

# GENETIC FACTORS ASSOCIATED WITH THE DEVELOPMENT OF NEUROPATHY IN TYPE 2 DIABETES

Tézisek

**dr. Tordai Dóra Zsuzsanna**

Rácz Károly Konzervatív Orvostudományi Tagozat

Semmelweis Egyetem



Témavezető: dr. Putz Zsuzsanna, Ph.D, egyetemi docens

Hivatalos bírálók: dr. Nagy Géza, Ph.D, egyetemi adjunktus

dr. Kis János Tibor, Ph.D, részlegvezető főorvos

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: dr. Demeter Judit, MTA doktora, egyetemi tanár

Tagok: dr. Reismann Péter, Ph.D, egyetemi docens

dr. Vermes Gábor, Ph.D, részlegvezető főorvos

Budapest

2024

## I. BEVEZETÉS

A cukorbetegség és szövődményei egyre nagyobb terhet jelentenek a társadalomnak. Mérvadó becslések szerint a cukorbetegség és előállapotainak mintegy ötven százalékos emelkedésére számíthatunk. Nyilvánvaló a cukorbetegség gyakoribbá válása maga után vonzza a szövődményeinek gyakoribb előfordulását is, amelyek alapvetően hatással vannak a cukorbeteg életminőségére, és a hosszútávú túlélésükre.

A cukorbetegség idült szövődményeit didaktikai szempontok alapján, mikro- és makrovaszkuláris szövődményekre szokás osztani. A mikrovaszkuláris szövődmények, a retinopathia, a nephropathia és a neuropathia diabetes specifikusnak minősül. A makrovaszkuláris szövődmények a stroke, a szívinfarktus és a perifériás verőérbetegség az atherosclerosis különböző megnyilvánulási formái.

A mikrovaszkuláris szövődmények közül kiemelkedő jelentőségű a neuropathia, amely a cukorbetegség rossz prognózisú szövődménye és a cukorbetegek több, mint a felénél idővel megjelenik. A diabéteszes perifériás neuropathiát (DPN) napjainkban a diabéteszes láb legfontosabb kóroki tényezőjének tartjuk. A fejlett ipari országokban a nem traumás eredetű alsó végtagi amputáció több, mint felét cukorbetegéknél végzik, melyek közül elsősorban a neuropathiás eredetűek megelőzésére nyílna lehetőség, időben történő felismeréssel és megfelelő komplex kezeléssel. Az autonóm neuropathia tünetegyüttesén belül kiemelkedő jelentőségű a kardiovaszkuláris autonóm neuropathia (CAN), melynek fennállása ötszörösére emeli a betegek kardiovaszkuláris halálozását.

A diabéteszes neuropathia létrejöttének pontos mechanizmusa a folyamatosan bővülő ismereteink ellenére még ma sem teljesen tisztázott. A patogenetikai háttér feltárásában az utóbbi évek jelentős előrelépést hoztak – különösen gyors fejlődés zajlik a molekuláris biológiai mechanizmusok megismerése terén-, egyes részkérdések azonban még ma sem teljesen ismertek. Régóta ismert, hogy a cukorbeteg egy csoportjában viszonylag hamar megjelennek a mikrovaszkuláris szövődmények, míg másokban nem, vagy csak jóval később. Valószínű, hogy-e különbség oka genetikai tényezőkben keresendő.

## II. CÉLKITŰZÉSEK

Munkám során a következő kérdésekre kerestem a választ:

1. 2-es típusú cukorbetegségben szenvedő neuropathiás és neuropathia mentes betegeken teljes exom szekvenálás során azonosíthatók-e olyan genetikai variánsok, melyek fokozzák a neuropathia kialakulásának a kockázatát.
2. 2-es típusú cukorbetegségben szenvedő neuropathiás és neuropathia mentes betegeken teljes exom szekvenálás során azonosíthatók-e olyan genetikai variánsok, melyek csökkentik a neuropathia kialakulásának a kockázatát.

### III.MÓDSZEREK

#### III.1. A betegbeválasztás feltételei

A vizsgálatunkba összesen 24 neuropathiás (férfi/nő: 17/7; átlagéletkor:  $66.5 \pm 9,27$  év; BMI:  $31.5 \pm 5,0$  kg/m<sup>2</sup>; átlagos diabetestartam:  $10,3 \pm 6,2$  év; HbA1c:  $7,49 \pm 1,09\%$ ;) és 24 neuropathia mentes (férfi/nő: 13/11; átlagéletkor:  $56,2 \pm 10,8$  év; BMI:  $30,0 \pm 5,2$  kg/m<sup>2</sup>; átlagos diabetestartam:  $13,2 \pm 7,5$  év; HbA1c:  $7,04 \pm 1,0\%$ ;) 2-es típusú cukorbeteg bevonására került sor.

Azon betegeket, akik a szívfrekvencia-változások kimutatásán alapuló paraszimpatikus autonóm reflexesztek eredményét befolyásoló gyógyszereket (elsősorban bétablokkolót vagy nem-dihidropiridin kalcium-csatorna gátlót) szedtek, arra kértük, hogy a gyógyszereket a vizsgálatok elvégzését megelőző 48 órában hagyják ki.

Minden olyan beteget kizártunk a vizsgálatból, aki akut interkurrens betegség (lázás állapot, fertőzés stb.) vagy anyagcsere-kisiklás (diabetese ketoacidózis, diabetese hiperozmoláris állapot) miatt került hospitalizációra. További kizárási kritériumok voltak az autonóm vagy szenzoros funkciót befolyásoló egyéb betegség, mint pajzsmirigy- vagy májbetegség, krónikus veseelégtelenség, autoimmun kórkép vagy hematológiai rendellenesség, carpalis alagút szindróma, Parkinson-szindróma, spondylosis vagy discopathia stb. fennállása. A résztvevőket arra kértük, hogy a vizsgálatot megelőző 12 órában tartózkodjanak az erőteljes fizikai terheléstől, dohányzástól, a koffein és alkohol fogyasztásától.

Minden beteg a betegvizsgálat során szinuszritmusban volt, a nyugalmi EKG minden esetben normális volt.

A vizsgált alanyok előzetesen írásos beleegyező nyilatkozatukat adták, emellett etikai engedélyt kértünk (37596-8/2018/EÜIG).

## **III.2 Vizsgálati módszerek**

### **III.2.1 A szenzoros neuropathia vizsgálata**

A perifériás szenzoros funkció megítélésére a Neurometer-R, Q-sense készüléket, a Rydel-Seiffer-féle kalibrált hangvillát, valamint a Semmes-Weinstein monofilamentumot alkalmaztuk. A Neurometer-R készülék az áramérzet küszöbértékek (current perception threshold: CPT) meghatározása révén alkalmas mindhárom szenzoros idegrosttípus működésének egyidejű vizsgálatára. Kisfeszültségű elektromos ingerlést alkalmazva a testfelületen az áramérzet küszöbértékeket (current perception threshold, CPT) határoztuk meg. A vizsgálatot mind a felső (n. medianus), mind az alsó végtagon (n. peroneus) három különböző frekvencián (2 kHz, 250 Hz, 5 Hz) végeztük. A Q-sense a hő- és a fájdalomérzet, ezáltal a vékony idegrostok működésének kvantitatív vizsgálatára alkalmas. A Rydel-Seiffer-féle kalibrált hangvilla a vibrációérzésről, tehát - a vezetési sebesség méréshez hasonlóan - a vastag rostok funkciójáról nyújt felvilágosítást. A Semmes-Weinstein monofilamentum a protektív érzés vizsgálatára alkalmas. A tünetek gyakoriságának és súlyosságának a felmérésére a Neuropathia Teljes Tüneti Skálát (Neuropathy Total Symptom Score-6) használtuk.

### **III.2.2 A kardiovaszkuláris autonóm neuropathia vizsgálata**

A kardiovaszkuláris autonóm neuropathia kimutatására Ewing által standardizált öt kardiovaszkuláris reflexteszteket alkalmaztuk. A paraszimpatikus funkciót tükröző tesztek frekvenciaváltozáson, míg a szimpatikus funkciót tükröző tesztek vérnyomásváltozáson alapulnak.

A vizsgálatokat Cardiosys H-01 készüléken végeztük 12-elvezetéses EKG-vel és noninvazív vérnyomásméréssel.

### **III.2.3. Teljes exom szekvenálás**

A teljes exom szekvenálást Thermo Ion GeneStudio S5 platformon végeztük, amely során körülbelül 32 000 gén kódoló szekvenciáját határoztuk meg, amely betegenként

50 millió bázispárt jelentett. A DNS-t perifériás vérmintából izoláltuk a Roche HighPure DNA Isolation Kit alkalmazásával, a gyártói utasítások figyelembe vételével. A variáns hívást és azonosítást az Ion Reporter szoftver segítségével végeztük a dbSNP, ClinVar, gnomAD és OMIM adatbázisok használatával.

### III.3. Statisztikai elemzés

A teljes exom szekvenálást követően a variánsokat az ANNOVAR szoftverrel annotáltuk, amelyhez a dbSNP, ClinVar, gnomAD és OMIM forrásokból integráltuk az adatbázis információkat. Az Integrative Genomics Viewer (IGV) alkalmazásával vizualizáltuk az adatokat. Az ismétlődő olvasatokat (readeket) a Picard segítségével jelöltük meg. Az SNP-k a GATK segítségével kerültek megállapításra, a Variant Call Format (VCF) fájlokat pedig a BCFtools-szal egyesítettük, majd a SnpSift alkalmazás segítségével annotáltuk. A variáns annotációhoz használt referencia adatbázis a dbSNP hg38 build 151 volt, amelyet a NCBI dbSNP adatbázisból töltöttünk le. A PLINK v1.9 alkalmazás segítségével végeztük el a nyers VCF fájlok minőségellenőrzését. A minták SNP- adatokon alapuló megjósolt nemét összehasonlítottuk a vizsgált személyek fenotipikus nemével. Az SNP-eket a hiányozás arány, minor allél gyakoriság és Hardy-Weinberg pontos teszt p-értékek alapján szűrtük, a megfelelő küszöbértékekkel (0,05, 0,01,  $1e-10$ ). Az asszociációs vizsgálatokat az R v4.0.3 alkalmazás segítségével végeztük el. A GENESIS R Bioconductor csomag alkalmazását használtuk a logisztikus regressziós modell illesztéséhez. Az életkort, nemet és rokonságot a modell becsléseiben kontrolláltuk. Az utóbbit egy Genetikai Kapcsolati Mátrix (GRM) segítségével korrigáltuk, amit az SNPRelate csomaggal hoztunk létre. A kvantilis-kvantilis plotot a qqman R csomaggal hoztuk létre, a Manhattan plotot pedig a ggplot2 alkalmazással. Az SNP-eket a logisztikus regresszió p-értékei alapján mutatjuk be. Az összes statisztikai számítás az R v4.0.3 alkalmazással történt. A folytonos változókat átlaggal és szórással jellemeztük. A statisztikai szignifikanciát a Mann-Whitney tesztel értékeltük. A kategórikus változókat gyakoriságként adtuk meg, ahol a különbségeket a Fisher-féle exact tesztel értékeltük. Egy tesztet akkor tekintettünk szignifikánsnak, ha a p-érték 0,05- nél kisebb volt.

#### IV. EREDMÉNYEK

Kutatásunkba sikeresen azonosítottunk olyan genetikai variánsokat, amelyek szignifikánsan összefüggésbe hozhatók a neuropathia fokozott (**22-49-szeres**) kockázatával rs2032930 és rs2032931 rec-Q-mediated (RMI2) génben, rs604349 myosin binding protein H like (MYBPHL) génben és csökkent (**0.07-0,08-szoros**) kockázattal a rs91778 a multivesicular body subunit (MVB12B) génben és a rs2234753 a retinoid acid X receptor alpha (RXRA) génben.

Összevetettük ezen genetikai variánsok kapcsolatát az egyes klinikai paraméterekkel. Számos összefüggést találtunk a genetikai variánsok és az idegfunkció között. Az rs2032930 genetikai variáns szignifikáns összefüggést mutatott a n. medianuson 5 (p = 0,042) és 250 Hz-en (p = 0,003), és a n. peroneuson az 5 Hz-en mért áramérzet küszöbértékekkel (p = 0,037), valamint a mélylégzés teszttel (p = 0,022) és NTSS6-tal (p = 0,023). Az rs2032931 szignifikáns összefüggést mutatott a n. medianuson 250 Hz-en (p = 0,003), továbbá a n. peroneuson 5 Hz-en (p = 0,037) mért áramérzet küszöbértékekkel, valamint a mélylégzés teszttel (p = 0,022) és NTSS6-tal (p = 0,023). Az rs604349 szignifikáns összefüggést mutatott a n. medianuson 2000 (p = 0,049), 250 (p = 0,018) és 5 Hz-en (p = 0,005) mért értékekkel, továbbá a Q-Sense melegérzet küszöbértékekkel (p = 0,042). Az rs917778 genetikai variáns szignifikáns összefüggést mutatott a Q-sense hidegérzet küszöbértékekkel (p = 0,013). Az rs2234753 szignifikáns összefüggést mutatott a n. medianus 2000 Hz-en mért áramérzet küszöbértékekkel (p = 0,02), továbbá a mélylégzéses teszttel (p = 0,04), valamint a NTSS6-tal (p = 0,003).

## V. KÖVETKEZTETÉSEK

1. Kutatásunkban elsőként azonosítottunk 5 olyan genetikai variánst (rs2032930 és rs2032931 az RMI2 génből, rs604349 a MYBPHL génből, rs917778 az MVB12B és rs2234753 az RXRA génekből), amelyek hatással lehetnek a 2-es típusú cukorbetegségben a neuropathia kialakulásának kockázatára.
2. Három olyan genetikai variánst tudtunk azonosítani (az RMI2 génben az rs2032930 és rs2032931, valamint a MYBPHL génben az rs604349), amelyek a diabeteszes neuropathia kialakulásának kockázatát 22-49-szeresére növelik.
3. Vizsgálatunkban sikerült azonosítani két olyan genetikai variánst (az MVB12B génben az rs917778 és az RXRA génben az rs2234753), amelyek úgy tűnik, hogy protektív védelmet nyújthatnak a neuropathia kialakulásával szemben, a kockázat 0,07-0,08-ra csökkent.
4. Az rs2032930/rs2032931 genetikai variáns a DPN és a CAN kialakulásának nagyobb kockázatával jár. Az rs604349 genetikai variáns csak a szenzoros neuropathia kialakulását befolyásolja.
5. Az rs917778 csökkenti a DPN, míg a rs2234753 genetikai variáns mind a DPN, mind a CAN kialakulásának a kockázatát csökkenti.
6. Eredményeink nagyobb esetszámon történő validálást követően, várhatóan olyan új eredmények lesznek a kezünkben, amelyekkel lehetőséget teremthetünk a korai terápiás és prevenciós beavatkozásokhoz, és későbbiekben új gyógyszerfejlesztési célponttá is válhatnak.



## PUBLIKÁCIÓK

### Értekezés témájához közvetlenül kapcsolódó saját közlemények

**Tordai DZ**, Hajdú N, Rácz R, Istenes I, Békeffy M, Vági OE, Kempler M, Körei AE, Tóbiás B, Illés A, Pikó H, Kósa JP, Árvai K, Papp M, Lakatos PA, Kempler P, Putz Z. Genetic Factors Associated with the Development of Neuropathy in Type 2 Diabetes. International Journal of Molecular Sciences. 2024;25(3):1815.

**IF: 4,9**

**Tordai D**, Hajdú N, Rácz R, Kempler P, Putz Z. Interrelationship between Diabetic Neuropathy and Vitamin D Deficiency. DIAB CASE REP. 2023;8(5)

Putz Z, **Tordai D**, Hajdú N, Vági O.E, Kempler M, Békeffy M, Korei AE, Istenes I, Horváth V, Stoian AP, Rizzo M, Papanas N, Kempler P. Vitamin D in the Prevention and Treatment of Diabetic Neuropathy. CLINICAL THERAPEUTICS. 2022;44(5):813-23.

**IF:3,2**

Hajdú N, Rácz R, **Tordai DZ**, Békeffy M, Vági OE, Istenes I, Körei AE, Kempler P, Putz Z, Genetic Variants Influence the Development of Diabetic Neuropathy. International Journal of Molecular Sciences. 2024;25(12):6429.

**IF:4,9**

### Az értekezés témájától független saját közlemények

Putz Z, **Tordai DZ**. A prediabétesz kezelése a háziiorvosi gyakorlatban. HÁZIORVOS TOVÁBBKÉPZŐ SZEMLE. 2020;25(4):202-5.

Putz Z, **Tordai DZ**, Kempler M. A neuropathia diabetica felismerésének és kezelésének lehetőségei a SARS-CoV-2-járvány idején. HÁZIORVOS TOVÁBBKÉPZŐ SZEMLE. 2020;25(10):832-4.

Körei AE, Putz Z, Vagi OE, **Tordai DZ**, Menyhart A, Istenes I, Horváth VJ, Kempler P  
The handgrip test - A historical test for diabetic autonomic neuropathy or a marker of  
something else? J Diabetes Complications. 2024;38(2):108668

**IF:2,9**

Körei AE, Hajdú N, Putz Z, Istenes I, Békeffy MZ, **Tordai D**, Vagi O, Kempler P  
Diabeteses kéz? – Határterületi barangolások egy eset kapcsán. DIABETOLOGIA  
HUNGARICA. 2022;30(3):213-21.

Körei AE, Putz Z, Istenes I, **Tordai D**, Hajdú N, Békeffy MZ, Vagi O, Kempler P A  
dohányzás szerepe a cukorbetegség és szövődményeinek kialakulásában.  
DIABETOLOGIA HUNGARICA. 2022;30(4):264-72.

Putz Z, **Tordai D**, Hajdú N, Vági OE, Kempler M, Békeffy M, Körei AE, Istenes I,  
Kempler P A neuropathia diabetica genetikai aspektusai. DIABETOLOGIA  
HUNGARICA. 2022;30:35-41

Körei AE, Schnabel K, **Tordai D**, Békeffy M, Gulyásné GE, Putz Z, Istenes I, Tremmel  
A, Vági O, Hajdú N, Kempler P Indokolt lehet-e plazmaferézis, ill. opioid készítmény  
kiegészítő adása a neuropathia diabetica kezelésében? DIABETOLOGIA  
HUNGARICA. 2021;29(1):49-56

Vági OE, Putz Z, Istenes I, Hajdú N, Békeffy M, Körei AE, **Tordai D** Kempler P  
Kialakulhat-e Charcot-láb 25 éves 1-es típusú diabetes betegben? – esetismertetés.  
DIABETOLOGIA HUNGARICA. 2021;29(2):105-10.