

BEVEZETÉS

A neurológiai rendellenességek, például a sclerosis multiplex (SM) vagy az epilepszia (EP) olyan agyi eredetű rendellenességek, amelyek neuropszichiátriai tünetekkel járnak, és súlyos társadalmi és gazdasági terhet jelentenek társadalmunkra nézve. Az elmúlt évtizedben számos tanulmány foglalkozott e rendellenességek molekuláris hátterével. Az egyik fontos cél a mikro-RNS-ek (miRNS) potenciális szerepének vizsgálata e rendellenességek patofiziológiájában, valamint perifériás biomarkerként történő alkalmazásuk a betegség progressziójának és a terápiás válasz értékelésének céljából. Az ilyen vizsgálatok eredményei gyakran meglehetősen kétértelműek vagy nehezen magyarázhatók, az alkalmazott RNS-izolációs, miRNS-kimutatói módszerek és a különböző kiindulási anyagok széles skálája miatt, éppen ezért szükséges lenne egy megbízható és reprodukálható vizsgálati módszertan kidolgozása a miRNS-ek biomarkerként történő alkalmazására.

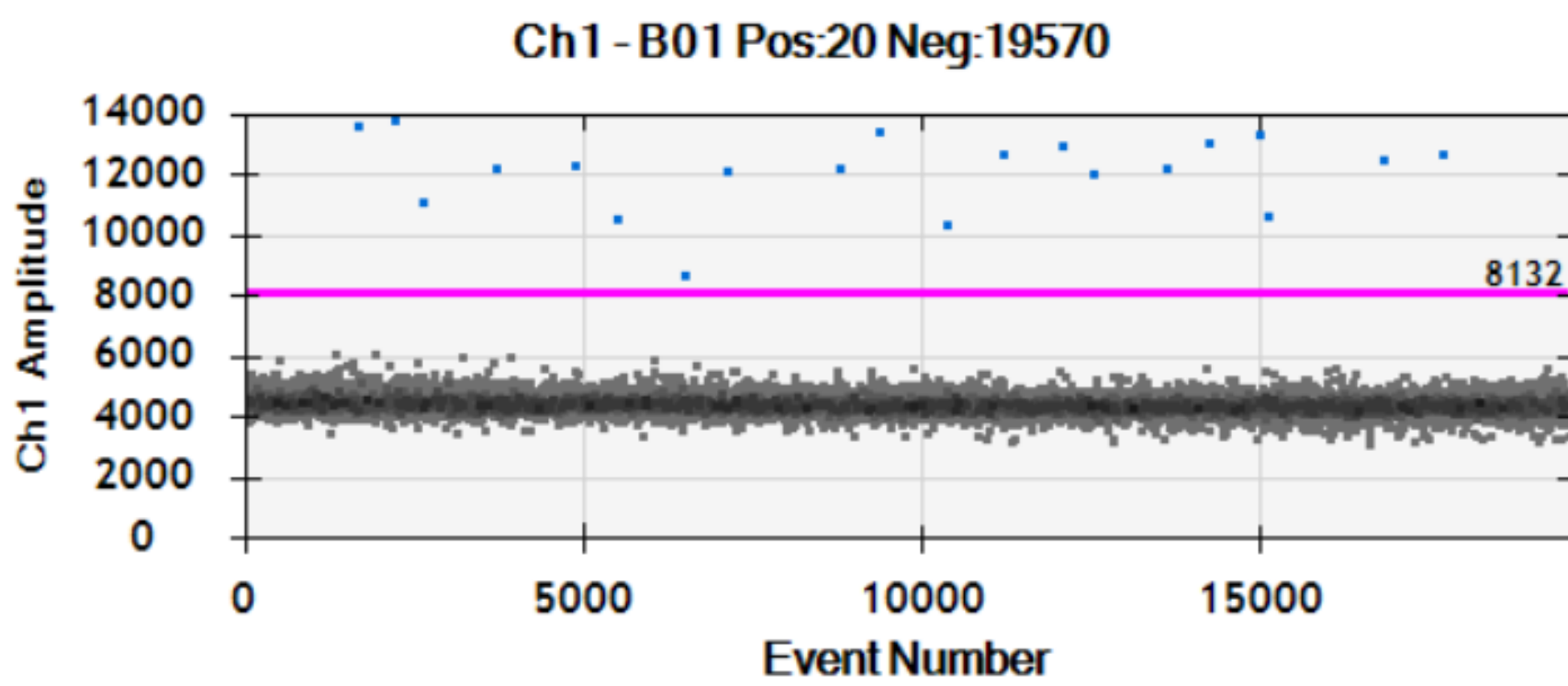
CÉLOK

Vizsgálataink során célul tűztük ki az egyes neurológiai rendellenességekhez köthető miRNS-ek expressziós szintjében történő változásainak detektálását, valamint ezen eredmények összevetését az egyéb klinikai vizsgálatokból nyert adatokkal, pl. MR adatok, betegség típusa, kezelésre adott válasz stb.

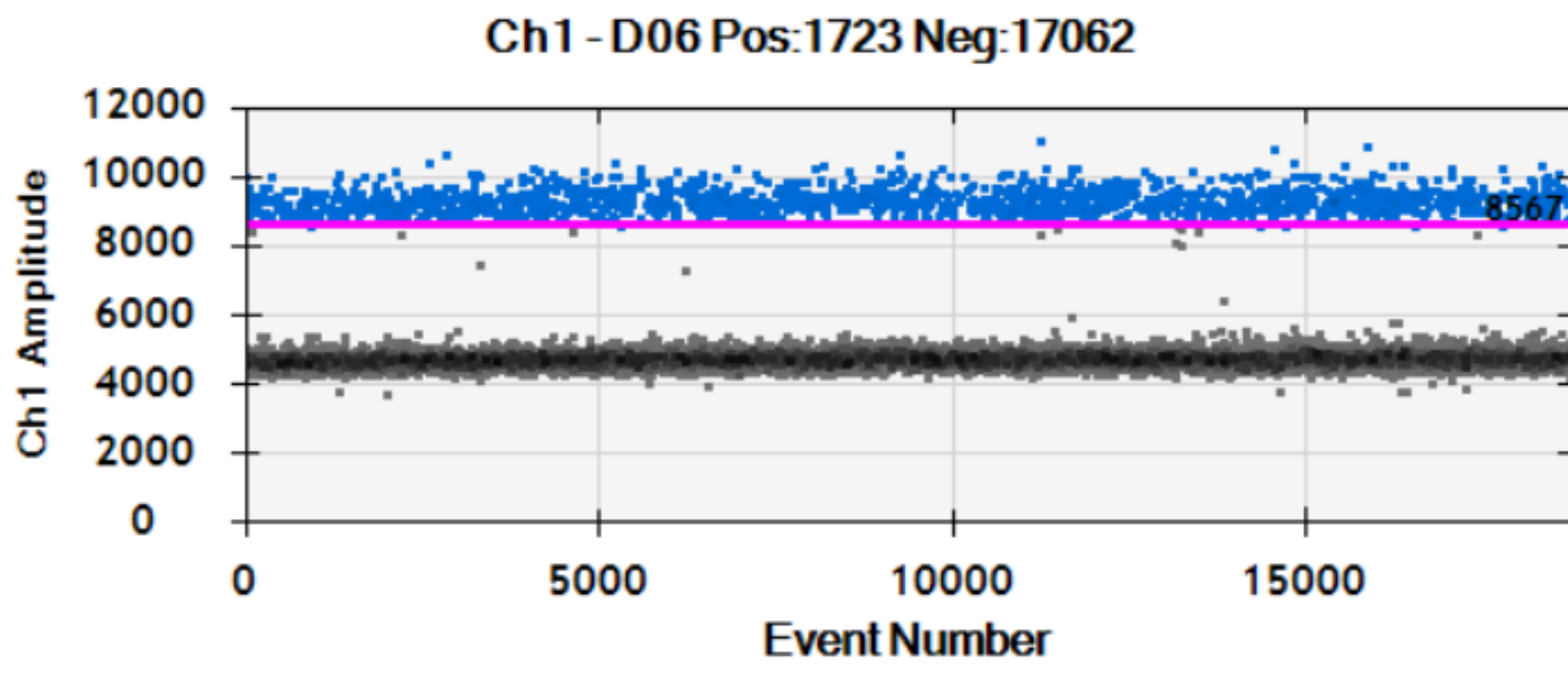
ANYAG ÉS MÓDSZER

- Elemszám: 52 SM + 71 EP humán vérérum+ 5 TLE és 4 Ctrl egér agyszövet
- Humán vizsgálatok:
 - A beleegyező nyilatkozat aláírását követően perifériás vért vettünk a vizsgálati alanyoktól sárga kupakos szérumszezátorcsövekbe.
- Állatkísérletek:
 - C57BL/6 egerek injektálása intrahippocampalis kainsavval (IHCA)/sóoldattal (Ctrl), terminálás 4 hét elteltével.
 - Az állatoktól vért, valamint a prefrontális kérget, hippocampuszt, és kisagyat tartalmazó agyszöveti mintákat vettünk.
- Molekuláris laboratóriumi vizsgálatok:
 - A vérmintákat max. 4 órán belül feldolgoztuk, a szérumból teljes RNS-t izoláltunk, ezt -80°C-on tároltuk további felhasználásig.
 - Az agyszöveti mintákat eltávolításukat követően rögtön -80°C-ra helyeztük megelőzve ezzel az RNS minőségének esetleges leromlását. Később ebből is teljes RNS-t izoláltunk.
 - Az RNS-t cDNS-re írtuk át reverz transzkripció PCR reakció során.
 - A továbbiakban a cDNS-t vizsgáltuk QX200 droplet digital PCR (ddPCR) rendszer segítségével specifikus miRNS primerek alkalmazásával.
- Egyéb klinikai vizsgálatok (pl. MRI)

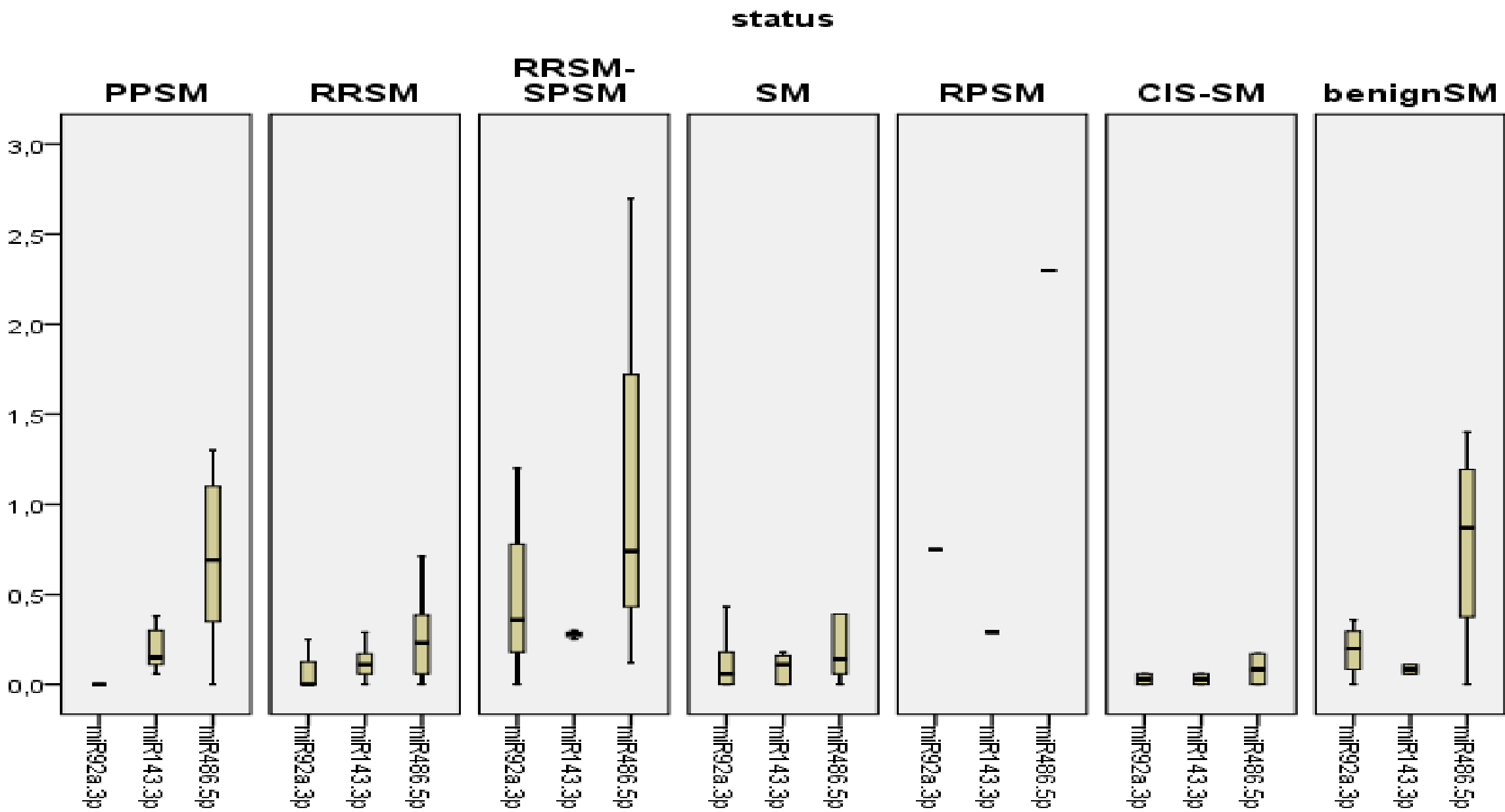
EREDMÉNYEK



2.A ábra. miR92a.3p szint (kópia/ul) szérumban

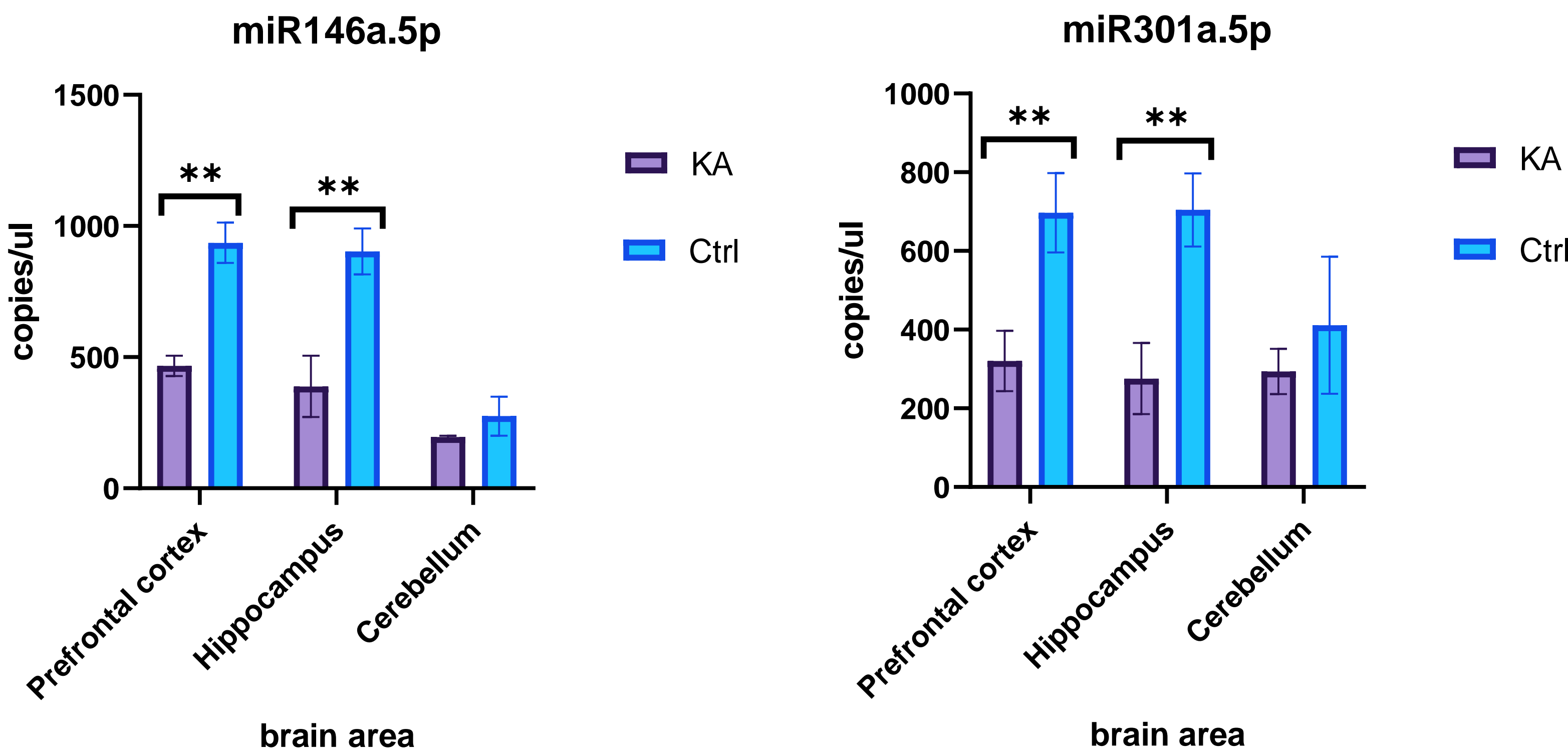


2.B ábra. miR-134.5p szint (kópia/ul) agyszövetben

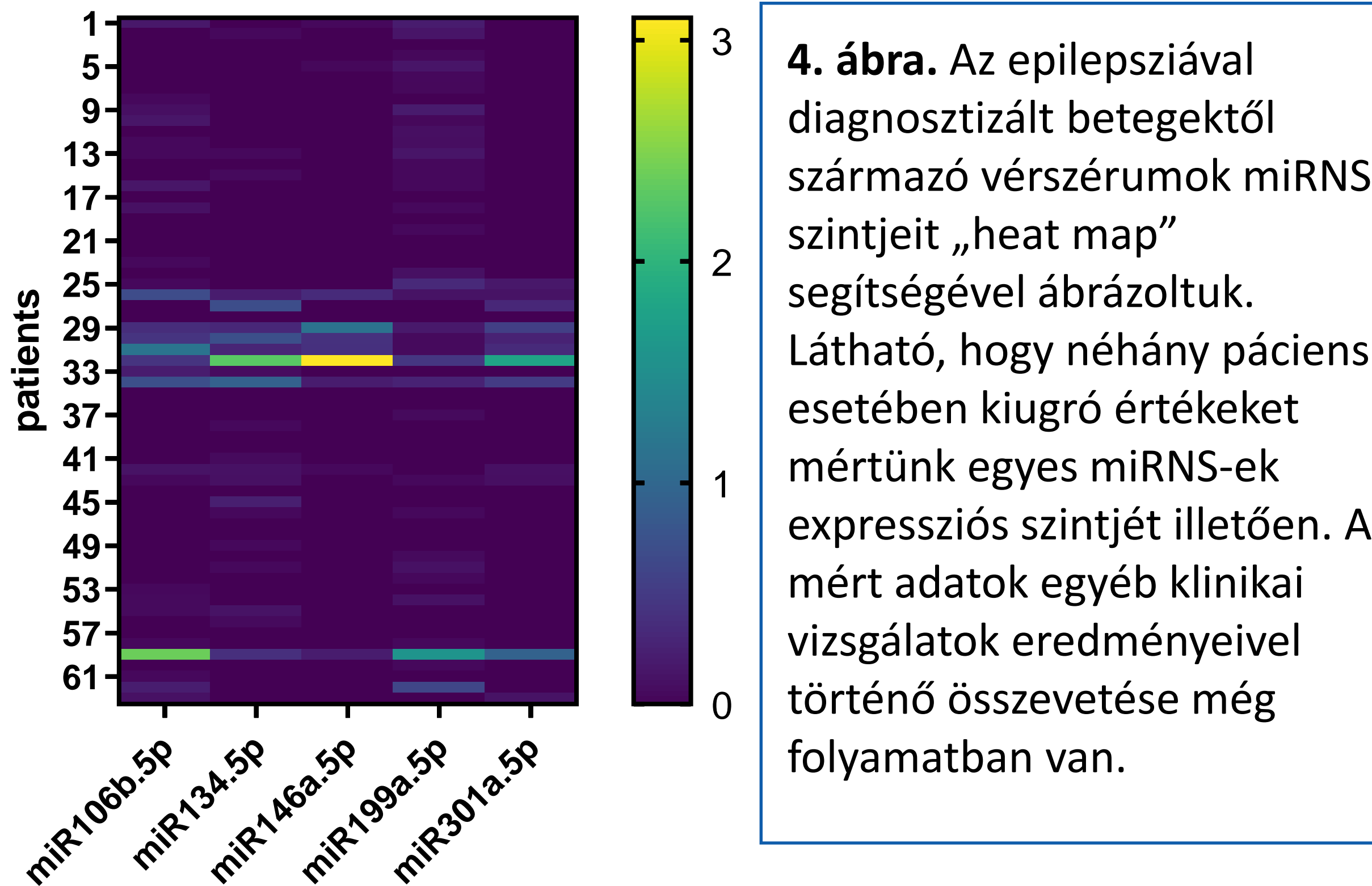


1. ábra. A QX200 Droplet Digital PCR (Bio-Rad) rendszer érzékenysége lehetővé teszi az egyes target miRNS-ek abszolút kvantifikációját vérérumból (A) és szöveti mintákból (B) egyaránt.

2. ábra. Az SM klinikai típusát figyelembe véve három vizsgált miRNS-nél találtunk különbséget az egyes csoportok között. Egyetlen szérums miRNS (*miR-486.5p*) esetén mutatható ki szignifikáns különbség ($p=0,005$) az SM típusok tekintetében. Ezen kívül korreláció figyelhető meg három szérums miRNS (*miR-92a.3p*, *miR-142.5p*, *miR-486.5p*) és az egyes specifikus MRI mérések (MRS, rsfMRI, PSIR) eredményei között.



3. ábra. A kainsav által indukált temporális lebeny epilepsziában (TLE) szenvedő egerek agyának vizsgálatakor két miRNS-nél (*miR-146a.5p* és *miR-301a.5p*) figyelhető meg szignifikáns különbség a kezelt és kontroll állatok között. Ez a jelenség mindkét esetben fennáll a prefrontális cortex és a hippocampus esetében is, míg a kisagnál nincs jelentős eltérés a vizsgált miRNS-ek szintjében. A IHKA kezelés hatására a perifériás vérben keringő miRNS-ek szintjének vizsgálata még folyamatban van.



4. ábra. Az epilepsziával diagnosztizált betegektől származó vérérumok miRNS szintjeit „heat map” segítségével ábrázoltuk. Látható, hogy néhány páciens esetében kiugró értékeket mérünk egyes miRNS-ek expressziós szintjét illetően. A mért adatok egyéb klinikai vizsgálatok eredményeivel történő összevetése még folyamatban van.

ÖSSZEFOGLALÁS, KONKLÚZIÓ

A különféle neurológiai rendellenességben szenvedő páciensektől-, valamint a KA-indukált TLE egérmodellből származó vér- és egyéb szövetminták vizsgálati eredményei kecsegtetőek, a jövőben mindenképpen szükségeszerű további minták gyűjtése és feldolgozása, a módszertan további finomításának érdekében. Az általunk alkalmazott QX200 ddPCR rendszer megbízható, alacsony RNS koncentrációjú minták esetén is elég érzékeny, így szérums miRNS-ek detektálására alkalmas. Egyetlen szérums miRNS (*miR-486.5p*) esetén mutattunk ki szignifikáns különbséget ($p=0,005$) az SM típusok tekintetében. TLE egerek vizsgálatakor 2 miRNS (*miR-146a.5p* és *miR-301a.5p*) szignifikánsan különbséget mutatott a IHKA-al kezelt és a kontroll állatok tekintetében.