett Kormos[1]
[1]Dermatological Research Group of the Hungarian Academy of Sciences and the University of Szeged, [2]Department of Dermatology and Allergology, University of Szeged

The aim of our work was to examine melanocyte biology as well as to identify environmental and genetic factors contributing to melanoma pathogenesis.

In previous work we described a novel culture technique using a cholera toxin and PMA-free medium (Mel-mix) for obtaining pure melanocyte cultures from human adult epidermis. In Mel-mix medium the cultured melanocytes are bipolar, unpigmented and highly proliferative. Further characterization of the cultured melanocytes revealed the disappearance of c-Kit and TRP-1 and induction of nestin expression, indicating that melanocytes dedifferentiated in this in vitro culture. Cholera toxin and PMA were able to induce c-Kit and TRP-1 protein expressions in the cells, reversing dedifferentiation. TRP-1 mRNA expression was induced in dedifferentiated melanocytes by UV-B irradiated keratinocyte supernatants, however direct UV-B irradiation of the cells resulted in further decrease of TRP-1 mRNA expression. These dedifferentiated, easily accessible cultured melanocytes provide a good model for studying melanocyte differentiation and possibly transdifferentiation. Because melanocytes in Mel-mix medium can be cultured with human serum as the only supplement, this culture system is also suitable for autologous cell transplantation.

Neonatal blue light phototherapy (NBLP) has been widely and successfully used for the treatment of neonatal jaundice to reduce the plasma concentration of bilirubin and, hence, to prevent kernicterus. Only a few and controversial data are available in the literature as to how NBLP influences melanocytic nevus development. Our goal was to conduct a twin study with the aim of better understanding the role of NBLP in melanocytic nevus development. We also investigated the roles of other environmental and constitutional factors in nevus formation. Fifty-nine monozygotic and dizygotic twins were included in this cross-sectional study. One of the twin members received NBLP, and the other did not. A whole-body skin examination was performed to determine the density of melanocytic skin lesions. The prevalence of benign pigmented uveal lesions was evaluated during a detailed ophthalmologic examination. A standardized questionnaire was used to assess data relating to constitutional, sun-exposure, and other variables. To search for possible gene-environmental interactions involved in the appearance of pigmented lesions, the melanocortin 1 receptor variants and the I439V polymorphism of histidine ammonia-lyase genes were also determined in the enrolled twins. According to our results, NBLP was associated with a significantly higher prevalence of both cutaneous and uveal melanocytic lesions. No association was found between the examined gene polymorphisms and the number of pigmented alterations in the examined study group. Our data suggest that NBLP could well be a risk factor for melanocytic nevus development. Phototherapy with blue-light lamps is a standard and essential therapeutic modality in neonatal care; therefore, additional in vivo and in vitro studies are necessary to establish its potential long-term adverse effects.

In 2006 we at the Department of Dermatology and Allergology, University of Szeged initiated a genetic sceerning program for familial melanoma patients and their relatives. As a result of this screening work we identified and characterized melanoma-predisposing CDKN2A mutations in the Hungarian population. In the next two chapters the results of two investigations are summerized.

A 33 year-old female patient presented at our Department with a slowly progressing pT2b stage malignant melanoma without internal organ involvement. Two years later the patient was diagnosed with multifocal breast cancer which histologically proved to be a Grade III invasive medullar

carcinoma. Apart from the mammary tumour PET CT suggested the presence of neoplasm affecting the tail of the pancreas. Explorative laparotomy found a medium differentiated adenocarcinoma of the pancreas with liver and local lymph node involvement. Immunhistochemical examination of the removed tumors proved that they were results of independent primary malignant processes. Family history revealed gastric and laryngeal carcinoma affecting the father of the patient and the father's sister deceased of breast cancer. Occurrence of multiple primary tumours in such a young individual and family history of malignancies suggested genetic predisposition. Therefore our aim was to perform the genetic screening of the patient and her father. Direct sequencing of the cell-cycle regulatory cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A) and the breast cancer 1 and 2 (BRCA1 and BRCA2) genes. Our genetic analysis revealed that the patient and her father both carry the relatively common R24P CDKN2A mutation in heterozygote form, however we did not detect any of the 15 most commonly occurring BRCA mutations, characteristic of the European population. Based on our results we hypothesize that the detected R24P mutation of the CDKN2A gene might cause genetic predisposition to breast cancer independently of other breast cancer predisposing germ-line mutations. We have performed a literature search and prepared a review on how CDKN2A mutations could be implicated in the pathogenesis of breast cancer.

The genetic predisposition to melanoma is quite heterogeneous. The major locus for melanoma predisposition is the cell-cycle regulatory CDKN2A gene on chromosome 9p21 though alterations in it have been detected in only 20-40% of melanoma-prone families. However, with regard to the frequency of melanoma-prone families linked to 9p21, the frequency of germline coding mutations of the CDKN2A gene is lower than expected. We set out to investigate whether the rare IVS1+37 G/C intronic mutation of the CDKN2A gene recently identified in a Hungarian melanoma-prone family, influences mRNA splicing regulation. To this end, CDKN2A minigenes containing the wild type and the mutant intronic sequence were created and transfected into HeLa cells with the aim of study of the mRNA transcripts. The results revealed the emergence of a differential splicing pattern from the wild type and the mutant minigene, suggesting that this mutation may alter the splicing of CDKN2A primary mRNA and therefore might have a pathogenetic role in familial melanoma. We believe that these results confirm the importance of the identification and characterization of CDKN2A intronic mutations with a view to improvement of our understanding of the pathogenesis and the explanation of why the frequency of germline coding mutations of the CDKN2A gene is lower than expected in melanoma-prone families linked to chromosome 9p21. The revised version of the paper summarizing the above results was submitted to the British Journal of Dermatology in December 2011.

We have finished the optimalization of the in situ detection of PRINS non-coding RNA. Tissue microarrays containing nevi and melanoma specimen will be used to detect the expression of PRINS in these samples. Based on the results of our real-time RT-PCR experiments we hypothetise that melanoma samples will express substantially lower levels of PRINS RNA than nevi. The results of the real-time RT-PCR and in situ hibridization experimets will be summarized and published in the near future.

Kormos B, Belső N, Bebes A, Szabad G, Bacsa S, Széll M, Kemény L, Bata-Csörgő Zs: In Vitro Dedifferentiation of Melanocytes from Adult Epidermis Plos One 6:13, 2011. IF: 4,411
Csoma Z, Tóth-Molnár E, Balogh K, Polyánka H, Orvos H, Ócsai H, Kemény L, Széll M, Oláh J. Neonatal blue light phototherapy and melanocytic nevi: a twin study. Pediatrics. 128 :e856-64, 2011. IF:5,391
K Balogh, E Nemes, G Uhercsák, Z Kahán, G Lázár, G Farkas, H Polyánka, E Kiss, R Gyulai, E Varga, E Keresztné Határvölgyi, L Kaizer, L Haracska, L Tiszlavicz, Ls Kemény, J Oláh, M Széll: Melanoma-predisposing CDKN2A mutations in association with breast cancer: a case-study and a meta-analysis. In: Melanoma in the Clinic - Diagnosis, Management and Complications of Malignancy (Ed: Mandi Murph), Rijeka, 2011, InTech, 211-224. p. (ISBN 978-953-307-571-6)

Teljes támogatás: 2 400 000,- Ft

KOMPLEX LABORATÓRIUMI PARAMÉTEREK VIZSGÁLATA ACUT PANCREATITIS GYÓGYSZERES KEZELÉSE SORÁN. KÍSÉRLETES ÉS KLINIKAI VIZSGÁLATOK.

[1]Szentkereszty Zsolt, [1]Kotán Róbert, [1]Pósán János, [1]Sápy Péter
[1]DE OEC Sebészeti Intézet

Bevezetés: A súlyos akut pancreatitis (SAP) etio-pathogenezisének egyik általánosan elfogadott elmélete a mikrocirkuláció romlásán alapul. Jelen tanulmány coerulein indukálta kísérletes pancreatitisben vizsgálja a haemorheologiai változásokat és azok befolyásolásának lehetőségeit. Tevékenységünk más részében a SAP-t kísérő intraabdominalis hypertonia kérdéseivel foglalkoztunk, melynek kimutatása és kezelése ugyancsak fontos feladat.

Kísérletes adatok

1. kísérletsorozat

Módszer: A vizsgálatok első fázisában arra kerestük a választ, hogy állatkísérletekben a coerulein különböző dózisai által kiváltott acut pancreatitis milyen hatással van a micro-rheologiai paraméterekre (vörösvérsejt deformabilitás, vörösvérsejt aggregatio). Kísérleteinket a DE OEC Sebészeti Műtéttani Tanszéken végeztük a közleményben szereplő társszerzők részvételével.

Kísérleteinket a 16/2008 DE MÁB sz. engedély alapján végeztük. Sprague-Dawley rats (Janvier Co., France) patkányokon a következő csoportokban: .

1. Kontroll csoport (n= 8; 4 nőstény és 4 hím)
2. 5 µg/kg coerulein csoport (n=10; 5 nőstény és 5 hím)
3. 10 µg/kg coerulein csoport (n=8; 3 nőstény és 5 hím).

Általános anaesthesiában (60 mg/kg, i.p., Thiopenthal), az acut pancreatitist 5, illetve 10 µg/kg coeruelin (Sigma-Aldrich Kft., Budapest) subcutan adásával váltottuk ki. A kontroll csoportban a coeruelin helyett azonos volumenű steril fiziológiás sóoldatot alkalmaztunk.

Laboratóriumi paraméterek meghatározásához vérvételek történtek a szer beadása előtt, majd azt követően 1 és 2 órával a vena caudalis lateralis punctiója révén (~700 µl vér vétele, 1,5 mg/ml K_3-EDTA-t tartalmazó fecskendőbe). A postoperatív első napon általános anaesthesiában laparotomiát követően vérvétel történt a vena cava caudalisból (K_3-EDTA anticoagulans), majd szövettani mintákat vettünk (pancreas, vékonybél, máj, vese, tüdő).

A vérmintákból meghatározásra kerültek kvalitatív és kvantitatív haematologiai paraméterek (Sysmex F-800 microcell counter), a vörösvérsejt deformabilitás (Rheoscan-D200 slit-flow ektacytométer) és a vörösvérsejt aggregatio (Myrenne MA-1 vörösvérsejt aggregométer). A vörösvérsejt deformabilitás mérések során standard 30 mPa.s viszkozitású PVP oldatot használtunk, és a deformabilitást leíró paraméterek elemzéséhez Lineweaver-Burk analízist alkalmaztunk. Az eredmények összehasonlítását egyirányú ANOVA teszttel végeztük. Statisztikailag szignifikánsnak a $p<0,05$ értékeket tekintettük.

A kiváltott pancreatitist szövettani vizsgálatokkal és serum amylase és lipase vizsgálatokkal támasztottuk alá.

Eredmények: Az 5, és a 10 µg/kg dózisban adott coerulein minden csoportban kiváltotta az acut pancreatitist, amelyet az amilase enzimaktivitás 1 óra, és még nagyobb mértékben 2 óra elteltével mutatkozó nagyarányú megemelkedése, valamint szövettani vizsgálatok is igazoltak. A legnagyobb mértékű micro-rheologiai romlást (vörösvérsejt deformabilitás és vörösvérsejt aggregatio) a 10 µg/kg dózisú coerulein adása után tapasztaltunk, legkifejezettebb mértékben nőstény állatokban (2 órás vizsgálati időpont). Az eredményekből készült kézirat a Clin. Hemorheol. Microcirc. folyóiratban (IF=2,838) elfogadásra került.

2. kísérletsorozat

Módszer: A kísérletsorozat második szakaszában célunk a különböző terápiás szerek, a Pentoxifillin, a kis molekulasúlyú heparin (enoxaparine) és Flunixin hatékonyságának összehasonlítása volt. Itt már célirányosan választottuk a 10 µg/kg dózisú coerulein alkalmazását nőstény patkányokban. Az összehasonlítási időpont a coerulein beadását követő 2. óra volt.

Kísérleteink során 50 nőstény Sprague-Dawley patkányt (testsúly: 292,1±13,84 g) random 5 csoportra osztottunk:

1. Kontroll csoport (C, n=10): altatásban szöveti mikrokeringés mérés, vérvétel, biopszia
2. Acut pancreatitis csoport (AP, n=10): 10 µg/kg coerulein s.c. beadását követő 2. órában szöveti mikrokeringés mérés, vérvétel és pancreas biopszia
3. Acut pancreatitis + Flunixin csoport (AP+Fl, n=10): az AP csoportban leírtakon túlmenően a coerulein adásával egyidőben 2,5 mg/kg Flunixin s.c. beadása
4. Acut pancreatitis + Pentoxifillin csoport (AP+Pe, n=10): az AP csoportban leírtakon túlmenően a coerulein adásával egyidőben 50 mg/kg Pentoxifillin i.p. beadása
5. Acut pancreatitis + Clexan csoport (AP+Cle, n=10): az AP csoportban leírtakon túlmenően a coerulein adásával egyidőben 2 mg/kg Clexan s.c. beadása. A vizsgálatokat a szöveti microcirculatiós áramlási paraméterek (blood flow unit, BFU) meghatározásával kezdtük (LD-01 laser Doppler szöveti áramlásmérő, Experimetria Kft.) a nyelv, a máj bal lebeny, egy jejunum-kacs, majd a pancreas területén. Fentieken túlmenően rectalis hőmérséklet mérés, vér PH és laktát szint és haemorheologiai paraméterek meghatározása történt.

Eredmények: A rectális hőmérséklet az AP csoportban jelentős mértékben megemelkedett, az AP+Fl és az AP+Cle csoportokban sokkal kevésbé azonban az AP+Pe csoportban igen magas testhőmérséklet értékeket mértünk, több esetben 40 °C felettit.

A szöveti microcirculatio (BFU) az összes acut pancreatitises csoportban alacsonyabb volt mind a négy vizsgálati ponton. Az AP+Pe csoportban a nyelv és a máj, kismértékben a pancreas vonatkozásában mutattunk ki mikrokeringés fokozódást. A vékonybél esetén a AP+Fl csoportban mutatkozott kismértékű mikrokeringés javulás. A máj és a pancreas vonatkozásában a legnagyobb mértékű BFU emelkedést a AP+Fl csoportban találtunk.

A vér pH értéke jelentős mértékben csökkent az AP csoportban míg a Flunixin-nel, Pentoxifillin-nel vagy Clexan-nal kezelt csoportokban a Kontroll és az AP csoportokban mért értéke között mutatkoztak. A laktát koncentráció az AP csoportban kisebb, AP+Fl közepes az AP+Pe jelentős mértékben emelkedett, míg a Clexan-nal kezelt csoportban nem különbözött jelentősen a Kontroll csoport értékeitől.

Az acut pancreatitis kiváltása után két órával a Kontroll csoporthoz képest alacsonyabb fehérvérsejt számot mértünk, kivéve a Clexannal kezelt csoportban. A haematocrit mindegyik pancreatitises csoportban emelkedést mutatott, legkisebb mértékben az AP+Fl csoportban. A thrombocyta szám is emelkedett, legnagyobb mértékben a Clexannal kezelt csoportban.

A vörösvérsejt deformabilitást leíró maximális elongatiós index értékek az AP csoportban jelentősen csökkentek. Az AP+Fl csoportban ez a romlás nem volt kimutatható. A membránstabilitás vizsgálatakor az osmoscan adatok is az AP+Fl csoportban mutatták a jobb értékeket.

A vörösvérsejt aggregatiót leíró M és M1 index értékek mindegyik acut pancreatitises csoportban megemelkedtek. A kezelt csoportok esetén a Flunixin esetén kisebb, a Pentoxifillin adásakor nagyobb mértékben találtunk javulást. Az ektacytometriás vörösvérsejt aggregatiós paraméterek hasonló irányú változásokat mutattak.

Klinikai adatok

A tevékenységünk más részében megteremtettük és meghonosítottuk az intraabdominalis nyomás mérésének módszerét a DE OEC Sebészeti Intézetben és az Aneszteziológiai és Intenzív Terápiás Tanszéken. A magyar szakirodalomból szinte teljesen hiányzó területet, mely az IAH/ACS diagnózisának és kezelésének kérdéseivel foglalkozik a Magyar Sebészet c. folyóiratban közleményben jelentettük meg. A kezdeti klinikai tapasztalataink alapján úgy gondoljuk, hogy súlyos akut pancreatitisben az intraabdominalis nyomás rutinszerű mérése elengedhetetlen, a mérés alapján a konzervatív és műtéti kezelés taktikája saját gyakorlatunkban változott. A dekompressziós laparotomiát csak a konzervatív kezelés lehetőségeinek eredménytelensége esetén javasoljuk. A műtéti indikáció felállításában azonban óvatosnak kell lenni, figyelembe kell venni azt a tényt, hogy ebben a betegségben a korai stádiumban végzett műtétek morbiditása és mortalitása magas.

Budget: 2.400.000.- HUF

CHANGES OF HEMORRHEOLOGIC LABORATORY PARAMETERS AND COURSE OF MEDICATION IN EXPERIMENTAL ACUTE PANCREATITIS. THE ROLE OF INTRAABDOMINAL PRESSURE IN SEVERE ACUTE PANCREATITIS.

[1]Szentkereszty Zsolt, [1]Kotán Róbert, [1]Pósán János, [1]Sápy Péter
[1]UD MHSC Inst. Of Surgery

Introduction: The micrucirculary disturbance in severe acute pancreatitis (SAP) is one of the generally accepted etiopethogenic theory. In presen study the hemorheologic changes end their possible inluence are analysed in coerulein induced experimental pancreatitis. On the other hand we cared for the questions of intraabdominal hypertony in SAP.

Experimental data

1st experimental series

Methods: In the first phase of the study of the changes of micro-hemorrheologic (red blood cell deformability and aggregation) changes were evaluated during different doses of cerulein induced experimental pancreatitis in rats. Our experiments were performed with the contribution of the colleagues of Department of Operative Techniques and Surgical Research of UD MHSC who are co-authors of the issued paper.

The experiments were approved by the University of Debrecen Committee of Animal Research (permission Nr.: 16/2008). Sprague-Dawley rats (Janvier Co., France) were divided into the following groups:

1. Controll group (n= 8; 4 female és 4 male)
2. Acute pancreatitis with 5 μg/kg coerulein group (n=10; 5 female és 5 male)
3. Acute pancreatitis with 10 μg/kg coerulein group (n=8; 3 female és 5 male).

The acute pancreatitis were induced in general aneshesia (60 mg/kg, i.p., Thiopenthal) by 5 or 10 μg/kg subcutaneously administered coerulein (Sigma-Aldrich Kft., Budapest). In the controll group equivalent dosage of physiologocal saline was given.

For laboratory cupping was performed from the lateral caudal vein (~700 μl blood, 1,5 mg/ml K_3-EDTA syring) before and after one and two hours of the coerulein administration. On the first postoperative day during laparotomy in general anaesthesiology cupping from the lateral caudal vein and histologic sempling from the pancreas, small intestine, liver, kidney and lung were performed.

Quantitative and qualitative hematologic parameters were measured from the blood (Sysmex F-800 microcell counter), red blood cell deformability (Rheoscan-D200 slit-flow ektacytometer) and aggregation (Myrenne MA-1 RBC aggregometer). For measuring of RBC deformability standard 30 mPa. viscosity PVP solution was used, and Lineweaver-Burk analysis was performed. For statistical analysis ANOVA probe was used. The difference was significant at $p<0,05$ value.

The pancreatitis was justified with histology and Amylase and Lipase level evaluation.

Results: The administration of 5 and 10 μg/kg coerulein were induced acute pancreatitis in all groups. The most serious deterioration of micro-rheology (RBC deformability and aggregation) were observed in those female rats (2 hours after pancreatitis was induced) that pancreatitis was induced with 10 μg/kg of coerulein. The results are published in Clin. Hemorheol. Microcirc. (IF=2,838).

2nd experimental series

Methods: In the second phase of the study the comparison of effectiveness of different drugs such as pentoxiphyllin, a lower miolecular weigh heparin (enoxaparine) and Flunixin was performed in 10 μg/kg coerulein induced pancreatitis female rats two hours after the pancreatitis was induced.

The fifty female Sprague-Dawley rats (weight: 292,1±13,84 g) were randomly divided into 5 groups:

1. Controll group (C, n=10): in general anaesthesia tissue miscrocirculation was examined, cupping an histology was performed.
2. Acute pancreatitis group (AP, n=10): 2 hours after 10 μg/kg coerulein was injected s.c. tissue microcirculation was examined, cupping and histology was performed.
3. Acute pancreatitis + Flunixin group (AP+Fl, n=10): at the time of coerulein injection 2,5 mg/kg Flunixin was also administered. The same examinations was performed as in AP group.
4. Acute pancreatitis + Pentoxifyllin group (AP+Pe, n=10): at the time of coerulein injection 50 mg/kg Pentoxifyllin i.p. was also administered. The same examinations were performed as in AP group.
5. Acute pancreatitis + Clexan group (AP+Cle, n=10): at the time of coerulein injection 2 mg/kg Clexan s.c.was also administered. The same examinations were performed as in AP group.

Tissue microrcirculatory parameters (blood flow unit, BFU) were measured with LD-01 laser Doppler tissue flowmetry, Experimetria Kft.) in the region of tongue, left lobe of liver, jejunum, and pancreas. Rectal tempearture, blood acidity and serum lactate level and hemorrheologic parametars were measured.

Results: The rectal temperature was significantly elevated in AP group, but it was moderate in AP+Fl and AP+Cle groups and high over 40 °C temperature was observed in AP+Pe group.

The tissue microcirculation (BFU) in all measured locations were lower in all acute pancreatitis group in AP+Pe group amelioration was developed in the tongue and liver microcircultaiuon. In the jejunum it was observed in AP+Fl group. In the liver and pancreas the most amelioration of BFU was noticed in the AP+Fl gruoup.

The blood pH level was significantly decreased in AP group while it was moderate in the Flunixin, Pentoxifyllin or Enoxaparine treated group. Till the increas of lactat level in AP group was minimal it was moderate in AP+Fl and it was pregnant in AP+Pe group but in was not different in the Clexan treated group.

After 2 hours of the induction of pancreatitis the WBC level was elevated in all groups but the AP + Cl group. The elevation of hematocrit level was significant in all groups and it was the lowest in AP+Fl group. The thrombocyte count number was also elevated in the treated groups and it was the most significant in the Clexan group.

During the measurement of RBC deformability the maximal elongation indexes were decreased significantly AP groups. In the AP+Fl group this tendency was not noticed. The osmoscan (membrane stability) confirmed the best results also in the AP+Fl group.

The M és M1 index levels featured the RBC aggregation were elevated in all AP groups. A moderate amelioration of these parameters were observed in the Flunixin treated groups and it was significant in the Pentoxifyllin treated group. The results of ektacytometric RBC aggregation were the same.

Clinical data

In the study time we established the measurement of intraabdominal pressure in the Ins. Of Surgery and Anaesthesiology and Intensive Care Unit of University of Debrecen. A review paper was accepted in the Magyar Sebészet journal about the diagnostic and treatment of IAH/ACS.

On the basis of our initial experiments the authors suggest that the routine measurement of intraabdominal pressure in severe acute pancreatitis is necessary and it can influence the conservative and surgical therapeutic tactics. The decompressive laparotomy is indicated only in cases when the conservative treatment is failed. Foresight is needed in indicating the decompressive operation, because it is well known that the mortality and morbidity of surgery in early stage of severe acute pancreatitis is high.

ETT 04-364/2009 Teljes támogatás: 6 000 EFt

HIPERALGÉZIÁVAL JÁRÓ ÁLLATKÍSÉRLETES MODELLEK NOCICEPTÍV ÉS ANTINOCICEPTÍV NEUROHUMORÁLIS MECHANIZMUSAI

Szolcsányi János, Pethő Gábor, Szőke Éva, Bölcskei Kata
Pécsi Tudományegyetem ÁOK Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet

A kapszaicin-érzékeny, Tranziens Receptor Potenciál Vanilloid-1 TRPV1-et kifejező peptiderg nociceptive idegvégződések a) nocicepciót, gyulladásos és neuropáthiás hiperalgéziát közvetítenek és b) aktivációjuk hatására belőlük nem csupán gyulladáskeltő tachikininek és CGRP, hanem szomatosztatin is felszabadul, mely a keringésbe jutva ellenregulációs "szenzokrin" antinocicepcív/gyulladásgátló hatást fejt ki a szomatosztatin-4 receptorok aktivációján keresztül. Ez az általunk felfedezett új neurohumorális mechanizmus korábbi és újabb eredményeit és gyógyszerkutatási perspektíváit összefoglaló munkában írtuk le, melynek több eredménye még további közleményekben kerül publikálásra (Curr. Topic Med. Chem. 11: 2253-2263, 2011).

1. Hőküszöbmérésen alapuló két új érzékeny nociceptív módszerünkkel kimutattuk, hogy a TRPV1 kationcsatorna aktivációja akútan denervált lábon szomatosztatin felszabadulást vált ki, mely szisztémásan gátolja a hiperalgéziát. TRPV1 aktiváció hiperalgéziát egyaránt gátolta a talpbőr incíziójánál (posztoperatív fájdalom-modell), formalin vagy idegsérüléses neuropathiás modellekben.

2. Forró vízzel (52°C 10 sec) kiváltott hiperalgézia TRPV1 kapszaicin receptor szenzibilizálása következtében jön létre, de további szerepet játszó mediátorokról (bradykinin, lipoxigenáz metabolitok, NO, P2X purinoceptor agonisták) is kaptunk bizonyítékokat (Life Sci. 86: 244-250, 2010).

3. A kapszaicin, reziniferatoxin és N-oleoildopamin TRPV1 agonisták helyi alkalmazásának napokig tartó antinociceptív hatását, időbeli lefolyását jellemeztük. Ez a tartós deszenzibilizáló hatás nem csak a forró, hanem a hideg ingerekkel szemben is kimutatható antinocicepciót eredményez (Eur. J. Pain 14: 480-486, 2010).

4. PACAP gén-hiányos egerek segítségével elsőként találtunk állatkísérletes bizonyítékot ezen neuropeptid szerepére a "migrén modell"-ként használatos nitroglicerinnel előidézett trigeminovaszkuláris aktivációban. Ez a megfigyelés bizonyíték arra, hogy a PACAP neuropeptid felszabadulása jelentős kóroktani szerepet játszhat a migrén kialakulásában, mivel a PACAP i.v. adása trigeminovaszkuláris aktivációt váltott ki (Neurobiol. Dis. 45: 633-644, 2012)

5. Kimutattuk, hogy sebészeti műtétek után és szepszisben a plazma szomatosztatin szint emelkedik (Peptides 31: 1208-1212, 2010)

6. Több éves géntechnológiai kísérletek után sikerült TRPV1 knockdown (siRNA) transzgenikus egértörzset előállítani. A TRPV1 knockdown egerek nociceptiv, gyulladásos és hőregulációs válaszainak jellemzése és összehasonlítása a TRPV1 knockout egerekkel megkezdődött (Cell Mol. Life Sci. 68: 2589-2601, 2011)

ETT 04-364/2009 Total support, HUF 4 800 000

NOCICEPTIVE AND ANTINOCICEPTIVE NEUROHUMORAL MECHANISMS IN ANIMAL MODELS OF HYPERALGESIA

János Szolcsányi, Gábor Pethő, Éva Szőke, Kata Bölcskei
University of Pécs, Faculty of Medicine, Department of Pharmacology and Pharmacotherapy

Capsaicin-sensitive peptidergic nociceptive nerve endings which express the Transient Receptor Potential Vanilloid type 1 (TRPV1) mediate a) nociception, inflammatory and neuropathic hyperalgesia and b) release in response to activation not only proinflammatory neuropeptides as tachykinins and CGRP but also somatostatin which reaches into the circulation and induces a counterregulatory "sensocrine" antinociceptive/anti-inflammatory effects by activation of somatostatin 4 receptors. This neurohumoral mechanism described by our group has drug developmental perspectives and has been reviewed recently (Curr. Toc. Med. Chem. 11: 2253-2263, 2011). This review contains also results described as follows.

1. By using our two highly sensitive nociceptive methods we have revealed that activation of the TRPV1 cation channel on the hindpaw after acute denervation results in release of somatostatin, which induces systemic antihyperalgesic effect. This inhibition of hyperalgesia ensued in models of postoperative pain (plantar incision), intraplantar formalin injection and in the nerve injury neuropathic model.
2. Hyperalgesia evoked by hot mater (52°C 10 sec) is mainly mediated by sensitization of the TRPV1 capsaicin receptor, but we obtained evidence also for the involvement of mediators like bradykinin, lipoxygenase metabolites, NO, P2X purinoceptor agonists (Life Sci. 86: 244-250, 2010).
3. Capsaicin, resiniferatoxin and N-oleoyldopamine as TRPV1 agonists induces after topical application an antinociceptive effect lasting for days. This effect was shown not only against hot stimuli but against nociceptive cold as well.
4. With the aid of PACAP gene-deleted mice we obtained experimental evidence for the first time that this neuropeptide plays a significant mediator role in the "migraine model" of producing trigeminovascular activation evoked nitroglycerin. The conclusions that the PACAP neuropeptide may play a significant role in the mechanism of migraine is supported also by our finding that i.v. injection of PACAP elicits activation of the trigeminovascular response (Neurobiol. Dis. 45: 633-644, 2012).
5. Evidence was obtained that in the plasma the somatostatin level is enhanced after surgical operation or sepsis (Peptides 31: 1208-1212, 2010).
6. It has been succeeded to create a strain of TRPV1 knockdown mice using siRNA technique. Nociceptive, inflammatory and thermoregulatory characteristics of these mice have been started and compared to the behaviour of the TRPV1 knockouts (Cell. Mol. Life Sic. 68: 2589-2601, 2011).

Teljes támogatás összege: 3.000.000,- Ft

Genetic factors beyond the damage of the white matter of the brain

The patient group underwent a detailed clinical scrutiny. The damage of the white matter of the brain was divided into two main clinical subcategories: 1, leukoaraiosis; 2, multiple sclerosis.
Healthy subjects without any brain damage was used as control group. On an original biochemical theory, MTHFR and UCP genetic variants were investigated with PCR methods.
The clinical data on the participants were enrolled from Pandy County Hospital. The PCR technique was performed at the University of Szeged.
The data were analysed by logistic regression models.
Some genetic variants of the UCP and MTHFR were found as susceptibility factors for the different white matter diseases.
The genetic factors underpinned our basic biochemical theories for the examined and common diseases of the white matter of the brain, thereby pointing towards new approaches to both the leukoaraiosis and multiple sclerosis.

References:

1, Szolnoki Z, et al.: Evaluation of the MTHFR A1298C Variant in Leukoaraiosis. J Mol Neurosci. 2011 Aug 16. ahead of publication. IF: 2.8

2. Szolnoki Z.: Common genetic variants of the mitochondrial trafficking system and mitochondrial uncoupling proteins affect the development of two slowly developing demyelinating disorders, leukoaraiosis and multiple sclerosis.. Curr Med Chem. 17: pp, 3583-90 (2010). IF: 4.7

3, **Szolnoki Z**, Kondacs A, Mandi Y, Bodor A, Somogyvari F: A homozygous genetic variant of mitochondrial uncoupling protein 4 affects the occurrence of leukoaraiosis.

Acta Neurol Scand. 123: pp,352-7. (2011) doi: 10.1111/j.1600-0404.2010.01391.x

4. **Szolnoki Z**, Kondacs A, Mandi Y, Bodor A, Somogyvari F: A homozygous genetic variant of mitochondrial uncoupling protein 4 exerts protection against the occurrence of multiple sclerosis.

Neuromolecular Med. 11: pp, 101-5. (2009). IF: 3.4

Teljes támogatás összege: 3.000.000,- Ft

Genetikai markerek vizsgálata neurológiaia betegségekben

A beteg csoport részletes klinikai átvizsgálás során esetett át. A fehérállomány károsodásokat két nagy csoportba soroltuk: 1, leukoaraiosis; 2, sclerosis multiplex.
A kontrol csoportot egészséges, agyi érbetegségekben nem szenvedő egyének képezték.
Eredeti biokémiai alap munka hipotézis szerint MTHFR és UCP genetika variánsokat vizsgáltunk, általunk kifejlesztett PCR technikával.
A klinikai vizsgálatok a Pándy Kálmán Kórház Neurológiai osztályán végeztük, a molekuláris vizsgálatok a Szegedi Tudományegyetem Mikrobiológiai tanszéken történtek.

Eredmények: bizonyos MTHFR és UCP variánsokat genetikai betegségre hajlamosító tényezőknek bizonyultak, bizonyos UCP variánsok védőfaktornak bizonyultak.

A találét összefüggések megerősítették eredeti biokémiai munka hipotézisünket, ezáltal új utat nyitottak a fenti betegségek alapkutatásai irányában.

A kutatáshoz kapcsolódó eredeti publikációk listája:

1, Szolnoki Z, et al.: Evaluation of the MTHFR A1298C Variant in Leukoaraiosis. J Mol Neurosci. 2011 Aug 16. ahead of publication. IF: 2.8

2. Szolnoki Z.: Common genetic variants of the mitochondrial trafficking system and mitochondrial uncoupling proteins affect the development of two slowly developing demyelinating disorders, leukoaraiosis and multiple sclerosis.. Curr Med Chem. 17: pp, 3583-90 (2010). IF: 4.7

3, **Szolnoki Z**, Kondacs A, Mandi Y, Bodor A, Somogyvari F: A homozygous genetic variant of mitochondrial uncoupling protein 4 affects the occurrence of leukoaraiosis.

Acta Neurol Scand. 123: pp,352-7. (2011) doi: 10.1111/j.1600-0404.2010.01391.x

4. **Szolnoki Z**, Kondacs A, Mandi Y, Bodor A, Somogyvari F: A homozygous genetic variant of mitochondrial uncoupling protein 4 exerts protection against the occurrence of multiple sclerosis.

Neuromolecular Med. 11: pp, 101-5. (2009). IF: 3.4

Teljes támogatás: 3.300.000 Ft

A KÉZHIGIÉNÉS EGYÜTTMŰKÖDÉS FEJLESZTÉSE TÍZ MAGYARORSZÁGI KÓRHÁZI OSZTÁLY EGÉSZSÉGÜGYI DOLGOZÓINAK KÖRÉBEN A KÓRHÁZI FERTŐZÉSEK ELŐFORDULÁSÁNAK CSÖKKENTÉSE, ÍGY AZ ELLÁTÁS SZÍNVONALÁNAK EMELÉSE ÉRDEKÉBEN

Dr. Szomor Katalin PhD.[1], Dr. Böröcz Karolina[2], Szabó Rita[2], Szálas Orsolya Krisztina[2]

[1]Általános Vírusdiagnosztikai Osztály, [2]Kórházi-járványügyi Osztály

A helyes kézhigiénével megelőzhetők a kórházi fertőzések, de az egészségügyi dolgozók együttműködési készsége világszerte alacsony. Hazai eredmények nem voltak, ezért kidolgoztunk egy felmérést a kórházak kézhigiénés gyakorlatára, illetve az egészségügyi dolgozók tudására és hozzáállására vonatkozóan, illetve egy oktatási segédanyagot. Feltételeztük, hogy a programunkkal javítható az egészségügyi dolgozók kézhigiénés együttműködési készsége.

2010-ben felhívást tettünk közzé a kórházak számára a kutatásunkban való önkéntes részvételre. A felhívás az EPINFO (Epidemiológiai Információs Hetilap) 17. évfolyamának 4. számában jelent meg 2010. február 5-én. Összesen 21 kórház (57 osztály) jelezte részvételi szándékát, mely a tervezett számnál majdnem 200 %-kal magasabb volt.

Kérdőívet dolgoztunk ki a résztvevő kórházak kézhigiénés helyzetének megismerésére, melyet az intézmények egy kivételével visszaküldtek (20 kórház és 56 osztály). Az eredményeket feldolgoztuk.

Az osztályok kézhigiénés helyzetét felmérő kérdőív öt fő témakört tartalmazott: általános információk, kézhigiénés szerek, a kézhigiénés tevékenység ellenőrzése, kézhigiénés protokoll megléte és további kézhigiénés lehetőségek.

Az általános információk vonatkozásában az alábbi eredményeket kaptuk: a kézhigiénés szerek közül alkoholos kézbedörzsölő szert az összes résztvevő osztályon használnak. A kézhigiénés tevékenység ellenőrzését az osztályok 16%-ában ellenőrzik. Kézhigiénés protokollt mindegyik kórház készített és a dolgozók által hozzáférhető. Kézmosási lehetőség (mosdó) a vizsgálók 100%-ában, illetve a kórtermek 84%-ában található. Alkoholos kézbedörzsölő szer a kórházi helységek 37%-ban találhatók.

Kidolgoztuk az egészségügyi dolgozók kézhigiénés tudásának felmérésére, illetve a kézhigiénés gyakorlatuk és együttműködési készségük megismerésére szolgáló kérdőíveket. Összesen 14 kórház küldte vissza a kérdőíveket (84%-os válaszadási arány).

A tudásfelmérő kérdőív hat fő témakört tartalmazott (definíciók ismerete, a kórokozók terjedési módjai, kézhigiénés szituációk, kézhigiénés módszerek ismerete, a kézen lévő kórokozók átviteli módjainak ismerete, illetve a kézhigiénés szerek ismerete. Az összes kérdés tekintetében a dolgozók 69%-a válaszolt helyesen.
Az egészségügyi dolgozók együttműködési készségének megismerésére szolgáló kérdőív (87%-os válaszadási arány) főbb eredményei: a dolgozók 73%-a megfelelő módon és

gyakorisággal végzik a kézhigiénés tevékenységet. A kézhigiénés termékekkel 54%-uk elégedett.

2011-ben történt meg az egészségügyi dolgozók kézhigiénés tevékenységének megfigyelésére szolgáló megfigyelési lapok kidolgozása, illetve a kézhigiénés oktatási anyag kidolgozása. A felmérésben még résztvevő 14 kórháznak kiküldtük a megfigyelési lapokat a kitöltési/megfigyelési útmutatóval, illetve részt vettek a Semmelweis Egyetem Menedzserképző Központja által tartott „Kézhigiéne fejlesztése" című oktatóprogramján, amelyen megtanulták a kézhigiénés tevékenységek megfigyelési szempontjait. Osztályonként 500 kézhigiénés alkalmat kellett megfigyelniük a kórházi infekciókontroll ápolóknak. Összesen két kórház (4 osztály) végezte el a megfigyelést, mely alapján az egészségügyi dolgozók kézhigiénés compliance-e 58%. Ezután közzé tettük az intézmény honlapján az oktatási segédanyagunkat, mely alapján a két kórháznak kellett elvégeznie a kézhigiénés oktatást. Ez a kórházak által nem történt meg. További felmérésre (osztályok-kontrollosztályok eredményeinek összehasonlítása, az oktatások megtörténte után egy újabb felmérési sorozat) így már nem volt több lehetőségünk. A részvételi arány nagy mértékű csökkenése miatt a második felmérés elvégzésére nem volt módunk.

Megjelent könyvfejezet:

- Dr. Böröcz Karolina: Egészségügyi ellátással összefüggő virális fertőzések megelőzése és felügyelete (5.3 fejezet,751-755. oldal)
  Klinikai és járványügyi virológia

  Főszerkesztő: Dr. Takács Mária, Vox Medica Kiadói Kft., 2011

Megjelent publikáció:

- Szabó Rita: Improving hand hygiene compliance among healthcare workers, Bulletin of National Centre for Epidemiology, 2011.augusztus

Budapest, 2011.01.30.

…….

témavezető

P.H. …….

intézmény igazgatója

Teljes támogatás: 3.300.000 Ft

IMPROVING HAND HYGIENE COMPLIANCE AMONG HEALTHCARE WORKERS IN TEN HUNGARIAN HOSPITAL WARDS IN ORDER TO REDUCE HEALTHCARE-ASSOCIATED INFECTIONS INCREASING THE LEVEL OF CARE

Dr. Katalin Szomor PhD.[1], Dr. Karolina Böröcz[2], Rita Szabó[2], Orsolya Krisztina Szálas[2]

[1]Division of Virology, [2]Department of Hospital Epidemiology and Hygiene

With proper hand hygiene hand-transmitted hospital infections can be prevented, but the compliance of health care workers is low all over the world. As prior surveys were not available, we developed a study to investigate the hand hygienic protocols used in hospitals and the attitude and knowledge of healthcare workers. A teaching material was also worked out. Our goal was to enhance the importance of hand hygiene and reach a higher compliance. As a first step, in 2010, we published a call for hospitals to voluntary participate in our research program. The call was published in EPINFO (Weekly Epidemiological Information Sheet of Hungary) on the 05th of February, 2010. A total of 21 hospitals (57 wards) announced their participation, which exceeded the estimated by almost 200%.
A questionnaire was developed to study the hand hygienic status of the participants. All but one institutes answered the questionnaire. All results were processed.

The hand hygiene survey questionnaire focused on five main topics: general information on hand hygienic supplies, hand hygienic monitoring activities, the existence of hand hygienic protocols and additional hand hygienic opportunities.
Regarding the general information topic, the following results were obtained: from the available hand hygienic products, alcoholic hand rub is used by all participating wards. The control of hand hygienic activities is monitored by the 16% of the participants. All hospitals developed hand hygienic protocols which are available for the employees. Hand washing facilities (sink) are present in 100% of the investigated examining rooms, and in 84% of the investigated hospital rooms. Alcoholic hand rub is provided in 37% of hospital rooms.

A questionnaire was developed to study the hand hygienic knowledge, behavior and compliance of healthcare workers. Altogether 14 hospitals returned the questionnaires (84% response rate).

The questionnaire to assess knowledge of healthcare workers concentrated on six main topics (knowledge of definitions, pathogen transmission modes, hand hygienic situations, hand hygienic practices, the possible hand-transmission modes of pathogens and hand hygienic agents). Correct answers were given by 69% of workers.

The main results of questionnaires regarding the cooperation of health workers (87% response rate) were the following: 73% of workers used hand hygienic methods in appropriate manner and with adequate frequency. 54% of them were satisfied with the available hand hygienic products.

In 2011 an observation sheet in order to monitor the activities of hand hygiene of healthcare workers, and a hand hygienic educational material were developed, and sent to the 14 participating hospitals with the monitoring guidance. Workers of the participating hospitals

attended the "Enhancing of hand hygiene" educational program, held by the Management Training Centre of Semmelweis University, where they learned the aspects of monitoring hand hygiene. Hospital infection control nurses had to observe 500 hand hygienic occasions by wards. Only two hospitals (4 wards) carried out the observation, based on which hand hygienic compliance of healthcare workers is 58%. Then the educational materials were published at our institutional web site, according to which two hospitals had to perform hand hygienic education, but it did not happen. Therefore we had no more chance to carry out any additional surveys (comparison of the results of wards and control wards, second survey after education). Due to significant decrease in participating, we had no more possibilities to carry out the second survey.

Published book chapter:
• Karolina Böröcz MD: Egészségügyi ellátással összefüggő virális fertőzések megelőzése és felügyelete [Prevention and control of healthcare associated viral infections.] in Klinikai és járványügyi virológia [Clinical and Epidemiological Virology.]
Editor: Mária Takacs PhD, Vox Medica Publishing Ltd., 2011(Chapter 5.3, pp. 751-755.)

Published papers:
• Rita Szabó: Improving hand hygiene compliance among healthcare workers, Bulletin of National Centre for Epidemiology, August 2011.

Budapest, 01.30.2012.

…….

supervisor

P.H. …….

director of institute

Teljes támogatás: 2 400.000,- Ft

A NOCICEPTIN ÉS A hsp70 MINT STRESSZ-JELLEMZŐK SZABÁLYOZÓ SZEREPE ÉS SZABÁLYOZOTTSÁGA KARDIO-VASZKULÁRIS KÓRKÉPEKBEN.

Tekes Kornélia[1], Sótonyi Péter[2], Sőti Csaba[3], Folyovich András[4], Hantos Mónika[5], Szegi Péter[1], Krepuska Miklós[2]

[1]Semmelweis Egyetem Gyógyszerhatástani Intézet,[2]Semmelweis Egyetem Érsebészeti Klinika, [3] Semmelweis Egyetem Orvosi Vegytani Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet, [4]Szt. János Kórház, [5]Bethesda Kórház

Az endogén ópiát-rendszer legújabban felfedezett receptorának, a mai receptor-besorolás szerinti NOP-receptornak, endogén agonistája az orphaninFQ/nociceptin (NC) heptadekapeptid, mely a preproorphaninFQ előanyag biológiailag igen aktív szekvenciája. Hatásának igen széleskörű, elsősorban állatkísérletes vizsgálatai döntően központi idegrendszeri hatásait, ill. a fájdalomérzékelésben betöltött szerepét elemezték. Perifériás szövetekben a NOP receptor szerepéről, a NC hatásairól kevés adat áll rendelkezésre. Állatkísérletek alapján felvetődött a NC-rendszer érintettsége a kardiovaszkuláris betegségekben, ill. a fizikai, mentális, sejtszintű stresszhez való adaptáció sikerességének szabályozásában.

Vizsgálataink első szakaszában a szív- és érbetegségek rizikója, ill. a szervezet stressz-megbírkózó képessége kvantitatív monitorozására alkalmas protokollt dolgoztunk ki, melyet a TUKEB befogadott (No:205-1/2007).. Elsőként krónikus ischemiás betegek csoportját, azaz 22 stabil angina pectoris (SAP) és 12 perifériás artéria-betegség (PAD) miatt hospitalizált beteg plazma nociceptin-szintjét hasonlítottuk 14 egészséges kontrol személy értékeihez. A protokoll szerint gyűjtött vér-mintákból elvégeztük a klinikai laboratóriumi vizsgálatokat, a plazma-mintákból RIA-módszerrel határoztuk meg a nociceptin-szinteket. Echocardiographiás, coronaria/peripheriás angiográfiás és EKG vizsgálatok alapján 12 beteg a Canadian Cardiovascular Society (CCS) szerinti III-IV súlyosságú, 10 beteg CCS II-III súlyosságú funkciós csoportba tartozott. A PAD betegek közül 9 claudicatio intermittens, 3 nyugalmi fájdalom és gangrena tüneteit mutatták. Mindhárom betegcsoportban a kontrol értéktől szignifikánsan alacsonyabb plazma NC szintet találtunk és a csökkenés mértéke a klinikai állapot súlyosságával szignifikáns összefüggést mutatott.

Vizsgálataink második szakaszába 59 beteget vontunk be, közülük 17 akut coronaria-syndroma (ACS) miatt került hospitalizálásra. A coronarographiás vizsgálat 15 esetben szignifikáns stenosist mutatott, mely azonnali perkután koronária intervenciót (PCI) igényelt. A klinikai laboratóriumi paraméterek meghatározását kiterjesztettük a troponin-T meghatározásra is, a szívizomsejt-nekrózis mértékének megállapításához. A vérplazma NC-szintjének méréséhez a coronarográfia utáni második napon gyűjtöttük a vérmintát. A mért értékek alapján a betegek három csoportba voltak sorolhatók: troponin-T pozitív (EPACS), troponin-T negatív (ENACS) és ischemiás szívbetegek (IHD). Mindhárom betegcsoportban szignifikánsan alacsonyabb plazma NC szintet találtunk, mint a korban illesztett kontrol csoport tagjai (n=31) esetében. A plazma NC szint szignifikáns korrelációt mutatott a fehérvérsejtszám, a trombocita-szám, a creatinin kináz aktivitás, a glutamate oxalecetsav transaminász aktivitás és a cholesterin-szint vonatkozásában is. Az ACS tüneteinek súlyossága szignifikáns negativ korrelációt mutatott a plazma NC szintjével, azaz minél súlyosabb állapotú volt a beteg, annál alacsonyabb NC szinteket tapasztaltunk.

Eredményeink alapján megállapítható, hogy a perifériás nociceptin- szint csökkenése szoros összefüggést mutat a kardiovaszkuláris betegségekkel, ami felveti azt a lehetőséget, hogy a plazma nociceptin szint a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásának előrejelző faktora lehet.

Teljes támogatás: 2 400.000,- Ft

Vizsgálataink folytatásaként egészséges kontrol fiatal férfiak és a férfi judo-válogatott korban illesztett csoportjában kerékpár-ergospirometriás terheléses vizsgálatokat végeztünk az általunk kifejlesztett, módosított Bruce-protokoll szerint és meghatározva az adott személy anaerob küszöbét. A terheléses vizsgálat során vér- és vizelet-mintákat gyűjtöttünk. A szérum-mintákból HPLC-EC módszerrel mértük a noradrenalin vérszint időbeli változását egy újonnan beállított és validált módszer alkalmazásával. A 16 fős kontrol csoport eredményei azt mutatják, hogy a 0 perces minták noradrenalin koncentrációja egyénenként igen nagy különbözőséget mutat (átlag ± SD: 339,65pg/ml ± 353.0; szélső értékek: 51,0 és 1317,46 pg/ml), viszont a 180 percig történő terhelés során 30 percenként vett vérminták noradrenalin-koncentrációja azonos tendenciát mutatva a terhelés végére a kiindulási érték 5-9 szeresére emelkedett. A hivatásos sportolók kiindulási noradrenalin-szintje szignifikánsan nem különbözött a kontrol személyekétől, viszont a terhelés hatására a szérum noradrenalin-szintje szignifikánsan alacsonyabb emelkedést mutatott. Az eredmények jól mutatják hogy a rendszeres fizikai aktivitás (fizikai stressz) a terhelés hatására kialakuló perifériás noradrenalin-szint emelkedését szignifikánsan csökkenti. A plazma-minták nociceptin-szintjének meghatározását is elvégeztük, de szignifikáns eltéréseket nem találtunk. Ennek oka lehet, hogy a 180 percig történő követési idő nem volt elégséges a NC plazma-szintjének változását előidézni, ami megerősíteni látszik a kardiovaszkuláris betegek esetében tapasztaltakat, azaz a krónikus ischemia és a csökkent perifériás nociceptin-szint közötti összefüggést.

Annak vizsgálatára, hogy a stress milyen formái befolyásolhatják a perifériás nociceptin-szintet, állatkísérletes vizsgálatunkban patkányok vemhességének utolsó 48 órájában táplálék-, és ivóviz- elvonással váltottunk ki a patkányok esetében rendkívül erősnek minősülő stresszt, ill. az anyállatok másik csoportjánál a szoptatás első két napjában alkalmaztuk ugyanezt az eljárást. Az utódok 3 hónapos korában a plazma nociceptin-szintjét RIA-módszerrel , a dopamin és metabolitjai (DOPAC és HVA) valamint a szerotonin és metabolitjai (5-HIAA és 5HTOL) szöveti szintjeit HPLC módszerrel mértük 5 agyi régióban (frontális cortex, hypothalamus, hippocampus, striatum, agytörzs). Az adatokat a hím és a nőstény egyedek vonatkozásában külön értékeltük. A hím utódoknál a frontális cortex, a hypothalamus, a hippocampus és az agytörzs esetében mind a szerotonin mind a dopamin metabolizmusában szignifikáns zavarokat találtunk, míg a nőstényeknél a striatum és a hypothalamus esetében mind a dopamin mind a szerotonin – metabolizmus zavarát tapasztaltuk, míg az agytörzsben csak a dopamin metabolizmus szignifikáns csökkenése volt megfigyelhető. Adataink alapján a perinatális korban elszenvedett erős stressz a központi idegrendszeri dopamin és szerotonin-metabolizmusra hosszútávú hatással van, mely a viselkedési válaszokat feltételezhetően számottevően modulálja. A plazma nociceptin-szint azonban meglepő módon szignifikáns emelkedést mutatott mindkét nem esetében. Eredményeink azt mutatják, hogy a stressz minősége és időtartama valamint a stressz megszünte utáni "regenerációs időtartam" a perifériás nociceptin-szint szempontjából ellentétes hatású mint a kardio-vaszkuláris kórképekre jellemző tartós ischemiás állapot.

A témában született közlemények:

Krepuska M, Sótonyi P, Csobay-Novák C, Szeberin Z, Hartyánszky I, Zima E, Szilágyi N, Horkay F, Merkely B, Acsády G, Tekes K:Plasma nociceptin/orphanin FQ levels are lower in patients with chronic ischemic cardiovascular diseases--A pilot study. Reg. Pept. 169: pp.1-5 (2011)

Tekes K, Szegi P, Laufer R, Hantos M, Csaba G: Effect of perinatal stress on the biogenic amine neurotransmitter level of the adult rat's brain. Int.J.Develop. Neurosci. 2: pp.171-175 (2011)

Csobay-Novák Cs, Sótonyi P, Krepuska M, Zima E, Szilágyi N, Tóth Sz, Szeberin Z, Acsády Gy, Merkely B, Tekes K: Decreased plasma nociceptin/orphaninFQ levels after acute coronary syndromes . Acta Physiol Hung. (közlésre benyújtva)

Teljes támogatás: 2 400.000,- Ft

CONTROLLING AND CONTROLLED ROLE OF NOCICEPTIN AND hsp70 AS STRESS MARKERS IN CARDIO-VASCULAR DISORDERS.

Kornélia Tekes [1], Péter Sótonyi [2], Csaba Sőti [3], András Folyovich [4], Mónika Hantos [5], Péter Szegi [1], Miklós Krepuska [2]

[1] Department of Pharmacodynamics, Semmelweis University,[2] Department of Vascular Surgery,Semmelweis University, [3] Department of Medical Chemistry, Molecular Biology and Pathobiochemistry, Semmelweis University, [4]St. János Hospital, [5]Bethesda Hospital

The heptadecapeptide orphanin FQ/ nociceptin (NC) is the endogenous agonist of the recently identified opioid receptor (newly categorized as NOP receptor). Nociceptin is derived from the preproorphaninFQ precursor and has a wide range of biological activity. In animal studies it was shown to modulate a wide variety of central nervous system functions (pain transmission, anxiety, memory, food intake, locomotor activity etc.) however in the peripheral systems only few data are available on the role of NOP receptor and nociceptin functions. Based on animal studies it was suggested that nociceptin may have a role in cardiovascular disorders, in the adaptation to different types of stressors.

In the first phase of our studies we have developed a protocol for the quantitative evaluation of risk factors and stress-coping capacity in cardio-vascular disorders that was approved by the Regional and Institutional Committee of Science and Research Ethics of Semmelweis University (Permission No:205-1/2007). In our first study 22 patients with chronic stable angina pectoris (SAP) and 12 patients with peripheral artery disease (PAD) were enrolled and 14 healthy subjects without any cardiovascular diseases served as a control group. Blood samples were taken from fasting subjects on the second day after admission to the hospital in order to measure plasma nociceptin levels by RIA method. Clinical laboratory parameters were also determined. Based on echocardiography,coronary/peripheral angiography and ECG measurements 12 patients presented severe angina pectoris symptoms rated by Canadian Cardiovascular Society (CCS III-IV) and 10 patients presented CCS II-III. grade of angina pectoris. Nine PAD patients of atherosclerotic origin had severe intermittent claudication and 3 patients had rest pain and gangrene, but none of them had night pain. Plasma nociceptin levels were significantly lower in all patients with chronic angina pectoris and peripheral artery disease than in healthy controls. Our findings show that the chronic ischemic conditions of atherosclerotic origin are associated with significantly lower plasma N/OFQ levels.

In the second phase of our studies 59 patients were enrolled. In 17 cases, acute coronary syndrome (ACS) was the cause of admission to the hospital. Blood samples were collected for usual laboratory measurements and troponin-T quick test as a specific marker of myocardial necrosis was also used. Laboratory results showed enzyme positivity in 10 cases (study group No. 1: enzyme positive acute coronary syndrome [EPACS], n=10), the other patients were grouped as having enzyme negative acute coronary syndrome (study group No. 2: ENACS, n=7). Coronarography showed significant stenosis in 15 patients, in which cases percutaneous coronary intervention (PCI) was performed immediately. The other 11 patients enrolled in this study were known ischemic heart disease patients (IHD). A group of 31 healthy people served as the control group. For plasma nociceptin measurements blood samples were withdrawn two days after coronarography. We have found significantly lower plasma nociceptin levels in all the three groups of patients compared to healthy volunteers. Strong linear association was detected in the EPACS group between plasma NC levels and white blood cell and platelet count, creatine-kinase and glutamate oxalacetate transaminase activity as well as cholesterol level. Our results show that plasma NC in ACS is very much dependent on whether there is an ischemic injury or not, followed by necrosis.

Our results demonstrated that peripheral nociceptin level is in strong correlation with cardiovascular disorders suggesting that decreased plasma NC level may serve as predictive factor for cardiovascular disorders.

Teljes támogatás: 2 400.000,- Ft

In our next human study age-matched groups of healthy males (n= 16) and members of the national judo-team were studied in an ergospirometric study using the modified Bruce protocol and determining the individual anaerobic-threshold. Blood samples were collected according to the protocol and serum noradrenalin levels were determined by a newly developed and validated HPLC-EC method. We have found very different serum noradrenalin levels in the 0 min samples (mean± SD: 339,65pg/ml ± 353.0, between 51,0 és 1317,46 pg/ml) however during the examination period and collecting the samples in every 30 min, the noradrenalin-level changes showed similar pattern. At the end of the 180 min examination period 5-9 times higher noradrenalin levels could be measured. The baseline serum noradrenalin level of the members of the national judo-team did not differ from that of healthy controls, however at the end of the examination period the increase in serum noradrenalin level was significantly lower. Our results suggest that regular high level physical activity, engage in sports (physical stress) decreases serum noradrenalin response to stress. We have also determined plasma nociceptin levels, however significant changes could not be seen during the examination period. We suggest that the 180 min examination period was not long enough to modify plasma nociceptin level and would give further evidence that chronic ischemia is needed for developing decreased plasma nociceptin level.

To further characterize the types of stresses influencing the peripheral NC level we have been using a rat model. Food and water – deprivation (as a strong stressor) was applied to female rats in the last 48 hours of their pregnancy and to another group of rats in the first two days of breastfeeding. When offspring was 3 month old plasma NC level and levels of biogenic amines such as dopamine and metabolites (DOPAC and HVA) and serotonin and its metabolites (5-HIAA and 5-HTOL) were measured in five brain areas (frontal cortex, hypothalamus, hippocampus, striatum, and brainstem) using HPLC. Data obtained for male and female offspring were evaluated separately. In males both dopamine and serotonin metabolism were significantly disturbed in frontal cortex, hypothalamus, hippocampus and brainstem, while in females both biogenic amine metabolism was disturbed only in striatum and hypothalamus. Significant decrease of dopamine metabolism was observed in the brainstem of females. Our data suggest that perinatal food and water deprivation-stress deeply and permanently influences the serotonergic and dopaminergic system of the brain, and may predict behavioural changes. However plasma NC level was found elevated in perinatally stressed offspring in both sexes. Data presented indicate that besides quality and duration of the stressors the "regeneration time" following the stress are all important factors in modulating peripheral nociceptin level. Data may give further evidence to our observation that cardiovascular disorders with chronic ischemic conditions may result in disturbed perpipheral nociceptin level.

Published results:

Krepuska M, Sótonyi P, Csobay-Novák C, Szeberin Z, Hartyánszky I, Zima E, Szilágyi N, Horkay F, Merkely B, Acsády G, Tekes K:Plasma nociceptin/orphanin FQ levels are lower in patients with chronic ischemic cardiovascular diseases--A pilot study. Reg. Pept. 169: pp.1-5 (2011)

Tekes K, Szegi P, Laufer R, Hantos M, Csaba G: Effect of perinatal stress on the biogenic amine neurotransmitter level of the adult rat's brain. Int.J.Develop. Neurosci. 2: pp.171-175 (2011)

Csobay-Novák Cs, Sótonyi P, Krepuska M, Zima E, Szilágyi N, Tóth Sz, Szeberin Z, Acsády Gy, Merkely B, Tekes K: Decreased plasma nociceptin/orphaninFQ levels after acute coronary syndromes . Acta Physiol Hung. (közlésre benyújtva)

Teljes támogatás:3000.000 Ft

NEUROPEPTIDEK SZEREPE AZ AFFEKTIV ÉS KOGNITIV FUNKCIÓKBAN. TERÁPIÁS LEHETŐSÉGEK.

Telegdy Gyula, Jászberényi Miklós, Tanaka Masaru, Bagosi Zsolt, Adamik Ágnes, Csabafi Krisztina
SZTE Kórélettani Intézet, Szegedi Tudományegyetem.

A vállalt feladat az újonnan felfedezett neuropeptidek hatásának vizsgálata olyan folyamatokban mint a tanulás és memória, szorongás és depresszió.A vizsgálatok kiterjedtek, a megismert biológiai funkció ismeretében, olyan fragmentumok ill.analógok vizsgálatára is, amelyek terápiás lehetőséget is kínálnak.

Az alábbi neuropeptidek vizsgálatát végeztük el.: urocortin és származékai (UCN1, 2 és 3), a neuropeptid AF, a Nobel-dijas Schally-val kooperációban az általuk szintetizált vegyületek közül az LH-RH antagonista Cetrorelix és a GH-RH antagonist MZ-4-71 peptideket. Angol kooperációban vizsgáltuk az isatin és származékainak lázcsillapitó hatását.

Az urocortin 3 anxiolytikus és antidepressziós hatás molekuláris centrumának vizsgálatával megállapitottuk, hogy a legkissebb hatás centrum a C-terminális tripeptid (AQI) de antidepressziós hatással rendelkezik az UCN3 19-27 is.

A C-terminális tripeptid depresszióval kapcsolatos hatásmechanizmus vizsgálatok arra mutatnak, hogy az astressin 2b és a phenoxybenzamin az antidepressziós hatást kivédi, a prazosin és a yohimbin hatástalan.

Az UCN3 anxiolytikus hatást mutat . A fragmentumok közül az UCN 3 18-38, 19-27, 28-38, 34-38, 36-38 még anxiolytikus hatással rendelkezik, azonban az UCN3 34-36 már hstástalan.

A hatásmechanizmusra vonatkozó vizsgálatokban megvizsgáltuk, hogy a CRF és UCN1, UCN2 és UCN3 hogyan befolyásolja a GABA kibocsájtást hypothalamusból elektromos ingerlés hatására.. Kimutattuk, hogy mind a CRF mind az UCN1 fokozza a GABA kibocsájtást. Az UCN2 és UCN3 hatástalan volt. A CRF és UCN1 hatása antalarminnal, amely CRF receptor antagonistája, gátolható volt. Az astressin 2b, amely a CRF2 receptor gátlója, hatástalannak bizonyult.

A Nobel-dijas Schally-val kooperációban megvizsgáltuk az általuk szintetizált LH-RH antagonista (Cetrorelix) hatását egerek és patkányok tanulására, az amyloid 25-35 által okozott tanulási defektusra, az anyag antidepressziós és anxiolytikus hatására. Megállapitottuk, hogy mind egerben mind patkányban javitotta a passiv elháritásos magatartás tanulását, kivédte az amyloid 25-35 tanulást kárositó hatását. Mindkét állatban antidepresszios és anxiolytikus hatást mutatott.

Ugyanebben a kooperációban vizsgáltuk az általuk szintetizált növekedési hormon releasing hormon antagonista (MZ-4-71) hatását. Kimutattuk, hogy az MZ-4-71 javitja a passziv elháritó teszben a kisérleti állat tanulását és memória funkcióját. Az un. plus-maze-ben tanulmányoztuk az MZ-4-71 szorongásra kifejtett hatását. Az MZ-4-71-nek határozott szorongást csökkentő hatása volt. A depresszióra kifejtett hatást az erőltetett uszási tesztben vizsgáltuk. Az MZ-4-71 minden paraméterben; az immobilizációban, az uszásban és a mászásban antidepressziós hatást mutatott. A beta-amyloid 25-35 kárositja tanulási folyamatokat, az MZ-4-71 kivédte a beta-amyloid hatását ha együtt adtuk a beta-amyloiddal vagy ha 30 perccel később adtuk a beta-amyloid kezelés után.

További vizsgálatok arra vonatkoztak, hogy az MZ-4-71 tanulástjavitó hatásában, milyen transmitterek vesznek részt. Ebből a célból az MZ-4-71 beadása elött az állatokat előkezeltük megfelelő receptor blokkolókkal. Amennyiben a hatás valamely receptoron keresztül érvényesült, akkor a receptor blokkolóval a hatást ki lehetett védeni. Az alábbi receptor blokkolókat használtuk a korábban beállitott dózisokban: haloperidol / dopamin receptor blokkoló) phenoxybenzamin (alfa-adrenerg receptor blokkoló), propranolol (beta-adrenerg receptor blokkoló), atropin (cholinerg receptor blokkoló), cyproheptadin és methysergid (serotonerg receptor blokkoló) naloxon (opiat receptor blokkoló).

Megállapitottuk, hogy az MZ-4-71 tanulástjavitó hatásában cholinerg, serotonerg, opiat mechanizmusok vesznek részt, ugyanakkor alfa-, beta-adrenerg vagy dopaminerg mechanizmusok ebben nem játszanak szerepet.

Az MZ-4-71 antidepressziós hatásában az alábbi tranmitterek vesznek rész: alfa-adrenerg, serotonerg és cholinerg. A dopaminerg, beta-adrenerg és GABA-erg mechanizmusok ebben nem vesznek részt.

Újonnan, az idegrendszerben felfedezett neuropeptidnek, a neuropeptid AF (NPAF) hatását vizsgáltuk az idegrendszer különböző funkcióira. Megállapitottuk, hogy az NPAF fokozza a mellékvesekéreg aktivitását, fokozza az állat mozgásaktivitását, csökkenti a testhőmérsékletet és fokozza dopamin kibocsájtást in vitro körülmények között a striatum és amygdala szeletekből. További, a szorongás és depresszióra vonatkozó vizsgálatok folyamatban vannak.

Új hatásos lázcsillapitót találtunk az isatin és analogjaiban, az angolokkal való kooperációban (Prof. Glover London) . Az új lázcsillapitó hatásmechanizmusa eltér az eddigiekben ismert lázcsillapitótól, mert a prostaglandin felszabadulás hatását is képes kivédeni. (szabadalmaztatva lett).

Közlemények jegyzéke:

Telegdy G., Tanaka, M., Schally A.V. Effects of the LHRH antagonist Cetrorelix on the brain function in mice..NEUROPEPTIDES 43: pp.229-234. (2009) IF: 2,492

Jászberényi M, Bagosi Zs.,Turzó B., Földesi I., Szabó Gy., Telegdy G.: Endocrine, behavioral and autonomic effects of neuropeptide AF. HORMONES AND BEHAVIOR.56: pp.24-34 (2009) IF:3,401

Bagosi Zs., Jászberényi M., Telegdy G.:The effects of endomorphins on striatal H3 GABA release induced by electrical stimulation –an in vitro superfusion study in rats. NEUROCHEMICAL RESEARCH 34:pp. 905-908 (2009) IF:2,260.

Telegdy G., Adamik, A. Tanaka, M., Schally A.V. Effects of the LHRH antagonist Cetrorelix on affective and cognitive functions in rats. REGULATORY PEPTIDES 159: pp. 142-147 (2010) IF: 2,276

Tanaka, M., Kádár,K, Toth, G, Telegdy,G. Antidepressant-like effects of urocortin 3 fragments BRAIN RES. BULLETIN, 84: pp. 414-418 (2011) IF:2,193.

Csabafi K., Jászberényi M., Bagosi Zs., Toth, G., Wollemann M., Telegdy Gy.,The action of a synthetic derivative of Met5-enkephalin-Arg-6-Phe7 on behavioral and endocrine responses PEPTIDES 32: pp.1656-1660 (2011) IF.2.705.

Telegdy G., Adamik, A, Glover V.: Antipyretic action of isatin and its analogues in mice and rats. NEUROSCIENCE AND MEDICINE 2: pp. 1-5 (2011)

Telegdy,G., Kádár,K., Tóth, G.: Anxiolytic action of urocortin 3 fragments in mice. BEHAVIORAL BRAIN RES. 222: pp. 295-298 (2011) IF:3,22

Telegdy,G., Tanaka, M.,Schally A.: The effects of the growth hormone-releasing hormone (GHRH) antagonist on brain function in mice BEHAVIORAL BRAIN RES. 224: pp.155-158 (2011) IF:3.22

Tanaka, M, Schally A.V. and Telegdy G.: Neurotransmission of the antidepressant-like effects of the growth hormone-releasing hormone antagonist MZ-4-71. BEHAVIORAL BRAIN RES ., doi: 10.1061/ j.bbr.2011.12.022. (2011) IF:3,22

Bagosi Zs., Csabafi K., Jászberényi M., Telegdy Gy.: The effects of corticotrophin-releasing factor and urocortin 1 on hypothalamic and limbic gamma-amino butyric acid release - the impacts on hypothalamic pituitary-adrenal axis. NEUROCHEMISTRY INTERNATIONAL Accepted for publication. IF: 3,6

Budget: 3000,000 HUF

THE ROLE OF NEUROPEPTIDES IN THE AFFECTIVE AND COGNITIVE FUNCTIONS. THERAPEUTIC CONSIDERATIONS.

Gyula Telegdy, Miklós Jászberényi, Masaru Tanaka, Zsolt Bagosi, Ágnes Adamik, Csabafi Ágnes
SZTE Dept. Pathophysiology University of Szeged.

The aim of the project was to study the newly discovered neuropeptides in processes such as learning and memory functions, anxiety and depression. The study was extended to fragments and analogues of some neuropeptides, which could be considered as potential therapeutical agents.

The following neuropeptides have been studied: urocortin and related compounds (UCN 1,2 and 3) neuropeptide AF, in ooperation with the Nobel Lauraete Prof. AV Schally, with the compounds synthetized by their laboratories such as the LH-RH antagonist Cetrorelix and GH-RH antagonist MZ-4-71.

The biologically active anxiolytic and antidepressant center of the UCN 3 has been established . This was the C-terminal tripeptide (AQI). However for antidepressant action the UCN 3 19-27 was also active.

The antideprassant action of the C-terminal tripeptide could be abolished by astressin 2b and phenoxybenzamine . The prazosin and yohimbin were ineffective.

UCN 3 elicits anxiolytic action also. The following fragments were effective: UCN 3 18-38, 19-27. 28-38, 34-38. 36-38. However the fragment UCN 3 34-36 was ineffective.

Regarding the mechanism of actions CRF , UCN 1, UCN 2 and UCN 3 was studied on GABA release following electical stimulation from the hypothalamic tissue. Both CRF and UCN 1 stimulated GABA release, which could be blocked by antalarmin**.** Astressin 2 b was ineffective. UCN 2 and UCN 3 were ineffective in stimulating GABA release.

In cooperation with the Nobel Lauraete AV. Schally, we tested their LH-.RH antagonist Cetrorelix, in rats and mice on learning of passive avoidance behavior and correction of learning deficit caused by amyloid 25-35, on anxiety and depression. Cetrorelix facilitated the learning,corrected the learning deficit caused by amyloid and elicited anxiolytic and antidepressant activity.

In similar cooperation MZ-4-71 a growth hormone releasing hormone antagonist was tested. MZ-471 treatment improved passive avoidance learning, corrected the amyloid 25-35 caused learning deficit and showed anxiolytic and antidepressant activity.

The transmitters involved in these actions were also tested. In order to demonstrate the involvement of different transmitters, the animals were treated with different receptor blockers prior to MZ-4-71 treatment. If a given receptor blocker suspended the MZ-4-71 action, illustrated the involvement of the specific transmitters. The following receptor blockes were used: haloperidol, dopamine receptor blocker, atropine, cholienergic , phenoxybenzamine . alfa-adrenerg receptor blocker, cyproheptadine and methysergide, serotonergic receptor blocker, naloxone opiate receptor blocker. We demonstrated that in the facilitation of learning cholinergic, serotonergic, opiate mechanisms are involved. However alfa- beta-adrenerg or dopaminergic mediations are not involved in this action.

In the antidepressant action of MZ-4-71 the following transmitters are involved: alfa-adrenerg, serotonerg and cholinerg. The dopaminerg, beta-adrenerg and GABA-erg mechanisms are not involved.

The newly discovered neuropeptide in the central nervous system, neuropeptide AF (NPAF), has been tested on different functions of the brain. We demonstrated that NPAF simulates the activity of the adrenal cortex, stimulates the locomotion of the animals, decreased the body temperature and increased the dopamine release in vitro from the striatum and amygdala.
The experiments regarding the action of NPAF in anxiety and depression are in progress .

New antipyretic substances have been described; isatin and its analogues, in cooperation with British collegue (Prof. V. Glover). Some of the analogues are very potent antipyretics, even more the mechanism of actions are different from the conventional antipyretics; namely they elicit antipyresis on prostaglandine caused fewer and not on blocking PG synthesis..

References

Telegdy G., Tanaka, M., Schally A.V. Effects of the LHRH antagonist Cetrorelix on the brain function in mice..NEUROPEPTIDES 43: pp.229-234. (2009) IF: 2,492

Jászberényi M, Bagosi Zs.,Turzó B., Földesi I., Szabó Gy., Telegdy G.: Endocrine, behavioral and autonomic effects of neuropeptide AF. HORMONES AND BEHAVIOR.56: pp.24-34 (2009) IF:3,401

Bagosi Zs., Jászberényi M., Telegdy G.:The effects of endomorphins on striatal H3 GABA release induced by electrical stimulation – an in vitro superfusion study in rats. NEUROCHEMICAL RESEARCH 34:pp. 905-908 (2009) IF:2,260.

Telegdy G., Adamik, A. Tanaka, M., Schally A.V. Effects of the LHRH antagonist Cetrorelix on affective and cognitive functions in rats. REGULATORY PEPTIDES 159: pp. 142-147 (2010) IF: 2,276

Rákosi KR. Tanaka, M., Telegdy,G., Tóth, G. Antidepressive action of short human urocortin III fragments and analogues. J. PEPTIDE SCIENCE 16:pp 125, Suppl. 1 (2010)

Tanaka, M., Kádár,K, Tóth, G, Telegdy,G. Antidepressant-like effects of urocortin 3 fragments BRAIN RES. BULLETIN, 84: pp. 414-418 (2011) IF:2,193.

Csabafi K., Jászberényi M., Bagosi Zs., Tóth, G., Wollemann M., Telegdy Gy.,The action of a synthetic derivative of Met5-enkephalin-Arg-6-Phe7 on behavioral and endocrine responses PEPTIDES 32: pp.,1656-1660 (2011) IF.2.705.

Telegdy G., Adamik, A, Glover V.: Antipyretic action of isatin and its analogues in mice and rats. NEUROSCIENCE AND MEDICINE 2: pp. 1-5 (2011)

Telegdy,G., Kádár,K., Tóth, G.: Anxiolytic action of urocortin 3 fragments in mice. BEHAVIORAL BRAIN RES. 222: pp. 295-298 (2011) IF:3,22

Telegdy,G., Tanaka, M.,Schally A.: The effects of the growth hormone-releasing hormone (GHRH) antagonist on brain function in mice BEHAVIORAL BRAIN RES. 224: pp.155-158 (2011) IF:3.22

Tanaka, M, Schally A.V. and Telegdy G.: Neurotransmission of the antidepressant-like effects of the growth hormone-releasing hormone antagonist MZ-4-71. BEHAVIORAL BRAIN RES ., doi: 10.1061/ j.bbr.2011.12.022. (2011) IF:3,22

Bagosi Zs., Csabafi K., Jászberényi M., Telegdy Gy.: The effects of corticotrophin-releasing factor and urocortin 1 on hypothalamic and limbic gamma-amino butyric acid release - the impacts on hypothalamic pituitary-adrenal axis. NEUROCHEMISTRY INTERNATIONAL accepted for publication. IF: 3.6

NAGYÍZÜLETI ENDOPROTÉZISEK POZÍCIONÁLÁSA ÉS A KLINIKAI EREDMÉNYEK ÖSSZEFÜGGÉSEI. IMPLANTÁTUM POZÍCIÓ IN VIVO MEGHATÁROZÁSA MODERN 3D KÉPALKOTÁSSAL

Dr.Than Péter, Dr.Somoskeöy Szabolcs
PTE Mozgásszervi Sebészeti Intézet, Ortopédiai Klinikai Tanszék

Napjaink nagyízületi protetikai irányelvei közül az egyik legfontosabb az implantátumok pontos pozícionálására való törekvés. Irodalmi adatok igazolják, hogy a normálistól nagymértékben eltérő elhelyezés esetén korai aszeptikus lazulással és a komponensek mechanikai elhasználódásával kell számolnunk. A pozíció posztoperatív megállapításának lehetőségei közül az egyik forradalmian új diagnosztikus eszköz az EOS képalkotás lehet, mely alkalmas a humán csontváz három dimenziós modellezésére.
Jelen kutatási projekt célja egyrészt a pozícionálás és a hosszú távú klinikai eredmények összefüggéseinek megállapítása, másrészt az EOS alsó végtagi alkalmazási lehetőségeinek igazolása volt. Utóbbi téma a nemzetközi irodalomban is kifejezetten újszerűnek számít.
A kutatási periódus kezdetén nagy számban végeztünk alsó végtagokon EOS röntgen felvételeket egészséges kontroll csoportban és csípő- illetve térdízületi arthrosissal bíró betegeknél. Megállapítottuk a proximalis femur, valamint a térdízület geometriai paramétereit mindkét csoportban, eredményeinket a nemzetközi irodalomban közreadtuk. Ennek kiegészítéseként jelenleg zárjuk le azokat a vizsgálatainkat, melyekkel gyermekkorban, a növekedés függvényében vizsgáltuk a proximalis femur geometriai jellemzőit és a térdízületi tengelyt. Eredményeinket nemzetközi publikálásra készítjük elő. Egyértelműen kimutatható volt, hogy az EOS diagnosztika mind 2D, mind 3D üzemmódban alkalmas az alsó végtag különböző geometriai értékeinek igen pontos és jól reprodukálható vizsgálatára. Azt is igazoltuk, hogy a 3D képalkotás további egzakt információkat ad olyan horizontális síkú paraméterek tekintetében, melyek a hagyományos röntgen felvételekkel nem detektálhatóak.
Retrospektív klinikai tanulmányokat folytattunk az intézetben évtizedekkel ezelőtt beültetett térd implantátumok helyzete és az aszeptikus lazulás összefüggéseinek vizsgálatára, radiológiai módszerekkel értékelve a protézisek pozícióját és a végtagtengelyt. Eredményeinket két magyar nyelvű közleményben foglaltuk össze. Megállapítottuk, hogy meghatározott hibahatáron belül rosszul beültetett egyes komponensek hosszútávon sem vezetnek közvetlenül aszeptikus lazuláshoz, azonban a malpozíció kombinációban egyértelmű korai lazulást eredményez, különösen emelkedett BMI érték mellett.
Több tanulmányunk jelenleg is folyamatban van, melyek közül a legfontosabb az EOS használata különböző műtéti beavatkozásokat követően, elsősorban a végtag rotáció és térdízületi tengelyek vonatkozásában. A végtag rotációs viszonyait femuron és tibián végzett velőűr szegezések után határoztuk meg. Első eredményeink alapján az EOS képalkotás alkalmas arra, hogy a rotációs eltéréseket pontosan detektálja. Másik ilyen típusú vizsgálatunk a térdprotézisek beültetése utáni végtag tengely megállapítása EOS-al.
Munkánkat összefoglalva elmondhatjuk, hogy verifikálni tudtuk az EOS diagnosztika alkalmazhatóságát az alsó végtag tengelyének és egyéb geometriai értékeinek meghatározásában felnőtt- és gyermekkorban. Adataink további vizsgálatok során referenciaként szolgálhatnak és megnyithatják az utat az EOS képalkotás számára más kutatási területeken is. További fontos eredménynek tartjuk, hogy retrospektív klinikai vizsgálattal megállapítottuk és a hazai irodalomban elsőként közreadtuk a térdprotézisek aszeptikus lazulása és a hibás pozicionálás közötti összefüggéseket.

3.000.000 HUF

Than P., Létai B., Somoskeöy Sz., Horváth G.: A totál térdprotézis pozícionálása és az aszeptikus lazulás hosszú távú összefüggései. Magyar Traumatológia 54:103-111 (2011)

Than P., Szuper K., Somoskeöy Sz., Warta V., Illés T.: Geometrical values of the normal and arthritic hip and knee detected with the EOS imaging system. Int.Orthop. Epub (közlésre elfogadva) [IF.:1,825-(09)]

Than P., Szuper K., Somoskeöy Sz.: Hibás pozícióban beültetett totál térdprotézis aszeptikus lazulása és revíziója. Esetismertetés. Magyar Traumatológia (közlésre elfogadva)

3.000.000 HUF

CLINICAL RESULTS OF MAJOR JOINT ARTHROPLASTY DEPENDING ON POSITIONING OF THE PROSTHESIS. DETECTION OF THE IN VIVO IMPLANT POSITION WITH MODERN 3D DIAGNOSTICS.

Péter Than MD, Szabolcs Somoskeöy MD
Department of Orthopedics, Institute of Musculoskeletal Surgery, University of Pécs;

One of the most important tendencies of today's joint replacement practice is the aim to implant the prosthesis components in the most accurate way. It has been verified by data of the international literature that significantly inappropriate positioning can be followed by early aseptic loosening and mechanical wear of the prosthesis. Among the different possibilities of postoperative detection of implant position one revolutionary new diagnostic method is the EOS radiological system, which allows 3D modeling of the human skeleton.
The aim of present scientific project was on one hand to describe the connection between implant alignment and long term clinical results and on the other, to apply the EOS system for investigation of the lower limb. The latter topic is rarely discussed even in international scientific literature.
In the beginning of the study period we have performed EOS radiographs of the lower extremity in high numbers in healthy persons as control, and in patients with knee-, and hip osteoarthritis. We established in both groups different geometrical values of the proximal femur and the knee, and published our data in international literature. Additionally we currently finish those investigations which aimed to examine the geometrical parameters of the proximal femur and the axis of the knee in childhood during growth. These data are under preparation for international publication. We could clearly demonstrate that both the 2D and 3D EOS diagnostic options are suitable for accurate and well reproducible description of different geometrical values of the lower extremity. We were also able to verify that the 3D tool provides further precise information of those horizontal plane parameters which cannot be detected with conventional radiographs.
We performed retrospective clinical studies in order to investigate the correlation between the position of knee prostheses implanted decades ago at our institute and their eventual aseptic loosening. Position and lower limb alignment were detected with radiological methods; results have been published in two Hungarian papers. In our conclusion slight malpositoning of a single component did not result in loosening not even on a long term basis, but combined implantation failures were followed by early loosening especially in case of elevated BMI.
At present we are still working on some related studies, out of which the most important is the application of the EOS diagnostics after different surgeries in order to detect rotational conditions of the extremity and the alignment of the knee joint. The former was performed after intramedullary nailing of the femur and the tibia. Our early results show that the EOS radiographs are well suitable for accurate description of rotational conditions of bones after these surgeries. A further study of this type is the investigation of lower limb alignment after knee replacement with EOS.
As a summary of our work we can state that we were able to prove that EOS is well applicable for the description of alignment and different geometrical values of the lower limb both in adults and children. These data can be seen as reference for further studies and can provide the background for the use of the method in other scientific fields. A further important result of our work is that by retrospective clinical investigations we could establish and for the first time in national literature publish the correlation between aseptic loosening of knee replacement and malpositioning of the implant.

Teljes támogatás: 4.200.000,- Ft

AZ INTERFERON REZISZTENCIA ÉS ÁTTÉTKÉPZÉS GENOMIKÁJA A BŐR MELANÓMÁJÁBAN

Tímár József, Barbai Tamás, Imrédy Eleonóra, Rásó Erzsébet
Semmelweis Egyetem, 2.sz. Pathologiai Intézet

A nemzetközi publikus adatbázisok felhasználásával elvégeztük a humán melanomára vonatkozó genomikai vizsgálatok un. meta-analízisét és meghatároztuk az un. konszenzus prognosztikus mintázatot. Az elemzés során egy 350 génből álló metasztázis-mintázatot találtunk, melynek centrumát egy 17 génes mintázat alkotta amely minimálisan 3 vizsgálatban is megjelent. A konszenzus mintázat validitását mi sem jelzi jobban, mint számos a melanoma progresszióval korábban már igazoltan kapcsolatban lévő gén jelen van a miáltalunk azonosított mintázatban: az apoptózis-rezisztenciáért felelős Bcl2A1, az áttétképzésért felelős WNT5a és OPN valamint a proliferációt szabályozó EGFR. Miután ez utóbbi gén és fehérje terméke számos új sikeres célzott terápiával befolyásolható, eddigi adataink és több kisérletes vizsgálatunk alapján új validált molekuláris terápiás célponttá teszi az EGFR-t bőr melanomában.
A melanómás betegek terápiája drámai változás előtt áll a célzott terápiák korszakának beköszöntével, azonban ezt csak a B-RAF mutáns vagy a HLA-A0201+ daganatot hordozó betegek fogják élvezni, a többieknek marad a konvencionális citokin terápia. Ennek személyre szabott alkalmazását segíti elő, hogy korábban microarray eljárásokkal megfelelő IFN-érzékeny/rezisztens klónokat használva egy 32 génből álló rezisztencia mintázatot állapítottunk meg, melynek genetikai és biológiai validálását végezzük. A 32 gén 15%-a rendelkezik IRE promoter régióval (ISG12A, IRF2, PDE9A, WNT7A). A gének 78%-a fokozottan expresszálódott az IFN-rezisztens klónokban. Az egyik ilyen gén a purinerg Ca-csatornák családjába tartozik, azonban inhibitorának nem volt sejtnövekedést befolyásoló hatása. A mintázatban észleltük a CB1 cannabinoid receptor megjelenését is amit PCR vizsgálatokkal és szekvenálással validáltunk. Megállapítottuk, hogy a CB1 receptor nevusban is és melanomában is kimutatható mRNS és fehérje szinten. Kimutattuk a receptor funkcióját, mert in vitro és in vivo CB1 agonistáknak antiproliferatív hatásuk van. Genomikai elemzéseink során felfigyeltünk a glukokortikoid receptor expressziójára is, melyet validáltunk és igazoltuk, hogy szteroidokkal apoptosis indukálható humán melanómában. Klinikailag az IFN-rezisztencia a daganatprogresszióval párhuzamosan jelenik meg, ezért vizsgáltuk, hogy az IFN-rezisztencia mintázat milyen kapcsolatban áll az áttétképzéssel: erre releváns humán melanoma spontán tüdőáttét modellt használtunk. A 32-génes mintázat 13 génje a melanóma-progressziótól függetlennek bizonyult, azonban egy a 32-gént alkotó 6-génes mintázat egyben un. metasztatikus mintázatot képez: közülük 2 IFN-szabályozott gén. Egy ettől eltérő 7-génes mintázat alkotta az un. metasztázis-iniciáló génmintázatot (a primer tumorban) és egy 4-génes csoport a metasztázis-fenntartó génmintázatot (az áttétekben): mindkét csoportban 2-2 génről kiderült hogy az IFN direkt szabályozása alatt áll. Mindezen eredmények arra utalnak, hogy az IFN-rezisztencia kialakulása genetikailag az áttétképző képesség kialakulásához is kapcsolódik. Eredményeink alapján nemzetközi szabadalmi bejelentés készül. Végül nagyobb hazai klinikai beteganyagon meghatároztuk a B-RAF mutáció gyakoriságát ami két eltérő kohorszon is 70%-nak adódott, míg az N-RAS mutáció gyakorisága 20%.

Közlemény

Tímár J, Győrffy B, Rásó E: Gene signature of the metastatic potential of cutaneous melanoma. Clin Exp Metastasis 27:371-387,2010, IF 3.91
Dobos J, Kenessey I, Tímár J, Ladányi A. Glucocorticoid receptor expression and antiproliferative effect of dexametasone on human melanoma cells. Pathol Oncol Res 17: 729-734, 2011, IF 1.48
Kenessey I, Bánki B, Márk Á, Varga N, Ladányi A, Rásó E, Tímár J. Revisiting CNR1 Receptor as Drug Target in Human Melanoma. Pathol Oncol Res 18: 2012, in press.IF 1.48
Tímár J, Barbai T, Győrffy B, Rásó E. Understanding melanoma progression by gene expression signatures. Pfeffer U. ed. Cancer Genomics - Molecular classification, prognosis and response prediction, Springer Publ. Co, Dordrecht, 2012 (in press)

Budget: 4,200,000.- HUF

GENOMICS OF INTERFERON RESISTANCE AND METASTATIC POTENCIAL IN HUMAN SKIN MELANOMA

József Tímár, Tamás Barbai, Eleonóra Imrédy, Erzsébet Rásó
2nd Department of Pathology, Semmelweis University

Using international public databases, a so-called meta-analysis of genomic studies on human melanoma was performed and a so-called consensus prognostic pattern was determined. During the analysis a metastasis-pattern composed of 350 genes was found, the centre of which was formed by a 17-gene pattern detectable in a minimum of 3 studies. Nothing indicates better the validity of the consensus pattern than the fact that a number of genes already proved as having role in melanoma progression were present in our identified pattern: Bc12A1 responsible for apoptosis resistance, WNT5a and OPN responsible for metastasis, as well as EGFR which regulates proliferation. Since the latter gene and its protein product can be influenced by several new and successful targeted therapies, based on our data and experimental studies, EGFR may become the target of new validated molecular therapy for skin melanoma.

Dramatic changes will occur in the therapy of melanoma patients with the advent of targeted therapies from which, however, only BRAF mutant or HLA-A0201+ carriers will benefit. All other patients will still be receiving conventional cytokine therapy. Personalized application will be facilitated by a resistance pattern made up of 32 genes, which has been determined by us using previously constructed IFN-sensitive/resistant clones. The genetic and biological validification of this resistance pattern is in progress. Fifteen percent of the 32 genes have IRE promoter region (ISG12A, IRF2, PDE9A, WNT7A). In total, 78% of the genes showed enhanced expression in the IFN-resistant clones. One of these genes belonged to the purinergic calcium channel family, however its inhibitor had no influencing effect on cell growth. The CB1 cannabinoid receptor was also detectable in the pattern, which we validified by PCR analysis and sequencing. The CB1 receptor was demonstrable in both nevus and melanoma at mRNA and protein levels. Its receptor function was revealed, since in vitro and in vivo CB1 agonists showed antiproliferative effect. During the course of our genomic studies, presence of the glucocorticoid receptor was also noticeable, which we validated and further, we proved that steroids can induce apoptosis in human melanoma. Clinically, IFN-resistance appears parallel with tumor progression, we therefore examined the connection between IFN-resistance pattern and metastasis, using a relevant human melanoma spontaneous lung metastasis modell. Thirteen genes of the 32-gene pattern proved to be independent of melanoma progression, however, a 6-gene pattern within the 32-gene pattern formed a so-called metastatic pattern: among them 2 IFN-regulated genes. A differing 7-gene pattern constructed the so-called metastasis-initiating gen pattern (in the primary tumor), whereas a 4-gene group assembled the metastasis-maintaining gene pattern (in the metastases): it was revealed that 2 genes each of both groups are under the direct influence of IFN. Our results refer to the fact that genetically the development of IFN-resistance is in relation with the development of metastasis ability as well. Based on our results an international patent application is in preparation. Finally, we determined the rate of occurrence of B-RAF mutation in a larger national population of clinical patient with the findings of 70% in two various cohorts and a 20% frequency in regard to N-RAS mutation.

List of publications:

Tímár J, Győrffy B, Rásó E: Gene signature of the metastatic potential of cutaneous melanoma. Clin Exp Metastasis 27: 371-387, 2010, IF 3.91

Dobos J, Kenessey I, Tímár J, Ladányi A: Glucocorticoid receptor expression and antiproliferative effect of dexametasone on human melanoma cells. Pathol Oncol Res 17: 729-734, 2011, IF 1.48

Kenessey I, Bánki B, Márk Á, Varga N, Ladányi A, Rásó E, Tímár J: Revisiting CNR1 receptor as drug target in human melanoma. Pathol Oncol Res 18: 2012, in press, IF 1.48

Tímár J, Barbai T, Győrffy B, Rásó E: Understanding melanoma progression by gene expression signatures. In: Pfeffer U. ed., Cancer Genomics – Molecular classification, prognosis and response prediction, Springer Publ. Co., Dordrecht, The Netherlands, 2012, in press

Teljes támogatás: 3.000.000,- Ft

A KAPSZAICIN RECEPTOR (TRPV1) SZEREPE AZ ELHÍZÁSBAN

Tóth Attila[1], Papp Zoltán[1], Pórszász Róbert[2], Boczán Judit[3], Czikora Ágnes[1], Rutkai Ibolya[1]
[1]Debreceni Egyetem, OEC, Kardiológiai Intézet, Klinikai Fiziológiai Tanszék, [2]Debreceni Egyetem, Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézet; [3]Debreceni Egyetem, Neurológiai Klinika

A kapszaicin receptorról (vanilloid receptor 1, TRPV1) feltételezték, hogy fontos szerepet játszhat az elhízásban, amennyiben TRPV1 knockout egerekben a testsúly gyarapodás csökkenését találták zsírban gazdag diéta hatására. Ezen kísérleti adatokból azt a következtetést vonták le, hogy a fűszeres étrend hozzásegíthet a testsúly megtartásához, aminek népegészségügyi jelentősége lehet.

Saját kísérleteinkben két megközelítést alkalmaztunk: egyrészt patkányokat deszenzitizáltunk neonatális korban A Jancsó-Szolcsányi professzorok által kidolgozott módszer alapján, másrészt TRPV1 knockout egereket is felhasználtunk, annak eldöntésére, hogy a TRPV1 funkció hiánya valóban befolyásolja-e a zsírdús diéta (energiatrtalom 60%-a zsírban) hatására az állatok testsúlygyarapodását. Eredményeink nem támasztották alá az eredeti megfigyelést. Nem kaptunk különbséget a testsúlygyarapodásban a TRPV1 funkcionális státusának függvényében. Sajnos a negatív eredmények publikálása többnyire nehézségekbe ütközik, így ezen kutatási adatainkat nem sikerült megjelentetnünk.

További kísérleteinkben a fentebb említett állatmodellekben a TRPV1 vaszkuláris biológiai jelentőségét tanulmányoztuk. Ezen munkánk eredményeként született kísérletes adataink egy része már publikációra került (Czikora és munkatársai), illetve közlésre előkészített kézirat formájában áll rendelkezésre. A legfontosabb eredményeink ebben a tekintetben (1) a TRPV1 expresszálódik vaszkuláris simaizomsejtekben, ahol aktivációja vazokonstrikciót vált ki és hozzájárulhat a lokális vérellátás szabályozásához; (2) az arteriális TRPV1 farmakológiai tulajdonságai eltérhetnek a szenzoros neuronokban expresszálódó receptorokétól; (3) a neonatális deszenzitizációs protokoll hatására a szenzoros neuronok sejttestjein található TRPV1 pozitivitást mutató neuronok száma jelentősen csökken, ám ugyanez nem érinti a vaszkuláris TRPV1 expressziót (az fenntartott maradt). Ezen adataink arra utalnak, hogy a TRPV1 jelentős arteriális hatással rendelkezhet, amely sejttípusok feltehetőleg a gyorsabb deszenzitizáció miatt kevésbé érzékenyek a tartós kapszaicin kezelés hatásaira. Ennek jelentősége lehet a kapszaicin tartalmú krémekkel történő kezelések (például neuropátia) során, ahol tartós vaszkuláris mellékhatásra nem kell számítani.

További lipid anyagcserében érintett egérmodelleket vizsgálva került látóterünkbe a PARP-2 szerepe. A PARP-2 génkiütött állatmodellben eddig sikerült vizsgálnunk a mindenféle kezelés nélküli vaszkuláris paramétereket (melyek nem különböztek a vad típusú csoporttól). Ugyanakkor a PARP-2 hiányos állatok védettnek bizonyultak az olyan oxidatív hatásokkal szemben, mint a doxorubicin kezelés (Szántó Magdolna és munkatársai).

Végül, a pályázat segítségével sikerül egy olyan összefoglaló jellengű kéziratot is publikálnunk, amelyben az anandamid lehetséges TRPV1 moduláló szerepét elemztük (Tóth Attila és munkatársai).

Közlemények

Toth A; Blumberg PM; Boczan J. Anandamide and the vanilloid receptor (TRPV1)VITAMINS AND HORMONES-ADVANCES IN RESEARCH AND APPLICATIONS (ISSN: 0083-6729) 81: pp. 389-419. (2009) IF: 2.439

Szántó M*, Rutkai I*, Hegedűs Cs, Czikora Á, Rózsahegyi M, Kiss B, Virág L, Gergely P, Tóth A, Bai P Poly(ADP-ribose) polymerase-2 depletion reduces doxorubicin-induced damage through SIRT1 induction. CARDIOVASCULAR RESEARCH 92:(3) pp. 430-438. (2011) IF: 6.051*

Czikora A; Lizanecz E; Bako P; Rutkai I; Ruzsnavszky F; Magyar J; Porszasz R; Kark T; Facsko A; Papp Z; Edes I; Toth A Structure-activity relationships of vanilloid receptor agonists for arteriolar TRPV1. BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY (ISSN: 0007-1188), in press PMID: 21883148. (2012) IF: [4.925*

Budget: 3,000,000.- HUF

THE ROLE OF CAPSAICIN RECEPTOR (TRPV1) IN OBESITY

Attila Tóth[1], Zoltán Papp[1], Róbert Pórszász[2], Judit Boczán[3], Ágnes Czikora[1], Ibolya Rutkai[1]
[1]University of Debrecen, Institute of Cardiology, Division of Clinical Physiology, [2]University of Debrecen, Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, [3]University of Debrecen, Department of Neurology

It has been proposed that the capsaicin receptor (vanilloid receptor 1, TRPV1) is involved in obesity, based on data suggesting a reduced growth rate in TRPV1 knock out mice fed with a high fat diet. It has been concluded, that spicy food may help to maintain body weight, which may have an important impact on the society in terms of health care and life style.

We have made an effort to validate this proposal. We have used two experimental conditions to silence TRPV1: rats were desensitized neonatally, according to the protocol developed by Jancsó and Szolcsányi; and TRPV1 knockout mice were also used. These experimental animals were fed with a diet containing 60% of the energy in the form of fat. We were unable to confirm the proposed protective role of TRPV1 in high fat diat induced obesity in the rat or mice. We have got no difference in the rate of weight gain in control and TRPV1 negative groups. Unfortunately, it is not easy to publish negative data, therefore our data related to this project are unpublished.

Our further experiments concentrated on the role of the TRPV1 in the vascular tissues of these animal models. Some of our data related to this project has alrady been published. Our most important findings are (1) the TRPV1 is expressed in vascular smooth muscle cells, and its activation result in vasoconstriction. TRPV1 thetefore may contribute to the regulation of tissue perfusion (Czikora et al); (2) The pharmacological properties of the arteriolar TRPV1 may differ from that of located in the sensory neurons (Czikora et al); (3) Neonatal capsaicin desensitization results in the diasappearance of TRPV1 positive sensory neurons, but it does not affect vascular TRPV1 expression and capsaicin mediated functions (unpublished). These data suggest that TRPV1 has a role in vascular biology, but this vascular TRPV1 may be less sensitive to the application of capsaicin. Local treatments with capsaicin containing substances may be effective to desensitize sensory TRPV1 (for example in the case of neuropathic pain), while arteriolar TRPV1 may be unaffected in the long term (data has not been published yet).

As we have searched for additional animal models of obesity we have obtained access to PARP-2 knockout mice. So far we have studied the role of PARP-2 in the vascular biology (where we have identified no difference from the control). However, PARP-2 knockout mice were found to be resistant to oxidative stress upon doxorubicin treatment (Szántó et al.).

Finally, the anandamide effects of TRPV1 was reviewed in an other publication with the financial aid of this ETT grant (Tóth et al.).

Publications:

Toth A; Blumberg PM; Boczan J. Anandamide and the vanilloid receptor (TRPV1)VITAMINS AND HORMONES-ADVANCES IN RESEARCH AND APPLICATIONS (ISSN: 0083-6729) 81: pp. 389-419. (2009) IF: 2.439

Szántó M*, Rutkai I*, Hegedűs Cs, Czikora Á, Rózsahegyi M, Kiss B, Virág L, Gergely P, Tóth A, Bai P Poly(ADP-ribose) polymerase-2 depletion reduces doxorubicin-induced damage through SIRT1 induction. CARDIOVASCULAR RESEARCH 92:(3) pp. 430-438. (2011) IF: 6.051*

Czikora A; Lizanecz E; Bako P; Rutkai I; Ruzsnavszky F; Magyar J; Porszasz R; Kark T; Facsko A; Papp Z; Edes I; Toth A Structure-activity relationships of vanilloid receptor agonists for arteriolar TRPV1. BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY (ISSN: 0007-1188), in press PMID: 21883148. (2012) IF: [4.925*

2 cm

Teljes támogatás: 3.000.000,- Ft

A PROLAKTIN-RELEASING PEPTID ÉS A NESFATIN HATÁSAINAK FUNKCIONÁLIS VIZSGÁLATA

Tóth Zsuzsanna E.[1], Bodnár Ibolya[2], Zelena Dóra[3]
[1]Semmelweis Egyetem, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet, [2]Semmelweis Egyetem, Humánmorfológiai és Fejlődésbiológiai Intézet, [3]MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet

Az energiaháztartás egyensúlyának fenntartása összetett folyamat, melyet alapvetően a felvett és a leadott energia mennyisége határoz meg. Az egyensúlyt számos tényező befolyásolja, többek közt a táplálkozási szokások, a testhőmérséklet, az alvás ébrenlét ciklus, a stressz, de a születés előtti táplálás is. Munkánk egy részében két, a táplálékfelvételt csökkentő agyi peptid hatásait vizsgáltuk patkányokon; a prolaktin-releasing peptidét (PrRP) és a nesfatin1/NUCB2-ét (nesfatin). Eredményeink alapján a két peptid párhuzamosan, több ponton is ellenőrizni tudja az energiaháztartást. Kutatócsoportunk elsőként írta le, hogy a nesfatin, a PrRP-hez hasonlóan, serkenti a hipothalamo-hipofízis-mellékvese tengely működését, ezáltal a stresszválaszt. Kimutattuk, hogy a nesfatin a táplálékfelvételre az ismertnél jóval hosszabb távú (48h) hatást fejt ki, emeli a testhőmérsékletet, és hatásai interakcióban állnak a diurnális ritmussal. Mind a PrRP, mind a nesfatin gátolni képes a REM alvásciklust is a dorsolateralis hipothalamuszon keresztül, ahol MCH neuronok találhatók, melyek aktivációja szoros korrelációt mutat a REM alvás paramétereivel.

A magzati korban történő éhezés felnőttkori elhízást okoz, melynek okai nem ismertek. Úgy találtuk, ezekben az esetekben a táplálékfelvételt szabályozó agyi központ, a hipotalamusz fejlődése késik, mely előidézheti a metabolikus egyensúlyi pont eltolódását. A PrRP és nesfatin expressziója felnőttekben ugyan megemelkedik, de a szervezet nem reagál megfelelően a hatásukra. Ezt a centrálisan beadott nesfatin táplálékfelvételt gátló hatásának csökkenése is jelezte.

A kidolgozott technikákat számos kollaborációban hasznosítottuk. Ezek közé tartozik az a munka, amelyben a TGF alfa növekedési faktor szerepét vizsgáltuk a központi idegrendszer stroke utáni regenerációjában. Kimutattuk, hogy a TGF alfa hatására az új erek falában megjelenő, csontvelő eredetű őssejtekből származó endotel sejtek száma jelentősen emelkedett, illetve ezen őssejtekből az egészséges agyra jellemző, nem reaktív asztrociták is kialakultak. Más munkákban in situ hibridizációval igazoltuk a RasGRP3 expresszió növekedését humán melanómákban, illetve a szekretin mRNS expresszióját primer érzőneuronokban.

Közlemények:

1. Leker RR*, **Tóth ZE***, Shahar T*, Cassiani-Ingoni R, Szalayova I, Key S, Bratincsak A, Mezey E: NEUROSCIENCE 163: 233-243 (2009) IF: 3,292
2.Renner E, Szabo-Meltzer KI, Puskas N, **Tóth ZE**, Dobolyi A, Palkovits M: EUROPEAN JOURNAL OF NEUROSCIENCE 31: 302-314 (2010) IF: 3,658
3. Konczol K, Bodnar I, Zelena D, Pinter O, Papp RS, Palkovits M, Nagy GM, **Tóth ZE**: NEUROCHEMISTRY INTERNATIONAL 57: 189-197 (2010) IF: 3,601
4. **Tóth ZE**, Leker RR, Shahar T, Bratincsak A, Szalayova I, Key S, Palkovits M, Cassiani-Ingoni R, Mezey E: STEM CELLS AND DEVELOPMENT 20: 539-546 (2011) IF: 4,791
5. Heinzlmann A, **Tóth ZE**, Koves K: JOURNAL OF MOLECULAR NEUROSCIENCE 43: 101-108 (2011) IF: 2,922
6. Kitka T, Adori C, Katai Z, Vas S, Molnar E, Papp RS, **Tóth ZE**, Bagdy G: NEUROCHEMISTRY INTERNATIONAL 59: 686-694 (2011) IF: 3,601
7. Yang D, Tao J, Li L, Kedei N, **Tóth ZE**, Czap A, Velasquez JF, Mihova D, Michalowski AM, Yuspa SH, Blumberg PM: ONCOGENE 30: 4590-4600 (2011) IF: 7,414
8. Könczöl K, Pintér O, Ferenczi Sz, Kovács K, Palkovits M, Zelena D, **Tóth ZE**: INTERNATIONAL JOURNAL OF OBESITY *in press* (2012) IF: 5,125
9. Könczöl K, Palkovits M, **Tóth ZE**: FAME 2011, Pécs, előadás

* osztott elsőszerzőség

Budget: 3,000,000.- HUF

FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE EFFECTS OF PROLACTIN-RELEASING PEPTIDE AND NESFATIN IN THE RAT

Zsuzsanna E. Tóth[1], Ibolya Bodnár[2], Dóra Zelena[3]
[1]Semmelweis University, Department of Anatomy, Histology and Embryology, [2]Semmelweis University, Department of Human Morphology and Developmental Biology, [3]HAS, Intstitute of Experimental Medicine

Regulation of energy balance is a complex process determined mainly by the energy intake and expenditure. This balance is influenced by numerous factors like eating habits, body temperature, sleep-wake cycle, stress, and also by the intrauterine nutrition. We investigated two food intake decreasing neuropeptides in rats; the effects of prolactin-releasing peptide (PrRP) and nesfatin1/NUCB2 (nesfatin). According to our results both peptide may control energy balance at several points. Our group firstly described that nesfatin, similarly to PrRP, may activate the hypothalamo-pituitary adrenal axis, and thus stimulates the response to stress. We also demonstrated that nesfatin have a far more longer effect (48h) on food intake than it was supposed earlier, it elevates the body temperature, and its effects interact with the diurnal rhythm. Both PrRP and nesfatin is able to inhibit the REM sleep stage acting through the dorsolateral hypothalamus, where MCH neurons are localized, whose activation is in close correlation with the REM parameters.

Intrauterine under nutrition leads to obesity in adulthood by unknown mechanisms. We have found that in these cases development of the hypothalamus, a main food intake regulatory center in the brain, is delayed, which can contribute to the shift of the metabolic set point. Although PrRP and nesfatin expressions in the adults are elevated, the organism does not react to their effects properly. This was also indicated by the decreased food intake inhibitory capability of nesfatin administered centrally.

In other works we used the methods developed in the laboratory for collaborations. We examined the role of the growth factor, TGF alpha, in the regeneration of the central nervous system following stroke. TGF alpha increased both the number of the bone marrow stem cells originating epithelial cells in the new vessels, and the number of the stem cells originating non-reactive astrocytes, characteristic otherwise for the healthy brain. We have also showed using in situ hybridization method that expression of RasGRP3 is increased in human melanomas, and that secretin mRNA is expressed in primer sensory neurons.

Publications:

1. RR Leker*, **ZE Tóth***, T Shahar*, R Cassiani-Ingoni, I Szalayova, S Key, A Bratincsak, E Mezey: NEUROSCIENCE 163(1): pp. 233-243 (2009) IF: 3.292
2. E Renner, KI Szabo-Meltzer, N Puskas, **ZE Tóth**, A Dobolyi, M Palkovits: EUROPEAN JOURNAL OF NEUROSCIENCE 31: pp. 302-314 (2010) IF: 3.658
3. K Konczol, I Bodnar, D Zelena, O Pinter, RS Papp, M Palkovits, GM Nagy, **ZE Tóth**: NEUROCHEMISTRY INTERNATIONAL 57 (3): pp. 189-197 (2010) IF: 3.601
4. **ZE Tóth**, RR Leker, T Shahar, A Bratincsak, I Szalayova, S Key, M Palkovits, R Cassiani-Ingoni, E Mezey: STEM CELLS AND DEVELOPMENT 20 (3): pp. 539-546 (2011) IF: 4.791
5. A Heinzlmann, **ZE Tóth**, K Koves: JOURNAL OF MOLECULAR NEUROSCIENCE 43 (1): pp. 101-108 (2011) IF: 2.922
6. T Kitka, C Adori, Z Katai, S Vas, E Molnar, RS Papp, **ZE Tóth**, G Bagdy: NEUROCHEMISTRY INTERNATIONAL 59 (5): pp. 686-694 (2011) IF: 3.601
7. D Yang, J Tao, L Li, N Kedei, **ZE Tóth**, A Czap, JF Velasquez, D Mihova, AM Michalowski, SH Yuspa, PM Blumberg: ONCOGENE 30 (45): pp. 4590-4600 (2011) IF: 7,414
8. K Könczöl, O Pintér, S Ferenczi, K Kovács, M Palkovits, D Zelena, **ZE Tóth**: INTERNATIONAL JOURNAL OF OBESITY in press (2012) IF: 5,125
9. K Könczöl, M Palkovits, **ZE Tóth**: FAME 2011, Pécs, lecture

* These authors contributed equally to the work

Teljes támogatás: 7.800.000,-Ft

KORASZÜLÖTTEK IMMUNRENDSZERE AZ ELSŐ POSTNATALIS HÉT SORÁN. A T-LIMFOCITÁK AKTIVÁCIÓJÁNAK ÉS SZÉRUM CITOKINSZINTEK KINETIKÁJÁNAK A KAPCSOLATA A PERINATALIS SZÖVŐDMÉNYEKKEL. AZ ENDOGÉN KORTIZOLSZINT JELENTŐSÉGE

Tulassay Tivadar[1,2], Vásárhelyi Barna[2,3], Nobilis András[4], Szabó Miklós[1], Hajdú Júlia[5], Cseh Áron[1]
[1]Semmelweis Egyetem, I.sz. Gyermekklinika, [2]MTA-SE Gyermekgyógyászati és Nephrológiai Kutatócsoport, [3]Labormedicina Intézet, [4]II.sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika, [5]I. sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika,

A koraszülötteket fenyegető perinatális szövődmények kialakulásában az ellenőrizetlenül zajló, már a méhen belül elkezdődött szisztémás gyulladásos reakciónak (FIRS) központi szerepe van. A FIRS kapcsán a veleszületett és a szerzett immunitásért felelős sejtek egyaránt aktiválódnak, aminek a jele lehet az általuk termelt gyulladásos mediátorok – az ún. citokinek – szintjének az emelkedése.
Az ETT támogatás segítségével azokat a tényezőket vizsgáltuk, amelyek a FIRS mellett befolyásolhatják kora- és újszülötteknél a citokintermelést. Három területen értünk el eredményeket

(1) Gyulladásos státusz és immunfenotípus jellemzése koraszülötteknél a perinatális időszakban.
1500 gramm születési súly alatti koraszülöttektől vettünk megszületéskor, valamint az 1., a 3. és a 7. posztnatális napon vérmintát. 17 citokin szintjét, illetve az adaptív és a veleszületett immunitásért felelős sejtek előfordulási gyakoriságát határoztuk meg. Azt vizsgáltuk, hogy ezeket a paramétereket befolyásolja-e a gyermekek klinikai állapota, mellékveseműködése, illetve az anyának adott szteroid kezelés.
Kimutattuk, hogy FIRS-ben a legtöbb citokin (MCP-1, IL-1béta; IL-5; IL-6; IL-8; IL-10; IL-12; IL-13, valamint a TNF-alfa) szintje (az irodalmi adatoknak megfelelően) emelkedik. Érdekes módon azonban FIRS a gyulladásos sejtek prevalenciáját lényegében nem befolyásolta. A citokinszintek csökkentése révén viszont gyulladáscsökkentő hatású az endogén kortizol (a T limfocitákon belül Th1/Th2 sejtek arányának a csökkentése révén), valamint az anyának adott szteroid (a gyulladást fokozó Th1 sejtek számának a csökkentése révén).
A FIRS-ben nem szenvedő koraszülöttek alcsoportjában a postnatalis kor függvényében jellegzetes érési mintázatokat találtunk. A gyulladásos citokinek szintje a postnatalis idő függvényében fluktuált (az életkor előrehaladtával például az IL-6, IL-8, IL-12 szintje csökkent, az IL-1b, IL-2 és IL-4 szintje nőtt). Fontos megállapítás, hogy hasonló érési folyamatot észleltünk a veleszületett immunitásért felelős sejtek (NK, NKT, iNKT) esetében is. Az endogén kortizolszint ebben az alcsoportban kifejezetten gátolta az IL-2, IL-5 és IL-6 szinteket, a T-limfocita aktivációt, valamint emelte a Th2 sejtek arányát. Ezek az érési jelenségek FIRS fennállása esetén nem voltak kimutathatóak; FIRS-ben ráadásul az endogén kortizoltermelés sem fejtett ki gyulladáscsökkentő hatást.
Eredményeink azért fontosak, mert rámutatnak: a koraszülötteknél számos tényező a FIRS-től függetlenül, „fiziológiásan" is hat a gyulladásos markerekre. Az immunrendszer érését, illetve az endogén reguláló mechanizmusok hatását a fennálló FIRS felfüggeszti.
(2) A gyulladásos választ reguláló T limfociták aktivációjának a monitorozása az intracelluláris kalciumszignál alapján
Az egészséges újszülöttekre jellemző, hogy a gyulladásfokozó és- gátló citokinek aránya a gyulladásgátló citokinek irányába eltolt. Ezeknek a citokineknek a termeléséért a Th1, illetve a Th2 sejtek a felelősek. Az csak részleteiben feltárt, hogy a Th1 és a Th2 sejtek ugyanolyan extracelluláris inger hatására miért termelnek ellentétes hatású citokineket.
A pályázott időszakban jellemeztük a Th1 és a Th2 sejtek intracelluláris szignalizációját. Ehhez egy speciális mérőmódszert dolgoztunk ki áramlási citométerre, ami nagyszámú sejtben lehetővé teszi a kalciumjel monitorozását a limfocitaaktiváció során.
Gátlószerek hozzáadásával kimutattuk, hogy a Th1 és a Th2 sejtekben az intracelluláris kalcium-háztartás gyökeresen eltérő. Th2 sejtekben a mitokondriumok kalciumfelvétele, valamint a CRAC

csatornák aktivitása kisebb mértékű, illetve a SERCA transzporter aktívabb, mint Th1 sejtekben. Ennek eredményeként az aktiváció hatására bekövetkező kalciumjel is eltérő lesz, ami összefügghet az eltérő citokintermeléssel.

Egy további vizsgálatban azt is kimutattuk, hogy újszülöttekben még a gyulladásos citokineket termelő a Th1 limfociták aktivációja is kisebb mértékű a felnőttekéhez képest. A háttérben kisebb az intracelluláris kalciumexpozíció állhat. Rámutattunk, hogy ennek oka az lehet, hogy az aktiváció alatt a kalciumszint fenntartását biztosító káliumcsatornák éretlenek. (A káliumcsatornák működésének és expressziójának megváltozása egyébként a terhességre jellemző immuntolerancia kialakulásában is fontos szerepet játszik: kimutattuk, hogy a koraszülöttség egyik gyakori okával, a preeclampsiával is összefügghet a limfocita-aktiváció eltérése.)

A kidolgozott áramlási citometriás módszerrel egyéb intracelluláris analitok (mitokondrium membrán potenciál, szabadgyök-képződés, nitrogén-monoxid termelődés) mérési lehetőségét is megteremtettük, illetve azt számos egyéb immunmediált betegségben (így reumatológiai kórképekben, valamint sclerosis multiplexben) a Th1 és Th2 sejtek működésének jellemzésével validáltuk. Az ezen betegségek kapcsán kapott eredmények segíthetnek a perinatális immunzavarok egyes jelenségeinek a jobb megértésében is.

(3) Biomarkerek vizsgálata szövődményes terhességben

A perinatális szövődmények tekintetében a koraszülöttség a fő rizikófaktor. A koraszülésnek az egyik leggyakoribb oka a preeclampsia. A preeclampsia korai felismerése és adekvát kezelése az anyai és a magzati morbiditást és mortalitást egyaránt csökkenti.

A pályázati támogatásnak köszönhetően egy új marker, a solubilis urokináz plazminogén aktivátor (suPAR) szérumszint szenzitivitását és specificitását értékeltük preeclampsiában. Eredményeink azt mutatták, hogy a suPAR - a CRP és IL-6 szintek mérésén túl - segíthet a szisztémás immunaktivációt kimutatni preeclampsiában.

1. Szalay B, Mészáros G, Cseh A, Acs L, Deak M, Kovacs L, Vasarhelyi B, Balog A: CLINICAL AND DEVELOPMENTAL IMMUNOLOGY 2012: pp. 808724 (2012) IF: 2,263
2. Toldi G, Kaposi A, Zsembery Á, Treszl A, Tulassay T, Vásárhelyi B: IMMUNOBIOLOGY 217(1): pp. 37-43 (2012) IF: 4,140
3. Toldi G, Molvarec A, Stenczer B, Müller V, Eszes N, Bohács A, Bikov A, Rigó J Jr, Vásárhelyi B, Losonczy G, Tamási L: INTERNATIONAL IMMUNOLOGY 23: pp 669-677 (2011) IF: 3,301
4. Toldi G, Folyovich A, Simon Z, Zsiga K, Kaposi A, Mészáros G, Tulassay T, Vásárhelyi B: JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY 237: pp. 80-86 (2011) IF: 2,901
5. Toldi G, Bíró E, Szalay B, Stenczer B, Molvarec A, Rigó J, Vásárhelyi B, Bekő G: CLINICAL CHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE 49:(11) pp. 1873-1876 (2011) IF: 2,069
6. Mészáros G, Szalay B, Toldi G, Kaposi A, Vásárhelyi B, Treszl A: ASSAY DRUG DEV TECHNOL 2011 Sep 15. [Epub ahead of print] PMID: 21919740 (2011) IF: 2,70
7. Prókai Á, Fekete A, Bánki NF, Müller V, Vér Á, Degrell P, Rusai K, Wagner L, Vannay A, Rosta M, Heemann U, Langer RM, Tulassay T, Reusz Gy, Szabó AJ: SURGERY 150 (1) pp: 39-47 (2011) IF: 3,406
8. Pongor V, Toldi G, Szabó M, Vásárhelyi B: ORV. HETIL.152: pp. 575-580 (2011)
9. Toldi G, Treszl A, Vásárhelyi B: In: Autoimmune Disorders – Pathogenetic Aspects (ed: Mavragani C). Intech. ISBN 978-953-308-70-9 (2011) [book chapter]

Budapest, 2012. január 20.

Dr.Tulassay Tivadar
egyetemi tanár
témavezető

Teljes támogatás: 7.800.000,-Ft

PRETERM INFANTS' IMMUNE SYSTEM DURING THE FIRST POSTNATAL WEEK. THE ASSOCIATION BETWEEN T LYMPHOCYTE ACTIVATION AND SERUM CYTOKINE KINETICS WITH THE RISK OF PERINATAL COMPLICATIONS. THE SIGNIFICANCE OF THE INTERACTION OF ENDORINE AND IMMUN SYSTEMS.

Tivadar Tulassay[1,2], Barna Vásárhelyi[2,3], András Nobilis [4], Miklós Szabó [1], Júlia Hajdú [5], Áron Cseh [1]
[1]Semmelweis University, First Department of Pediatrics, [2] MTA-SE Research Group of Pediatrics and Nephrology, [3]Department of Laboratory Medicine, [4]Second Department of Gynaecology & Obstetrics, [5] First Department of Gynaecology & Obstetrics

The uncontrolled systemic inflammatory response syndrome (FIRS) has a central role in the short- and long-term development of perinatal complications of the preterm infant. FIRS is characterized by the activation of cells responsible for the innate and adaptive immunity and hallmarked by an increase of the production of inflammatory mediators called cytokines.
With the aid of the present grant we analyzed factors that may have an impact on cytokine production in preterm and term neonates additionally to the FIRS. We reached important results in the following fields.

(1) Characterization of inflammatory state and immune phenotype in the perinatal period in preterm neonates.
On Day 0, 1, 3 & 7 after birth Samples were collected from babies born with a birth weight under 1500 grams. We screened the level of 17 cytokines and the prevalence of immune cells responsible for adaptive and innate immunity. We analyzed whether these parameters were affected by the babies' clinical status, adrenal function and prenatal maternal steroid therapy.
In line with literary data we demonstrated that the levels of the majority of the cytokines (including MCP-1, IL-1béta; IL-5; IL-6; IL-8; IL-10; IL-12; IL-13, and TNF-alpha) increase in FIRS.
Interestingly, FIRS was not associated with immune phenotype. Of note, the endogenous cortisol and prenatal maternal steroid therapy have anti-inflammatory action due to their impact on cytokine levels. In addition, cortisol and maternal steroid therapy decreased Th1/Th2 ratio and Th1 cell numbers, respectively.
In a subgroup of preterm babies without FIRS we identified characteristic maturation patterns in the investigated parameters. The level of inflammatory cytokines fluctuated with postnatal age (e.g. the level of IL-6, IL-8, IL-12 decreased while the level of IL-1b, IL-2 and IL-4 cytokine increased with increasing age). Of note, similar maturation process was documented in the prevalence of cells responsible for innate immunity (NK, NKT, iNKT). In this subgroup, the endogenous cortisol levels significantly decreased IL-2, IL-5 and IL-6 levels and T-lymphocyte activation markers and increased the prevalence of Th2 cells. These processes were not observed in preterm babies with FIRS. In addition, endogenous cortisol was not able to control inflammatory cytokines in FIRS either.
These results indicate that several factor irrespectively of FIRS may have a physiologic impact on inflammatory state in the preterm neonate. The normal maturation and the impact of endogenous regulatory factors are suspended in the presence of FIRS.

(2) Monitoring of the activation of T lymphocytes responsible for the regulation of inflammatory response using intracellular calcium levels as a marker
The rate of pro- and anti-inflammatory cytokines is skewed to an anti-inflammatory direction in the healthy neonate. These cytokines are produced by Th1 and Th2 cells. However, it is not fully elucidated why the cytokines produced by Th1 and Th2 differ in the presence of identical stimuli.
Therefore we characterized the intracellular calcium signalization of activated Th1 and Th2 cells. We developed a specific tool for flow cytometry that enabled us to monitor calcium levels in a large number of cells during lymphocyte activation.

With the use of specific inhibitors we demonstrated that intracellular calcium homeostasis dramatically differ in activated Th1 and Th2 cells. In Th2 cells, the calcium uptake of mitochondria and the activity of CRAC channels are lower, the activity of SERCA transported is higher compared to those observed in Th1 cells. As a result the calcium signal patterns differ and this may lead to different cytokine producing properties.

In an additional study we demonstrated that in healthy neonates the response of Th1 cells to activation stimuli is lower than that of healthy adults. This may be explained, at least partly, by a lower intracellular calcium exposure during activation. The underlying mechanism may be the immature functionality and expression of potassium channels responsible for the maintenance of calcium influx to the cell. (Of note, the altered function and expression of potassium channels may be of central importance in the development of immune tolerance in healthy pregnancy: we demonstrated that abnormal potassium channel function is associated with the risk of preeclampsia in the mother, a frequent cause of premature birth.)

With the use of the developed flow cytometry method we also created an opportunity to monitor other intracellular parameters during lymphocyte activation (including mitochondrium membrane potential, free radical generation, nitric-oxide production). This approach was used to reveal the T-cell activation disturbance in a number of other immune mediated disorders characterized by altered Th1 and/or Th2 function. The results obtained may help to better understand the immune dysregulation in preterm neonates.

(3) Investigation of biomarkers in complicated pregnancies

Preterm birth is the leading factor responsible for perinatal complications. Preeclampsia is a major cause of premature birth. The early identification of mothers with this complication may improve fetal and maternal morbidity and mortality.

With the aid of this grant we had the opportunity to assess the sensitivity and specificity of soluble activator urokinase plasminogen activator (suPAR) serum levels in preeclampsia. Our results indicated that suPAR may be an additional marker to CRP and IL-6 levels that would help to assess systemic immune activation in preeclampsia.

10. Szalay B, Mészáros G, Cseh A, Acs L, Deak M, Kovacs L, Vasarhelyi B, Balog A: CLINICAL AND DEVELOPMENTAL IMMUNOLOGY 2012: pp. 808724 (2012) IF: 2,263
11. Toldi G, Kaposi A, Zsembery Á, Treszl A, Tulassay T, Vásárhelyi B: IMMUNOBIOLOGY 217(1): pp. 37-43 (2012) IF: 4,140
12. Toldi G, Molvarec A, Stenczer B, Müller V, Eszes N, Bohács A, Bikov A, Rigó J Jr, Vásárhelyi B, Losonczy G, Tamási L: INTERNATIONAL IMMUNOLOGY 23: pp 669-677 (2011) IF: 3,301
13. Toldi G, Folyovich A, Simon Z, Zsiga K, Kaposi A, Mészáros G, Tulassay T, Vásárhelyi B: JOURNAL OF NEUROIMMUNOLOGY 237: pp. 80-86 (2011) IF: 2,901
14. Toldi G, Bíró E, Szalay B, Stenczer B, Molvarec A, Rigó J, Vásárhelyi B, Bekő G: CLINICAL CHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE 49:(11) pp. 1873-1876 (2011) IF: 2,069
15. Mészáros G, Szalay B, Toldi G, Kaposi A, Vásárhelyi B, Treszl A: ASSAY DRUG DEV TECHNOL 2011 Sep 15. [Epub ahead of print] PMID: 21919740 (2011) IF: 2,70
16. Prókai Á, Fekete A, Bánki NF, Müller V, Vér Á, Degrell P, Rusai K, Wagner L, Vannay A, Rosta M, Heemann U, Langer RM, Tulassay T, Reusz Gy, Szabó AJ: SURGERY 150 (1) pp: 39-47 (2011) IF: 3,406
17. Pongor V, Toldi G, Szabó M, Vásárhelyi B: ORV. HETIL.152: pp. 575-580 (2011)
18. Toldi G, Treszl A, Vásárhelyi B: In: Autoimmune Disorders – Pathogenetic Aspects (ed: Mavragani C). Intech. ISBN 978-953-308-70-9 (2011) [book chapter]

Budapest, 20 January, 2012

Dr.Tivadar Tulassay
professor

Teljes támogatás: 6.000.000,- Ft

VASTAGBÉL REGENERÁCIÓS HIBÁK (FEKÉLYEK ÉS DAGANATOK) KIALAKULÁSÁNAK MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI ALAPJAI RNS ÉS DNS METILÁCIÓS SZINTEN

Tulassay Zsolt[1,2], Molnár Béla[1,2], Herszényi László[1], Sipos Ferenc[1], Miheller Pál[1], Udvardyné Galamb Orsolya[1,2]
[1]Semmelweis Egyetem, II. sz. Belgyógyászati Klinika, [2] Magyar Tudományos Akadémia-Semmelweis Egyetem Molekuláris Medicina Kutatócsoport

A gyulladásos bélbetegségek (IBD) nem-IBD colitis-től való perifériás vér alapú elkülönítését végeztük teljes genomszintű expressziós profilozással. Az IBD-s vérmintákat 13 differenciáló gén segítségével különítettük el a nem IBD-s és egészséges mintáktól. 5 transzkriptum alapján 100%-os érzékenységgel és fajlagossággal elkülönítettük a colitis ulcerosás (UC) és a Crohn-betegek (CD) vérmintáit. Bizonyos vérben talált génexpressziós eltérések a gyulladásos vastagbélhámban is kimutathatóak. Egy perifériás vér alapú molekuláris assay hozzájárulhat az IBD jövőbeli szűréséhez és diagnosztikájához (1).

A Septin 9 colorectális rák (CRC) szűrőmarker metilációval összefüggő mRNS és fehérjeszintű eltéréseit elemeztük a colorectális adenoma-dysplasia-carcinoma szekvencia előrehaladása során. A Septin 9 gén működését gátló DNS metiláció fokozódásával párhuzamosan kimutattuk a gén mRNS- és fehérjetermékeinek szövetbeli csökkenését. Sejtkultúra modellben demetilációs kezelést követően ez a csökkenés visszafordíthatónak bizonyult, amely arra utalhat, hogy a Septin 9 szűrőmarker terápiás célpontként is felhasználható (2).

A vastagbéldaganatokban zajló metilációs események genomszintű tanulmányozását lehetővé tevő génexpresszión alapuló módszert fejlesztettünk ki, lézerrel kimetszett minták és metilációs sejttenyészet modell együttes felhasználásával. 17 metilációs szabályozás alatt álló, az adenoma-carcinoma szekvencia során csökkenő kifejeződésű gént azonosítottunk, amelyek a jövőben kezelési célpontok lehetnek (3).

A CRC kemoprevenciójával kapcsolatosan, az NS398 szelektív ciklooxigenáz-2 gátló génexpressziós hatásának tanulmányozása során kimutattuk, hogy az képes visszafordítani a colorectális adenoma-carcinoma szekvencia során fellépő génexpressziós eltéréseket. Az NS398 az adenoma stádiumban jellemző génexpressziós változásokat hatékonyabban fordította meg, mint az CRC-re jellemzőeket, ezért az NS398 hatékony CRC kemoprevenciós vegyület a rákmegelőző adenoma stádiumban (4).

A colorectális karcinogenezis és progresszió fehérejmarkereit azonosítottuk fehérjechip és szöveti microarray technológia alkalmazásával, és tanulmányoztuk az mRNS és a fehérjeszint összefüggését. Az ép, a korai valamint az előrehaladott CRC érzékeny és specifikus megkülönbözetésére alkalmas fehérjemarker-panelt (CCNA1, AR, TOP1, TGFB, HSP60, ERK1) fejlesztettünk ki. Összefüggés állapítható meg a transzkriptóm és az ellenanyag array eredményei között, így az előbbit mint nagy teljesítményű szűrőmódszert alkalmazhatjuk a meghatározott célpontokra tervezett ellenanyag microarray használatát megelőzően. Az ellenanyag microarray-knek alapvető fontosságuk lehet a daganatos megbetegedések jövőbeli diagnosztikájában (5).

Szöveti microarray-n végzett immunhisztokémiai vizsgálatokkal az oszteopontin (OPN) termelődés és a proliferációs/apoptotikus ráta (PAR) fokozódását mutattuk ki a colorectális adenoma-dysplasia-carcinoma szekvencia előrehaladása során. A PAR és OPN kifejeződés meghatározása segíthet a rákképződés szövettani fázisainak azonosításában. Az emelkedett hámeredetű OPN a stromában fokozhatja a fibroblaszt-myofibroblaszt átalakulást, amely megváltoztathatja az őssejt mikrokörnyezetének sejtarányát, visszahatva annak proliferációs tulajdonságaira (6).

A bélhez kapcsolódó limfoid szövet (GALT) feltételezhetően a vastagbél nyálkahártya regenerációjában és a vastagbéldaganatok kialakulásában egyaránt központi szerepet játszik. Gyulladásos körülmények közt az izolált limfoid follikulusok (ILF) száma, átmérője és sűrűsége is megnövekszik. Szerepük nem kizárólag az immunvédelem fenntartásában, de emellett az

egészséges vastagbél nyálkahártya regenerációs folyamataiban is elengedhetetlen. A karcinogenezis során az ILF-ok kettős szerepet töltenek be. Egyrészt a vaszkuláris endotheliális növekedési faktor receptor jelátviteli rendszeren keresztül speciális citokin és celluláris miliő kialakításával elősegítik a tumor növekedését és a metasztatikus folyamatokat, másrészt jelenlétük néhány esetben jobb prognózissal hozható összefüggésbe (7, 8).

Az öregedés vastagbélbeli mikroszkópos és molekuláris jeleit, valamint ezek szerepét vizsgáltuk a megváltozott hámregenerációban. Az öregedés során bekövetkező telomer rövidülés és megváltozott immunválasz krónikus gyulladás kialakulását okozhatja, ami a vastagbélhám károsodását idézi elő. A hám megújulási képessége is gyengébb, amit a regenerációban szerepet játszó őssejtek működésének és vándorlási képességének átalakulása, a regenerációt szabályozó gének metilációs mintázatának megváltozása, növekedési faktorok által szabályozott jelutak módosulásai magyarázhatnak. Ezen folyamatok további megismerésének nagy klinikai jelentősége lehet számos betegség megelőzésében és új terápiás lehetőségek kifejlesztésében (9).

A nyiroksejt aggregátumok szerepének vizsgálatára férfi csontvelővel transzplantált nőbetegekből származó vastagbél-mintákat elemeztünk XY kromoszóma FISH-t és immunhisztokémiai festést követően. A kötőszöveti rétegben egyes Musashi-1+ őssejtek CDX2 pozitivitást is mutattak, ami a hámirányú elköteleződésükre utal. A nyiroksejt aggregátumok közelében lévő kripták hámrétegben elhelyezkedő, csontvelői eredetű CD45- sejtek megnövekedett aránya arra utal, hogy a csontvelői eredetű sejtek részt vesznek a hám regenerációjában, a nyiroksejt aggregátum pedig vándorlásuk köztes állomása lehet (10).

A regenerációval összefüggő növekedési faktor és hámmarker expressziót határoztuk meg UC-s betegek limfoid aggregátumaiban. Kimutattuk, hogy a limfoid elemek és a subepitheliális follikulusok számának az emelkedése szoros kapcsolatban áll a gyulladás súlyosságával. Az EGFR és HGFR pozitív limfoid aggregátumbeli sejtek feltehetően a nyálkahártya-regenerációs folyamatok beindításában játszanak szerepet. A CDX2/CK pozitív szubepitheliális sejtek jelenléte arra utal, hogy a mezenchimális-epitheliális tranzíció a limfoid aggregátumokban történhet (11).

Közlemények jegyzéke:

1. Sipos F, Galamb O, Wichmann B, Krenács T, Tóth K, Leiszter K, Műzes G, Zágoni T, Tulassay Z, Molnár B. DISEASE MARKERS 30:(1) pp. 1-17. (2011) IF:1.723

2. Tóth K, Galamb O, Spisák S, Wichmann B, Sipos F, Valcz G, Leiszter K, Molnár B, Tulassay Z. PATHOLOGY & ONCOLOGY RESEARCH 17:(3) pp. 503-509. (2011) IF:1.483

3. Spisak S, Kalmar A, Molnár B, Sipos F, Wichmann B, Galamb O, Tulassay Z. ORVOSI HETILAP 151:(20) pp. 805-814. (2010)

4. Galamb O, Spisák S, Sipos F, Tóth K, Solymosi N, Wichmann B, Krenács T, Valcz G, Tulassay Z, Molnár B. BRITISH JOURNAL OF CANCER 102:(4) pp. 765-773. (2010) IF: 4.831

5. Spisák S, Galamb O, Sipos F, Wichmann B, Solymosi N, Nemes B, Molnár J, Molnár B, Tulassay Z. DISEASE MARKERS 28:(1) pp. 1-14. (2010) IF: 1.723

6. Valcz G, Sipos F, Krenács T, Molnar J, Patai AV, Leiszter K, Tóth K, Solymosi N, Galamb O, Molnár B, Tulassay Z. PATHOLOGY & ONCOLOGY RESEARCH 16:(4) pp. 541-545. (2010) IF: 1.483

7. Sipos F, Muzes G, Galamb O, Spisak S, Krenacs T, Toth K, Tulassay Z, Molnar B. PATHOLOGY & ONCOLOGY RESEARCH 16:(1) pp. 11-18. (2010) IF: 1.483

8. Sipos F, Muzes G. WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY 17:(13) pp. 1666-1673. (2011) IF: 2.240

9. Sipos F, Leiszter K, Tulassay Z. WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY 17:(25) pp. 2981-2986. (2011) IF: 2.240

10. Valcz G, Krenács T, Sipos F, Patai AV, Wichmann B, Leiszter K, Tóth K, Balogh Z, Csizmadia A, Hagymási K, Masszi T, Molnár B, Tulassay Z. JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY 64:(9) pp. 771-775. (2011) IF: 2.475

11. Sipos F, Mozes G, Valcz G, Galamb O, Toth K, Leiszter K, Krenacs T, Tulassay Z, Molnar B. SCANDINAVIAN JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY 45:(4) pp. 440-448. (2010) IF: 1.966

Budget: 6,000,000.- HUF

MOLECULAR BIOLOGICAL BASIS OF DEVELOPMENT OF REGENERATIVE FAILURES (ULCERS AND CANCERS) ON MRNA AND METHYLATED DNA LEVEL IN THE COLON

Zsolt Tulassay[1,2], Béla Molnár[1,2], László Herszényi[1], Ferenc Sipos[1], Pál Miheller[1], Orsolya Udvardyné Galamb[1,2]
[1]2nd Department of Internal Medicine, Semmelweis University, [2] Hungarian Academy of Sciences-Semmelweis University Molecular Medicine Research Unit

Peripheral blood-based discrimination of inflammatory bowel diseases (IBD) from non-IBD colitis was performed by genome-wide gene expression profiling. A set of 13 transcripts was differentially expressed in IBD, non-IBD controls and healthy blood samples. Ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) blood cases could be distinguished by 5 genes with 100% specificity and sensitivity. Some disease-associated alterations in blood transcripts were also detected in colonic tissue. A molecular diagnostic assay using easily accessible peripheral blood would greatly assist in the screening and diagnosis of IBD (1).

Methylation-associated mRNA and protein level alterations of Septin 9 colorectal cancer (CRC) screening marker were analyzed during the colorectal adenoma-dysplasia-carcinoma sequence progression. In parallel with the increasing DNA hypermethylation of Septin 9 gene, decrease of its mRNA and protein products could be detected in colonic tissue. In cell culture model, these changes could be reversed by demethylation agents converting this screening marker gene into therapeutic target (2).

A gene expression-based method using laser microdissected samples and cell culture methylation model was developed, which can be applied for a genome-wide analysis of the methylation events during the colorectal tumorigenesis. In line with the adenoma-carcinoma sequence progression, 17 methylation-regulated genes with decreasing expression were identified which can be potential therapeutic targets in the future (3).

Gene expression effects of NS398 selective cyclooxigenase-2 inhibitor were studied and it was shown that NS398 has a reverse effect on the expression of several genes that altered in colorectal adenoma-carcinoma sequence. NS398 more efficiently inverted the expression changes at the adenoma than in carcinoma stage suggesting it is an effective drug in CRC chemoprevention (4).

Protein markers of colorectal carcinogenesis and progression were identified using protein array and tissue microarray technologies and the connection between mRNA and protein expression levels was also analyzed. A protein marker set (CCNA1, AR, TOP1, TGFB, HSP60, ERK1) was developed which could differentiate normal specimen, early and late stage CRC with high sensitivity and specificity. A correlation could be established between transcriptome and antibody array results, hence the former may be used as a high-capacity screening method before applying antibody arrays containing already planned targets. Antibody microarrays may have a fundamental importance in the diagnostics of tumorous diseases in the future (5).

Elevated osteopontin (OPN) expression and proliferative/apoptotic ratio (PAR) were detected in the colorectal adenoma-dysplasia-carcinoma sequence by immunohistochemical analyses on tissue microarray slides. Determination of PAR and OPN expression may help to identify the different histological stages of the colorectal carcinogenesis. The increased epithelium-derived OPN may contribute to the increased fibroblast-myofibroblast transition determining stem cell niche in colorectal cancer (6).

Gut-associated lymphoid tissue (GALT) is supposed to play a central role in both the organization of colonic repair mechanisms and colorectal carcinogenesis. In inflammatory conditions, the number, diameter and density of isolated lymphoid follicles (ILFs) increases. They are not only involved in immune surveillance, but their presence is also indispensable in normal mucosal regeneration of the colon. In carcinogenesis, ILFs may play a dual role. On the one hand they may support tumor growth and the metastatic process by vascular endothelial growth factor receptor signaling and producing a specific cytokine and cellular milieu, but on the other hand their presence is sometimes associated with a better prognosis (7, 8).

Budget: 6,000,000.- HUF

The age-related microscopic and molecular alterations and their role in the colonic mucosal regeneration were studied. The age-related telomere shortening and inflamm-ageing may lead to the development of colonic inflammation, which results in epithelial damage. On the other hand, the altered migration and function of regenerative stem cells, the age-related methylation of mucosal healing-associated genes, together with the alterations of growth factor signaling with age, may be involved in delayed mucosal regeneration. The further understanding of these mechanisms are of great clinical importance with regard to disease prevention and modern therapeutic strategies (9).

For studying the role of the lymphoid aggregates, colonic samples from female patients initially transplanted with male bone marrow were analyzed using XY chromosome FISH and immunohistochemistry. The stromal Musashi-1+ cells were positive for CDX2 as well, as a sign of epithelial differentiation. Elevated number of intraepithelial CD45- bone marrow-derived cells at lymphoid aggregates suggests that they play a role in epithelial regeneration and that lymphoid aggregates serve as their migration route (10).

Regeneration associated growth factor receptor and epithelial marker expression were determined in lymphoid aggregates of ulcerative colitis. It was shown that the number of lymphoid aggregates was in tight positive correlation with the severity of inflammation. EGFR and HGFR positive subepithelial cells in lymphoid aggregates may be involved in the induction of the regenerative mucosal processes. The presence of CDX2/CK positive subepithelial cells suggests that mesenchymal-to-epithelial transition may be located to lymphoid aggregates (11).

References:

1. Sipos F, Galamb O, Wichmann B, Krenács T, Tóth K, Leiszter K, Műzes G, Zágoni T, Tulassay Z, Molnár B. DISEASE MARKERS 30:(1) pp. 1-17. (2011) IF:1.723
2. Tóth K, Galamb O, Spisák S, Wichmann B, Sipos F, Valcz G, Leiszter K, Molnár B, Tulassay Z. PATHOLOGY & ONCOLOGY RESEARCH 17:(3) pp. 503-509. (2011) IF:1.483
3. Spisak S, Kalmar A, Molnár B, Sipos F, Wichmann B, Galamb O, Tulassay Z. ORVOSI HETILAP 151:(20) pp. 805-814. (2010)
4. Galamb O, Spisák S, Sipos F, Tóth K, Solymosi N, Wichmann B, Krenács T, Valcz G, Tulassay Z, Molnár B. BRITISH JOURNAL OF CANCER 102:(4) pp. 765-773. (2010) IF: 4.831
5. Spisák S, Galamb O, Sipos F, Wichmann B, Solymosi N, Nemes B, Molnár J, Molnár B, Tulassay Z. DISEASE MARKERS 28:(1) pp. 1-14. (2010) IF: 1.723
6. Valcz G, Sipos F, Krenács T, Molnar J, Patai AV, Leiszter K, Tóth K, Solymosi N, Galamb O, Molnár B, Tulassay Z. PATHOLOGY & ONCOLOGY RESEARCH 16:(4) pp. 541-545. (2010) IF: 1.483
7. Sipos F, Muzes G, Galamb O, Spisak S, Krenacs T, Toth K, Tulassay Z, Molnar B. PATHOLOGY & ONCOLOGY RESEARCH 16:(1) pp. 11-18. (2010) IF: 1.483
8. Sipos F, Muzes G. WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY 17:(13) pp. 1666-1673. (2011) IF: 2.240
9. Sipos F, Leiszter K, Tulassay Z. WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY 17:(25) pp. 2981-2986. (2011) IF: 2.240
10. Valcz G, Krenács T, Sipos F, Patai AV, Wichmann B, Leiszter K, Tóth K, Balogh Z, Csizmadia A, Hagymási K, Masszi T, Molnár B, Tulassay Z. JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY 64:(9) pp. 771-775. (2011) IF: 2.475
11. Sipos F, Mozes G, Valcz G, Galamb O, Toth K, Leiszter K, Krenacs T, Tulassay Z, Molnar B. SCANDINAVIAN JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY 45:(4) pp. 440-448. (2010) IF: 1.966

Teljes támogatás: 2.400.000,- Ft

A TÁPLÁLKOZÁSI MAGATARTÁS ÉS A TESTKÉP ZAVARAINAK EPIDEMIOLÓGIAI VIZSGÁLATA SPECIÁLIS KOCKÁZATI POPULÁCIÓKBAN, TRANSZKULTURÁLIS MEGKÖZELÍTÉSBEN

Túry Ferenc, Dukay-Szabó Szilvia, Varga Márta, Babusa Bernadett
Budapest, Semmelweis Egyetem, Magatartástudományi Intézet

Az evészavarok (anorexia, bulimia, s az újabb kórképek: izomdiszmorfia, orthorexia) gyakoriságát kultúrközi összehasonlítással, több populáción mértük fel. A vizsgálatok több területre terjedtek ki.

1. Evészavarok epidemiológiája orvostanhallgatók között három országban (Ausztria, Németország, Magyarország).

Ez a vizsgálat az 1989-ben végzett hasonló felmérés megismétlése volt 20 év után. Hazánkban két centrum vett ebben részt 2010-ben: Debreceni Egyetem (560 kitöltött kérdőív), Semmelweis Egyetem (465 kitöltött kérdőív). A hazai adatbázis jelenleg az Innsbrucki Egyetemen, a vizsgálat központjában van, ahol elkezdődött az adatfeldolgozás. Az adatok fontos támpontokat nyújtanak a modern evészavarok elterjedtségének időbeli változásairól.

2. Evészavarok epidemiológiája romániai populációban

A vizsgálat az 1995-ben Kolozsvárott végzett hasonló felmérés megismétlése volt 2009-ben. Az első alkalommal 553 fős mintán (160 férfi, 393 nő), a második alkalommal 761 fő (215 férfi, 546 nő) töltötte ki a kérdőíveket. Az időbeli változások arra utalnak, hogy a nők vékonyabbak, a férfiak izmosabbak szeretnének lenni. A szubklinikai anorexia gyakorisága nőknél 2,5%-ról 1,7%-ra csökkent, férfiaknál gyakorlatilag nem változott. A szubklinikai bulimia aránya mindkét nemben csökkent. Ugyanakkor a testi elégedetlenség mind a nőkben, mind a férfiakban jelentősen fokozódott. Az adatokat kongresszuson bemutattuk, a közlemény folyamatban van.

3. Evés- és testképzavarok felmérése látássérült személyek között

Célunk az volt, hogy részletes képet kapjunk a látássérültek testélményének kialakulásáról, táplálkozási attitűdjükről. A vizsgálatba 18 és 40 év közötti személyeket vontunk be (a felső korhatárt az evészavarok epidemológiai adatainak ismeretében tartottuk indokoltnak). Az adatközlés önkéntes és anonim volt. A felmérésben segítségünkre voltak a Magyar Református Egyház Vakmissziójának munkatársai. Az adatgyűjtés során eddig 52 eset gyűlt össze. A felajánlott személyes konzultáció lehetőségével eddig senki sem élt. Az adatgyűjtés és az adatfeldolgozás folyamatban van.

4. Az orthorexia nervosa epidemiológiája dietetikus hallgatók között

A kórkép új típusú evészavar, egészségesétel-függőségnek felel meg. Nemzetközi kutatások szerint az egészségügyi foglakozásúak fokozott orthorexia-kockázattal rendelkeznek. A jelen vizsgálat az orthorexia gyakoriságát és háttértényezőit elemezte 124 dietetikus hallgatónő körében. Az adatok alapján a hallgatók fokozott kockázattal rendelkeznek az orthorexia kialakulása szempontjából. Kérdés, hogy ez mennyiben felel meg a foglalkozás követelményeinek. Ezért további vizsgálatok szükségesek.

5. Az izomdiszmorfia felmérése testépítők és nem testépítő egyetemisták között

Az izomdiszmorfia testépítő férfiak testképzavarát jelenti, a soványságfóbia áll az előtérben. 60 testépítő és 60 nem testépítő egyetemista összehasonlítása során kiderült, hogy az izomdiszmorfia összefügg a testépítéssel, a magasabb ideális testsúllyal és evészavar-jellemzőkkel.

Egy izomdiszmorfia tesztet (Muscle Appearance Satisfaction Scale – MASS) validáltunk más populációkban, 289 súlyemelő, valamint 240 egyetemista között. A teszt értékes és megbízható mérőeszköznek bizonyult az izomdiszmorfiás jellemzők mérésére.

Fontosabb közlemények:

1. Túry F, Güleç H, Kohls E: Assessment methods for eating disorders and body image disorders. J PSYCHOSOM RES 69: pp. 601-611 (2010) IF: 2,908

Teljes támogatás: 2.400.000,- Ft

2. Babusa B, Urbán R, Czeglédi E, Túry F: Psychometric properties and construct validity of the Muscle Appearance Satisfaction Scale among Hungarian men. BODY IMAGE 9: pp. 155-162 (2012) IF: 2,193
3. Babusa B, Túry F: Muscle dysmorphia in Hungarian noncompetitive male bodybuilders. EATING AND WEIGHT DISORDERS (in press) IF: 1,016
4. Túry F, Babusa B, Dukay-Szabó Sz, Varga M: Az evés- és a testképzavarok újabb típusai a modern civilizációs ártalmak között. MAGYAR TUDOMÁNY 171: pp. 1306-1315 (2010)
5. Babusa B, Túry F: Az izomdiszmorfia nozológiai helye és mérése. PSYCHIATRIA HUNGARICA 26: pp. 158-166 (2011)

Előadások:

1. Túry F, Antal I: A thirteen-year follow-up study of eating disorders in Roumania. Jubilee Congress on Eating Disorders, Alpbach, 2010.10.23.
2. Varga M, Máté G, Dukay-Szabó Sz, Papp I, Túry F: Egészségesétel-függőség vizsgálata magyar dietetikus hallgatók körében. III. Magyar Evészavar Kongresszus, Budapest, 2010.9.17.
3. Babusa B, Túry F: Az izomdiszmorfia prevalenciája és evészavarral kapcsolatos karakterisztikája férfi testépítők körében. A MPT vándorgyűlése, Sopron, 2011.1.26-29.
4. Babusa B, Túry F: Methods for assessing male body image (poster). INTACT symposium: The dynamics of eating disorders. Braga, 2009.11.12-14.

Teljes támogatás: 2.400.000,- Ft

EPIDEMIOLOGICAL STUDY OF THE DISORDERS OF EATING BEHAVIOURS AND BODY IMAGE DISORDERS IN SPECIAL RISK POPULATIONS, IN A TRANSCULTURAL APPROACH

Ferenc Túry, Szilvia Dukay-Szabó, Márta Varga, Bernadett Babusa
Budapest, Semmelweis University, Institute of Behavioural Sciences

The morbidity of eating disorders (anorexia, bulimia, and the new forms: muscle dysmorhpia, orthorexia) was studied in several populations, in a transcultural comparison. The investigations involved several topics.

1. Epidemiology of eating disorders among medical students in three countries (Austria, Germany, Hungary)

The study was the repetition of a similar study made in 1989. Two Hungarian centres were involved in 2010: University of Debrecen (560 fulfilled questionnaires), Semmelweis University (465 fulfilled questionnaires). The Hungarian database is in the University of Innsbruck, in the study centre, and the statistical analyis is in progress. The data will provide important points of view about the temporal changes of the morbidity of modern eating disorders.

2. Epidemiology of eating disorders in a Romanian population

The study was the repetition of a similar study from 1995 made in the University of Cluj-Napoca. It was made in 2010. In the first study 553 subject were involved (160 males, 393 females). In the second phase 761 subject fulfilled the questionnaires (215 males, 546 females). The temporal changes show that the females want to be slimmer, the males more muscular. The prevalence of subclinical anorexia decreased in females (2.5%–1.7%), and there was no change among males. The prevalence of subclinical bulimia decreased in both sexes. Moreover, the body dissatisfaction significantly increased in males and females. The data were presented in congresses, the publication is in progress.

3. Eating disorders and body image disorders among blind people

Our aim was the detect the development of body experience, and the eating attitudes of blind people. Subjects aged 18-40 years were involved (the upper limit was important in the knowledge of the epidemiology of eating disorders). The screening was anonymous and volunteer. The study was helped by the experts of the Blind Mission of the Hungarian Reformed Church. So far 52 cases were collected. The proposed personal consultation was not asked by any of the subjects. The data collection and processing is in progress.

4. Epidemiology of orthorexia nervosa among dietician students

The orthorexia is a new eating disorder, and means dependence on healthy food. On the basis of international studies the subjects working in the health system show an increased risk of orthorexia. The present study analyzed the prevalence and background factors of orthorexia among 124 female dieticians. The data show that the dietician students present an increased risk of the disorder. It is question whether this is a consequence of the specialities of this occupation. More research is needed in this field.

5. Study of muscle dysmorphia in body builders and non body builder students

The muscle dysmorphia means a special body image disorder of male body builders, the slimness phobia is in the foreground. We compared 60 body builders to 60 non body builder students, and the muscle dysmorphia seems to be in relation with body building, higher ideal body weight, and some eating disorder characteristics.

An instrument measuring muscle dysmorphia (Muscle Appearance Satisfaction Scale – MASS) was validated in other populations, among 289 weight lifters, and 240 students. The MASS proved to be a reliable and valid instrument for measuring the characteristics of muscle dysmorphia.

Important publications:

6. Túry F, Güleç H, Kohls E: Assessment methods for eating disorders and body image disorders. J PSYCHOSOM RES 69: pp. 601-611 (2010) IF: 2,908
7. Babusa B, Urbán R, Czeglédi E, Túry F: Psychometric properties and construct validity of the Muscle Appearance Satisfaction Scale among Hungarian men. BODY IMAGE 9: pp. 155-162 (2012) IF: 2,193
8. Babusa B, Túry F: Muscle dysmorphia in Hungarian noncompetitive male bodybuilders. EATING AND WEIGHT DISORDERS (in press) IF: 1,016
9. Túry F, Babusa B, Dukay-Szabó Sz, Varga M: Az evés- és a testképzavarok újabb típusai a modern civilizációs ártalmak között. MAGYAR TUDOMÁNY 171: pp. 1306-1315 (2010)
10. Babusa B, Túry F: Az izomdiszmorfia nozológiai helye és mérése. PSYCHIATRIA HUNGARICA 26: pp. 158-166 (2011)

Congress presentations:

5. Túry F, Antal I: A thirteen-year follow-up study of eating disorders in Roumania. Jubilee Congress on Eating Disorders, Alpbach, 2010.10.23.
6. Varga M, Máté G, Dukay-Szabó Sz, Papp I, Túry F: Examination of orthorexia among Hungarian dieticians. III. Magyar Evészavar Kongresszus, Budapest, 2010.9.17.
7. Babusa B, Túry F: The prevalence and some characteristics of muscle dysmorphia among male body builders. A MPT vándorgyűlése, Sopron, 2011.1.26-29.
8. Babusa B, Túry F: Methods for assessing male body image (poster). INTACT symposium: The dynamics of eating disorders. Braga, 2009.11.12-14.

Teljes támogatás: 3.000.000,- Ft

STIMULÁLÓ ÉS GÁTLÓ T SEJT – APC MOLEKULÁRIS KÖLCSÖNHATÁSOK VIZSGÁLATA EGYEDI MOLEKULA ÉRZÉKENYSÉGŰ BIOFIZIKAI MÓDSZEREKKEL

Vámosi György, Damjanovich Sándor, Bodnár Andrea, Szalóki Nikoletta, Volkó Julianna, Nagy Éva
Debreceni Egyetem OEC, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet

IL-15 transzprezentációja:
Az interleukin-15 a $CD8^+$ memória T sejtek fontos túlélési faktora. Receptora három alegységből (αβγ) tevődik össze. Korábbi kísérleti eredmények arra utalnak, hogy az IL-15 elsősorban ún. transzprezentáció révén fejti ki hatását. Ennek során a dendritikus sejtek vagy monociták felszínükön kifejezik a receptor α alegységét, mely megköti a ligandumot, és bemutatja azt a T vagy NK sejteken kifejezett βγ receptor heterodimernek. A folyamatot proliferációs kísérletekkel igazolták, mindeddig nem volt közvetlen bizonyíték a funkcionális receptor heterotrimer létrejöttére egy intercelluláris kölcsönhatás során. FRET mérésekkel kimutattuk, hogy a $CD4^+$ JFCI T sejtek által kifejezett IL-15Rα, amely nagy affinitással köti az IL-15 ligandumot, a $CD4^+$ KWT limfóma sejtek által kifejezett IL-15Rβ receptor alegység molekuláris közelségében helyezkedik el. Ezek a kísérletek az IL-15 transzprezentációjának első közvetlen fizikai bizonyítását jelentik.

MHC I molekulák szerepe interleukin-2/15 receptorok működésének szabályozásában:
Az IL-2 és -15 a T sejtek aktiválásában, apoptózisában és memóriasejtként való túlélésében fontos szerepet játszanak. Az MHC I fő funkciója az antigénprezentáció, de emellett kimutatták, hogy számos sejtfelszíni receptorral *cis* kölcsönhatásokat alakít ki. Az IL-2 és -15 receptorról korábban igazoltuk, hogy lipid tutajokban közös klaszterben fejeződik ki az MHC I glikoproteinnel. Arra voltunk kíváncsiak, hogy az MHC I jelenléte befolyásolja-e a receptorok összeszerelődését és működését. Ezért RNS interferenciával csendesítettük az MHC I expresszióját. FRET méréseink azt mutatták, hogy az IL-2Rα és az IL-15Rα alegységek homoasszociációja és heteroasszoasszociációja is csökkent, valamint gyengült az asszociáció az MHC I molekulákkal is. FCS mérésekkel kimutattuk, hogy a molekulaklaszterek diffúziós állandója megnőtt, azaz a klaszterméret csökkent. A géncsendesített sejtekben szignifikánsan megnőtt az IL-2 vagy IL-15 által kiváltott STAT5 foszforiláció. Az MHC I tehát gátolja az IL-2/15 jelátvitelét. További kísérleteink arra irányulnak, hogy feltárjuk a gátlás mechanizmusát. Eredményeink rámutathatnak az MHC I nem-klasszikus szerepére a T sejt aktiváció gátlásában, illetve MHC I-hez kapcsolódó autoinflammatorikus betegségek kialakulására szolgáltathatnak magyarázatot.

Membránfehérjék mobilitásának és aggregációjának függése a membránpotenciáltól:
A sérült, gyulladt szöveti területeken az extracelluláris káliumkoncentráció megnő. Ez a limfociták membránjának depolarizációját hozhatja létre. Az IL-2 és -15 receptorok β és γ alegységei működésük során foszforilálódnak, ezáltal permanens dipólmomentumra tesznek szert. Így a membránpotenciál változása hatással lehet a konformációjukra, és ezen keresztül kölcsönhatásaikra. FCS-sel kimutattuk, hogy az IL-2/15 receptorok és az MHC I és II mobilitása csökken, ha a membránt az extracelluláris káliumszint emelésével vagy a Kv1.3 feszültségfüggő káliumcsatornákat blokkoló margatoxin alkalmazásával depolarizáljuk. Arra voltunk kíváncsiak, hogy a mobilitás vajon a fehérje-fehérje kölcsönhatások változása miatt változik-e meg. A fehérjék közötti kölcsönhatásokat FRET-tel mértük. A vizsgált asszociációk erősödtek, ami összhangban áll a mobilitás csökkenésével, a klaszterméret növekedésével. Az IL-2 által kiváltott STAT5 foszforilációt a membrándepolarizáció növelte, míg az IL-15 által indukáltat nem változtatta. Ez arra utalhat, hogy a két citokin kötődése a receptorok konformációját eltérő módon befolyásolhatja.

Koleszterol-specifikus antitestek szerepe a HIV target-sejteinek membrán-remodeling folyamatában és a vírusproliferációban:

Teljes támogatás: 3.000.000,- Ft

Az ELTE Immunológiai Intézettel kollaborációban vizsgáltuk a koleszterin-ellenes antitestekkel kezelt HIV target sejtek membránfehérjéinek mobilitását FCS segítségével. A vizsgálatok egy olyan kísérletsorozatba illeszkedtek, melyekkel partnereink kimutatták, hogy a koleszterin-ellenes antitestek a HIV target-sejtjeinek membránját átrendezik és a vírusok bejutását gátolják *in vitro*.

Retinsav receptor működése a mobilitás tükrében:
A retinsav receptor (RAR) és a retinoid X receptor (RXR) a magreceptorok családjába tartozó, ligandfüggő transzkripciós faktorok, melyek az immunválaszban (pl. T sejt sors alakítása) is szerepet játszanak. Az RAR-RXR heterodimer ligand hiányában korepresszort, míg ligand jelenlétében koaktivátort köt, ami a génátíródás gátlását vagy aktiválását eredményezi. A receptorok kölcsönhatásait, működését és dinamikáját befolyásoló tényezőket érzékeny fluoreszcenciás módszerek (FCS, FRET) és molekuláris biológiai eljárások kombinációjával vizsgáltuk. Célunk a receptorműködést leíró „molekuláris kapcsoló" modell pontosítása volt. Kíváncsiak voltunk arra, hogy a megváltozott DNS-kötőképességű vagy kofaktor-kötőképességű receptorok hogyan kötődnek a kromatinhoz, és ez hogyan tükröződik mobilitásukban. A vad típusú GFP-RAR diffúziója két komponenssel írható le, melyek közül a gyorsabb (1-5 ms difúziós idejű) egy monomerre vagy egy kisméretű komplexre jellemző mobilitással rendelkezik, míg a lassabb feltehetően a DNS-hez való tranziens kötődés időállandóját tükrözi (10-50 ms). Ligandkötés hatására a lassú komplex mennyisége 30%-ról 45%-ra nő. A csak korepresszor kötésére képes mutánsok esetében a lassú komponens mennyiségének ligand által kiváltott növekedése elmarad. A teljes hosszúságú koaktivátor kötése, illetve az ehhez kapcsolódó egyéb faktorok jelenléte tehát meghatározó szerepet tölt be a lassú komponens hányadának megnövekedésében. Feltehetően megnő a receptor dimer affinitása a kromatinhoz a koaktivátor jelenlétében.

1. Vámosi G, Damjanovich S, Szöllősi J, Vereb Gy: Measurement of Molecular Mobility with Fluorescence Correlation Spectroscopy. CURRENT PROTOCOLS IN CYTOMETRY. Wiley Interscience Chapter 2:Unit2.15 (2009)
2. Balogh A, Beck Z, Kis A, Izsépi E, Cervenák L, László G, Bíró A, Liliom K, Mocsár G, Vámosi G, Füst G, Matkó J: New cholesterol-specific antibodies remodel HIV-1 target cells' surface and inhibit their in vitro virus production. JOURNAL OF LIPID RESEARCH 51: pp. 286-96 (2010) IF: 4,917
3. Berényi E, Benko I, Vámosi G, Géresi K, Tárkányi I, Szegedi I, Lukács L, Juhász I, Kiss C, Fésüs L, Aradi J. In vitro and in vivo activity of 4-thio-uridylate against JY cells, a model for human acute lymphoid leukemia. BIOCHEMICAL BIOPHYISCAL RESEARCH COMMUNICATIONS 410: pp. 682-7 (2010) IF: 2,595
4. Brázda P, Szekeres T, Bravics B, Tóth K, Vámosi G*, Nagy L* (* senior corresponding authors): Live-cell fluorescence correlation spectroscopy dissects the role of coregulator exchange and chromatin binding in retinoic acid receptor mobility. JOURNAL OF CELL SCIENCE 124: pp. 3631-42 (2011) IF: 6,29

Budget: 3.000.000.- HUF

STIMULATORY AND INHIBITORY T CELL - APC MOLECULAR INTERACTIONS OBSERVED BY BIOPHYSICAL METHODS WITH SINGLE MOLECULE SENSITIVITY

György Vámosi, Sándor Damjanovich, Andrea Bodnár, Nikoletta Szalóki, Julianna Volkó, Éva Nagy
Department of Biophysics and Cell Biology, Medical and Health Science Center, University of Debrecen

Transpresentation of IL-15:
Interleukin-15 is an important survival factor of $CD8^+$ memory T cells. Its receptor is composed of three subunits ($\alpha\beta\gamma$). Earlier results suggest that IL-15 mainly acts via a mechanism called transpresentation. In this process dendritic cells or monocytes express the α subunit of the receptor, bind the ligand and present it to a neighbouring T or NK cell expressing the βγ receptor heterodimer. The process has been proven by proliferation assays; there has been no direct physical evidence for the formation of a functional receptor heterotrimer in an intercellular interaction. By fluorescence resonance energy transfer (FRET) measurements we have shown that IL-15Rα binding ligand at the surface of $CD4^+$ JFCI T cells is in the molecular vicinity of IL-15Rβ receptor subunits expressed by $CD4^+$ KWT T lymphoma cells. These experiments are the first direct physical evidence for the transpresenation of IL-15.

The role of MHC I molecules in regulating the function of interleukin-2/15 receptors:
IL-2 and -15 play a central role in T cell activation, apoptosis and memory. The main role of MHC I is antigen presentation, but it has also been shown that it interacts in *cis* with other cell surface receptors. Earlier we have proven that that IL-2R and -15R are co-expressed with MHC I in lipid rafts. We were interested whether the presence of MHC I influences the assembly and function of interleukin receptors. Therefore we silenced MHC I expression by RNAi. Our FRET studies showed that homoassociation of IL-2Rα and IL-15Rα subunits as well as their heteroassociation decreased, and their interaction with MHC I weakened. With fluorescence correlation spectroscopy (FCS) measurements we found that the diffusion coefficient of molecular clusters increased, i.e. the cluster size diminished. In gene silenced cells IL-2/15 induced STAT5 phospohrylation significantly increased, indicating that MHC I inhibits IL-2/15 signaling. Our further experiments are aimed at clarifying the mechanism of inhibition. Our results may indicate the non-classical role of MHC I in the inhibition of T cell activation, and may help understand the mechanism of autoinflammatory diseases related to mutations of MHC I.

Dependence of the mobility and aggregation of membrane proteins on the membrane potential:
At the injured tissues the extracellular K^+ concentration increases. This may induce the depolarization of the membrane of T cells. The β and γ subunits of IL-2 and -15 receptors are phosphorylated during their function, thereby they gain a permanent dipole moment. Thus, changes of the membrane potential may influence their conformation and interactions. By using FCS we have shown that the mobility of IL-2/15 receptors and MHC I and II decreases if the membrane is depolarized by raising the extracellular K^+ concentration or by blocking Kv1.3 voltage gated K^+ channels with margatoxin. We were interested whether the mobility change is due to the alteration of protein-protin interactions. We measured protein-protein interactions by FRET. The studied associations became stronger, which is in accord with the decrease of mobility and the increase of cluster size. STAT5 phosphorylation induced by IL-2 was enhanced, whereas that induced by IL-15 did not change. This may be because of different conformational changes of the receptors induced by the two cytokines.

Role of anti-cholesterol antibodies in membrane remodeling of HIV target cells and virus proliferation:

In collaboration with the Institute of Immunology at Eötvös Loránd University we studied the mobility of membrane proteins by FCS of HIV target cells treated with anti-cholesterol antibody. These experiments were part of a study concluding that anti-cholesterol antibodies lead to reorganization of the cell membrane and inhibit the entry of viruses in vitro.

Retinoic acid receptor function in light of mobility:
Retinoic acid receptor (RAR) and retinoid X receptor (RXR) are ligand dependent transcription factors, which also play a role in immune responses (e.g. influence T cell fate). In the absence of ligand the RAR-RXR heterodimer binds corepressor, whereas in the presence of ligand it binds coactivator resulting in the repression or activation of the target gene, respectively. We studied the factors influencing the interactions, function and dynamics of the receptors by a combination of sensitive fluorescence techniques (FCS, FRET) and molecular biological tools. Our aim was to refine the above described molecular switch model of receptor function. We were interested, how the mutant receptors having altered DNA- or cofactor-binding capability can attach to the chromatin, and how this is reflected in their mobility. The diffusion of wild type GFP-RAR can be described by two components, the faster of which (1-5 ms diffusion time) has a mobility of a monomer or a small oligomeric complex, while the slow one probably reflects the time constant of transient DNA-binding (10-50 ms). Ligand binding induces an increase of the slow population from 30 to 45%. In the case of mutants capable of only corepressor binding the ligand-induced increase of the slow fraction is absent. Binding of full length coactivator and associated other transcription factors seems to be indispensable for the increase of the slow fraction. We also concluded that the affinity of the receptor dimer to chromatin probably increases in the presence of coactivator.

1. Vámosi G, Damjanovich S, Szöllősi J, Vereb Gy: Measurement of Molecular Mobility with Fluorescence Correlation Spectroscopy. CURRENT PROTOCOLS IN CYTOMETRY. Wiley Interscience Chapter 2:Unit2.15 (2009)
2. Balogh A, Beck Z, Kis A, Izsépi E, Cervenák L, László G, Bíró A, Liliom K, Mocsár G, Vámosi G, Füst G, Matkó J: New cholesterol-specific antibodies remodel HIV-1 target cells' surface and inhibit their in vitro virus production. JOURNAL OF LIPID RESEARCH 51: pp. 286-96 (2010) IF: 4.917
3. Berényi E, Benko I, Vámosi G, Géresi K, Tárkányi I, Szegedi I, Lukács L, Juhász I, Kiss C, Fésüs L, Aradi J. In vitro and in vivo activity of 4-thio-uridylate against JY cells, a model for human acute lymphoid leukemia. BIOCHEMICAL BIOPHYISCAL RESEARCH COMMUNICATIONS 410: pp. 682-7 (2010) IF: 2.595
4. Brázda P, Szekeres T, Bravics B, Tóth K, Vámosi G*, Nagy L* (* senior corresponding authors): Live-cell fluorescence correlation spectroscopy dissects the role of coregulator exchange and chromatin binding in retinoic acid receptor mobility. JOURNAL OF CELL SCIENCE 124: pp. 3631-42 (2011) IF: 6.29

ETT Nyilvántartási szám: 03-146/2009

2011. ÉVI SZAKMAI RÉSZJELENTÉS

Témavezető neve: Dr. Váradi András

Téma címe:

AZ ABCC6 TRANSZPORTER SZEREPE AZ ARTÉRIÁK MESZESEDÉSÉBEN

2011. évben elvégzett munka és az elért eredmények rövid ismertetése:

1/ A K-vitamin szerepe az ABCC6-okozta puha szöveti/érfali kalcifikációban:

1/A: *In vivo* kisérletek: Nemzetközi kollaborációban wt és Abcc6-/- állatokat etettünk különféle K-vitamin formákkal, és vizsgáltuk a puha szöveti kalcifikációs markerek megjelenését. Azt találtuk, hogy a bejutatott K-viatmin formák nem befolyásolták a meszesedés mértékét a fenotipust mutató Abcc6-/- állatokban (Brampton et al, 2011, Cell Cycle).

1/B *Ex vivo* és *in vitro* kisérletek: A wt és Abcc6-/- állatokon elvégzett májperfúziós kisérleteink, valamint sejtkultúrán és biokémiai transzport-assayk felhasználásával nyert erdeményeink azt bizonyítják, hogy a májban keletkező K3-vitamin glutation konjugatum nem szubsztrátja az ABCC6 transzporternek. (Fülöp et al, 2011 BBRC).

Fenti eredményeink azt támasztják alá, hogy a K-viatmin formák nem játszanak döntő szerepet az ABCC6-mediálta puha szöveti/érfali kalcifikációban, bár a transzporter valószinűleg szerephez jut a K-vitamin formák ADME-tulajdonságaihoz.

2/ Hasonló módszerek alkalmazásával sikerült tisztáznunk, hogy – szemben a legutóbbi hipotézisekkel – az adenozin nem szubsztrátja az ABCC6 fehérjének (Szabó et al, 2011, Mol. Genet. Metab.).

3/ Beállítottunk egy *in vivo* módszert, amely segítségével a szívizom kalcifikációja néhány napon belül vizsgálható egérben (Brampton et al, submitted).

4/ Megvalósítottuk humán ABCC6 májspecifikus expresszióját egérben. E módszer

segítségével mind a betegséget okozó mutációk májban való processzálása, mindpedig a kalcifikációs fenotipus *in vivo* „rescue"-ja vált tanulmányozhatóvá (Le Saux et al, 2011, Plos One).

5/ Nagy, az egész kutatási területete átfogó review-cikket jelentettünk meg (Váradi et al, 2011, Curr. Drug Targets).

……Bp…….. 2011. …december…….hó …12……. nap

témavezető **intézményvezető**

ph

ETT Registration number: 03-146/2009

SCIENTIFIC PARTIAL REPORT OF YEAR 2011

Name of supervisor: Dr. András Váradi

Title:

ROLE OF ABCC6 TRANSPORTER IN THE CALCIFICATION OF ARTERIES

Brief description of the completed tasks and achievements in 2011:

1/ Role of vitamin K in calcification of soft tissues/blood vessels:

1/A: *In vivo* experiments: wild-type and Abcc6-/- animals were fed with various forms of K vitamin, and the markers characteristic to soft tissue calcification were monitored in collaboration with international co-workers. We found that the investigated K vitamin forms did not alter the calcification of Abcc6-/- animals showing the proper phenotype (Brampton et al, 2011, Cell Cycle).

1/B *Ex* vivo and *in vitro* experiments: Our experiments done by liver perfusion on wt and Abcc6-/- animals *ex vivo* and either in cell culture or by various biochemical assays *in vitro* have proven that the vitamin K3 gluthation conjugate in the liver is not a substrate of ABCC6. (Fülöp et al, 2011 BBRC).

Our above results support the hypothesys that the various forms of K vitamin do not play a major role in the ABCC6 mediated soft tissue/ blood vessel calcification, though the transporter likely contributes to ADME characteristics of the K vitamin forms.

2/ Applying similar approches we have demonstrated that, in contrast to the previous hypothesis, adenosin is not a substrate of the ABCC6 protein (Szabó et al, 2011, Mol. Genet. Metab.).

3/ We have set up an *in vivo* method suitable for investigating the appearance of heart muscle calcification in a few days interval. (Brampton et al, submitted).

4/ We have expressed human ABCC6 in mice in a liver specific manner. With this approach both the processing of the disease causing ABCC6 mutants and the rescue of the calcification phenotype by the expressed constracts are possible to investigate. (Le Saux et al, 2011, Plos One).

5/ We have published a broad review giving panoramic view of the entire scientific field. (Váradi et al, 2011, Curr. Drug Targets).

..... December, 2011, Budapest

Supervisor **Head of the Institution**

ph

2 cm

Teljes támogatás: 2.400.000.- Ft

A VASTÚLTERHELŐDÉS NÉPEGÉSZSÉGÜGYI JELENTŐSÉGE

Várkonyi Judit [1], Prohászka Zoltán[1], Kalabay László [2]
[1]SE III.sz. Belgyógyászati Klinika, [2]SE, Családorvosi Tanszék

A pályázat célja szerint a 2009 decembertől 2011 decemberig eltelt 2 naptári évben 15986 személy szűrése történt meg. Ezek közül a májfunkció kóros értéke alapján 40 egyén került kiemelésre, akiknek a transferrin saturátiós értékük 45% feletti volt. Ezek közül 11 a hematológiai ambulantiánkra irányított beteg volt. A többi egyén beküldő orvosainak további vizsgálatokra szóló felhívást küldtünk ki. 5 személy jelentkezett eddig a felhívásunkra, ezek közül: 2 HFE wt, 1 C282Y heterozygota, 1 H63D homozygota és 1 H63D heterozygota volt. A találati arány tehát elég jónak mondható. A Medsolból azonban az eddig meg nem jelentekről megtudhattuk, hogy 7 tumor miatt, 5 autóimmun folyamat miatt, 14 pedig alkoholizmus miatt gondozott beteg.
A hematológiai ambulanciára célzottan vasanyagcsere zavarra utaló labor miatt került, vagy az eddigi ismeret terjesztő és háziorvosoknak adott előadások, publikációk,media szereplések nyomán az ambulantiára irányított betegek esetében homozygota/compound heterozygota: 12, H63D homozygota: 1, 19 H63D/C282Y heterozygota illetve 33 HFE vad típus derült ki. Ez utóbbiak többnyire alkohol betegek voltak. A heterozygota állapot részben családvizsgálat során derült ki, részben májbetegség, vascularis esemény, tumoros betegség kivizsgálása során, diabetes gondozás esetén derült ki. Volt, akinél rendszeres alkohol, C-vitamin vagy zöld tea fogyasztás derült ki a magasabb vas érték hátterében.
Az eltelt 2 naptári évben tehát összesen 14 Hemochromatotisos (HH) beteg került felismerésre. Összetételük szerint: 11 ffi és 3 nő, 4 C282Y homozygota, 4 H63D homozygota és 6 compound heterozygota mutans. A heterozygoták száma: 33 volt. A betegeket gondozásba vettük, a heterozygotákat pedig életmód beli útmutatásokkal valamint a tumor szűrés fontosságára figyelmüket felhívva bocsátottuk el.
Tehát a kiszűrt, de behívásunkra még meg nem jelent 35 beteg gén statusáról nincs információnk. A felszólítót ismételten megküldjük számukra.
Megbízás alapján ezen kívül 1/ Fémion meghatározás történt MDS betegek sérumában és teljes vérre vonatkozóan (Dr.Szentmihályi Klára MTA Kémiai Intézet). Az eddigi eredmények szerint a MDS betegek vvs fémion koncentrációja eltér a normal kontrollokban mértekétől. Ennek lehet terápiás jelentősége, különös tekintettel a Líthium és Calcium signifikánsan alacsonyabb koncentrációja miatt. A Líthiumról ugyanis ismert, hogy terápiás agadban képes a sejtszámok emelésére cytochin válasz révén; a D-vitamin pótlásról pedig ismertté vált, hogy előnyös lehet tumoros betegségek kemoprevenciójára.(1/ Focosi D et al. Lithium and hematology: established and proposed uses. J Leuk Biol 85. Jan. 2009. 2/Callens C et al. Targeting iron homeostasis induces cellular differentiation and synergizes with differentiating agents in acute myeloid leukemias. J Exp Med 2010; 207/4/:731-750.)
2/ROS értékelés (SE I.sz. Pathológiai Intézet. Dr.Barna Gábor): Az áramlási citometria mérések során vizsgáltuk a reaktív oxidatív gyökök fejlődését MDS-es betegek vérében.

Ghoti H. és mtsai 2007-ben kimutatták, hogy oxídatív gyökök mennyisége növekedett a vérlemezkékben és a vörösvértestekben (vvt) MDS-s betegek vérében egészséges kontroll mintákhoz képest. Ghoti –val egyezően mi is azt találtuk, hogy a vérlemezkékben és vvt-kben jelentősen megnövekszik a ROS termelés MDS betegekben.
3/ Serum réz meghatározás (Dr. Bekő Gabriella, SE Központi Laboratórium) történt HH és MDS betegek esetében. A vas és a réz irodalomból megismert, a felszívódás szintjén történő kompetícióját kihasználva törekedtünk a rézszint korrekciójára azon HH és MDS betegek esetében, akiknél a réz / coeruloplasmin szint alacsonynak bizonyult. Az ebben a témában elért eredményeinkről az MDS Springer könyv 11-es fejezetében számoltunk be.
4/ HH és MDS betegek esetében serum hepcidin meghatározást végeztünk a francia partnerrel (Pierre Brissot, Rennes) történt együttműködésben. Eredményeinket kéziratban foglaltuk össze, melynek bírálata még tart. Lényegét tekintve azt találtuk, hogy MDS-ben a hepcidin (H) szintre ellentétes folyamatok hatnak: az anemia önmagában H szintet csökkentő, ugyanakkor a transzfúziós terápia azt emelő hatású a normális regulációból adódóan. A HH betegek estén a H szint alacsony. Olyan MDS betegek esetében, akik RARS subtípushoz tartoznak és / vagy HFE génmutációt hordoznak, a H szint magas lehet a várttól eltérően, de erre a transzfúziós kezelés szolgál magyarázatul. Az irodalomban egyedülálló felismerésként azt találtuk, hogy MDS-ben a ferritin/hepcidin ratio szerint az abszolut értelemben magas H szint ellenére a ferritin értékhez képest relative H elégtelenséggel kell számolnunk. A tanulmányban javaslatot teszünk arra, hogy az MDS betegek vizsgálatához tartozzon hozzá a HFE génvizsgálat is, mert génmutáció jelenlétében a vastúlterhelődés kialakulásának fokozott kockázata megjósolható.
5/ a kutatásokra fordított pénz maradékát HFE génmeghatározás költségeinek fedezésére fordítottuk. Ideális lenne, ha ezt a génvizsgálatot a biztosító befogadná és a költségeit fedezné. A jövőben megpróbálunk lépéseket tenni ez ügyben.
Összefoglalva: a fenti módon véghezvitt populáció szűréssel eddig- a felhívásra jelentkezők kis száma miatt- kevés HH beteg került kiszűrésre, azonban a nagy számban felfedezett heterozygota miatt a szűrés jelentősége a daganat prevenció nyújtotta lehetőségekben van.
A további terveink: tervezzük a pályázat révén nyert adatok további elemzését illetve egy esetleges további pályázatban azt megnézni, hogy egyes solid tumoros megbetegségek esetében, nagyszámú beteganyagot véve alapul, milyen arányú lesz a heterozygoták részvétele. Az eddigi eredmények ugyanis azt mutatják, hogy a vastúlterhelődés fokozott veszély a szöveti integritás szempontjából, fokozza a daganatos kockázatot és mivel ez a heterozygota állapotban is kimutatható, a HH beteg és családjuk esetében a tumor szűrés jelentősége fokozottan érvényes.

THE SIGNIFICANCE OF IRON OVERLOAD ON PUBLIC HEALTH

Judit Várkonyi [1], Zoltán Prohászka[1], László Kalabay[2]
[1]Semmelweis University, 3rd Department of Internal Medicine [2] Semmelweis University, Faculty of Family Doctors

Accoring to the grant's goals in the two year period from December 2009 to December 2011 the screening of 15986 subjects had been carried out.
Out of them 40 persons had been picked out on the basis of their abnormal liver function tests and also on their transferrin saturation levels that were higher than 45%.
Invitation letter were sent out to the addresses of the family doctors of these 40 persons to perform the genetic test. Only 5 persons came among 2 were HFE wt, 1 was C282Y heterozygote, 1 was H63D homozygote and 1 was H63D heterozygote. From this result it is clearly seen that the hit score is quite good.
From the Medsol system we could be informed on that those who were screened out 7 were cared for malignancies, 5 for autoimmune disease and 14 suffered from alcohol dependency.
Other patients from other sources who had laboratory alterations and visited our center because their doctors directed them to us upon internet information, or other publications and media presentations, C282Y homozygote / compound heterozygote were 12, H63D homozygote: 1, either H63D or C282Y heterozygote were 19 and 33 were HFE wt subjects. Most of the HFE wt subjects were regular alcohol abusers or consumed vitamine C or green tea regularily. Heterozygotes were found when involved families were screened or when liver disease, vascular events, malignant processes were investigated or in diabetes care.
In the past calendar 2 years all in all 14 HH patients were disclosed: male 11, female 3, C282Y homozygote 4, H63D homozygote 4, compound heterozygote: 6. Heterozygotes were 33.
Being aware of HFE results, HH patients entered our care protocol system and those who were heterozygote had been educated for the importance of tumour screening and to keep healthy life stile.
For the 35 subjects who had not come to further genetic investigation we send them invitation letter again.
Upon commission
1/ Trace element determination has been carried out in MDS patients and in healthy controls (Dr. Klara Szentmihályi. Department of Chemistry, Hungarian Academy of Sciences). Our preliminary results show that certain trace element concentrations in MDS red blood cells significantly less then that of controls. This could be of therapeutic significance especially regarding on Lithium and Calcium.
It is known that Li in therapeutical does might increase cell counts through cytochin signaling, and regular vitamin D and calcium intake might be advantageous for chemoprevention of malignancies (1/ Focosi D et al. Lithium and hematology: established and proposed uses. J Leuk Biol 85. Jan. 2009. 2/ Callens C et al. Targeting iron homeoastasis induces cellular differentiation and synergizes with differentiating agents in acute myeloid leukemias. J Exp Med 2010; 207/4/:731-750.).

2/ Reactive oxygen species (ROS) evaluation (Dr. Gábor Barna at Semmelweis Univ. 1st Dept.Pathology): ROS formation was studied by flow cytometry analysis in MDS patients and our results in line with those of Ghoti H et al 2007, that in MDS RBCs and Thrombocytes ROS generation is significantly higher than in those of normal controls.
3/ Serum copper and coeruloplasmin determination were performed in HH and MDS patients (Dr. Gabriella Bekő, Semmelweis University, Central Laboratory). The aim was to exploit the known competition between iron and copper at the level of absorption to decrease iron influx from the gut. Moreover the correction of copper and coeruloplasmin level helps to decrease iron overload and iron toxicity in both HH and MDS patients. Our results had been published in the Springer book edition titled as The Myelodysplastic Syndromes, in chapter 11).
4/ Serum Hepcidin (H) determination had been carried out in Pierre Brisso laboratory in Rennes, France. Our results are included in a manuscript that is already under review. The main message is that H level in MDS is a result of conflicting influences: anemia itself reduces but regular blood tranfusion elevates H level. In HH the H level is low. In those MDS patients who have the RARS subtype and /or have HFE gene mutations the ferritin/hepcidin ratio reflecting best the relaive H insufficiency is higher than the other MDS patients. In the study we suggest to perform the HFE gene analysis upfront in MDS because in the presence of either of the mutations in the HFE gene the early onset and the most severe iron overload might be prognosed.
5/ The sum left from above commissions our scientific laboratory (Dr.Zoltan Prohászka) has been consumed for genetic testing. It would be an ideal situation if our health insurance company would finance the test in the future.
In summary: by our population screening we could disclose less HH patients then it was expected. This is however explained by the low answering rate on our invitations. The relative high number of heterozygotes however underlines the importance of this screening in the possible prevention of malignancies.
Future plans: to analyse further study data and to continue in disclosing more HH patients and heterozygotes as well. We are interested in evaluating HFE gene mutation in big patients cohorts of different malignancies to reveal the real importance of heterozygozity in the development of different neoplasms- probable by new grant application.

Teljes támogatás: 4.500.000,- Ft

AZ ENDOCITÓZIS FOLYAMATÁNAK TÉRBELI ÉS IDŐBELI FELBONTÁSÁRA ALKALMAS MOLEKULÁRIS MÓDSZER KIDOLGOZÁSA ÉLŐ SEJTBEN

Várnai Péter, Tóth Dániel J.
Semmelweis Egyetem, Élettani Intézet

Az endocitózis egyrészt alapvető szerepet játszik bizonyos tápanyagok és kórokozók sejtbe jutásában, másrészt a plazmamembrán receptorok sejtfelszíni számának, és ezen keresztül a sejtek adott anyagok (hormonok, neurotranszmitterek) iránti érzékenységének szabályozásában. A folyamat adott sejtfelszíni receptor aktiválódásával kezdődik, amit a receptor foszforilációja és/vagy ubiquitinációja követ. Következő lépésként adaptor molekulák kezdenek el kötődni a receptorhoz (arresztin, epszin, AP-2 stb.), és a receptor elindul a sejtmembrán bizonyos jól definiált pontja felé (lipid raft, klatrin burkos gödör). Ezután kezdődik a sejtmembrán görbítése, az endocitotikus vezikula lefűződése, majd sejten belüli mozgása, bizonyos membránokkal történő fúziója. Az endocitózis kivitelezésének és szabályozásának vizsgálata során több tucat fehérjét azonosítottak, de arról, hogy ezek az endocitózis melyik típusában, illetve mely receptorok esetében működnek, kevés az összehasonlító vizsgálat.

Jelen támogatásból egy olyan módszert fejlesztettünk ki, amely alkalmas plazmamembrán fehérjék endocitózisának követésére oly módon, hogy a fehérjéket luciferáz enzimmel jelöltük meg, amely bioluminescens energiatranszfer mérésével lehetővé teszi annak kimutatását, hogy a fehérje egy Venus fluoreszcens fehérjével megjelölt környezetbe érkezik. Ezzel a technikával képesek voltunk számos plazmamembrán receptor esetében (AT1-es angoitenzin II, 2C szeretonin, β2 adrenerg és EGF receptor) kimutatni azok ingerlés következtében történő sejtmembránról való lefűződését, és endocitotikus vezikulákba történő megérkezését HEK 293 sejtekben. Megállapítottuk, hogy a plazmamembrán foszfaidilinozitol 4,5-bioszfoszfát (PIP2) depléciója nem gátolja sem a G fehérjéhez kapcsolt receptorok β-arresztin 2 kötését, sem a receptorok (beleértve az EGF receptort is) klatrin burkos gödröcskékbe jutását, azonban megakadályozza ez utóbbi membránról való lefűződését.

Vizsgálatainkhoz szükséges volt a rapamicin-függő plazmamembrán PIP2 depléciós rendszer fejlesztésére. A T2A peptidek beépítésével egyrészt megoldottuk a rendszer működéséhez szükséges két fehérje egyetlen plazmidról való 1:1 arányú expresszióját, másrészt hasonlóan a plazmamembrán PIP2 szintjének csökkentéséhez, megvalósítottuk a Golgi foszatidilinozitol 4-foszfát (PI4P) depléció kérdését is. Kollaborációban vizsgáltuk más folyamatok, úgymint a kapacitatív Ca^{2+}-influx lipid szabályozását, és megállapítottuk, hogy a folyamat független a plazmamembrán PIP2 szintjétől, viszont jelentősen gátolható a plazmamembrán PI4P szintjének csökkentésével. A rapamicin-függő heterodimerizáció alkalmazásával képesek voltunk membránok közötti kapcsolat módosítására, illetve ezekbe a kontaktpontokba különféle szenzorok (például Ca^{2+} szenzor) bejuttatására. Mindez lehetővé tette a mitokondriumok és az endoplazmás retikulum közötti interakció jelentőségének kimutatását, és a kapcsolat következtében kialakuló lokális Ca^{2+} koncentráció kvantitatív meghatározását.

1.) Korzeniowski MK, Popovic MA, Szentpetery Z, **Varnai P**, Stojilkovic SS, Balla T: J BIOL CHEM 284: 21027-21035 (2009) IF: 5.328
2.) Szentpetery Z, **Varnai P**, Balla T: P NATL ACAD SCI USA 107: 8225-8230 (2010) IF: 9.771
3.) Korzeniowski MK, Manjarres IM, **Varnai** P, Balla T: SCI SIGNAL 3: ra82 (2010) IF: 6.120
4.) Csordas G*, **Varnai P***, Golenar T, Roy S, Purkins G, Schneider TG, Balla T, Hajnoczky G: MOL CELL 39: 121-132 (2010) IF: 14.194
5.) Csordas G, **Varnai P**, Golenar T, Sheu SS, Hajnoczky G: MOL CELL ENDOCRINOL doi: 10.1016/j.mce.2011.11.011 (2011) IF: 4.119
6.) Tóth DJ, Tóth J, Gulyás G, Balla A, Balla T, Hunyady L, **Várnai P**: J CELL SCI *in press* (2012) IF: 6.290

*osztott elsőszerzőség

Teljes támogatás: 4.500.000,- Ft

DEVELOPMENT OF A MOLECULAR METHOD TO INVESTIGATE THE SPATIO-TEMPORAL CHARACTERISTICS OF ENDOCYTOSIS IN LIVE CELLS

Péter Várnai, Dániel J. Tóth
Department of Physiology, Semmelweis University

Endocytosis plays an essential role in the delivery of certain nutrients and pathogens into the cells. Furthermore, the number of plasma membrane receptors on the cell surface, and thus the sensitivity of cells to certain ligands (hormones, neurotransmitters) are also regulated by endocytosis. The endocytic process is initiated by the activation of the receptor, followed by its phosphorylation and/or ubiquitination. The next step is the binding of adaptor molecules (e.g. arrestin, epsin, AP-2) to the receptor, which is then directed to specific regions of the cell membrane (lipid rafts, clathrin-coated pits). The cell membrane is then invaginated, the endocytic vesicles are cut off the membrane and are transported within the cell to finally fuse with specific intracellular membranes. Dozens of proteins have been identified as participants in the generation and regulation of endocytosis. However, only very few comparative studies have examined the relative importance of these proteins in the various types of endocytosis, or in the endocytosis of different receptors.

This grant was used to develop a method for the monitoring of the endocytosis of plasma membrane proteins. Proteins were tagged with a luciferase enzyme, which allowed the detection of their presence or appearance in areas labeled by the Venus fluorescent protein through the measurement of bioluminescence resonance energy transfer. Using this method, we were able to detect the removal of various plasma membrane receptors (AT1 angiotensin II, 2C serotonin, β2 adrenergic and EGF receptors) from the plasma membrane upon stimulation and their subsequent arrival in endocytic vesicles in HEK 293 cells. We found that the depletion of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) from the plasma membrane does not inhibit the β-arrestin 2 binding of G protein-coupled receptors, and does not hinder the delivery of receptors (including the EGF receptor) to clathrin-coated pits. However, it prevents the fission of these pits from the plasma membrane.

For our studies the further development of the rapamycin-based plasma membrane PIP2-depletion system was needed. By applying T2A peptides we managed to express the two proteins of the depletion system from a single plasmid in equimolar quantities, and similarly to the PIP2-depletion of the plasma membrane, we also achieved the reduction of phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P) levels in the Golgi. We studied the lipid regulation of other processes, such as the store-operated Ca^{2+}-influx in collaboration. We concluded that this process was independent of plasma membrane PIP2 levels, but can be significantly inhibited by the reduction of PI4P in the plasma membrane. With the help of the rapamycin-inducible heterodimerization system we were also able to modify intermembrane connections, and we managed to target various sensors (e.g. a Ca^{2+} sensor) into these intermembrane contact points. These achievements allowed us to highlight the importance of the connection between mitochondria and the endoplasmic reticulum, and to quantitatively measure local Ca^{2+} levels resulting from this connection.

1.) Korzeniowski MK, Popovic MA, Szentpetery Z, **Varnai P**, Stojilkovic SS, Balla T: J BIOL CHEM 284: 21027-21035 (2009) IF: 5.328
2.) Szentpetery Z, **Varnai P**, Balla T: P NATL ACAD SCI USA 107: 8225-8230 (2010) IF: 9.771
3.) Korzeniowski MK, Manjarres IM, **Varnai** P, Balla T: SCI SIGNAL 3: ra82 (2010) IF: 6.120
4.) Csordas G*, **Varnai P***, Golenar T, Roy S, Purkins G, Schneider TG, Balla T, Hajnoczky G: MOL CELL 39: 121-132 (2010) IF: 14.194
5.) Csordas G, **Varnai P**, Golenar T, Sheu SS, Hajnoczky G: MOL CELL ENDOCRINOL doi: 10.1016/j.mce.2011.11.011 (2011) IF: 4.119
6.) Tóth DJ, Tóth J, Gulyás G, Balla A, Balla T, Hunyady L, **Várnai P**: J CELL SCI *in press* (2012) IF: 6.290

* These authors contributed equally to the work

Teljes támogatás: 6.000- eFt

AZ IDEGSZÖVET VÉDEKEZŐ MECHANIZMUSAI KÖRNYEZETI KÁROSÍTÓ TÉNYEZŐKKEL SZEMBEN. A KINURENINEK ÉS ANALÓGJAI

Vécsei László[1,] Toldi József[2], Fuzik János[2]

[1]SZTE, ÁOK, Neurológiai Klinika és [2]TTIK, Fiziológiai, Anatómiai és Idegtudományi Tanszék, Szeged

Környezeti toxikus ágensek vagy endogén excitotoxinok fokozottabban aktiválva az excitatorikus receptorokat (ER) komoly szerepet tölthetnek be a neurodegeneratív kórképek kialakulásban. A kinurénsav (KS) a triptofán metabolizmus endogén metabolitja –mint széles spektrumú ER antagónista- protektív szerepet játszhat a neurológiai kórképek létrejöttében. Jelen programban újonnan szintetizált KS analógok idegrendszeri hatásait vizsgáltuk. A KS-amidok nem váltottak ki jelentős magatartásfarmakológiai változást. Az analógok (különösen KS-1) további vizsgálatokra érdemes vegyületnek bizonyultak *(Nagy és mtsai. 2010)*. Az új KS-analóg metabolizmusát követtük egér szérumban a KS koncentráció időbeni változásának mérésével. A vizsgálatok a molekula viszonylag jó *in vivo* stabilitását igazolták *(Zádori és mtsai. 2011a)*. A négy ér occlusios ischemás modellben patkányokon neuroprotektív hatást találtunk a vegyület perifériás injektálásakor. Ez az effektus jelentős volt az előkezelést követően, de a reperfusio alatt adva is szignifikánsnak bizonyult *(Gellért és mtsai. 2011)*. A Huntington kór transgenikus egérmodelljében (N171-82Q) igen kedvező hatásúnak bizonyult a molekula: növelte a transgenikus egerek túlélését, javította a lokomotoros aktivitást, csökkentette a testtömeg veszteséget és gátolta a striatális neuronok atrophiáját *(Zádori et al. 2011b)*. A KA, illetve analógjai minden bizonnyal a migrén pathomechanismusában is szerepet játszhatnak. Antinociceptív hatást fejthetnek ki a peripherian, a trigeminális nucleus caudalisban és befolyásolhatják a migrén generátort, illetve a corticalis tovaterjedő gátlást is *(Fejes és mtsai 2011, Párdutz és mtsai közlés alatt)*. Kedvezően módosítva a kinurenin anyagcserét olyan farmakológiai hatást érhetünk el, amely a jelenleg alkalmazott memantin mellett az Alzheimer kór kezelésében terápiás alternatíva lehet *(Kincses és mtsai. 2010, Plangár és mtsai 2011, Sas és mtsai 2010)*. KA-analógok alkalmazása, illetve az endogén triptofán / kinurenin metabolizmus befolyásolása lehetséges terápiás stratégiává válhat a Parkinson kór kezelésében is *(Szabó és mtsai. 2011, Zádori és mtsai közlés alatt)*.

Közlemények

Fejes, A., Párdutz, Á., Toldi, J., **Vécsei, L.**: Kynurenine metabolites and migraine: experimental studies and therapeutic perspectives. *Current Neuropharmacol. 9, 376-387, 2011. IF:2,783 (2010)*

Gellért, L., Füzik, J., Göblös, A., Sárközi, K., Marosi, M., Kis, Zs., Farkas, T., Szatmári, I., Fülöp, F., **Vécsei, L.,** Toldi, J.: Neuroprotection with a new kynurenic acid analog in the four-vessel occlusion model of ischemia. *Eur. J. Pharmacol. 667:182-187, 2011. IF: 2,737 (2010).*

Teljes támogatás: 6.000- eFt

Kincses, Zs.T., Toldi, J., **Vécsei, L.:** Kynurenines, neurodegeneration and Alzheimer's disease.
J. Cell. Mol. Med. 14, 2045-2054, 2010. IF: 4,608 (2010)

Nagy, K., Plangár, I., Tuka, B., Gellért, L., Varga, D., Demeter, I., Farkas, T., Kis, Zs., Marosi, M., Zádori, D., Klivényi, P., Fülöp, F., Szatmári, I., **Vécsei, L.,** Toldi, J.: Synthesis and biological effects of some kynurenic acid analogs. *Bioorganic. Med. Chem. 19, 7590-7596, 2011. IF: 2,978 (2010)*

Párdutz, Á., Fejes, A., Bohár, Zs., Tar, L., Toldi, J., **Vécsei, L.**: Kynurenines and headache. *J. Neural. Transmission in press, 2012. IF: 2,597 (2010)*

Plangár, I., Zádori, D., Klivényi, P., Toldi, J., **Vécsei, L**.: Targeting the kynurenine pathway-related alterations in Alzheimer's disease: a future therapeutic strategy. *J. Alzheimer's Disease 24, 199-209, 2011. IF:4,261 (2010)*

Sas, K., Párdutz, Á., Toldi, J**., Vécsei, L.:** Dementia, stroke and migraine: Some common pathological mechanisms. *J. Neurol. Sci. 299, 55-65, 2010. IF: 2,167 (2010)*

Szabó, N., Kincses, Zs.T., Toldi, J**., Vécsei, L.:** Altered tryptophan metabolism in Parkinson's disease: A possible novel therapeutic approach. *J. Neurol. Sci. 310, 256-260, 2011. IF: 2,167 (2010)*

Zádori, D., Ilisz, I., Klivényi, P., Szatmári, I., Fülöp, F., Toldi, J., **Vécsei, L.,** Antal, P.: Time-course of kynurenic acid concentration in mouse serum following the administration of a novel kynurenic acid analog. *J. Pharmac. Biomed. Anal. 55, 540-543, 2011a. IF:2,733 (2010)*

Zádori, D., Nyíri, G., Szőnyi, A., Szatmári, I., Fülöp, F., Toldi, J., Freund, T.F., **Vécsei, L.,** Klivényi, P.: Neuroprotective effects of a novel kynurenic acid analogue in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J. Neural. Transm. 118, 865-875, 2011b. IF:2,597 (2010)*

Zádori, D., Klivényi, P., Toldi, J., Fülöp, F**., Vécsei, L.:** Kynurenines in Parkinson's disease: therapeutic perspectives. *J. Neural. Transm. in press, 2012, IF:2,597(2010)*

Teljes támogatás: 6.000- eFt

PROTECTIVE MECHANISMS OF NEURONAL TISSUE AGAINST ENVIRONMENTAL TOXIC FACTORS. THE ROLE OF KYNURENINES AND THEIR ANALOGUES.

Vécsei, László[1], Toldi, József[2], Fuzik, János[2]
[1]Department of Neurology and [2]Department of Physiology, Anatomy and Neuroscience, University of Szeged, Szeged, Hungary

The overactivation of excitatory receptors (ER) by environmental toxic factors or endogenous excitotoxins plays a key role in the pathomechanism of several neurodegenerative disorders. Kynurenic acid (KYNAC) is an endogenous product of the tryptophan metabolism and, as a broad-spectrum antagonist of ER, may serve a protective agent in neurological disorders. Synthesis and biological effects of some KYNAC analogs were investigated. Behavioral studies with these KYNAC amides demonstrated that they do not exert significant nonspecific general side-effects. KYNAC-1 may be considered a promising candidate for further investigations *(Nagy et al. 2010)*. It was studied the time-course of KYNAC concentration in mouse serum following the administration of the novel KYNAC analog. The results point to the good *in vivo* stability of this KYNAC amide *(Zádori et al. 2011a)*. It was found neuroprotection with the KYNAC analog in the four-vessel occlusion model of ischemia of rats. This effect was robust in the event of pretreatment, and also when the drug was administered at the time of reperfusion *(Gellért et al. 2011)*. In the transgenic mouse model of Huntington's disease (N171-82Q) the analog exhibited several significant effects: it prolonged the survival of the transgenic mice, ameliorated their hypolocomotion, prevented the loss of weight and completely prevented the atrophy of the striatal neurons *(Zádori et al. 2011b)*. KYNAC and its derivatives may act as modulators at various levels of the pathomechanism of migraine. They can give rise to antinociceptive effects at the periphery, in the trigeminal nucleus caudalis, and may also act on migraine generators and cortical spreading depression *(Fejes et al. 2011, Párdutz et al in press)*. Drugs targeting the kynurenine pathway would serve as an alternative choice amongst anti-glutamate agents in addition to the currently availabe memantine in the treatment of Alzheimer's disease *(Kincses et al. 2010, Plangár et al. 2011, Sas et al. 2010)*. The use of KYNAC analogs or prodrugs, or modulation of the activities of intrinsic enzymes of the tryptophan/ kynurenine pathway is a possible therapetutic strategy of Parkinson's disease *(Szabó et al. 2011, Zádori et al. in press)*.

References

Fejes, A., Párdutz, Á., Toldi, J., **Vécsei, L.**: Kynurenine metabolites and migraine: experimental studies and therapeutic perspectives. *Current Neuropharmacol. 9, 376-387, 2011. IF:2,783 (2010)*

Gellért, L., Füzik, J., Göblös, A., Sárközi, K., Marosi, M., Kis, Zs., Farkas, T., Szatmári, I., Fülöp, F., **Vécsei, L.,** Toldi, J.: Neuroprotection with a new kynurenic acid analog in the four-vessel occlusion model of ischemia. *Eur. J. Pharmacol. 667:182-187, 2011. IF: 2,737 (2010).*

Kincses, Zs.T., Toldi, J., **Vécsei, L.:** Kynurenines, neurodegeneration and Alzheimer's disease.

Teljes támogatás: 6.000- eFt

J. Cell. Mol. Med. 14, 2045-2054, 2010. IF: 4,608 (2010)

Nagy, K., Plangár, I., Tuka, B., Gellért, L., Varga, D., Demeter, I., Farkas, T., Kis, Zs., Marosi, M., Zádori, D., Klivényi, P., Fülöp, F., Szatmári, I., **Vécsei, L.,** Toldi, J.: Synthesis and biological effects of some kynurenic acid analogs. *Bioorganic. Med. Chem. 19, 7590-7596, 2011. IF: 2,978 (2010)*

Párdutz, Á., Fejes, A., Bohár, Zs., Tar, L., Toldi, J., **Vécsei, L.**: Kynurenines and headache. *J. Neural. Transmission in press, 2012. IF: 2,597 (2010)*

Plangár, I., Zádori, D., Klivényi, P., Toldi, J., **Vécsei, L**.: Targeting the kynurenine pathway-related alterations in Alzheimer's disease: a future therapeutic strategy. *J. Alzheimer's Disease 24, 199-209, 2011. IF:4,261 (2010)*

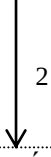
Sas, K., Párdutz, Á., Toldi, J**., Vécsei, L.:** Dementia, stroke and migraine: Some common pathological mechanisms. *J. Neurol. Sci. 299, 55-65, 2010. IF: 2,167 (2010)*

Szabó, N., Kincses, Zs.T., Toldi, J**., Vécsei, L.:** Altered tryptophan metabolism in Parkinson's disease: A possible novel therapeutic approach. *J. Neurol. Sci. 310, 256-260, 2011. IF: 2,167 (2010)*

Zádori, D., Ilisz, I., Klivényi, P., Szatmári, I., Fülöp, F., Toldi, J., **Vécsei, L.,** Antal, P.: Time-course of kynurenic acid concentration in mouse serum following the administration of a novel kynurenic acid analog. *J. Pharmac. Biomed. Anal. 55, 540-543, 2011a. IF:2,733 (2010)*

Zádori, D., Nyíri, G., Szőnyi, A., Szatmári, I., Fülöp, F., Toldi, J., Freund, T.F., **Vécsei, L.,** Klivényi, P.: Neuroprotective effects of a novel kynurenic acid analogue in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J. Neural. Transm. 118, 865-875, 2011b. IF:2,597 (2010)*

Zádori, D., Klivényi, P., Toldi, J., Fülöp, F**., Vécsei, L.:** Kynurenines in Parkinson's disease: therapeutic perspectives. *J. Neural. Transm. in press, 2012, IF:2,597(2010)*



Budget: 4,500,000.- HUF

AZ ÖREGEDÉSI FOLYAMAT LASSÍTÁSA (ÉLETHOSSZ NÖVELÉSE) ÉS AZ IDŐSKORI DEGENERATÍV FOLYAMATOK KIALAKULÁSÁNAK KÉSLELTETÉSE GENETIKAI ÉS FARMAKOLÓGIAI ESZKÖZÖKKEL: AUTOFÁGIA INHIBÍTOROK KERESÉSE

Vellai Tibor[1], Kovács Attila Lajos[2], Sigmond Tímea[1], Vellainé Takács Krisztina[1], Barna János[1], Billes Viktor[1]
Eötvös Loránd Tudományegyetem, [1]Genetikai Tanszék és [2]Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék

A 2009-2011-es kutatási periódusban elért eredmények:
1, Az öregedési folyamat egyik fő szabályozó rendszere az inzulin/IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*) útvonal, amely növekedési faktorok és a tápanyag ellátottság függvényében hormonálisan állítja be a sejtek metabolikus aktivitását. E jelátviteli rendszer *downstream* effektora a FoxO transzkripciós faktor, amely (vagy amelynek izoformái) a célgének expressziós aktivitásán keresztül szabályozza az élettartamot fonalférgekben, rovarokban és emlősökben egyaránt. Érdekes jelenség, hogy számos ivarosan szaporodó állati fajban a két nem élettartama szignifikánsan eltér egymástól. Emberben például a nők várható élettartama 3-5 évvel hosszabb a férfiakénál, és ennek megfelelően a nőkben később alakulnak ki időskori degeneratív betegségek. A fonalféreg *Caenorhabditis elegans*-ban a szomatikus szexuális differenciációt az ún. szex-determinációs génkaszkád szabályozza, amelynek terminális (effektor) transzkripciós faktora a TRA-1 fehérje. A TRA-1 a humán GLI (*Glioma-associated*) fehérjék (a *Hedgehog* – Hh – útvonal komponense) féreg ortológja. A TRA-1 a hím-specifikus gének represszálásán keresztül határoz meg hermafrodita sejtsorsot (a TRA-1 hímnősekben aktív, míg hímekben inaktív). Bioinformatikai eszközökkel genom szinten meghatároztuk a TRA-1 potenciális célgénjeit (Hargitai és mtsai; 2009); ezek egyike a FoxO-szerű faktort kódoló *daf-16*. Kimutattuk, hogy a TRA-1 aktivitás megváltozása (*tra-1* funkcióvesztéses és funkcónyeréses mutánsokban) jelentősen befolyásolja a *daf-16/FoxO* expresszióját. Ezzel összhangban a TRA-1 fehérje képes kötődni a *daf-16/FoxO* potenciális promóter (szabályozó) eleméhez, valamint a *tra-1* funkcónyeréses mutánsok 2-3 nappal (20-30%-kal) tovább élnek a normális *tra-1(+)* állatoknál. A hermafrodita állatok élettartama is 20%-kal meghaladja a hímek élettartamát. Eredményeink alapján elmondható, hogy a TRA-1/GLI aktiválja a *daf-16/FoxO* transzkripcióját. Mivel a DAF-16/FoxO az autofágia (sejtes önemésztés) szabályozásán keresztül hat az öregedési folyamat sebességére, a TRA-1/GLI rendszer - és ezen keresztül a Hh útvonal - egy új *upstream* szabályozója a FoxO-autofágia tengelynek (Hotzi és mtsi; *Sex-specific regulation of aging* – kézirat elkészítés alatt).
2, *C. elegans* öregedési modellben az apoptotikus génkaszkád fontos szerepet játszik az élettartam meghatározásában és számos egyedfejlődési lépésben. Kimutattuk, hogy az autofág gének és az apoptotikus génkaszkád redundáns módon szabályozzák a *C. elegans* korai egyedfejlődését: apoptózis; autofágia deficiens kettősmutáns (vagy RNS interferencia kezelt) állatok súlyos morfológiai rendellenességeket mutatnak és elpusztulnak az embrionális fejlődés során (Erdélyi és mtsi., 2011; Borsos és mtsi., 2011). Ezzel szemben az apoptózis vagy autofágia deficiens egyszeres mutáns állatok embrionális fejlődése végbemegy, az embriók életképesek. Meghatároztunk továbbá egy bZip-szerű transzkripciós faktort (ATF-2), amely összehangolja az apoptotikus és autofág útvonalak aktivitását. Igazoltuk, hogy számos sejthalált indukáló kémiai ágens (pl. kemoterápiás szerek; 5-Fluorouracil, Methotrexát) potensen aktiválja autofág gének (pl. Atg8) expresszióját, és ezen keresztül az autofág folyamatot. Hasonló molekuláris események figyelhetők meg humán sejttenyészetekben is (Sengupta és mtsi, kézirat elkészítés alatt).
3, Az autofág folyamata egy egyensúlyi reakcióval kezdődik: az autofág izoláló membrán szintézisének kezdeti lépését egy III. típusú PI3K (foszfatidil-inozitol 3-kináz) katalizálja. A reakció antagonistái a miotubularin-típusú (MTM) foszfatázok. Az MTM fehérjék tehát negatívan szabályozzák az autofágiát, genetikai vagy farmakológiai eszközökkel történő inaktiválásuk potenciálisan serkentheti az autofág degradációt (Vellai és mtsi, 2009; Vellai és Klionsky, 2010; Vellai és Takács-Vellai, 2009, 2010). *C. elegans*-ban és Drosophilában kimutattuk, hogy az MTM6

fehérje mutációs blokkolása vagy RNS interferencia-csendesítése robosztus autofág aktivációhoz vezet. Az *mtm-6(-)* mutáns fonalférgek szignifikánsan tovább éltek a vad típusnál. Drosophilában hasonló megfigyelést tapasztaltunk az MTM14 (Jumpy) foszfatáz inaktiválása esetén is. Az MTM14 deficiens legyek élettartama közel 30%-kal hosszabb, mint a normális vad típusú kontroll állatoké. Ez a jelenség mindkét nemben szembetűnő volt. Ezzel konzisztensen humán toxikus fehérjéket (α-synucleint és β-amiloidot) expresszáló *Drosophila* szem degenerációja csökkenthető MTM14 inaktiválással (Billes és mtsi., 2011-2012; kézirat bírálata a *Science* magazinban – jelenleg a bírálók kérésére a molekuláris háttér kidolgozása folyik). Végül a humán MTM14 fehérjéhez specifikusan kötődő (és autofágiát indukáló) kismolekulákat szelektáltunk molekula könyvtárakból.

4, Létrehoztunk egy olyan adatbázist, amely jelátviteli rendszerek (genetikai útvonalak) keresztbeszélgetéseit tartalmazza, illetve új jelátviteli kapcsolatokat tár fel (Korcsmáros és mtsi., 2010). Az adatbázis elemzésével és bővítésével az autofág rendszer szabályozási és működési kapcsolatát kívánjuk jobban feltérképezni. Eddigi eredményeink alapján az látható, hogy az AMPK (*AMP-dependent protein kinase* – a sejt energia szenzora) kináz transzkripcionális (a Ras/Erk útvonalon keresztül) és posztranszkripcionális módon a TOR (*target of rapamycin*) kinázon keresztül szabályozza az autofág folyamatot.

Publikációk:

Vellai T, Takács-Vellai K, Sass M, Klionsky DJ : The regulation of aging: does autophagy underlie longevity? TRENDS IN CELL BIOLOGY 19 (10): pp. 487-494 (2009) IF: 12,115

Hargitai B, Kutnyánszky V, Blauwkamp TA, Steták A, Csankovszki G, Takács-Vellai K, **Vellai T**: *xol-1*, the master sex switch gene in *C. elegans*, is a transcriptional target of the terminal sex-determining factor TRA-1/GLI. DEVELOPMENT 136 (23): pp. 3881-3887 (2009) IF: 7,194

Vellai T, Klionsky DJ: A second report from the EMBO conference on autophagy: mechanism, regulation and selectivity of autophagy. AUTOPHAGY 6 (1): pp. 197-198 (2010) IF: 6,829

Korcsmáros T, Farkas IJ, Szalay MS, Rovó P, Fazekas D, Spiró Z, Böde C, Lenti K, **Vellai T**, Csermely P: Uniformly curated signaling pathways reveal tissue-specific cross-talks and drug target candidates. BIOINFOMATICS 26 (16): 2042-2050 (2010) IF: 4,328

Vellai T, Takács-Vellai K: Regulation of protein turnover by longevity pathways. ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICAL BIOLOGY 694: pp. 69-80 (2010) IF: 2,02

Erdélyi P, Borsos É, Takács-Vellai K, Kovács T, Kovács AL, Sigmond T, Hargitai B, Pásztor L, SenGupta T, Dengg M, Pécsi I, Tóth J, Nilsen H, Vértessy BG, **Vellai T**: Shared developmental roles and transcriptional control of autophagy and apoptosis in *C. elegans*. JOURNAL OF CELL SCIENCE 124 (9): pp. 1510-1518 (2011) IF: 6,144

Borsos É, Erdélyi P, **Vellai T** : Autophagy and apoptosis are redundantly required for *C. elegans* embryogenesis. AUTOPHAGY 7 (5): pp. 557-559 (2011) IF: 6,829

Vellai T, Takács-Vellai K: Regulation of protein turnover by longevity pathways. In: PROTEIN SYNTHESIS AND AGING, ed. Nektarios Tavernarakis, Landes Bioscience, Georgetown, Texas, USA, pp. 69-80 (2009)

2 cm

Budget: 4,500,000.- HUF

2 cm

2 cm

DECELERATING THE AGEING PROCESS (INCREASING LIFESPAN) AND DELAYING THE INCIDENCE OF AGE-RELATED PATHOLOGIES BY GENETIC AND PHARMACOLOGICAL INTERVENTIONS: SEARCHING FOR AUTOPHAGY INHIBITORS

Tibor Vellai[1], Attila Lajos Kovács[2], Tímea Sigmond[1], Krisztina Takács-Vellai[1], János Barna[1], Viktor Billes[1]
Eötvös Loránd University, [1]Department of Genetics and [2]Department of Anatomy, Cell- and Developmental Biology

Results from the 2009-2011 period:

1, The insulin/IGF-1 (insulin-like growth factor-1) signalling pathway acts as a major upstream regulatory system of the ageing process in various animal taxa including nematodes, insects and mammals. This conserved neuroendocrine system controls metabolism and the rate at which the cells accumulate cellular damage in response to growth factors and nutrient availability. The downstream effector component of the insulin/IGF-1 signalling pathway is the forkhead-like FoxO transcription factor, which regulates ageing (lifespan) through modifying the expression of its target genes. Interestingly, in several sexually reproducing animal species life expectancy differs significantly between the two sexes. For example, in humans females live longer by 3-5 years than males. Consistent with this phenomenon, the incidence of age-related degenerative diseases (e.g., cancer, neurodegenerative diseases, immune deficiency and so on) occurs significantly later in females, as compared with males. In the nematode *Caenorhabditis elegans* sexual differentiation is controlled by the sex-determining genetic pathway whose terminal transcription factor is TRA-1. TRA-1 is the worm orthologue of human GLI (Glioma-associated) proteins functioning as components of the Hedgehog (Hh) signal transduction system. TRA-1 determines sexual fate by repressing male-specific genes; TRA-1 is active in hermaphrodites but inactive in males. Using bioinformatics, we have determined a comprehensive set of potential TRA-1 target genes in the *C. elegans* genome (Hargitai et al., 2009). One of these targets is *daf-16* that encodes the worm FoxO-like transcription factor. We showed that decreasing or increasing TRA-1 activity (in *tra-1* gain-of-function and loss-of-function mutant animals) strongly influences the expression of *daf-16/FoxO*. Consistently, TRA-1 is able to bind to the potential regulatory element in the TRA-1 promoter in vitro, as well as *tra-1* hyperactive mutants live longer by 2-3 days (20-30%) than the normal [*tra-1(+)*]. Also, the hermaphrodite lifespan exceeds that of the male by 20%. These results indicate that TRA-1/GLI activates *daf-16/FoxO* expression in controlling ageing. As autophagy (bulk self-degradation process of eukaryotic cells) mediates the regulatory role of the insulin/IGF-1 signalling pathway on ageing, the TRA-1/GLI system – and hence the Hh signalling pathway – operates as a novel upstream controller of the FoxO-autophagy axis (Hotzi et al., manuscript in preparation – *Sex-specific regulation of ageing*).

2, In the *C. elegans* ageing model, the apoptotic gene cascade plays an important role in the determination of lifespan and in several developmental processes. We have demonstrated that autophagy genes and apoptosis redundantly control early development in this animal: autophagy; apoptosis double mutant (or RNA interference treated) animals arrest development at early embryonic stages, coupled with severe morphological defects (Erdélyi et al., 2011; Borsos et al., 2011). In contrast, single mutants defective for either apoptosis or autophagy develop as normal embryos (i.e., these embryos are viable). Furthermore, we have identified a bZip-like transcription factor (ATF-2) that orchestrates the activity of apoptosis and autophagy. We have also provided evidence that several cell death-inducing agents such as chemotherapeutic drugs (5-Fluorouracil, Methotrexate) potently activate the expression of autophagy genes (e.g., Atg8) and thus the autophagic process. A similar mechanism operates in human cell lines as well (Sengupta et al., manuscript submitted).

3, The autophagic process begins with the synthesis of the isolation membrane that sequesters cytoplasmic components destined to be degraded. This reaction is catalysed by type III

PI3K (phosphatidyl-inositol 3-kinase). Myotubularin (MTM) phosphatases function as antagonists of this chemical reaction. Thus, MTM proteins negatively controls autophagy, and, hence, their genetic or pharmacological inhibition potentially promotes autophagic breakdown (Vellai et al., 2009; Vellai and Klionsky, 2010; Vellai and Takács-Vellai, 2009; 2010). We have shown both in *C. elegans* and the fruit fly *Drosophila melanogaster* (another genetic model of ageing) that mutational inactivation or RNAi-mediated depletion of MTM6 leads to a robust activation of autophagy. *mtm-6(-)* mutant nematodes lived significantly longer than wild-type animals. We have observed a similar extent of lifespan extension in mutant *Drosophila* defective for MTM14 (also called *Jumpy*). The mean lifespan of Jumpy deficient flies was longer by nearly 30% than that of the wild-type. This phenomenon was evident in both sexes. *Drosophila* expressing aggregation prone toxic human proteins (α-synuclein and β-amyloid) in the compound eye displays obvious degeneration of the eye tissue. This degeneration can be suppressed by inactivating MTM14/Jumpy (i.e., autophagy induction) (Billes et al., manuscript in preparation). We then identified small molecules – from molecule libraries – with the capacity to specifically bind to human Jumpy (they act as potential autophagy inductors).

4, Finally, we have generated a database (SignaLink) that collects signalling cross-talks of genetic pathways from nematodes, flies and humans, and can identify novel cross-talks too (Korcsmáros et al., 2010). Using this molecule database, we are currently analysing the regulatory network and mechanism of autophagy in order to understand better how this process operates during the ageing process. Our preliminary results suggest that AMPK (AMP-dependent protein kinase, the cell's energy sensor) regulates autophagy both at the transcriptional and post-transcriptional levels. The former takes place through the canonical Ras/Erk pathway, whereas the latter occurs through the TOR (target of rapamycin) kinase.

Publications:

Vellai T, Takács-Vellai K, Sass M, Klionsky DJ: The regulation of aging: does autophagy underlie longevity? TRENDS IN CELL BIOLOGY 19 (10): pp. 487-494 (2009) IF: 12,115

Hargitai B, Kutnyánszky V, Blauwkamp TA, Steták A, Csankovszki G, Takács-Vellai K, **Vellai T**: *xol-1*, the master sex switch gene in *C. elegans*, is a transcriptional target of the terminal sex-determining factor TRA-1/GLI. DEVELOPMENT 136 (23): pp. 3881-3887 (2009) IF: 7,194

Vellai T, Klionsky DJ: A second report from the EMBO conference on autophagy: mechanism, regulation and selectivity of autophagy. AUTOPHAGY 6 (1): pp. 197-198 (2010) IF: 6,829

Korcsmáros T, Farkas IJ, Szalay MS, Rovó P, Fazekas D, Spiró Z, Böde C, Lenti K, **Vellai T**, Csermely P: Uniformly curated signaling pathways reveal tissue-specific cross-talks and drug target candidates. BIOINFOMATICS 26 (16): pp. 2042-2050 (2010) IF: 4,328

Vellai T, Takács-Vellai K: Regulation of protein turnover by longevity pathways. ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICAL BIOLOGY 694: pp. 69-80 (2010) IF: 2,02

Erdélyi P, Borsos É, Takács-Vellai K, Kovács T, Kovács AL, Sigmond T, Hargitai B, Pásztor L, SenGupta T, Dengg M, Pécsi I, Tóth J, Nilsen H, Vértessy BG, **Vellai T**: Shared developmental roles and transcriptional control of autophagy and apoptosis in *C. elegans*. JOURNAL OF CELL SCIENCE 124 (9): pp. 1510-1518 (2011) IF: 6,144

Borsos É, Erdélyi P, **Vellai T**: Autophagy and apoptosis are redundantly required for *C. elegans* embryogenesis. AUTOPHAGY 7 (5): pp. 557-559 (2011) IF: 6,829

Vellai T, Takács-Vellai K: Regulation of protein turnover by longevity pathways. In: PROTEIN SYNTHESIS AND AGING, ed. Nektarios Tavernarakis, Landes Bioscience, Georgetown, Texas, USA, pp. 69-80 (2009)

Teljes támogatás:2.400.000,- Ft

METFORMIN HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA A NA^+/K^+ ATPÁZ SZUBCELLULÁRIS LOKALIZÁCIÓJÁRA DIABETES MELLITUSBAN

Vér Ágota[1], Somogyi Anikó[2], Rosta Klára[3] Banki Fanni[4], Rónai Katalin[1]
Semmelweis Egyetem [1]Orvosi Vegytani Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet, [2]II. Sz Belgyógyászati Klinika, [3]I. sz Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika, [4]I. sz Gyermekgyógyászati Klinika

A diabéteszben kialakuló kóros sejthipertrófia, az interstíciumban és perivaszkulárisan észlelhető fibrózis a vesében súlyos strukturális károsodásokhoz vezet, a folyamat egyik érintettje a Na^+/K^+ ATPáz (NKA) enzim. STZ-diabéteszes állatmodellen vizsgáltuk a NKA expresszióját és intracelluláris elhelyezkedését a diabéteszben alkalmazott gyógyszer metformin kezelés hatására. Megállapítottuk, hogy diabéteszben fokozódik a vesekéreg NKA alfa1 alegységének mRNS és fehérje expressziója. A hiperglikémia a hiperozmolaritáson túl az inzulinopéniától függetlenül befolyásolja a tubuláris NKA expresszióját. A megnövekedett mennyiségű NKA jelentős hányada nem lát el ion transzport funkciót, hanem a citoszolban található, az immunhisztokémiai kép hasonló az ishémia reperfúziós állapothoz. Metformin kezelés, a RAAS gátlókhoz hasonlóan a vérnyomást befolyásoló hatástól függetlenül csökkenti a vércukor szintet és javítja a vesefunkciót, csökkenti a NKA expressziót. Metformin kezelés helyreállítja a vesében a NKA intracelluláris elhelyezkedését, az enzim a kezelés hatására diabéteszes vesében is sejthártyában lokalizálódik, ezáltal helyreáll az enzim iontranszport funkciója.

Az inzulin akut hatását egészséges és STZ-diabéteszes patkányok szívizom szövetén vizsgáltuk. Az egészséges szívizomban a NKA alfa1 alegysége főleg a plazma membránban, míg az alfa2 az intracelluláris membránokban található. A NKA alegységek inzulin-függően helyeződnek a sejtfelszínre, a kontroll esetében inzulin adást követően 3,3-szor nagyobb az alfa2, 1,37- szor az alfa1 és 1,51-ször a beta1($P<0.02$) mennyisége a sejthártyában. Diabéteszes szívizomban hasonlóan a haráncsíkolt izom Ca^{2+}ATPázhoz a NKA alegységeinek expressziója csökken, melynek mértéke alfa1 esetén 25 % ($P<0.05$), alfa2 50% ($P<0.01$). A diabéteszes szívizomban az inzulin hatására ugyancsak csökken az alegységek kihelyeződés mértéke: alfa2 1,92 ($P<0.02$), alfa1 1,19 és beta1 1,34 ($P<0.02$). Az inzulin függő alfa2 és alfa1 izoformák kihelyeződése PI3 kináz dependens folyamat. Diabéteszben a metformin megváltoztatta a NKA intracelluláris eloszlását, fokozta a sejtmembrán lokalizációt és javította az inzulin indukált kihelyeződés hatékonyságát is.

Rosta K, Tulassay E, Enzsoly A, Ronai K, Szantho A, Pandics T, Fekete A, Mandl P, Ver A: Insulin induced translocation of Na(+)/K(+)-ATPase is decreased in the heart of streptozotocin diabetic rats. ACTA PHARMACOLOGICA SINICA 30: (12) pp. 1616-1624 (2009) IF: 1,783

Rácz G, Szabó A, Vér Á, Zádor E:The slow sarco/endoplasmic reticulum Ca2+-ATPase declines independently of slow myosin in soleus muscle of diabetic rats. ACTA BIOCHIMICA POLONICA 56:(3) pp. 487-493. (2009) IF: 1,262

Prokai A, Fekete A, Banki NF, Muller V, Ver A, Degrell P, Rusai K, Wagner L, Vannay A, Rosta M, Heemann U, Langer RM, Tulassay T, Reusz G, Szabo AJ:Renoprotective effect of erythropoietin in rats subjected to ischemia/reperfusion injury: Gender differences. SURGERY 150: (1) pp. 39-47 (2011) IF: 3,408

Teljes támogatás:2.400.000,- Ft

THE EFFECT OF METFORMIN ON SUBCELLULAR LOCALIZATION OF NA^+/K^+ ATPASE IN DIABETES MELLITUS

Vér Ágota[1], Somogyi Anikó[2], Rosta Klára[3] Banki Fanni[4], Rónai Katalin[1]
Semmelweis University [1]Department of Medical Chemistry, Molecular Biology and Pathobiochemistry, [2]II. Department of Internal Medicine, [3]I. Department of Obstetrics and Gynecology, [4]I. Department of Pediatrics

This study investigates the effect of STZ-diabetes leading to diabetic nephropathy, on the abundance and localization of the renal Na^+/K^+ATPase (NKA), a major contributor of renal sodium handling. We measured renal function and mRNA expression, protein level, subcellular distribution, of NKA alpha-1 subunit in the kidney cortex. Metformin has beneficial effects on diabetes-induced increase of serum creatinine and urea nitrogen levels. Diabetes increased NKA alpha-1 protein level and enzyme activity. Control kidneys showed NKA alpha-1 immunopositivity on the basolateral membrane of proximal tubular cells, while D broadened NKA immunopositivity towards the cytoplasm. Our study demonstrates that diabetes mellitus increases the mRNA expression, which is abolished by metformin treatment. Despite an increase in total NKA quantity in diabetic nephropathy, the redistribution to the cystosol suggests the Na pump is no longer functional. Metformin treatment enhanced the plasma membrane localization of the enzyme. We investigated also the effect of acute insulin administration on the subcellular localization of NKA isoforms in cardiac muscle of healthy and STZ-diabetic rats. In healthy rat heart muscle alpha1 isoform of NKA resides mainly in the plasma membrane fraction, while alpha2 isoform in the intracellular membrane pool. Diabetes decreased the abundance of NKA similarly to Ca^{2+} -ATPase in skeletal muscle. The abundance of alpha1 isoform decreased (25 %, $P<0.05$) in plasma membrane and alpha2 isoform (50%, $P<0.01$) in the intracellular membrane fraction. Insulin-stimulated translocation of alpha1-subunit was only detectable by cell surface biotinylation technique. After insulin administration protein level of alpha2 increased by 3.3-fold, alpha1 by 1.37-fold and beta1 by 1.51-fold ($P<0.02$) in the plasma membrane of control. Insulin treatment caused and less than 1.92-fold ($P<0.02$), 1.19-fold (not significant) and 1.34-fold ($P<0.02$) increase of appropriate subunits of NKA in plasma membrane in diabetes. The insulin-induced translocation was wortmannin sensitive. Metformin treatment enhanced the effect of insulin. This study demonstrates that insulin influences the plasma membrane localization of NKA isoforms in the heart, alpha2 isoform translocation is the most vulnerable to the reduced insulin response in diabetes. Insulin mediates NKA alpha1- and alpha2-subunit translocation in the cardiac muscle via a PI3-kinase-dependent mechanism and metformin has a beneficial effect on NKA function.

Rosta K, Tulassay E, Enzsoly A, Ronai K, Szantho A, Pandics T, Fekete A, Mandl P, Ver A: Insulin induced translocation of Na(+)/K(+)-ATPase is decreased in the heart of streptozotocin diabetic rats. ACTA PHARMACOLOGICA SINICA 30: (12) pp. 1616-1624 (2009) IF: 1.783
Rácz G, Szabó A, Vér Á, Zádor E:The slow sarco/endoplasmic reticulum Ca2+-ATPase declines independently of slow myosin in soleus muscle of diabetic rats. ACTA BIOCHIMICA POLONICA 56:(3) pp. 487-493. (2009) IF: 1.262
Prokai A, Fekete A, Banki NF, Muller V, Ver A, Degrell P, Rusai K, Wagner L, Vannay A, Rosta M, Heemann U, Langer RM, Tulassay T, Reusz G, Szabo AJ: Renoprotective effect of erythropoietin in rats subjected to ischemia/reperfusion injury: Gender differences. SURGERY 150: (1) pp. 39-47 (2011) IF: 3.408

Teljes támogatás: 3,600.000,- Ft

RECEPTOR TIROZINKINÁZOK ÉS INTEGRINEK MOLEKULÁRIS KÖLCSÖNHATÁSÁNAK SZEREPE GLIOMÁK TERÁPIA-REZISZTENCIÁJÁBAN

Vereb György[1], Petrás Miklós[1], Lajtos Tamás[1] Szöllősi János[1], Klekner Álmos[2]
Debreceni Egyetem OEC [1]Biofizikai és Sejtbiológia Intézet és [2]Idegsebészeti Klinika

A multiform glioblasztomák kezelését a tumor invazivitásán túl csökkent sugárérzékenysége is gyakran hátrányosan befolyásolja. Újabban feltételezik, hogy a sejtadhéziós molekulák és a receptor tirozinkinázok között funkcionális együttműködés alakulhat ki, mely hozzájárulhat a terápiarezisztanciához. Az tirozinkináz aktivitású epidermális növekedési faktor receptor (EGFR, ErbB1) amplifikációja megfigyelhető a magas (IV.) grádusú glioblasztómák kialakulása során, és korrelációt mutat azok rossz prognózisával, sugárrezisztenciájával, mellyel érdekes módon a 7. kromoszóma többlete is korrelál — az EGFR génje pedig a 7p-n található.

Sejtadhéziós molekulákra történő áramlási citometriás szűrés során megállapítottuk, hogy az integrin β1 felszabályozódik a többlet ErbB1-et ektopikusan kifejező U251 glioblasztoma sejteken. Több szubklónt hoztunk létre, részben az ErbB1-et kódoló 7. kromoszóma darabok mikrosejt fúzióval történő bejuttatásával, részben ErbB1 expressziós vektor elektroporációjával. Ezekben a csökkenő sugárérzékenység növekvő ErbB1 és integrin β1 szinttel korrelált. Míg az ErbB1 jelentős túlkifejezése a közepes többlettel szemben előnyt jelentett a kolóniaképzésben, nem okozott nagyobb sugárrezisztenciát, sem gyorsabb proliferációt reguláris sejtkultúrákban, és a passzálások során az ErbB1 szint közepesre esett vissza. Ugyanakkor az integrin β1 szint mindvégig magasan maradt, és meghatározta a fokozott sugárrezisztencia mértékét. Áramlási citometriás FRET mérések alapján a várt növekvő ErbB1 – integrin β1 heteroasszociáció mellett a két molekula kifejeződését meglepő módon csökkenő ErbB1 homoasszociáció kísérte. Kétoldalú mikroszkópos FRET kísérletek azt mutatták, hogy azokban a szubmikronos pixelekben, ahol magasabb az ErbB1 – integrin β1 heteroasszociáció, az ErbB1 homoasszociáció alacsonyabb, jelezve, hogy a vizsgált molekulák között versengés folyik az asszociációs partnerekért. A heteroasszociáció felé történő eltolódást fokozottabb, EGF-fel kiváltható, Akt foszforiláció kísérte, ami a magas expressziójú klónok fokozott sugárrezisztenciájában a túlélési jelpályák részvételére utal. Ezt megerősíti, hogy a többlet ErbB1/integrin okozta sugárrezisztencia a PI3K gátlásával visszafordítható.

A továbbiakban II és IV grádusú fagyasztott tumor mintákon mikroszkópos FRET protokollt dolgoztunk ki, mely azt mutatta, hogy a IV grádusú daganatokban a II-eshez képest általában magasabb ErbB1 és integrin β1 szint mellett az két molekula heteroasszociációja is magasabb. Többszörös lépésenkénti lineáris regresszió az asszociációt mind a poolozott minták, mind a IV grádusúak esetében a relapszusmentes idő prediktorának mutatta. A túlélést hasonlóképpen elemezve az ErbB1-integrin β1 interakció mellett az integrin β1 expresszió is szignifikáns faktornak látszik. A két gráduscsoport mellett a poolozott mintákból képzett, a mért paraméterek (expressziók, asszociáció) átlaga alatti és feletti csoportokat is összevetettük Kaplan-Meier analízissel. A túlélést a hisztopatológiai grádus és az ErbB1-integrin heteroasszociáció egyeformán jól elkülönítette ($p<0.001$), míg az ErbB1 és integrin β1 szintek kisebb, de még szignifikáns eltérést mutattak.

A feltárt ErbB1 – integrin β1 heteroasszociáció felveti egy klinkailag releváns prediktív diagnosztikai módus lehetőségét: a fehérje szintek mellett molekuláris kölcsönhatásaik mérését intraoperatív mintákban. Ehhez a Baross Gábor program támogatásával fluoreszcencia élettartam mérő mikroszkópot építettünk. Bár az eredmények felvetik a tirozinkináz célpontú molekuláris terápiák RGD-mimetikus integrin blokkolókkal való kombinálásának a lehetőségét a multiform glioblasztóma esetén, további kísérleteink azt mutatták, hogy az integrin β1 jelátvitelét az RGD szekvenciák nem koherensen változtatják meg, sőt, az integrin β1 leszabályozása sejtes modelljeinkben ErbB1 felszabályozódáshoz és fokozott proliferációhoz vezet, ami a két molekulacsoport közötti kölcsönös szabályozási hurkok lehetőségére utal. Emiatt az ígéretes kombinált molekuláris terápiákat feltáró kutatásokat tovább folytatjuk.

Budget: 3,600,000.- HUF

ROLE OF MOLECULAR INTERACTIONS BETWEEN RECEPTOR TYROSINE KINASES AND INTEGRINS IN THE THERAPY RESISTANCE OF GLIOMAS

György Vereb[1] Miklós Petrás[1], Tamás Lajtos[1] János Szöllősi[1], Álmos Klekner[2]
[1]Department of Biophysics and Cell Biology; [2]Department of Neurosurgery, University of Debrecen Medical and Health Science Center

Treatment of multiform glioblastoma is frequently hampered by, in addition to its invasiveness, decreased radiosensitivity of the tumor. Recent findings provide evidence for functional crosstalk between certain cell adhesion molecules and receptor tyrosine kinases suggesting that they may contribute to therapy resistance. Also, overexpression of ErbB1/EGFR has been shown to correlate with worse outcome and radiation resistance, and also with excess of chromosome 7p, which is the locus for the ErbB1 gene.

In a flow cytometric screen on adhesion molecules we have identified that integrin β1 is upregulated upon ectopic expression of ErbB1 in U251 glioblastoma cells. Several sublones were obtained either by introducing extra chromosome 7 material coding ErbB1 using microcell fusion, or by electroporating an ErbB1 expression vector. In these clones, decreasing radiosensitivity correlated with increasing ErbB1 and integrin β1expression levels. While a great excess of ErbB1 provided a colony forming advantage over medium excess, it did not yield better radiation resistance or faster proliferation under regular culture conditions, and clones with a great excess dropped to medium level over time. In the meanwhile, integrin β1 levels remained elevated and defined the extent of increased radiation resistance. Interestingly, increased expression of ErbB1 and integrin molecules was paralleled by decreasing ErbB1 homoassociation and increasing ErbB1 – integrin β1 heteroassociation rates discerned from flow cyotmetric FRET. A microscopic two-sided FRET approach revealed that in pixels with higher ErbB1 – integrin β1 heteroassociation, ErbB1 homoassociation was lower, indicating a competition for association partners between these molecules. Furthermore, the shift towards heteroassociation was accompanied by a boosted Akt phosphorylation response to EGF, a possible explanation for greater radiation resistance in high expressing clones. This radiation resistance could be reverted by inhibiting PI3K.

We have implemented acceptor photobleaching FRET on frozen tissue sections of grade II and IV clinical glioblastoma samples to further check the possible role of this ErbB1-integrin signaling axis. Grade IV tumors showed higher ErbB1 and integrin β1 expression levels and greater ErbB1 – integrin β1 heteroassociation than Grade II tumors. Multiple stepwise linear regression highlighted FRET efficiency as the predictor of time to relapse both for pooled grade II and IV samples and for the grade IV cases alone. Analyzing survival times of pooled grade II and grade IV cases by multiple stepwise linear regression showed that besides ErbB1-integrin β1 interaction, the expression level of integrin β1 also significantly contributes to the prediction of survival. Kaplan-Meier analysis was used to compare survival and time-to-relapse of grade II vs. grade IV groups, as well as groups formed by splitting the pooled samples into below vs. above the overall mean expression level of ErbB1, integrin β1 and mean heteroassociation state. Survival was determined best and equally well by histopathological grading and ErbB1-integrin heteroassociation ($p<0.001$), while ErbB1 and integrin β1 levels showed less, but still significant differences.

The revealed ErbB1 – integrin β1 heteroassociation raises the possibility of introducing a clinically relevant diagnostic method for the measurement a molecular interactions in addition to expression in histopathological samples. To facilitate such developments, an infrastructural development for the microscopic measurement of associations based on fluorescent lifetimes was implemented with support from the Baross Gabor programme. While the results raise the possibility of combining RGD-mimetic integrin blockers with molecularly targeting tyrosine kinases in high grade glioblastoma, our experiments have shown that integrin β1 signaling is not coherently affected by RGD sequences, and, further, that down-regulation of integrin β1 brings about the up-regulation of ErbB1 and enhanced proliferation rate in the ^{2} cm model cell lines, thus hinting at the mutual (cross)regulatory pathways between these molecules. Work to find promising therapeutic combinations is therefore in progress.

Teljes támogatás: 3 000 000,- Ft

A TRANZIENS KIFELÉ HALADÓ KÁLIUM ÁRAM SZEREPE A KAMRAI REPOLARIZÁCIÓBAN EMLŐS SZÍVIZMON.

Virág László[1], Koncz István[1], Kristóf Attila András[2]
[1]SZTE Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet, [2]MTA-SZTE Keringésfarmakológiai Kutatócsoport

Projektünkben a tranziens kifelé haladó kálium áram (I_{to}) kamrai repolarizációban betöltött szerepét vizsgáltuk emlős szívizmon. Folytattuk és kiegészítettük korábban végzett kísérleteinket kutya és humán kamrai preparátumokon. Ebben a vizsgálatban felhasználtuk azt a megfigyelést, hogy a chromanol 293B nem csak a késői egyenirányító kálium áram lassú komponensét (I_{Ks}), hanem nagy koncentrációban (100 μM) az I_{to} áramot is nagymértékben gátolja anélkül, hogy más repolarizáló K^+ áramokat befolyásolna. Így teljes I_{Ks} blokk jelenlétében az akciós potenciál (AP) repolarizációjában és az ionáramokban chromanol 293B hatására létrejött változások a szer I_{to} áramra gyakorolt hatásának tulajdoníthatók. Az akciós potenciál clamp kísérletek egy lassan inaktiválódó és egy "késői" chromanol-szenzitív áram komponenst mutattak az akciós potenciál plató fázisa alatt kutya kamrai miocitákon. Chromanol 293B, I_{Ks} gátló jelenlétében, szignifikánsan nyújtotta az akciós potenciált kutya kamrai szívizmon. Ez az I_{to} gátlás hatására bekövetkezett megnyúlás fordított frekvencia-függő tulajdonsággal bírt, amely hatás jelentős mértékben megnőtt és gyakran korai utópotenciálok (EAD) keletkezéséhez vezetett, miután a repolarizációs tartalékot (repolarization reserve) 0.1 μM dofetilid (a gyors késői egyenirányító kálium csatornák - I_{Kr} - gátlószere) segítségével beszűkítettük. Eredményeinket számítógépes szimulációval megerősítettük. Méréseink azt mutatták, hogy az I_{to} fontos szerepet játszhat a repolarizációs folyamatokban és jelentősen hozzájárulhat a repolarizációs tartalékhoz kutya kamrai szívizomban. Eredményeinket a *British Journal of Pharmacology* című szaklapban publikáltuk.

Az I_{to} áram jellemzőit, denzitását, inaktivációs és az inaktivációból való visszatérés kinetikáit valamint a steady-state inaktivációját is megvizsgáltuk humán szívből izolált kamrai miocitákon. Úgy találtuk, hogy az I_{to} jelentős mértékű repolarizáló áramot szállíthat az akciós potenciál plató és a késői repolarizációs fázisai alatt. Ezeknek és más humán kamrán nyert adataink segítségével sikerült egy humán kamrai AP számítógépes modellt kifejleszteni (*PLoS Computational Biology*).

Jelentős nagyságú I_{to} áramot észleltünk kutya pitvari szívizomsejteken. Az áram inaktivációja kétfázisú volt. Az I_{to} lassú komponense jelentősen lassabb volt pitvaron, mint kamrai szívizomsejtekben. Úgy találtuk, hogy az I_{to} jóval nagyobb repolarizáló áramot szállít a pitvari akciós potenciál plató fázisa alatt, mint kamrán, ennek ellenére kutya pitvari szívizom preparátumokon chromanol 293B alkalmazása (I_{to} gátolás) nem nyújtotta meg az akciós potenciál időtartamát, csak a plató fázis tolódott el a pozitívabb potenciálok irányába.

Az antianginás tulajdonságú ivabradin és a nem-szteroid gyulladásgátló diclofenac elektrofiziológiai hatásait is megvizsgáltuk. Kísérleteink megmutatták, hogy sem az ivabradin sem a diclofenac nem befolyásolta az I_{to} áramot emlős szívből izolált miocitákon. Az ivabradinra vonatkozó eredményeinket a *European Journal of Pharmacology* című szaklapban közöltük, a diclofenac-val foglalkozó cikkünket pedig a *British Journal of Pharmacology* című szaklapba küldtük be, jelenleg elbírálás alatt áll.

Virág L, Jost N, Papp R, Koncz I, Kristóf A, Kohajda Zs, Harmati G, Carbonell-Pascuall B, Ferrero JM, Papp JGy, Nánási PP, Varró A: BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY 164: pp. 93-105 (2011) IF: 4.925

O'Hara T, Virág L, Varró A, Rudy Y: PLoS COMPUTATIONAL BIOLOGY 7(5): e1002061. doi:10.1371/journal.pcbi.1002061 (2011) IF: 5.515

Koncz I, Szél T, Bitay M, Cerbai E, Jaeger K, Fülöp F, Jost N, Virág L, Orvos P, Tálosi L, Kristóf A, Baczkó I, Papp JGy, Varró A: EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY 668: pp. 419-426 (2011) IF: 2.737

Jost N, Kohajda Z, Kristof A, Kovacs PP, Husti Z, Juhasz V, Kiss L, Varro A, Virag L, Baczko I: CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY 18 (24): pp. 3675-3694 (2011) IF: 4.630

Budget: 3 000 000.- HUF

CONTRIBUTION OF THE TRANSIENT OUTWARD POTASSIUM CURRENT TO VENTRICULAR REPOLARIZATION IN MAMMALIAN HEART.

László Virág[1], István Koncz[1], Attila András Kristóf[2]
[1]Department of Pharmacology and Pharmacotherapy, University of Szeged; [2]Division for Cardiovascular Pharmacology, Hungarian Academy of Sciences, University of Szeged

In this project the contribution of the transient outward potassium current (I_{to}) to action potential repolarization was studied in mammalian heart. We proceed and supplement our experiments carried out earlier in dog and also in human ventricular preparations. In this study we took advantage of the observation that at high (100 μM) concentration chromanol 293B in addition to block the slow delayed rectifier potassium current (I_{Ks}), also largely inhibits I_{to} without affecting other repolarizing K^+ currents. Therefore, in the presence of full I_{Ks} block chromanol 293B induced change of action potential (AP) and of ionic currents can be attributed to its effect on I_{to}. Action potential clamp experiments in dog ventricular myocytes revealed a slowly inactivating and a "late" chromanol-sensitive current component flowing during the action potential plateau. Action potentials were significantly lengthened by chromanol 293B in the presence I_{Ks} blockade in dog ventricular muscle. This lengthening effect of I_{to} inhibition showed reverse rate-dependent properties. It was extremely augmented after additional attenuation of repolarization reserve by 0.1 μM dofetilide, an inhibitor of the rapid delayed rectifier potassium current (I_{Kr}), resulting in the occurrence of early afterdepolarizations (EAD). The results have been confirmed by computer simulation. The results indicate that I_{to} is involved in governing repolarization in canine ventricular myocardium and, it contributes significantly to the repolarization reserve. Therefore, blockade of I_{to} may enhance proarrhythmic risk. These results were published in the *British Journal of Pharmacology*.

The characteristics of I_{to} current including density, inactivation kinetics, recovery from inactivation and the steady-state inactivation of the current was measured in undiseased human ventricular myocytes. It was found that I_{to} may carry significant outward current in the plateau and the later phase of repolarization of the action potential. A human ventricular AP computer model was developed using our undiseased human ventricular data including these I_{to} measurements (*PLoS Computational Biology*).

A large I_{to} current was observed in dog atrial myocytes. The inactivation phase of the current was best fitted by two exponentials. The slow time constant of I_{to} inactivation found to be much slower compared to that measured in dog ventricular myocytes. However, it was found that I_{to} carries much larger outward current in the plateau phase of the atrial action potential than that found in ventricular cells, blockade of the current by chromanol 293B did not lengthen the action potential, only the plateau phase was shifted to more positive potential in dog atrial preparations.

The electrophysiological effects of the novel antianginal agent ivabradine and of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac were also characterized. Our experiments showed that neither ivabradine nor diclofenac influenced I_{to} current in mammalian ventricular myocytes. The results concerning ivabradine were published in the *European Journal of Pharmacology*. Our manuscript regarding diclofenac has been sent to the *British Journal of Pharmacology*.

Virág L, Jost N, Papp R, Koncz I, Kristóf A, Kohajda Zs, Harmati G, Carbonell-Pascuall B, Ferrero JM, Papp JGy, Nánási PP, Varró A: BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY 164: pp. 93-105 (2011) IF: 4.925

O'Hara T, Virág L, Varró A, Rudy Y: PLoS COMPUTATIONAL BIOLOGY 7(5): e1002061. doi:10.1371/journal.pcbi.1002061 (2011) IF: 5.515

Koncz I, Szél T, Bitay M, Cerbai E, Jaeger K, Fülöp F, Jost N, Virág L, Orvos P, Tálosi L, Kristóf A, Baczkó I, Papp JGy, Varró A: EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY 668: pp. 419-426 (2011) IF: 2.737

Jost N, Kohajda Z, Kristof A, Kovacs PP, Husti Z, Juhasz V, Kiss L, Varro A, Virag L, Baczko I: CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY 18 (24): pp. 3675-3694 (2011) IF: 4.630

Melléklet

Teljes támogatás: 800.000.Ft

A BARRETT-NYELŐCSŐ ÉS A NYELŐCSŐ ADENOCARCINOMA PATHOMECHANIZMUSÁNAK, VALAMINT A CARCINOMA PREVENCIÓ LEHETŐSÉGEINEK KLINIKAI ÉS KÍSÉRLETES VIZSGÁLATA.

Wittmann Tibor[1], Izbéki Ferenc[1], Rosztóczy András[1], Lázár György[2], Németh István[3], Tiszlavicz László[3], Hegyi Péter[1]

[1]SZTE I. sz. Belgyógyászati Klinika, [2]SZTE Sebészeti Klinika, [3]SZTE Patológiai Intézet

2003-ban a Szegedi Tudományegyetem I. sz. Belgyógyászati Klinikájának irányításával, Csongrád, Békés és Bács-Kiskun megye kórházainak gasztroenterológusai, sebészei és patológusainak részvételével megalakult a ***Dél-magyarországi Barrett Munkacsoport***, amely létrehozta a *Dél-magyországi Barrett Regisztert*. Ebbe az adatbázisba a 2011 decemberéig 1200 Barrett-nyelőcsöves beteg adatai kerültek be. Magyarországon továbbra is ez az egyetlen adatbázis a Barrett-nyelőcső előfordulására és kezelési lehetőségeire vonatkozóan, amely a betegségre vonatkozó nemzetközi adatbázisok részére is adatot szolgáltathat. Az ETT pályázati kutatási támogatás eredményeiről ebben a pályázati időszakban 10 hazai és európai kongresszuson tartottunk előadást.

A betegek adatainak elemzéséből származó eredeti megállapítások:

1. Specializált intestinalis metaplasia jelenléte esetén a Barrett nyelőcsöves betegek nyelőcső funkciója súlyosabban károsodott, mint egyéb metaplasiak esetén.
2. A nyelőcső funkció még súlyosabban károsodott volt, ha dyplasia is jelen volt a metaplasias hámban.
3. A szövettani minták részletes értékelése alapján megállapítottuk, hogy a különböző típusú metapláziák gyakran együttesen fordulnak elő.
4. A nyálkahártya superficialis mirigyei központi szerepet játszanak a metaplasticus hám további differenciálódásában.
5. A GERD és a Barrett-nyelőcső előfordulási gyakorisága magasabb a cervicalis inlet patch-csel rendelkező egyénekben.
6. A laparoscopos technikával végzett Nissen szerinti antireflux műtét eredményesen szűnteti meg a kórképfontos pathogenetikai faktorát jelentő savas és epés refluxot azon betegekben, akikben a gyógyszeres kezelés sikertelen volt.
7. A műtét az operált betegek jelentős részében 5 éves nyomonkövetés során kivédte a betegség progresszióját.
8. A konzervatív kezelési csoportban (emelt dózisú PPI, PPI+Aszpirin) 103 beteg 29 hónapos követése során dysplasia kialakulását, súlyosbodását nem észleltük.

Közlemények: [**1**]Rosztóczy A, Izbéki F, Róka R, Németh I. Gecse K, Vadászi K, Kádár J, Vetró É, Tiszlavicz L, Wittmann T. The evaluation of oesophageal function in patients with different types of oesophageal metaplasia. **Digestion. 2011;84:273-80.** [**2**]Rosztóczy A., Izbéki F., Németh I.B., Dulic S., Vadászi K., Róka R., Gecse K., Gyökeres T., Tiszlavicz L., Wittmann T. Detailed oesophageal function and morphological analysis shows high prevalence of gastro-oesophageal reflux disease and Barrett's oesophagus in patients with cervical inlet patch. **Dis Esophagus. 2011 Nov 22. [Epub ahead of print]** [**3**].Nemeth I.B., Rosztoczy A., Izbeki F, Roka R, Gecse K, Sukosd F, Nyari T, Wittmann T, Tiszlavicz L. A renewed insight into barrett's esophagus: Comparative histopathological analysis of esophageal glandular metaplasia. **Dis Esophagus. 2011 Oct 28. [Epub ahead of print]** [**4**] Simonka Z, Paszt A, Abrahám S, Pieler J, Tajti J, Tiszlavicz L, Németh I, Izbéki F, Rosztóczy A, Wittmann T, Rárosi F, Lázár G. The effects of laparoscopic Nissen fundoplication on Barrett's esophagus: Long-term results. **Scand J Gastroenterol. 2012;47:13-21.** [**5**]. Inczefi O, Nemeth I, Izbeki F, Roka R, Gecse K, Tislavicz L, Vadaszi K, Wittmann T, Rosztoczy A. Long-term follow-up of mucosal cyclooxygenase-2 (COX-2) activity in patients with Barrett's metaplasia and aspirin treatment. **Gut 2010, 59 (Suppl2): A116.** [**6**] Benkő É, Ocskó Cs, Németh I, Izbéki F, Róka R, Gecse K, Vadászi K, Tiszlavicz L, Wittmann T, Rosztóczy A. Evaluation of patients with endoscopically suspected esophageal metaplasia (ESEM) by trimodal - high resolution magnifying endoscopy (HRME), endoscopic autofluorescence (AFI) and narrow band imaging (NBI) endoscopic technique - initial Hungarian experience. **Z Gastroenterol 2009, 47, 460A.** [**7**] Rosztóczy A, Németh I, Izbéki F, Vadászi K, Róka R, Gecse K, Tiszlavicz L, Wittmann T. Expression of protease-activated receptor-2 (PAR-2) in Barrett's esophagus. **Z Gastroenterol 2009, 47, 479A.** [**8**] A. Rosztóczy, P. Hegyi, D. Laczkó, Z. Rakonczay Jr., F. Izbéki, T. Wittmann, V. Venglovecz. Functional characterization of metaplastic human oesophageal epithelial cells **Gut 2011; 60 (Suppl 3) A376-377.**

Melléklet

Teljes támogatás: 800.000.Ft

CLINICAL AND EXPERIMENTAL EVALUATION OF THE PATHOMECHANISM OF BARRETT'S ESOPHAGUS AND THE PREVENTION ESOPHAGEAL ADENOCARCINOMA.

Tibor Wittmann[1], Ferenc Izbéki[1], András Rosztóczy[1], György Lázár[2], István Németh[3], László Tiszlavicz[3], Péter Hegyi[1]

[1]1st Department of Medicine University of Szeged, [2]Department of Surgery University of Szeged, [3]Institute of Pathology University of Szeged

In 2003 at the First Department of Medicine of the University of Szeged we initiated the ***South Hungarian Regional Surveillance Group for the Study of Barrett Esophagus*** with participating gastroenterologists, surgeons, pathologists from hospitals in counties Csongrád, Békés and Bács-Kiskun and the ***South-Hungarian Barrett Register*** has been established by the members. Up to the end of December 2011, data from 1200 patients with Barrett's esophagus has been entered into this database. This database is still the only source of data with respect to prevalence and treatment options of Barrett's esophagus in Hungary which supplies data into international databases. The results of the studies supported from ETT grand were presented in 10 Hungarian and international conferences.

Original observations made by the analysis of the database:

9. Patients with specialized intestinal metaplasia had more severe esophageal function abnormalities than those with other types of esophageal metaplasia (e.g. gastric).
10. The esophageal function was further impaired if dysplasia was present in the metaplastic mucosa.
11. Meticulous evaluation of the biopsies revealed that the different types of metaplasia coexist commonly.
12. Superficial mucus glands play a central role in the differentiation of the metaplastic mucosa.
13. The detailed evaluation of the esophageal morphology and function in subjects with CIP showed a high prevalence of GERD and Barrett's esophagus.
14. Laparoscopic antireflux surgery can appropriately control the reflux disease in a majority of the patients who had unsuccessful medical treatment.
15. The laparoscopic Nissen fundoplication inhibited the progression and induced the regression of Barrett's metaplasia in a significant proportion of these patients during 5 years of follow-up.
16. In the medically treated (double-dose proton pump inhibitor alone or double-dose proton pump inhibitor + aspirin) groups involving 103 patients, development of new or increase of the grade of dysplasia in esophageal metaplasia have not been observed during the period of 29 months observation.

References: [**1**]Rosztóczy A, Izbéki F, Róka R, Németh I. Gecse K, Vadászi K, Kádár J, Vetró É, Tiszlavicz L, Wittmann T. The evaluation of oesophageal function in patients with different types of oesophageal metaplasia. **Digestion. 2011;84:273-80.** [**2**]Rosztóczy A., Izbéki F., Németh I.B., Dulic S., Vadászi K., Róka R., Gecse K., Gyökeres T., Tiszlavicz L., Wittmann T. Detailed oesophageal function and morphological analysis shows high prevalence of gastro-oesophageal reflux disease and Barrett's oesophagus in patients with cervical inlet patch. **Dis Esophagus. 2011 Nov 22. [Epub ahead of print]** [**3**].Nemeth I.B., Rosztoczy A., Izbeki F, Roka R, Gecse K, Sukosd F, Nyari T, Wittmann T, Tiszlavicz L. A renewed insight into barrett's esophagus: Comparative histopathological analysis of esophageal glandular metaplasia. **Dis Esophagus. 2011 Oct 28. [Epub ahead of print]** [**4**] Simonka Z, Paszt A, Abrahám S, Pieler J, Tajti J, Tiszlavicz L, Németh I, Izbéki F, Rosztóczy A, Wittmann T, Rárosi F, Lázár G. The effects of laparoscopic Nissen fundoplication on Barrett's esophagus: Long-term results. **Scand J Gastroenterol. 2012;47:13-21. [5**]. Inczefi O, Nemeth I, Izbeki F, Roka R, Gecse K, Tislavicz L, Vadaszi K, Wittmann T, Rosztoczy A. Long-term follow-up of mucosal cyclooxygenase-2 (COX-2) activity in patients with Barrett's metaplasia and aspirin treatment. **Gut 2010, 59 (Suppl2): A116. [6]** Benkő É, Ocskó Cs, Németh I, Izbéki F, Róka R, Gecse K, Vadászi K, Tiszlavicz L, Wittmann T, Rosztóczy A. Evaluation of patients with endoscopically suspected esophageal metaplasia (ESEM) by trimodal - high resolution magnifying endoscopy (HRME), endoscopic autofluorescence (AFI) and narrow band imaging (NBI) endoscopic technique - initial Hungarian experience. **Z Gastroenterol 2009, 47, 460A. [7]** Rosztóczy A, Németh I, Izbéki F, Vadászi K, Róka R, Gecse K, Tiszlavicz L, Wittmann T. Expression of protease-activated receptor-2 (PAR-2) in Barrett's esophagus. **Z Gastroenterol 2009, 47, 479A.** [**8**] A. Rosztóczy, P. Hegyi, D. Laczkó, Z. Rakonczay Jr., F. Izbéki, T. Wittmann, V. Venglovecz. Functional characterization of metaplastic human oesophageal epithelial cells **Gut 2011; 60 (Suppl 3) A376-377.**

Teljes támogatás: 4.800.000,- Ft

A SZENZORINEURÁLIS HALLÁSKÁROSODÁSOK SEJTSZÍNTŰ MECHANIZMUSAINAK ÉS GYÓGYSZERES PROTEKCIÓJÁNAK VIZSGÁLATA

Zelles Tibor[1], Fekete Ádám[1], Szabó Szilárd[1], Horváth Tamás[2,4], Polony Gábor[3], Aller Máté[4,1]
[1]MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet, [2]Bajcsy-Zsilinszky Kh., Fül-Orr-Gége Osztály, [3]Semmelweis Egyetem, Fül-Orr-Gégészeti és Fej-Nyaksebészeti Klinika, [4]Semmelweis Egyetem Doktori Iskola

A halláskárosodás a leggyakoribb szenzoros deficit. Több mint 250 millió embert érint. Bármely életkorban előfordulhat, bármilyen súlyossággal, jelentős szociális és gazdasági terheket rakva a társadalomra. Nagy az igény olyan gyógyszerek fejlesztésére, amelyek a szenzorineurális halláskárosodások (SNHL; pl. presbycusis, zaj- vagy aminoglikozid antibiotikumok okozta halláskárosodás) megelőzésére és kezelésére alkalmasak. Az adekvát terápia hiánya elsősorban a molekuláris patomechanizmus alapos ismeretének hiányára vezethető vissza. *Kutatási témánk* a patomechanizmus két fő komponensének, a hallóneuronok excitotoxikus károsodásának és a redox homeosztázis károsodásának vizsgálatára, valamint a lehetséges protekcióra összpontosított.

Vizsgáltuk az excitotoxikus idegsejt károsodás egyik meghatározó elemét, az intracelluláris Ca^{2+} homeosztázis zavarát és annak a károsodás során szintén fellépő perzisztens Na^+ árammal való kölcsönhatását. *Kimutattuk*, hogy a perzisztens, nem inaktiválódó Na^+ áram okozta $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés hátterében a feszültségfüggő Ca^{2+} csatornák, a Na^+/Ca^{2+} cserélő fordított működése valamint a mitokondriális Ca^{2+} felvétel és leadás eredő hatása áll. Ezek a tényezők meghatározott időbeliséggel járulnak hozzá a Ca^{2+} emelkedéshez. (*Fekete et al., J. Neurochem.*)

Az intracelluláris Ca^{2+} jelátvitelt vizsgáltuk a Corti szervben is (halló érzékszervünk). Úgy gondolják, hogy az ATP, amelynek szintje megemelkedik zajkárosodás során, része a belsőfül védelmi rendszerének. *Kimutattuk*, hogy az ATP okozta Ca^{2+} emelkedésért, bár a Corti szerv különböző támasztósejtjeiben különböző mértékben, de mind az ionotróp (P2X), mind a metabotróp (P2Y) purinerg receptorok felelősek. Ennek a purinerg receptor mediálta Ca^{2+} szignalizációnak szerepe lehet az ATP SNHL-ok elleni védő hatásában.

A halláskárosodások hátterében álló másik fontos tényező a reaktív oxigán származékok (ROS). Szerepük igazolt az összes SNHL-ban. Változásuk dinamikája és pontos mechanizmusa azonban ismeretlen, megfelelő idő- és térbeli felbontású mérésük hiányában. *Kifejlesztettünk* egy fluoreszcens ROS festékre (hydroetidin) épülő funkcionális imaging módszert, amellyel egy örökletes emberi süketség modelljéül szolgáló egértörzs felnőtt egyedeinek hemicochleájában tudjuk mérni a szuperoxid képződést. Az eredmények a genetikailag módosított egerek ROS homeosztázisának és mitokondriumainak károsodását mutatták.

A laterális olivocochleáris (LOC) efferensek beidegzik a primér hallóneuronokat és védik őket a SNHL-okban fellépő excitotoxicitástól. A dopamin (DA), a LOC efferensek egyik transzmittere, fontos szerepet játszik ebben a védő hatásban. *In vitro* kísérletekben a cochleáris DA felszabadulás befolyásolásának számos módját *írtuk le* és *felfedeztük* a rasagilin DA felszabadulást potencírozó hatását. Ezek az eredmények felvetették ennek az antiparkinson és neuroprotektív hatással is rendelkező vegyületnek a SNHL-okban való alkalmazását. (*Lendvai et al., Neurochem. Int.*)

Az ötletet *szabadalmaztattuk* és *beállítottunk* egy kanamycin indukálta halláskárosodás modellt, hogy *in vivo* tesztelhessük a potenciálisan otoprotektív vegyületeket. Az aminoglikozid antibiotikumok jól ismertek halláskárosító mellékhatásukról. Hallásküszöböt mérve objektív audiometriával (ABR) *megállapítottuk*, hogy a rasagilin csökkentette a kanamycin okozta hallásromlást a magasabb frekvenciákon, ahol a károsodás kifejezettebb.

Összefoglalva: vizsgáltuk a SNHL-ok patomechanizmusát és találtunk egy potenciálisan hallásvédő vegyületet, aminek klinikai kipróbálását tervezzük.

Fekete A, Franklin L, Ikemoto T, Rózsa B, Lendvai B, Vizi ES, Zelles T. J NEUROCHEM, 111(3): 745-56 (2009) IF: 3.999
Lendvai B, Halmos GB, Polony G, Kapocsi J, Horváth T, Aller M, Vizi E.S, Zelles T. NEUROCHEM INT 59(2):150-8 (2011) IF: 3.601

Budget: 4,800,000.- HUF

DECIPHERING CELLULAR MECHANISMS OF SENSORINEURAL HEARING LOSSES AND TESTING POTENTIALLY COCHLEOPROTECTIVE COMPOUNDS

Tibor Zelles[1], Ádám Fekete[1], Szilárd Szabó[1], Tamás Horváth[2,4], Gábor Polony[3], Máté Aller[4,1]
[1]Institute of Experimental Medicine, HAS, [2]Bajcsy-Zsilinszky Hosp., Dept. Otorhinolaryngology, [3]Semmelweis University, Dept. Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, [4]Semmelweis University, School. of Ph.D. Studies

Hearing impairment is the most frequent sensory deficit, affecting more than 250 million people worldwide. It may occur at any age with any degree of severity and can impose a heavy social and economic burden on the society. There is a massive demand for the development of drugs that can prevent and cure sensorineural hearing losses (SNHLs; e.g. presbycusis, noise- or aminoglycoside-induced hearing loss). Absence of adequate drug therapy is mainly due to the insufficient knowledge of the basic molecular mechanisms of SNHLs. *Our project was focusing on* excitotoxic injury of the hearing nerves and damage of the redox homeostasis, two major components of the patomechanism. Finding a potentially otoprotective drug was also an aim.

We investigated a basic component of excitotoxic damage of nerve cells, i.e., the disturbance of intracellular Ca^{2+} homeostasis and its interaction with persistent Na^{+} current. *We showed* that the underlying mechanisms for increased persistent, non-inactivating Na^{+} current-evoked elevation of $[Ca^{2+}]_i$ are the influx of Ca^{2+} through the voltage-gated Ca^{2+} channels, reverse operation of the Na^{+}/Ca^{2+} exchanger and the net effect of mitochondrial Ca^{2+} uptake and release. These components contribute to the Ca^{2+} signal with different temporal patterns. (*Fekete et al., J. Neurochem.*)

The intracellular Ca^{2+} signaling was also investigated in the organ of Corti, which is the transducer of hearing. ATP, the level of which is increased in noise-induced HL, is thought to be a part of the defending system in the inner ear. *We showed* that the ATP-evoked Ca^{2+} response in different supporting cells of the organ of Corti is mediated through both ionotropic (P2X) and metabotropic (P2Y) purinergic receptors. This purinergic receptor-mediated Ca^{2+} signaling is supposed to be important in the protection what ATP exerts against SNHLs.

Another important factor involved in hearing impairment is the imbalance between reactive oxygen species (ROS) production and elimination. The role of ROS is substantiated in all forms of SNHLs. However, the dynamics and precise mechanisms of its changes are unknown, mainly because of the absence of a reliable detection method. *We developed* a functional imaging method, using the ROS sensitive fluorescent dye hydroethidine to measure superoxide production in hemicochlea prepared from adult mice of a model of human hereditary deafness. Results showed a malfunction of redox homeostasis and mitochondria in the genetically modified mice.

Lateral olivocochlear (LOC) efferents innervate the primary auditory neurons and protect them against glutamatergic overstimulation (excitotoxicity) in SNHLs. Dopamine (DA), released from LOC efferents, plays an important role in this protection. In *in vitro* experiments *we explored* several ways of the modulation of LOC DA release and also *discovered* the significant potentiating effect of rasagiline on the action potential-evoked DA release. These results rised the possibility of using this antiparkinsonian and neuroprotective drug in SNHLs. (*Lendvai et al., Neurochem. Int.*)

The idea was *patented* and *we set up* a kanamycin-induced HL model for testing the potentially otoprotective effect *in vivo* in mice. Aminoglycoside antibiotics are well known for their SNHL-inducing side effects. Measuring hearing threshold by objective audiometry (ABR) *revealed* that rasagiline attenuates the kanamycin-evoked HL at higher frequences, where the impairment is more pronounced.

In summary, we investigated the patomechanism of SNHLs and found a potentially otoprotective drug, ready for clinical trial.

Fekete A, Franklin L, Ikemoto T, Rózsa B, Lendvai B, Vizi ES, Zelles T. J NEUROCHEM, 111(3): 745-56 (2009) IF: 3.999

Lendvai B, Halmos GB, Polony G, Kapocsi J, Horváth T, Aller M, Vizi E.S, Zelles T. NEUROCHEM INT 59(2):150-8 (2011) IF: 3.601

Teljes támogatás: 2.400.000,-Ft

A SZÓJA ÉS A SZÓJA EREDETŰ FITOÖSZTROGÉNEK SZÁJÜREGI HATÁSAI

Zelles Tivadar[1], Fehér Erzsébet[2]
[1]Orálbiológiai Tanszék, [2]Anatómiai, Szövettani és Fejlődéstani Intézet
Semmelweis Egyetem

A szóját egyre nagyobb mértékben alkalmazzák tápanyag kiegészítőként. Nőknél a hormon-helyettesítő terápia alternatívájaként ajánlják mamma carcinoma esetén és osteoporosisban. Korábbi adatok szerint a nyers szójababbal táplált patkányokban pancreas hipertrófia és hiperplázia alakult ki. A nyers szójabab parotisra kifejtett hatását patkányokon vizsgáltuk. Fényt kívántunk deríteni a különböző neuropeptid tartalmú idegrostok szerepére az acinus sejtek változásaiban. Fény- és elektronmikroszkóppal vizsgáltuk a mirigyek struktúráját, valamint a neuropeptid-tartalmú idegrostokat (NPY, GAL, SOM, SP, CGRP, VIP). A parotisok súlya jelentősen növekedett a szójababbal táplált állatokban a kontrolokhoz viszonyítva. A neuropeptid tartalmú idegrostok változásai különbözőek voltak: az NPY-immunreaktív rostok száma szignifikánsan csökkent, a GAL-immunreaktív rostoké viszont jelentősen növekedett. Enyhe növekedést találtunk a VIP-rostok esetében. A többi vizsgált immunreaktív rostok száma változatlan maradt. Elektronmikroszkóposan nagyszámú differenciálatlan mirigysejtet találtunk az acinus sejtek között. Ezek közül számos sejt két magot és kisszámú granulumot tartalmazott. Ezek a granulumok azonban nem a szerózus, hanem a mukózus sejtekben találhatókhoz hasonlított. A kapott eredmények direkt morfológiai bizonyítékokat szolgáltatnak a szója-táplálásnak a parotis struktúrájára, valamint neuropeptid tartalmú idegrostjaira kifejtett hatásáról. Feltehetően az igen jelentős mirigy-megnagyobbodás hátterében az itt leírt változások állanak.

A nyálmirigykutatás egyik legrégebbi elméleti és gyakorlati kérdése, hogy vajon a mirigyek tömege és a funkcionális kapacitásuk között szoros-e a kapcsolat? Elfogadott, hogy a technetium felvétel különösen alkalmas a mirigyfunkció vizsgálatára. Az egyidejű hipertrófia/hiperplázia (Htr/Hpl) állatkísérletes model alkalmasnak látszik a kérdés vizsgálatára. Korábban kimutattuk, hogy a hőkezelt szójababbal történő táplálás a parotis igen jelentős mértékű, egyidejű hipertrófiáját/hiperpláziáját okozza (hasonlatosan a pancreas megnagyobbodásához) patkányokban. Meglepő, de ugyanez a hatás nem érvényesül a submandibularis mirigyben. Egy másik alkalmas model a vizsgálatokra az Isoproterenollal (ISO) történő kezelés, ahol mindkét nagy nyálmirigy jelentős hipertrófiája/hiperpláziája alakul ki. A nyálmirigyek funkcionális aktivitását a non-invasive, dinamikus NanoSPECT/CT készülékkel/módszerrel vizsgáltuk a mirigyek nyugalmi állapotában. Kísérleti állataink a vizsgálathoz ~100 MBq of 99mTcO4-t kaptak. A Tc-99 maximális felvétele mindkét vizsgálati csoportban és mindkét vizsgált nagy nyálmirigyben a 10. percen belül alakult ki. A maximális technetium felvétel a kísérletek 5., majd 10. napjára graduálisan emelkedett a parotisok esetében, mind a szójával táplált, mind az ISO-val kezelt állatokban, illetve az ISO-val kezelt állatok submandibularis mirigyeiben. Ez az emelkedés nem következett be a szójával kezelt állatok submandibularis mirigyeiben – amelyekben a mirigymegnagyobbodás sem jött létre. Az eredmények értékelése azt mutatta, hogy egyrészt a mirigyek megnagyobbodásával egyidejűleg növekedik a „funkcionális kapacitásuk”, ez azonban elmarad a szerv-tömegek növekedésétől.

Az orvosi és fogorvosi gyakorlatban elterjedten alkalmazzák a fluoroquinolonokat (i.e. Peflacine, PEF). A legismertebb gasztrointesztinális mellékhatásuk a nyáltermelés

csökkentése. Korábbi kísérleteinkben kimutattuk, hogy a krónikus PEF-kezelés patkányokban a szekréciós egységek atrófiáját okozza. A csökkent nyáltermelés oka a Topoizomeráz II, illetve a DNS szintézis gátlása. Kísérleteinkben a Pefloxacin kezelés hatását vizsgáltuk patkányok parotisában, amely szerózus és gl.submandibularisában, amely mukózus nyálmirigy. Krónikus kezelés hatására az SP- és a CGRP-immunreaktiv idegrostok száma csökkent mindkét vizsgált nagy nyálmirigyben. Az SP és a CGRP-reaktivitás a nyálmirigyek szenzoros és a paraszimpatikus idegrostjaiban van jelen, így ezek az eredmények arra utalnak, hogy a PEF elsősorban a mirigyek paraszimpatikus innervációjára hat.

További támogatott gasztroenterológiai munkák:

A tengerimalac májának beidegzése jelentős hasonlóságot mutat az emberével: nagyszámú NPY és dopamin-ß-hydroxyláz immunreaktiv idegrostot lehet megfigyelni szoros kapcsolatban a centrális vénákkal. Intralobulárisan néhány substance P, somatostatin és VIP rost volt megfigyelhető, míg galanin-rostokat csak a portális triádok körül találtunk.

Az idegrostokból, limfocitákból és hízósejtekből történő substance P release, továbbá a TNF-α gastritisben résztvesznek a gyulladás fokozásában és a szövetkárosodás kialakulásában.

Szőke E, Zelles T, Boros I, Fehér E: Effects of raw soya diet on the rat parotid gland. Acta Alimentaria, 38, 237-248, 2009.

Zelles T, Kellermayer M, Máthé D, Dobó-Nagy C, Horváth I, Offenmüller K, Szigeti K : Technetium-99 pertechnetate imaging of parotid hypertrophy/hyperplasia in unstimulated state. CED-IADR Meeting, p.32, 2011. Under compilation to Archives of Oral Biology

Kelentey B, Deak A, Zelles T, Matesz K, Foldes I, Veress G, Bacskai T: Modification of innervations pattern by fluoroquinolone treatment in the rat salivary glands. The Anatomical Records, 293, 271-279, 2010.

Pongor É, Ledó N, Altdorfer K, Lengyel G, Fehér E: Distribution and possible origin of neuropeptide-containing nerve elements in the mammalian liver. Acta Veter. Hung. 58, 177-187. 2010.

Fehér E.: Neuroimmunmoduláció a gyomor nyálkahártyában. Orv. Hetil. 47, 1930-1933, 2010.

Pongor É, Altdorfer K, Fehér E.: Colocalization of substance P with tumor necrosis factor-α in the lymphocytes and mast cells in gastritis in experimental rats. Inflamm Res., 60, 163-168, 2011.

Budget: 2.400.000.-HUF

EFFECTS OF SOYA AND SOYA-DERIVED FITOESTROGENS ON THE ORAL CAVITY

Zelles Tivadar[1], Fehér Erzsébet[2]
[1]Department of Oral Biology, [2]Department of Anatomy, Histology and Embriology, Semmelweis University

Soy is increasingly used as a food additive. In women, it is recommended as an alternative to hormonal replacement therapy or/and a preventive agent against breast cancer and osteoporosis. Previous data revealed that rats fed on raw soybean diet developed pancreas hypertrophy and hyperplasia. An animal model was used in our experiment to examine the effects of raw soybean on parotid gland of rats. The purpose of this study was to light on the role of different neuropeptide-containing nerve fibres on changes in the acinar cells. The morphological structure and the neuropeptide-containing nerve fibers (NPY, GAL, SOM, SP, CGRP, VIP) of the glands were examined by light and electronmicroscopy. Significant increase of the organ weight was detected in the animals fed by raw soybean compared to control samples. Changes in the number of different neuropeptide-containing nerve fibres were various: Significant decrease in the NPY-immunoreactive (IR) and significant increase in the GAL-IR nerve fibres were observed.Slight but not significant increase in VIP-IR-; and no changes in the other IR nerve fibres were found. The electronmicroscopic alterations of acinar cells were manifest, where a large number of undifferentiated glandular cells were seen among the acini. Some of these cells contained two nuclei and their cytoplasm contained only a few secretory granules. These granules were similar to those in the mucous cells but not to the serous ones. The results presented here provide direct morphological evidence for the role of raw soy on the density of different neuropeptide-containing nerve fibres inducing proliferation in the acinar cells of parotid glands from rats. It is suggested that the hypertrophic changes in the glands might be caused by the alterations of nerve fibres.

One of the oldest questions in the salivary research – both in theoretical and clinical aspects – is whether there is a close relation between tissue mass and functional capacity of salivary glands? It is widely accepted that the technetium uptake is particularly useful for evaluating the glandular functions. The hypertrophy and simultaneous hyperplasia (Htr/Hpl) model appears suitable to study this question. Previously we have shown that heat treated raw soya-bean feeding induces a marked Htr/Hpl of rat parotids (similar to the pancreas enlargement induced by soya). A surprising difference is the lack of effect of the soya diet on submandibular glands. There is another animal model, the well known Isoproterenol (ISO)-Htr/Hpl, where both maior glands are enlarged. The functional activity of salivary glands was scanned for 10 days by the dynamic, non-invasive NanoSPECT/CT method under unstimulated conditions in the above-mentioned Htr/Hpl in rats. Animals were injected with ~100 MBq of 99mTcO4 and imaged after injection. Maximal Tc-99 uptake was reached within 10 minutes by all glands in both treatment groups. Gradually increased uptake was detected on the 5th and 10th days by the parotids, of both soya and ISO-treated animals and by the submandibular glands of ISO-treated rats. There was no increase in the submandibular glands of soya-fed rats. Conclusions: There is a simultaneous increase of tissue mass and function in the glands where Htr/Hpl were detected but the increased rate of function is lower than the glands.

Fluoroquinolones (i.e. Peflacine, PEF) are widely used in dental and medical therapy. The most common side effects of the fluoroquinolones are the gastrointestinal disorders

accompanied by the decreased saliva production. It was previously demonstrated that chronic treatment of the rat with PEF resulted in morphological sign of atrophy in the secretory units. The molecular mechanism of decreased saliva production caused by PEF treatment was explained by the topoisomeraze II inhibition and subsequent disorder of DNA synthesis. Methods: The aim of this study was to determine the effect of pefloxacin treatment to the innervation pattern of the parotid, as a pure serous, and sublingual, as pure mucous salivary glands of the rat. After chronic treatment with PEF we have found decrease of SP and CGRP-immunoreactive nerve fibers in the major salivary glands. As SP and CGRP are present in the sensory and the parasympathetic nerves of salivary glands, these findings suggest that the PEF effects mainly on the parasympathetic innervation of salivary glands.

Additional works in the gastroenterology were supported:

The innervation of the guinea pig liver shows the highest similarity to that of the human liver: Large numbers of NPY and dopamine-ß-hydroxylase immunoreactive nerve fibers were observed in close contact with central veins and ran parallel with sinuses. A few substance P, somatostatin and VIP fibers were also detected intralobularly, while galanin nerve fibres were only observed around portal triads.

Substance P release from nerve fibers, lymphocytes and mast cells together with TNF-α can enhance the development of gastric inflammation and participate in tissue damage in gastritis

Szőke E, Zelles T, Boros I, Fehér E: Effects raw soya diet on the rat parotid gland. Acta Alimentaria, 38, 237-248, 2009.

Zelles T, Kellermayer M, Máthé D, Dobó-Nagy C, Horváth I, Offenmüller K, Szigeti K : Technetium-99 pertechnetate imaging of parotid hypertrophy/hyperplasia in unstimulated state. CED-IADR Meeting, p.32, 2011. Under compilation to Archives of Oral Biology

Kelentey B, Deak A, Zelles T, Matesz K, Foldes I, Veress G, Bacskai T: Modification of innervations pattern by fluoroquinolone treatment in the rat salivary glands. The Anatomical Records, 293, 271-279, 2010.

Pongor É, Ledó N, Altdorfer K, Lengyel G, Fehér E: Distribution and possible origin of neuropeptide-containing nerve elements in the mammalian liver. Acta Veter. Hung. 58, 177-187. 2010.

Fehér E.: Neuroimmunmoduláció a gyomor nyálkahártyában. Orv. Hetil. 47, 1930-1933, 2010.

Pongor É, Altdorfer K, Fehér E.: Colocalization of substance P with tumor necrosis factor-α in the lymphocytes and mast cells in gastritis in experimental rats. Inflamm Res., 60, 163-168, 2011.