

DEBRECENI EGYETEM

Laki Kálmán Doktori Iskola

Doktorandusz hallgatóinak 2017. évi konferenciája

2017. június 9.

Program

Előadás kivonatok

Helyszín: DE, Klinikai Központ, Augusztá nagyelőadó terem

Program

- 13:00 Megnyitó **Prof. Dr. Balla József**
- 13:05-14:15 **PhD értekezés előzetes vitája**
- Mezei Zoltán András:
Regulation of plasma factor XIII levels in healthy individuals;
factor XIII and the risk of coronary artery disease
- A vitát vezeti: Prof. Dr. Balla József, MTA doktor
Hivatalos bírálók: Dr. Lizanecz Erzsébet, PhD
Dr. Pfliegler György, PhD
- 14:15-14:45 **Szünet**
- 14:45-16:00 **PhD konferencia, Szekció I.**
- Moderátor: **Prof. Dr. Muszbek László**
Prof. Dr. Papp Zoltán
- 14:45-15:00 **Balogh Gábor**
A XIII-as véralvadási faktor transzglutamináz reakciójának első lépése, in silico kísérletek
- Témavezető: Dr. Komáromi István
Intézet: Debreceni Egyetem, ÁOK, LMI, Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszék
- 15:00-15:15 **Bíró Erika**
Gyermekkori tumor lízis szindróma, és ami mögötte van
- Témavezető: Dr. Szabó Tamás
Intézet: Debreceni Egyetem, KK, Gyermekgyógyászati Intézet
- 15:15-15:30 **Bódi Beáta**
Kapcsolat a titin izoformák érése és a szívizomsejtek oxidatív károsodása között
- Témavezető: Prof. Dr. Papp Zoltán
Intézet: Debreceni Egyetem, Klinikai Fiziológiai Tanszék

- 15:30-15:45 **Csípő Tamás**
A Tranziens Receptor Potenciál Melastatin-4 (TRPM4) gátlásának vazorelaxáns hatásai
Témavezető: Prof. Dr. Tóth Attila
Intézet: Debreceni Egyetem, ÁOK, Klinikai Fiziológiai Tanszék
- 15:45-16:00 **Csongrádi Alexandra**
A hemoglobin és bomlástermékei gátolják a szérum- és a szöveti ACE-aktivitást
Témavezető: Prof. Dr. Tóth Attila
Intézet: Debreceni Egyetem, ÁOK, Klinikai Fiziológiai Tanszék
- 16:00-16:15 **Szünet**
- 16:15-17:45 **Szekció II.**
Moderátor: **Prof. Dr. Kappelmayer János**
Prof. Dr. Kiss Csongor
- 16:15-16:30 **Esze Regina**
A mannózkötő lektin szint hatása az arteria carotis intima-media vastagságra 2-es típusú diabetesben 7 éves követés során
Témavezető: Dr. Káplár Miklós
Intézet: Debreceni Egyetem, KK, Belgyógyászati Intézet
- 16:30-16:45 **Kárai Bettina**
Áramlási Citometriai vizsgálatok myelodysplasiaszindrómában
Témavezető: Dr. Hevessy Zsuzsanna
Intézet: Debreceni Egyetem, ÁOK, Laboratóriumi Medicina Intézet
- 16:45-17:00 **Nagy Annamária**
Cink hatása a vaszkuláris simaizomsejtek oszteoblasztos transzformációjára
Témavezető: Prof. Dr. Balla József
Intézet: Debreceni Egyetem, KK, Belgyógyászati Intézet, Nephrológiai Tanszék, Vaszkuláris Biológiai Kutató Laboratórium

17:00-17:15

Pethő Dávid

Az alfa-1-mikroglobulin szerepe az ateroszklerózisban

Témavezető: Prof. Dr. Balla József

Intézet: Debreceni Egyetem, KK, Belgyógyászati Intézet, Nephrológiai Tanszék, Vaszkuláris Biológiai Kutató Laboratórium

17:15-17:30

Speker Marianna

A protein C deficiencia laboratóriumi és molekuláris genetikai aspektusai

Témavezető: Dr. Bereczky Zsuzsanna

Intézet: Debreceni Egyetem, ÁOK, LMI, Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszék

17:30-17:45

Nánásy-Vass Melinda

Immunadszorpciók kezelése alkalmazása dilatatív cardiomyopathiában, kezdeti tapasztalatok

Témavezető: Prof. Dr. Soltész Pál

Intézet: Debreceni Egyetem, KK, Belgyógyászati Intézet, Angiológiai Tanszék

17:45-

Összegzés – Prof. Dr. Balla György

A XIII-as véralvadási faktor transzglutamináz reakciójának első lépése, in silico kísérletek

Balogh Gábor

Témavezető: Dr. Komáromi István

Intézet: Debreceni Egyetem, ÁOK, LMI, Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszék

A XIII-as véralvadási faktor A alegysége a transzglutamináz enzimek családjába tartozik, aktív formája izopeptid kötések kialakítására képes szubsztrátok glutamin, illetve lizin oldalláncai között. A transzglutamináz reakció mechanizmusára vonatkozóan kevés a rendelkezésre álló kísérleti adat. Célunk a reakciómechanizmus első lépésének (tioészter intermedier képződése, ammónia felszabadulás) vizsgálata, valamint az átmeneti állapotok és az intermedierek szerkezetének meghatározása volt ONIOM-típusú hibrid QM/MM számításokkal, MP2, illetve sűrűségfüggő (M06-2X, ω B97XD) QM módszerek alkalmazásával. Ezen kívül hibrid QM/MM metadinamikai szimulációkat is végeztünk a DFTB3 félempirikus QM módszer segítségével.

A nem-proteolitikusan aktivált FXIII-A röntgendiffrakciós szerkezetéből az α 2-antiplazmin N-terminális dodekapeptidjét dokkolatva nyert kiindulási szerkezetet szimulált hőkezelés segítségével finomítottuk. A Michaelis-komplex ONIOM(MP2:AMBER) típusú számítások és QM/MM/MD metadinamika alapján egyaránt ikerionos szerkezetű (Cys314 tiolát, protonált His373). A rácspontokban végzett geometriaoptimalizálás útján nyert potenciálisenergia-felületeken egy ikerionos szerkezetű intermedier volt megfigyelhető tetraéderes geometriájú szénatommal. Az átmeneti állapot és az intermedier zérusponthoz vibrációra korrigált energiája valamennyi DFT módszer és bázis mellett közel azonosnak adódott, az energiáját 80-105 kJ/mol. Az ikerionos intermedier (korrigálás után) alacsony, 22-27 kJ energiáját leküzdésével tioészterre alakulhat tovább a C-N kötés hasadása révén. Ezzel szemben a QM/MM/MD metadinamikával nyert potenciálisenergia-felület egy egylépéses reakcióra enged következtetni 98 kJ/mol energiagáttal, ahol az ammónia felszabadulása a nukleofil támadást követően azonnal végbemegy.

Megfigyeléseinkből arra következtethetünk, hogy a korábban javasolt (Pedersen et al., Protein Sci 1994; 3: 1131) reverz ciszetin-proteáz reakció felülvizsgálatra szorul.

Bíró Erika

Témavezető: Dr. Szabó Tamás

Intézet: Debreceni Egyetem, KK, Gyermekgyógyászati Intézet

A leukémiák, limfómák az összes gyermekkori rosszindulatú megbetegedés közül a leggyakrabban előforduló kórformák. Míg hosszú időn át a tumoros kórképek a gyógyíthatatlan betegségek közé tartoztak, napjainkban a betegek jó része gyógyultan távozik a klinikákról, illetve hosszú távú túlélőnek számít. Így egyre inkább előtérbe kerül az életminőség megőrzése, a betegség során jelentkező súlyos szövődmények rizikóbecslése és azok elkerülési lehetőségeinek vizsgálata.

A daganatok és az extrakorporális (EC) technikák közötti kapcsolat elemzése során irányult figyelmünk a tumor lízis szindrómára. A tumor lízis szindróma (TLS) a tumor sejtek szétesése következtében kialakuló metabolikus és elektrolit zavar, mely szövődményeivel (hirtelen szívhálál, görcsök, veseelégtelenség) a potenciálisan életveszélyes kórképek közé tartozik. Valamilyen kórformája (laboratóriumi, illetve klinikai) a hematológiai betegek 0,9-26 %-ban alakul ki, és akut veseelégtelenségük harmadik leggyakoribb oka. Kezelése során, figyelembe véve a metabolikus krízist és akut veseelégtelenséget, az EC technika igénye is fölmerül; melynek tényleges szükségessége, a kezelés megkezdésének időpontja az irodalmat is megosztja. A TLS kapcsolódó vesepótló kezelés szükségessége 10-50 %-ot mutat.

A szindróma leírása során több, a leukémiák típusával összefüggő rizikó besorolás, illetve laboratóriumi paramétereknek megfelelő definíció került elfogadásra, de ezek számos ponton (dialízis indikáció, prognózis meghatározás, nefrológiai követés, egyéb laborparaméterekkel, scorokkal való kapcsolata) kifejtetlenek maradtak.

Retrospektív vizsgálatainkban a 2006 és 2016 között kezelt leukémiás, limfómás gyerekeknél előforduló TLS-t vizsgáljuk, elsősorban nefrológiai szempontból, jelentős hangsúlyt helyezve az EC technikai igényre, valamint az utánkövetésre.

Jelenleg statisztikusok bevonásával kezdtük adatalemzésünket egy kiterjedt vizsgálati modell alapján. A vizsgálati időben a DEKK Gyermek Hematológiai Tanszékén 190 gyermeket kezelték, ahol kb. 10 % volt a legalább laboratóriumi TLS előfordulása (Cario-Bishop féle besorolás). Ezen belül kb. 50%-ban fordult elő valamilyen EC kezelés, melynek indikációja rendkívül széles körű volt. Az adatok földolgozása jelenleg is folyamatos. Tekintettel a nem túl magas betegszámra, egy országos tanulmány elkészítését tervezzük, mellyel kapcsolatban az előkészületek, egyeztetések szintén folyamatban vannak.

Kapcsolat a titin izoformák érése és a szívizomsejtek oxidatív károsodása között

Bódi Beáta

Témavezető: Prof. Dr. Papp Zoltán

Intézet: Debreceni Egyetem, Klinikai Fiziológiai Tanszék

Bevezetés: A szívizomsejtek posztnatális adaptációja során a kevésbé rugalmas N2B titin izoforma expressziója fokozódik a rugalmas N2BA izoformával szemben, mely a szívizomsejtek Ca^{2+} -független passzív erejének ($F_{\text{passzív}}$) fokozódását eredményezi. A titin oxidatív módosulásai fontos szerepet játszhatnak az újszülöttkori diasztolés diszfunkció létrejöttében. Ezért azt vizsgáltuk, hogy a szívizomsejtek $F_{\text{passzív}}$ értékei hogyan módosulnak *in vitro* alkalmazott oxidatív hatásokra különböző titin izoforma arányok mellett.

Anyagok és módszerek: Mechanikai és biokémiai vizsgálatainkat különböző életkorú (0,7,21 napos, fiatal; és 8 hetes, felnőtt) patkányok mechanikailag izolált és kémiaileg permeabilizált bal kamrai szívizomsejtjein végeztük. *In vitro* kísérleteink során az oxidatív hatásokat 10mM 2,2'-dithiodipyridine(DTDP) és Fenton reagens(50 μ M FeSO_4 , 1,5mM H_2O_2 , 6mM aszkorbinsav) alkalmazásával végeztük. Az izoformák *in vitro* SH oxidációjának és karbonilációjának követését (biotinilációt és OxyBlot™ technika) Westen immunoblot analízissel végeztük.

Eredmények: A DTDP és Fenton reagensek hatására 0 és 7 napos korban az $F_{\text{passzív}}$ szignifikánsan emelkedett, mely változás relatív értelemben a 21 napos fiatal és felnőtt állatokban mérséklődött (normalizált $\Delta F_{\text{passzív(DTDP)}}$ rendre: 99,29 \pm 26,02% vs. 64,89 \pm 23,2% vs. 38,57 \pm 20,9, vs. 18 \pm 7%;; normalizált $\Delta F_{\text{passzív(Fenton)}}$ rendre: 138 \pm 33%; vs. 55 \pm 13% vs. 27 \pm 8% vs. 18 \pm 7%; SL: 2,3 μ m, n=6-8). Az N2BA és N2B izoformák relatív oxidált-SH tartalma és a karbonilációja a kezeléseket követően a kor előrehaladtával szintén csökkent (N2BA_(DTDP): 80 \pm 1%, 71 \pm 1%, 64 \pm 1%, nem mérhető; N2B_(DTDP): 74 \pm 1%, 62 \pm 2%, 53 \pm 2%, 32 \pm 2%;; N2BA_(Fenton): 2,57 \pm 0,06 AU, 2,34 \pm 0,04 AU, 1,35 \pm 0,03 AU; nem mérhető; N2B_(Fenton): 2,9 \pm 0,1 AU, 2,58 \pm 0,04 AU, 1,74 \pm 0,04 AU, 1,53 \pm 0,05 AU a 0,7,21 napos és felnőtt patkányokban rendre, P<0,05, n=4-20).

Konklúzió: Posztnatális korban a szívizomsejtek $F_{\text{passzív}}$ értékei oxidatív jellegű behatásokra fokozatosan egyre kevésbé érzékenyek. A jelenség valószínűleg a titin izoformák éréséhez köthető.

A Tranziens Receptor Potenciál Melastatin-4 (TRPM4) gátlásának vazorelaxáns hatásai

Csípő Tamás

Témavezető: Prof. Dr. Tóth Attila

Intézet: Debreceni Egyetem, ÁOK, Klinikai Fiziológiai Tanszék

Kísérleteink célpontja, a Tranziens Receptor Potenciál Melastatin-4 (TRPM4), egy Na⁺-ra és K⁺-ra permeábilis intracelluláris Ca²⁺-koncentráció emelkedésére aktiválódó sejtfelszíni ioncsatorna. Irodalmi adatok alapján a TRPM4 csatornának fontos szerepe van a nyomásnövekedés indukálta membrán érfali depolarizáció és vazokonstrikció (miogén tónus) kialakításában. Célunk volt a csatorna érátmérő- és vérnyomás-szabályozásban betöltött szerepének pontosabb megismerése. Ennek érdekében in vivo környezetben, továbbá izolált mezenteriális és vázizom ereken vizsgáltuk a TRPM4 gátlásának hatásait, illetve megvizsgáltuk immunfluoreszcens festéssel az ioncsatorna jelentését és elhelyezkedését ugyanezen területekről származó szövetmintákban.

In vivo kísérleteink során hím Wistar-Kyoto patkányok artéria carotis-án keresztül invazív vérnyomásméréssel gyűjtöttünk adatokat. A TRPM4 antagonistá 9-Phenanthrol dóziszfüggő módon csökkentette az állatok vérnyomását.

Az izolált ereken végzett kísérletekben a TRPM4 gátlása a vázizomerek miogén tónusát felfüggesztette (120Hgmm-en mért érátmérő 100µM 9-phenanthrol hatására mért változása 168.18±65,36 µm-ről 239±22 µm-re), illetve a noradrenalin okozta vazokonstrikciót (10µM hatására érátmérő csökkenés 374±43 µm-ről 221± 41 µm-re) is csökkentette (100 µM 9-phenanthrol hatására érátmérő növekedés 221±41 µm-ről 396±23 µm-re) mezenteriális artéria preparátumon. A TRPM4 gátlás okozta vazodilatáció endothelfosztott ereken is kialakul (érátmérő növekedés 100±23 µm-ről 293±90 µm-re). Ezek alapján az eredmények alapján feltételeztük, hogy a TRPM4 jelen van az általunk vizsgált érterületeken, amelyet immunhisztokémiai módszerekkel meg is tudtunk erősíteni.

Eredményeink azt sugallják, hogy a TRPM4 szerepet játszhat a vazokonstrikció és miogén tónus kialakításában, és ez által a vérnyomás szabályozásában is.

A hemoglobin és bomlástermékei gátolják a szérums- és a szövetsi ACE-aktivitást

Csongrádi Alexandra

Témavezető: Prof. Dr. Tóth Attila

Intézet: Debreceni Egyetem, ÁOK, Klinikai Fiziológiai Tanszék

A renin-angiotenzin-aldoszteron rendszer (RAAS) kulcsfontosságú a vérnyomás szabályozásában. Túlzott aktivitása hipertóniához, illetve számos kardiovaszkuláris betegség kialakulásához vezethet, melynek szuppresszálása az angiotenzin-konvertáló enzim (ACE) aktivitásának gátlásán keresztül is megvalósulhat.

A szabad hemoglobin és bomlástermékei képesek csökkenteni a szérums- és a rekombináns ACE-aktivitását, *in vitro*. Munkánk során ezen endogén inhibitorok gátlásának típusát határoztuk meg, továbbá a szabad hemoglobin szövetsi endotél felszínén jelenlévő ACE-ra kifejtett hatását vizsgáltuk humán vena saphena érgyűrűkön.

Az ACE-aktivitás mérését fluoreszcens kinetikai módszerrel végeztük el, míg a szövetsi ACE gátolhatóságát koronária bypass (CABG) műtétekből (n=14) származó vena saphena érgyűrűkön (n= 20), izometriás miográf rendszeren vizsgáltuk.

Lineweaver-Burk-féle kettős reciprok ábrázolással a hemoglobin és bomlástermékei (hem, konjugált bilirubin) által kifejtett gátló mechanizmus hátterében nem kompetitív gátlást azonosítottunk (közös X-tengelyi metszéspont). A humán vena saphena ereken végzett mérések során 0,5 g/l hemoglobin jelenlétében angiotenzin I hozzáadásával (n=10 érgyűrű) az erek kontraktilitásának mértéke szignifikánsan csökkent a kontroll csoporthoz képest (norepinefrinhez viszonyított relatív erő hemoglobin nélkül; n=10 érgyűrű) (relatív erő: 39,49% ± 7,138%, kontroll: 79,25% ± 5,699%, p=0,0004). A kontrakció (kontroll: 0,1748 ± 0,03792 mN/sec; 0,1520 ± 0,04030 mN/sec, p=0,6849) és a deszenzitizáció (kontroll: 5,097 ± 1,042 μN/sec; 6,475 ± 0,9646 μN/sec, p=0,3445) kinetikájában nem találtunk különbséget.

Eredményeink alapján a hemoglobin és bomlástermékei nem kompetitív módon csökkentik a szérums ACE-aktivitását, továbbá a szabad hemoglobin képes gátolni a szövetsi ACE-aktivitását is, ezzel jelentősen csökkentve a RAAS aktivitását, *in vivo*.

A mannózkötő lektin szint hatása az arteria carotis intima-media vastagságra 2-es típusú diabetesben 7 éves követés során

Esze Regina

Témavezető: Dr. Káplár Miklós

Intézet: Debreceni Egyetem, KK, Belgyógyászati Intézet

Háttér és célok: A mannózakötő lectin (mannose-binding lectin-MBL) gyenge akut fázis fehérje, mely az antitestektől függetlenül aktiválja a komplementrendszer "lektin" útvonalát, valamint fontos szerepet játszik a veleszületett immunitásban. Irodalmi adatok alapján feltételezhető, hogy az MBL részt vesz a cukorbetegség mikro- és makrovaszkuláris szövődményeinek patogenezisében, valamint az MBL szintek prognosztikai markerkerként szerepelhetnek ezen szövődmények kapcsán. Eddig csak kis számú adatot közöltek az MBL szubklinikus ateroszklerózis (coronary artery intima-media thickness – IMT) kialakulásában betöltött szerepéről cukorbetegségben. Ezek alapján az alacsony MBL szint fokozza az IMT progresszióját, míg a magas MBL szintek védő hatást biztosítanak. Célunk az volt, hogy elemezzük a szérumban MBL szintek és az IMT változások közötti lehetséges összefüggést 2-es típusú diabeteses (T2DM) betegek 7 éves követése során.

Anyagok és módszerek: A szérumban MBL-szintet (ng / ml) és az IMT-t (mm) 106 2-es típusú diabeteses betegben (56 férfi és 50 nő) mértük. Az MBL szérumszintjét a molekula stabilitása alapján a vizsgálat végén szendvics ELISA módszerrel (BioPorto Diagnostics) határoztuk meg. Az IMT-t mind a vizsgálat kezdetekor, mind a 7 éves követés után meghatároztuk, melyhez mindkét esetben 2 D echo-t alkalmaztunk. A statisztikai elemzést ANOVA Newman Keuls poszt-hoc tesztekkel végeztük.

Eredmények: Abszolút MBL-hiányban (MBL <100 ng / ml) az IMT progressziója szignifikánsan nagyobb volt, mint MBL \geq 100 ng / ml feletti betegekben (n = 13, Δ IMT: 0,109 \pm 0,143 mm, p <0,001, ill. n = 93, Δ IMT: 0,039 \pm 0,134 mm, p = 0,15). Figyelembe véve, hogy a tiazolidin-dionok (TZD) csökkenthetik az IMT-t, a követési idő alatt TZD-szerekkel kezelt betegek kizárása után ismételt számolást végeztünk. Ebben az esetben az IMT progressziója mindkét csoportban szignifikáns volt, de az MBL hiányos csoportban nagyobb mérvű emelkedést tapasztaltunk (n = 11, Δ IMT: 0,138 \pm 0,103 mm, p <0,001) a normál és magas MBL szintekű betegekhez képest (n = 67, Δ IMT: 0,039 \pm 0,134 mm, p = 0,03). Az IMT változásait a kezdeti IMT értékek alapján is értékeltük. Az MBL hiányos betegcsoportban (MBL < 100 ng/ml), mind az induló IMT <0,8 mm, mind az IMT \geq 0,8 mm alcsoportokban szignifikáns progressziót észleltünk (n = 8, Δ IMT: 0,122 \pm 0,099 mm, p <0,01 és n = 3, Δ IMT: 0,184 \pm 0,121 MBL <100 ng / Mm, p <0,001). Ezzel szemben a normál vagy magas MBL szintű betegek esetében (MBL \geq 100 μ g / ml) sem a kezdeti IMT <0,8 mm (n = 50, Δ IMT: 0,099 \pm 0,106 mm, p = 0,06), sem az induló IMT \geq 0,8 mm (n = 17, Δ IMT: -0,047 \pm 0,146 mm, p = 0,4) mellett nem mutatkozott jelentős progresszió. Nem volt szignifikáns különbség az egyes csoportok HbA1c és lipid paramétereit között, és minden beteg 100 mg / nap ASA-t szedett.

Következtetés: Vizsgálataink azt mutatják, hogy az alacsony MBL szintek részben a kiindulási IMT értékek függvényében növelik az IMT progresszióját 2-es típusú cukorbetegségben 7 éves követés során, mely alapján az MBL a szubklinikus ateroszklerózis egyik markere lehet.

Kárai Bettina

Témavezető: Dr. Hevessy Zsuzsanna

Intézet: Debreceni Egyetem, ÁOK, Laboratóriumi Medicina Intézet

Bevezetés: Bár a myelodysplasias szindróma (MDS) diagnózisa citogenetika és morfológiai vizsgálaton alapul, az elmúlt években megjelent nemzetközi kutatások eredményei alapján az áramlási citometriai vizsgálat mind a diagnózis felállítása, mind a megfelelő prognosztikai besorolás esetében jelentős segítséget nyújthat.

Munkánk során célul tűztük ki, hogy egyrészt megvizsgáljuk az egyes preanalitikai tényezők hatását az MDS irányú áramlási citometriai vizsgálat eredményének interpretálására; másrészt kialakítunk egy egyszerű, hatékony áramlási citometriai pontozó rendszert, mely az MDS diagnózisának felállítását segíti.

Anyagok és módszerek: Preanalitikai tényezők közül a késleltetett mintafeldolgozásnak és az antikoaguláns típusának (EDTA, heparin) hatását elemeztük 29 immunfenotípus változó segítségével három napon keresztül 16 csontvelői mintán.

Az International/European LeukemiaNet (ELN) munkacsoport által MDS szűrésére ajánlott áramlási citometriai pontozó rendszer négy elemét, 25 kontroll és 51 MDS-ben szenvedő beteg csontvelői mintájának vizsgálata alapján, további kettővel egészítettük ki, az erythroid prekursorok CD71 rCV értékével és a mastocyták arányával a magvas sejtek között. Az így kialakított pontozó rendszer diagnosztikai és prognosztikai hatékonyságát 31 további MDS-es beteg csontvelői mintáján igazoltuk.

Eredmények: Összehasonlítva az eltérő módon antikoagulált csontvelői mintáknál a monocyta, lymphocyta, és a granulocyta elemek immunfenotípusát 13 paraméter esetében volt megfigyelhető szignifikáns különbség ($p < 0.05$). A késleltetett mintafeldolgozás számos esetben okozott immunfenotípus eltérést. Az egyes markerek részletes vizsgálatán túl pontoztuk (egy illetve két ponttal) a kiindulási mintától a sejtek arányának, vagy egy adott marker átlagos immunfluoreszcencia intenzitásának (MFI) 25% illetve 50%-os eltérését első és második napon. A heparinnal antikoagulált mintáknál összességében kevesebb eltérés volt látható, mint az EDTA-val antikoagulált csontvelői mintáknál (első nap: átlagosan 11 eltérés (EDTA), 8 eltérés (heparin); 2. nap: átlagosan 14 eltérés (EDTA), 12 eltérés (heparin)).

Az áramlási citometriai pontozó rendszer kialakításakor az első tanulmány során az erythroid prekursorok rCD71 rCV esetében ($p = 0.004$) és a mastocyták arányánál ($p = 0.001$) találtunk szignifikáns eltérést az MDS-es és nem MDS-es csontvelői minták összehasonlítása során. Kiegészítve ezen paraméterekkel az MDS szűrésére szolgáló pontozó rendszert a szenzitivitás 65%-ról 84%-ra emelkedett, miközben a specificitás nem változott (80%), melyet egy további tanulmányban is igazolni tudtunk (szenzitivitás: 81%, specificitás: 100%). Az újonnan kialakított pontozó rendszer alapján a kettőnél több ponttal rendelkező betegek esetében az eseménymentes túlélés szignifikánsan kevesebbnek bizonyult ($p = 0.001$).

Összefoglalás: A preanalitikai tényezők jelentősen befolyásolják az egyes sejtpopulációk immunfenotípusát, melynek ismerete nélkülözhetetlen az áramlási citometriai eredmény helyes interpretálásához. Az MDS diagnózisának felállítása és a betegek megfelelő prognosztikai csoportba történő besorolása során az áramlási citometriai vizsgálat gyors, objektív segítséget nyújthat.

Cink hatása a vaszkuláris simaizomsejtek oszteoblasztos transzformációjára

Nagy Annamária

Témavezető: Prof. Dr. Balla József

Intézet: Debreceni Egyetem, KK, Belgyógyászati Intézet, Nephrológiai Tanszék, Vaszkuláris Biológiai Kutató Laboratórium

Bevezetés: A vaszkuláris kalcifikáció fontos szerepet játszik az érlemezésedés (atherosclerosis), a krónikus veseelégtelenség (CKD) és számos kardiovaszkuláris megbetegedés pathomechanizmusában. Pontos mechanizmusa nem teljesen ismert, azonban kialakulásának hátterében az ásványi anyagok diszregulált metabolizmusa áll. A vaszkuláris kalcifikáció egy többlépéses aktívan szabályozott folyamat, mely elsősorban az érfal tunica media rétegében lokalizálódó simaizom sejteket érinti. Ennek során a sejtek elveszítik simaizom specifikus markereiket és oszteoblaszt szerű sejtekké transzdifferentiálódnak. A krónikus veseelégtelenségben szenvedő betegeknél hiperfoszfátémia figyelhető meg, amely aktív induktora a vaszkuláris kalcifikációnak ezzel növelve a betegek mortalitását és egyéb társbetegségek kialakulását (hiperinzulíniémia, hipertrófia, pangásos szívelégtelenség).

Módszerek: Humán aorta simaizomsejteken (HAoSMC) prokalcifikációs környezet biztosítása különböző koncentrációjú (2 – 3 mmol) inorganikus foszfátot és kalciumot (0,9 mmol) tartalmazó növekedési médiummal. A cink vaszkuláris kalcifikációra kifejtett hatásának vizsgálatához különböző koncentrációjú (5 μ M – 150 μ M) cink – kloriddal egészítettük ki a kalcifikációs médiumot. A kalcium depozitumok kvalitatív vizsgálatához Alizarin Red festést csináltunk, míg kvantitatív elemzéséhez dekalifikáció során kapott felülúszó kalcium tartalmát mértük. A sejtek intracelluláris inorganikus foszfát tartalmát sejtlizátumból mértük QuantiChrome Phosphate Assay Kit segítségével. Az aorta simaizomsejtek oszteoblaszt irányú transzdifferentiációja során expresszálandó fehérjék vizsgálata PCR és Western Blot segítségével.

Eredmények: Kísérleteink szerint a cink dózisfüggő módon gátolja a foszfát és kalcium indukálta kalcifikációt humán aorta simaizomsejteken, melyet az bizonyít, hogy a cink kezelés hatására csökkent az extracelluláris mátrixban megjelenő kalcium depozitumok mennyisége, valamint az oszteoblasztos transzdifferentiációra jellemző fehérjék expressziója.

A projekt a GINOP-2.3.2-15-2016-00043 pályázat támogatásával valósulhatott meg.

Az alfa-1-mikroglobulin szerepe az ateroszklerózisban

Pethő Dávid

Témavezető: Prof. Dr. Balla József

Intézet: Debreceni Egyetem, KK, Belgyógyászati Intézet, Nephrológiai Tanszék, Vaszkuláris Biológiai Kutató Laboratórium

Bevezetés: Az érlemezésedés (atherosclerosis) pathomechanizmusának egyik kulcsfontosságú lépése az ateroszklerotikus plakkok megjelenése az érfalban. Kialakulásuk hátterében az emelkedett vér koleszterin szint, azon belül is az alacsony sűrűségű lipoprotein (LDL) megemelkedése és szubendoteliális akkumulációja áll. Ha az LDL a vörösvértetek líziséből felszabaduló hemoglobinforrású hemmel reagál, oxidáción megy keresztül, mellyel számos gyökös folyamatot és oxidatív stresszt indukál az érfal sejtjeiben. Az alfa-1-mikroglobulin (A1M) egy kicsi globuláris fehérje, melynek általános funkciója a szabadgyökök és a hem megkötése. Számos egyéb betegségben vizsgálták már a szerepét. Célunk ateroszklerotikus körülmények között vizsgálni az A1M szerepét.

Módszerek: Egészséges donorokból származó LDL oxidációja hemmel, illetve annak gátlása A1M-nal. Lipidperoxidációs termékek mérése (konjugált-dién, lipidhidroperoxid, tiobarbitursav reaktív anyagok). Aorta endotélsejtek (HAEC) hemoxigenáz-1 (HO-1) génexpressziós és fehérjeszintű vizsgálata (PCR, Western-blot). A1M expressziós mintázatának vizsgálata humán aorta endothél (HAEC), simaizom (HAoSMC) és makrofág (MO) sejteken ateroszklerotikus körülményekben (PCR). A1M immunhisztokémiai festése humán ateróma plakkon.

Eredmények: Kísérleteink szerint az A1M hatékonyan gátolja a hem mediálta LDL oxidációt. Ilyen tekintetben az érfalat alkotó sejtek HO-1 expresszióját is képes csökkenteni. Vizsgálataink szerint az A1M bizonyos ateroszklerotikus körülmények között emelkedett szinten termelődik. Reményeink szerint az A1M megismerése és vizsgálata kulcsfontosságú lehet az ateroszklerózis leküzdésében.

A project a GINOP-2.3.2-15-2016-00043 pályázat támogatásával valósulhatott meg.

Speker Marianna

Témavezető: Dr. Bereczky Zsuzsanna

Intézet: Debreceni Egyetem, ÁOK, LMI, Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszék

A vénás tromboembólia komplex patomechanizmusú és etiológiájú betegség. Egyik leggyakoribb öröklött tényezője a protein C deficiencia (PCD) mely lehet I-es (kvantitatív) és II-es (kvalitatív) típusú. A II-es típus esetén további IIa és IIb altípusokat különböztethetünk meg, mely utóbbi a kromogén elven mérő funkcionális teszttel nem detektálható. A Leiden mutáció (FV p.Arg506Gln; FVL) jelenléte viszont az alvadási idő mérésen alapuló funkcionális teszttel interferál alámérést okozva.

A PCD hazai laboratóriumi diagnosztikájával kapcsolatban korrekt laboratóriumi ajánlás érdekében a 2007-2016 között PCD molekuláris genetikai hátterének felderítése céljából Tanszékünkre érkezett, alvadási tesztben csökkent PC aktivitással ($\leq 70\%$) rendelkező, 18 év feletti nem rokon személyek esetén (n=173) meghatároztuk a PC mutáció detektálási arányt, feltérképeztük a mutációs spektrumot, vizsgáltuk az egyes típusok megoszlását, továbbá összehasonlítottuk a rutin laboratóriumi diagnosztikában használt alvadási és kromogén teszteket a FVL mutáció hordozása tükrében. Két új, IIb altípusnak tűnő, aminosavcserével járó mutáció (p.Ala333Asp, p.Ala408Thr) esetén pedig vizsgáltuk azok patogenitását *in vitro* és *in silico*.

A vizsgált betegek (n=103) többsége ($\approx 60\%$) hordozta a FVL mutációt. A FVL nem hordozó személyek 96%-ánál azonosítottunk PC okozati eltérést, míg a FVL hordozók esetén ez az arány csupán 20% volt. A valódi PCD betegek többsége I-es típusú; a II-es típusú deficiensek döntő hányada pedig (70%) IIb típusú. A funkcionális tesztek összehasonlítása során alvadási tesztben minden aktivitás értéktartományon belül alacsonyabb mutáció detektálási ráta figyelhető meg a kromogén teszthez képest, melynek oka a FVL interferencia okozta alámérés. Vizsgálataink során 44 különböző eltérést azonosítottunk, melyek 41%-a az irodalomban még nem ismertetett. A IIb altípus hátterében összesen 9 misszensz mutációt azonosítottunk, melyek közül 3 új mutáció volt.

A 2 új mutáció (p.Ala333Asp, p.Ala408Thr) patogenitásának *in vitro* és *in silico* vizsgálata során egyaránt azt tapasztaltuk, hogy az alvadási tesztben csökkent aktivitások hátterében egymástól eltérő mechanizmusok álltak. A p.Ala333Asp variáns mennyiségi zavarhoz társuló funkcionális defektus következtében komplex fenotípust eredményez, míg a p.Ala408Thr mutáció patogenitása eredményeink alapján erősen megkérdőjelezhető.

A magyarországi PC deficiens populációban a deficiencia hátterében gyakori (alapító) mutáció nem mutatható ki és igen nagy számban fordul elő az irodalomban még nem ismertetett új mutáció. A szakirodalomtól eltérően a II-es típusú deficiensek döntő többsége (70%) IIb altípusba sorolható, azonban a hazai populáció szűrésére vonatkozó megbízható laboratóriumi ajánláshoz és diagnosztikus határérték megállapításához szükségesnek tartjuk további IIb altípust eredményező mutációk molekuláris szintű vizsgálatát.

Immunadszorpciók kezelése alkalmazása dilatatív cardiomyopathiában, kezdeti tapasztalatok

Nánásy-Vass Melinda

Témavezető: Prof. Dr. Soltész Pál

Intézet: Debreceni Egyetem, KK, Belgyógyászati Intézet, Angiológiai Tanszék

Az immunadszorpciók kezelése egy olyan kétlépéses szelektív aferezis technika, melynek során első lépésben plazmaszeparáció történik, majd a szeparált plazmát antitestkötő iker oszlopokon áramoltatjuk át. Non-specifikus kezelés során, nem szelektív módon kerülnek eltávolításra az antitestek, bárány eredetű polyclonalis anti-human immunoglobulint (TheraSorb), vagy szintetikus peptid-GAM ligandot tartalmazó (Globaffin) oszlopokkal. A specifikus kezelés (Coraffin adszorber) során szelektíve történik a β 1- adrenerg receptor ellenes antitestek eltávolítása.

Nemzetközi irodalmi adatok alapján az immunadszorpció (IA) reménykeltő eredményeket mutat az idiopathias dilatatív cardiomyopathia kezelésében. A kórképben ezidáig számos kardiális protein ellenes antitestet azonosítottak, mint az aktin, myosin, troponin I, tropomyosin, mitokondriális proteinek-, hősokk fehérjék-, sejtfelszíni-, muszkarinerg receptor-, vagy a β 1- adrenerg receptor ellenes antitestek. β 1- adrenerg receptor ellenes antitest pozitív betegeknek rosszabb a bal kamra funkció, valamint náluk gyakoribb a ventrikuláris arrhythmia és a hirtelen szívhalál előfordulása, mint az antitest negatív betegeknek. Irodalmi adatok alapján az antitestek extrakciójával javulás következhet be a szív pumpafunkciójában, a NYHA stádiumban, valamint kitolódhat a betegek szívtranszplantáció-/LVAD implantatio-mentes túlélési ideje.

2014. júliusában a Belgyógyászati Klinika Angiológia Tanszékének Intenzív Osztályán a Kardiológiai Intézettel együttműködve az országban elsőként végeztünk immunadszorpciók kezelést egy 43 éves, NYHA IV. stádiumú, idiopathias dilatatív cardiomyopathiában szenvedő, transzplantáció-jelölt férfibetegnek, akinél Western blot vizsgálattal IgG típusú myocardium ellenes antitest pozitívitás igazolódott. Kezelését megelőzően ejekciós frakciója 18% volt. Kardiológusaival történt egyeztetést követően immunadszorpciók kezelése mellett döntöttünk. Intenzív Osztályunkon egymást követő napokon, összesen 5 kezelést végeztünk, Globaffin iker immunadszorber segítségével. Az után követés 1. hónapjában a betegnél funkcionális javulást detektáltunk, terhelhetősége fokozódott. Az echocardiographia az isovolemias kontrakció javulását (465 Hgmm/sec-ról, 575 Hgmm/sec-ra), stroke volumen növekedését (49ml-ről, 66 ml-re) detektálta, azonban az ejekciós frakcióban változás nem mutatkozott. A kezelést követő 3. hónapban megismételt SPECT vizsgálat, az ejekciós frakció növekedését igazolta, 18%-ról, 29%-ra. A 6. hónapos kontroll vizsgálatok ismételten antitestek jelenlétét igazolták, azonban a beteg állapotromlása miatt további kezelés nem vált lehetővé.

Hosszú távú célunk újabb idiopathias dilatatív cardiomyopathiában szenvedő betegek kezelése, áthidalást biztosítva számukra a szívtranszplantációig, valamint a módszer bevezetése egyéb klinikai kórképek kezelésébe, mint például a cryoglobulinaemiás vasculitis, vagy például a Buerger-kór.