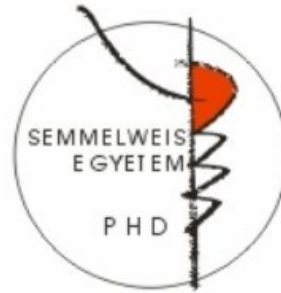


Epigenetikai vizsgálatok jelentősége elhízott gyermekekben

Doktori értekezés

Dr. Ács Orsolya Dóra

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Szabó András, DSc, egyetemi tanár
Dr. Török Dóra, PhD, egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Papp Gergő, PhD, tudományos főmunkatárs
Dr. Kovács Gábor László, PhD, főorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Reusz György, DSc, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Szamosi Tamás, PhD, egyetemi docens
Dr. Kiss Zoltán, PhD, főorvos

Budapest

2018

Tartalomjegyzék

I.	Rövidítések jegyzéke	4
II.	Bevezetés	6
	II.1. A gyermekkori elhízás jelentősége	6
	II.1.1. A gyermekkori elhízás definíciója, epidemiológiája	6
	II.1.2. A gyermekkori elhízás lehetséges okai	7
	II.1.2.1. Az idiopátiás gyermekkori elhízás	7
	II.1.2.2. A gyermekkori elhízás genetikai háttere	8
	II.1.2.2.1. A Prader-Willi-szindróma epidemiológiája, klinikai megjelenése	10
	II.1.2.2.2. A Prader-Willi-szindróma diagnózisa	11
	II.1.2.2.3. A Prader-Willi like fenotípus	13
	II.1.2.2.4. A Prader-Willi-szindróma prognosztikája, kezelési lehetőségei	14
	II.1.3. A gyermekkori elhízás szövődményei	14
	II.1.4. A gyermekkori elhízás kezelési lehetőségei	17
	II.2. A D-vitamin jelentősége	20
	II.2.1. A D-vitamin metabolizmusa	21
	II.2.2. A D-vitamin és a gyermekkori elhízás kapcsolata	22
	II.3. Epigenetikai szabályozás jelentősége	24
	II.3.1. Az epigenetikai szabályozás szerepe, útvonalai	25
	II.3.2. Az epigenetika és az elhízás kapcsolata	27
	II.3.3. Az epigenetika és a D-vitamin kapcsolata	28
III.	Célkitűzések	29
IV.	Módszerek	30
	IV.1. Betegek	30
	IV.1.1. Elhízott gyermekek	30
	IV.1.2. Prader-Willi-szindróma gyanús betegek	31
	IV.1.2.1. Holm score megállapítása	31
	IV.2. Molekuláris genetikai vizsgálatok	32

IV.2.1. Elhízott és Prader-Willi-szindróma gyanús betegek mintáin elvégzett vizsgálatok	32
IV.2.1.1. DNS izolálás és biszulfít kezelés	32
IV.2.1.2. Biszulfít szekvenáló polimeráz láncreakció (BS-PCR)	33
IV.2.2. Elhízott gyermekek mintáján elvégzett vizsgálatok	34
IV.2.2.1. Piroszekvenálás	34
IV.2.3. Prader-Willi-szindróma gyanús betegek mintáin elvégzett vizsgálatok	36
IV.2.3.1. Multiplex ligáció függő próba amplifikáció (MS-MLPA)	36
IV.2.3.2. Mikroszatellita analízis (MSA)	36
IV.3. Statisztikai módszerek	37
IV.4. Statisztikai szoftverek	37
IV.5. Etikai engedély	37
V. Eredmények	38
V.1. Az elhízott gyermekek metabolikus státuszának felmérése, illetve az esetükben előforduló, a metabolikus státusszal szorosan összefüggő szövődmények gyakoriságának leírása	38
V.2. A 25OHD3 vitamint-szint és a metabolikus paraméterek, valamint az elhízás mértékének és az általunk vizsgált gének metiláltsági fokának kapcsolata	40
V.3. Az elhízás mértékének és a D-vitamin metabolizmussal kapcsolatos (<i>VDR</i> , <i>CYP27B1</i>) gének DNS metiláltsági fokának összefüggései	41
V.4. Az elhízás mértékének és a metabolizmussal kapcsolatos (<i>POMC</i> , <i>IGF2</i>) gének DNS metiláltsági fokának összefüggései	41
V.5. Prader-Willi-szindrómás illetve Prader-Willi like fenotípusú gyermekeknél a Holm kritérium rendszer klinikai jelentőségének bizonyítása	44
V.6. A Prader-Willi-szindróma elsődleges igazolására alkalmazható, általunk kidolgozott DNS metilációs vizsgálat eredményei	45
VI. Megbeszélés	48
VI.1. A gyermekkori elhízás, annak mértékének és szövődményeinek jelentősége	48
VI.2. A D-vitamin vitatott szerepe gyermekkori elhízásban	49

VI.3. Epigenetikai mechanizmusok jelentősége a gyermekkori idiopátiás elhízás kialakulásában	51
VI.4. Epigenetikai vizsgáló módszerek Prader-Willi-szindróma igazolására, hazai lehetőségeink	52
VI.5. Limitációk	54
VII. Következtetések	55
VIII. Összefoglalás	57
IX. Summary	58
X. Irodalomjegyzék	59
XI. Saját publikációk jegyzéke	71
XII. Köszönetnyilvánítás	72
XIII. Mellékletek	74

I. Rövidítések jegyzéke

2TDM = 2-es típusú diabetes mellitus

ABPM = 24 órás vérnyomásmérés és monitorozás

ALP = alkalikus foszfatáz

BMI = Body Mass Index /testtömegindex

BMI SDS = Body Mass Index / testtömegindex deviaton score

BS-PCR = biszulfít szekvenáló polimeráz láncreakció

CGA = candidate gene approach / kandidáns gének vizsgálata

CPAP = continuous positive airway pressure / pozitív légnyomást fenntartó készülék

CpG = citozin-guanin dinukleotid

CYP24A1 = 24-hidroxiláz

CYP27B1 = alfa-1-hidroxiláz

CYP2R1 = 25- hidroxiláz

DNMT = DNS metiltranszferáz

EMQN = European Molecular Genetics Quality Network

FGF23 = fibroblast growth factor 23 / fibroblaszt növekedési faktor 23

GH = growth hormone / növekedési hormon

HDL = high density lipoprotein

HhaI enzim = Hha I restrikciós enzim

HOMA = Homeostasis Model Assessment index

HRM = high resolutin melting / nagyfelbontású olvadáspont elemzés

IGF1 = insulin like growth factor 1

IGF2 = insulin like growth factor 2

IGT = csökkent glükóz tolerancia

INSIG2 = insulin induced gene 2

LDL = low density lipoprotein

LEP = leptin

LEPR = leptin receptor

MAGEL2 = MAGE Family Member L2 fehérjét kódoló gén

MC4R = melanokortin receptor 4

miRNS = mikroRNS

MRKN3 gén = Macro Ring-Finger Protein 3-t kódoló gén

MSA = mikroszetellita analízis
MS-MLPA = metiláció függő multiplex ligáció függő próba amplifikáció
MS-PCR = metiláció specifikus polimeráz láncreakció
MS-SB = metiláció specifikus southern blotolás
NAFL = non-alcoholic fatty liver / nem alkoholos zsírmáj
NDN = nekdin fehérjét kódoló gén
OGTT = orális glükóz tolerancia teszt
PC1 = prokonvertáz 1
PCOS = policisztás ovárium szindróma
POMC = proopiomelanokortin
PWLS = Prader–Willi like szindróma
PWS = Prader–Willi szindróma
RXR = retinoid X receptor
SGOT = szérum glutamát-oxálacetát aminotranszferáz
SGPT = szérum glutamát-piruvát aminotranszferáz
SNORD116 gén = small nucleolar RNA, C/D Box 116 Cluster
snoRNS = nukleáris RNS
SNRPN gén = small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N gén
SNURF = SNRPN upstream reading frame
TG = triglicerid
T_m = (melting temperature) olvadási hőmérséklet
udp(15)mat = maternális uniparentális diszómia
UKGMGS = United Kingdom Clinical Molecular Genetics Society
UKNEQAS = United Kingdom External Quality Assessment Scheme
UVB = ultraviola β sugárzás
VDR = D-vitamin receptor
VDRE = D-vitamin reszponzív element
WHO = World Health Organisation

II. Bevezetés

II.1. A gyermekkori elhízás jelentősége

Az utóbbi években a gyermekkori elhízás előfordulása és annak mértéke drasztikusan növekedik világszerte, így Európában is. Ez az állapot egyre korábbi életkorban jelentkezik, ennek következtében az elhízással járó metabolikus változások és szövődményeik egyre korábban kezdik kifejteni hatásukat [1].

II.1.1. A gyermekkori elhízás definíciója, epidemiológiája

Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) a túlsúly definiálásához a testtömeg indexet (BMI) használja, amely a testtömeg (kg) és a testmagasság négyzetének (m²) hányadosa. A BMI alapú definíció szerint felnőtteknél 25 kg/m² feletti BMI értéknél túlsúly, 30 kg/m² BMI felett elhízás áll fenn. Gyermekesetében ehhez hasonló nemzetközileg elfogadott határértékek nem állnak rendelkezésre. Gyermekkorban a meghatározások nem abszolút értéket, hanem nemre és életkorra vonatkoztatott értéket adnak meg, ez az úgynevezett percentilis. Jelenlegi ajánlások szerint a gyermekkori túlsúly 85. és 95. BMI percentilis érték között áll fenn, 95. percentilis érték felett pedig gyermekkori elhízásról beszélünk [2-4]. A Magyar Csecsemő- és Gyermekgyógyászati Szakmai Kollégium ajánlása szintén ezen határértékeket javasolja. Számos külföldi tanulmány azonban a 97. vagy a 99. percentilist használja, azonban ezen határértékek nem mutatnak szorosabb összefüggést a zsírszövet akkumulációjával, mint a 95. BMI percentilis [4, 5].

A szakirodalomban gyakran fellelhető BMI-n alapuló definíció még az ún. „BMI Z-score”, amely nem más, mint a BMI SDS (BMI standard deviáció score) [6]. Ez a metodika figyelembe veszi a referencia populáció medián értékét és standard deviációját, ezáltal relativizálni tudja kortól és nemtől függetlenül az elhízás mértékét. Kiszámítása a következő képlet alapján történik:

$$\text{BMI Z-score} = \frac{[(\text{adott egyén BMI-je}) - (\text{referencia populáció BMI mediánja})]}{\text{referencia populáció BMI standard deviációja}}$$

Ha a Z-score egyenlő 0, akkor az egyén BMI-je megegyezik a referencia populáció mediánjával, vagyis az 50. percentilis értékkel. Ha a Z-score +1,00 akkor az kb. a 84., ha +2,00 az kb. a 98. és ha +2,85 akkor az kb. a 99. percentilis feletti értéknek felel meg [7].

A BMI percentilis érték meghatározásán felül használatosak még a körfogat méréseken, testzsír méréseken alapuló eljárások, ám ezek kivitelezése összetettebb, kiterjedtebb műszerparkot, több időt és szakképzettséget igényel [8-11].

A WHO adatai alapján 2010-ben 43 millió gyermek (ebből 35 millió fejlődő országbeli) volt túlsúlyos vagy elhízott világszerte. 2015-ben az 5 éven aluli elhízott vagy túlsúlyos gyermekek száma 42 millióra volt becsülhető. A gyermekkori elhízás prevalenciája 1990- től (4,2%) 2010-ig (6,7%) folyamatosan emelkedett, 2020-ra pedig 9,1%-os arány várható, azaz mintegy 60 millió gyermeket fog érinteni szerte a világon [12].

Egy 2010-ben történt hazai felmérés szerint országszerte a 18 év alattiak 23%-a legalább túlsúlyos [13].

II.1.2. A gyermekkori elhízás lehetséges okai

A gyermekkori elhízás kialakulása igen összetett és heterogén, mind exogén mind endogén tényezők szerepet játszanak benne. Kutatások bizonyítják, hogy a legjelentősebb külső befolyásoló tényező az ún. „obezogén környezet”, amely mind a helytelen életmódot, táplálkozást mind pedig az ezeket befolyásoló környezetet magába foglalja. Egyéni szinten az elhízás kialakulásában a legmeghatározóbb külső összetevő a bevitt és a felhasznált energia mennyiség közötti különbség. A klasszikus definíció szerint, amennyiben az elhízás kialakulása elsősorban az „obezogén környezet” következménye, idiopátiás obezitásról van szó, ez az esetek 95%-át jelenti. A másodlagos elhízás, amelynek gyakorisága kb. 5%, egyértelmű génműködés zavar vagy valamilyen primer betegség következménye (pl. agytumor, koponyatrauma, hypothyreosis, Chusing szindróma, növekedési hormonhiány, izombetegségek, pszichiátriai zavarok, gyógyszer által indukált pl.: szteroidok). A határ azonban nem ilyen éles, mivel a gén-környezet interakció is fontos szerepet tölt be az elhízás kialakulásában. Az elmúlt évek során elvégzett GWA (genome wide association) tanulmányok alapján több, mint 40 genetikai variáns mutatott összefüggést mind az idiopátiás, mind pedig a másodlagos elhízással és a zsíreloszlás megváltozásával [14-16].

II.1.2.1 Az idiopátiás gyermekkori elhízás

Az idiopátiás gyermekkori elhízás kialakulása is elsősorban az „obezogén környezet” következménye, amely magába foglalja a kulturális- és környezeti tényezőket, a

megváltozott életmódot és a megnövekedett energia bevitelt. Amerikai felnőttek között végzett felmérés alapján összességében az alacsonyabb jövedelemmel rendelkező és kevésbé iskolázott, valamint valamilyen etnikai kisebbséghez tartozó emberek esetében jellemző a nagyobb mértékű elhízás. Nagy valószínűséggel ez a tendencia a rosszabb tájékozottsággal, az egészségügyhöz való korlátozott hozzáféréssel, rosszabb táplálkozási- és sportolási lehetőségekkel van összefüggésben. Az elhízás kialakulásában az egyik alapvető tényező a mozgásszegény és teljesítményorientált életmód, amely az emberi szervezetre igen káros, olykor visszafordíthatatlan hatással van. A mai civilizált társadalomban túlsúlyban van az ülőmunka, a gyors étkezés, a nagyobb ételadagok, a szociális érintkezés háttérbe szorulása, a kevés szabadidős sporttevékenység. Mindezek pedig alapvetően meghatározzák a felnövekvő gyermekek életmódbeli döntéseit, ennek következtében pedig a testsúlyukat [17]. Ezt bizonyítja az kutatás is, amely alapján az elhízott óvodások 26-41%-a, az elhízott iskolások 42-63%-a lesz elhízott felnőtt, tehát az elhízott gyerekek kétszer akkora valószínűséggel lesznek elhízott felnőttek, mint a normál alkatú gyerekek [18]. Mindezek mellett társadalmilag a túlsúlyosság egyre elfogadottabbá válik, hiába jelent egyre növekvő népegészségügyi - és egyben gazdasági problémát világszerte.

A legújabb kutatások alapján az idiopátiás elhízás hátterében azonban nem csak és kizárólag külső tényezők állnak, mivel a gén-környezet interakciók is fontos szerepet töltenek be az elhízás kialakulásában. Az ún. „elhízásra hajlamos alkat” több komponensből áll, egyik generációról a másikra átörökíthető. Az intrauterin anyai és környezeti hatások a magzati fejlődésre, a születési súlyra és egyéb születési paraméterekre, a későbbi növekedési ütemre, és a későbbi túlsúly ill. elhízás kialakulására mind hatással lehetnek. Ezen DNS szekvenciát nem módosító öröklődést moduláló mechanizmusokkal foglalkozik az epigenetika tudománya [16].

II. 1.2.2 A gyermekkori elhízás genetikai háttere

Vannak olyan esetek, amikor az elhízás kialakulása egyértelműen génekhez és azok működészavarához, valamint egy adott szindrómához köthető. Az egy gén hibájából eredő obezitást monogénes obezitásnak, míg a komplex, egyéb klinikai tünetekkel járó elhízást, szindrómás elhízásnak nevezzük. A két csoport között több átfedés is megfigyelhető, mivel egyes gének, génszakaszok hibás működése okozhat komplett szindrómát is.

A monogénes elhízás általános jellemzői az igen ritka előfordulás, a korai kezdet és a hiperfágia. Családfa elemzések során több esetben deríthető fel konzangvinitás. Leggyakoribbak a táplálékfelvétel hipotalamikusan szabályozásában fontos szerepet játszó, teltségérzetért felelős anorexigén leptin kódoló *LEP* gén, a leptin receptort kódoló *LEPR* gén, az anorexigén neuropeptidet kódoló proopiomelanokortin *POMC* gén, és az ezen peptidek jelátviteli útjaiban jelentős szerepet játszó prokonvertáz 1-et kódoló *PC1* gén, valamint a melanokortin 4 receptort kódoló *MC4R* gén hiánya vagy csökkent működése. Mindez súlyos mértékű elhízás kialakulásához vezet már kora gyermekkorban, mindennek háttérében pedig a teltségérzet és ezzel együtt a táplálékfelvétel sérült hipotalamikusan szabályozása áll. Ezen ritka esetek igazolására pontos anamnézis felvétel, családfa elemzés, illetve jellemző klinikai tünetek regisztrálása, valamint az említett gének locusainak direkt DNS szekvenálása a legmegfelelőbb technika. Terápiás lehetőségek jelenleg a leptinpótlásban, a szigorú diétában és a – külföldön megfelelő indikációval gyermekek esetében is alkalmazható – bariatrikus sebészi technikákban merülnek ki [19].

Szindrómás elhízásról van szó, ha az elhízás más, jól körülhatárolt klinikai fenotípussal, például mentális retardációval, dysmorphiával vagy szervspecifikus fejlődési rendellenességekkel jelenik meg. Ugyan a klinikai megjelenés sokszor egyértelmű, számos esetben hasonló fenotípussal jelennek meg genetikailag különböző háttérrel rendelkező szindrómák. A szindrómák háttérében nem összefüggő genetikai hibák vagy kromoszóma-abnormalitások állhatnak, amelyek lehetnek autoszomálisak, azaz a hibás gén testi kromoszómán helyezkedik el, vagy nemi kromoszómához, az X-kromoszómához kötöttek. Napjainkban pedig egyre nagyobb jelentőséggel bír egyes szindrómák epigenetikai háttérének feltárása (pl.: imprinting defektus). A leggyakoribb obezitással járó szindrómák a Prader-Willi-szindróma, a Bardet-Biedl szindróma és az Alström szindróma [20].

A poligénesként is gyakran emlegetett idiopátiás elhízás akkor figyelhető meg, amikor az egyén az erre alkalmas környezetben hajlamot mutat az energia raktározására, annak felhasználása helyett. A legtöbb nyugati társadalomban megfigyelhető ez az eltolódás. Egyes elméletek szerint az elhízás kialakulása mögött a metabolizmust befolyásoló egyes gének illetve génszakaszok együttes működésbeli változása áll, ilyen például az endoplazmatikus retikulumban található membránproteint kódoló *INSIG2* gén, amely az energiahasznosításban játszik főszerepet [21]. A közelmúltban elvégzett kandidáns génvizsgálatok alapján az insulin-like growth factor 2 (*IGF2*) és a proopiomelanokortin

(*POMC*) gének expressziója direkt összefüggést mutatott a növekedéssel, elhízással, valamint a testösszetétellel. Az *IGF2* és a *H19* imprintált gének szabályozzák a növekedést és a testösszetétel alakulását. Az *IGF2* az IGF1 receptoron keresztül fejti ki anabolikus folyamatokat mediáló hatását. Ezen gének egy-egy kópiája anyai illetve apai eredetű, azonban a két kópia közül általában csak az egyik (apai) aktív, a másik pedig jelen van ugyan, de funkciót nem lát el. Ezt a szülő-specifikus gén aktivációt a genomiális imprinting okozza, amely olyan epigenetikai mechanizmusokon keresztül is kifejezheti hatását, mint a DNS metiláció. Az *IGF2* a születés előtti időszakban kifejezetten fontos szereppel bír, későbbiekben pedig a növekedést és a sejtproliferációt segíti elő, aktivitása az évek előrehaladtával egyre csökken. Az *IGF2* gén metiláltságát több tanulmány vizsgálta, elhízott felnőttek és túlsúlyos gyermekek körében többen a szubkután zsír vastagság, a nagyobb BMI és a DNS metiláció mértéke között egyértelmű összefüggést találtak, mind pozitív, mind negatív irányban, mindenezért a magzatot az anyaméhben érő hatásokat tartják felelősnek.

A *POMC* gén az anorexigén proopiomelanokortin neuropeptidet kódolja, ami kardinális szerepet tölt be a testsúly hipotalamikusan szabályozásában a teltségérzet és az energiafelhasználás befolyásolása révén. A *POMC* gén izolált deficienciája fennállásakor a monogénes obezitás egy igen ritka fajtájáról van szó. Egyéb elhízással kapcsolatos esetekben legtöbbször a gén valamilyen működésbeli eltéréséről lehet szó. Állatkísérletekben igazolódni látszik, hogy magas zsírtartalmú étrend fogyasztásakor a *POMC* gén hipermetilációja a magas leptin szint által közvetített hatást blokkolja, így elhízáshoz vezet. *Kuehnen és munkatársai* elsőként vizsgálták és írták le a *POMC* gén 1-2-3 exonjainak régiójában talált DNS metilációs eltérések, főként hipermetiláció, és a gyermekkori obezitás összefüggését. [22-24].

A legújabb kutatások szerint a környezeti faktorok (pl.: stressz, táplálkozás mennyisége és minősége, intra uterin hatások) génműködésre gyakorolt hatása következtében is kialakulhat obezitás, ezen változások legtöbbször epigenetikai módosulásokon keresztül jutnak érvényre [25].

II.1.2.2.1. A Prader-Willi-szindróma epidemiológiája és klinikai megjelenése

A Prader-Willi-szindróma (PWS) egy ritka (incidencia 1:30000 élve születés), nemeket egyenlő arányban érintő, komplex genetikai betegség, amelynek klinikai tünetei az életkorral

változnak. Újszülöttkorban az izomhipotónia, a meglassult fejlődés és a táplálási nehézségek, míg az idő előrehaladtával a csillapíthatatlan étvágy, az elhízás, alacsonyabb termet, scoliosis, strabizmus, jellegzetes dysmorph arcvonások, cryptorchismus, meglassult beszédfejlődés, viselkedési zavarok, és az egyre inkább elmaradó szellemi fejlődés válik dominánssá. A felnőttkort megélő paciensek között a hipogonadizmus, az infertilitás, az extrém mértékű elhízás, a szellemi érintettség, valamint az elhízás szövődményeinek (pl: diabetes mellitus) megjelenése a jellemző [26, 27]. A betegség hátterében a 15. kromoszóma hosszú karján található apai eredetű 15q11q13 régióban fellelhető gének expressziójának hiánya áll. Ezen szakaszon több, összetett funkciójú gén található (pl.: IMRKN3, MAGEL2, NDN, SNURF-SNRPN gén, valamint különböző C/D bokszo snoRNS-ek) [28, 29]. A PWS minimális kritikus régiója a SNORD 116 snoRNS génklaszter, amelynek funkciója a hiperfágiás fenotípussal helyezhető összefüggésbe [30, 31]. A PWS különböző mechanizmusok folytán alakulhat ki, amelyek típusa egyes megfigyelések szerint szoros összefüggést mutat a betegség lefolyásával és annak súlyosságával. Tehát a pontos genetikai diagnózis a korai fejlesztéshez és gyógyszeres terápiához igen fontos. Az esetek mintegy 70%-ában a legsúlyosabb formát okozó paternális deléció, 20-30%-ában anyai uniparentális diszómia, 4-5%-ában imprinting defektus, 1-2%-ában pedig kiegyensúlyozott, ill. kiegyensúlyozatlan transzlokáció a betegség oka [32-34].

II.1.2.2.2. A Prader-Willi-szindróma diagnózisa

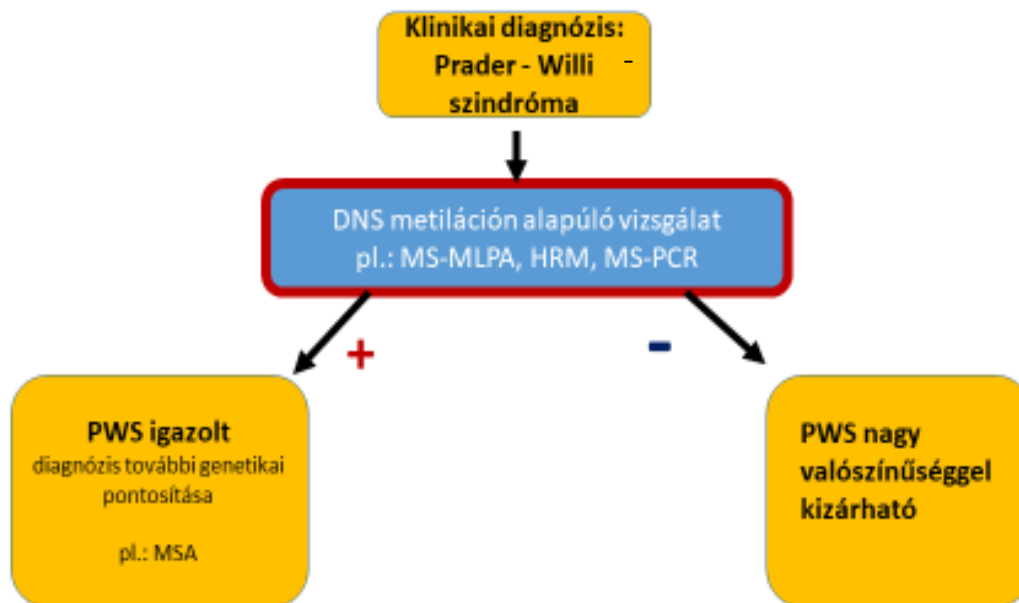
A PWS diagnózis lehetősége a klinikai tünetek alapján merül fel, amelynek igazolásához elengedhetetlen a genetikai vizsgálat. A klinikai diagnózis felállításához Holm és munkatársai kritériumrendszert dolgoztak ki, amely életkor-specifikusan segíti a PWS felismerését. Ez a módszer elsősorban szűrésre alkalmas, segítséget nyújt a klinikusnak, hogy mely betegnél indokolt a genetikai vizsgálat (2. táblázat).

Az SNRPN génlókuszo promotor régiójának DNS metilációs vizsgálata jelenleg a legérzékenyebb és leghatékonyabb kezdeti lépés a PWS gyanús betegek genetikai vizsgálatakor [35]. Erre a célra leginkább a metiláció specifikus multiplex ligáció függő próba amplifikáció (MS-MLPA) módszere terjedt el. Ezzel a technikával mind a target 15q11q13 régió kópia száma, mind pedig a metilációs státusz megállapítható, azonban az ehhez szükséges DNS szekvenáló teszt igen komplex, időigényes és jelentős költséggel jár. Az uniparentális diszómia illetve az imprinting defektus további elkülönítésére a mikroszatellita

analízis (MSA) alkalmas. A DNS metilációs státusz vizsgálatára további alternatív módszerek is rendelkezésre állnak, mint például a metiláció specifikus polimeráz láncreakció (MS-PCR), a metiláció specifikus southern blot (MS-SB), vagy a nagyfelbontású olvadáspont elemzés (HRM) [36-38]. A DNS metilációs vizsgálat eredménye a Prader-Willis szindrómás esetek 99%-ában pozitív, alkalmazásával mind a deléció, mind az anyai uniparentális diszómia illetve az imprinting defektus detektálható, míg a leginkább hozzáférhető FISH (fluoreszcensz in situ hibridizáció), csupán a deléció forma kimutatására alkalmas (ez kb. a betegek 70%-át fedi le). Az MSA, amely az UDP illetve deléció forma kimutatására alkalmas, kevésbé szenzitív, elsődleges szűrésre csak korlátozottan alkalmas [33] (1. ábra). Hazánkban Varjas Tímea és munkatársai RNS-izolálás után cDNS-t szintetizáltak, majd PCR-reakciót végeztek a teljes cDNS-mennyiséggel. A PCR-terméket agarózgélben futtatták, és a 15. kromoszóma 15q11-13 régiójára specifikus gént expresszióját vizsgálták. A gén expresszióját mindegyik egészséges egyénnél ki tudták mutatni, míg a klinikailag Prader-Willi-szindrómás betegeknél nem. Ez a módszer mindenképpen hatékony, ám kivitelézése nem egyszerű, időigényes [39]. A Prader-Willi-szindróma diagnózisa a korcsoport specifikus tüneteken és a genetikai vizsgálaton alapszik. A European Molecular Genetics Quality Network (EMQN), a United Kingdom External Quality Assessment Scheme (UKNEQAS), valamint a UK Clinical Molecular Genetics Society (UKGMGS) konszorzusa alapján az SNRPN génlókus promoter régiójának DNS metilációs vizsgálata jelenleg a legérzékenyebb és leghatékonyabb kezdeti lépés a Prader-Willi-szindróma gyanús betegek genetikai vizsgálatakor. Ezen módszerek szenzitivitása 99%-os. Mind a nyugat-európai országokban, mind pedig az Amerikai Egyesült Államokban a legelterjedtebb DNS metilációs vizsgálat az MS-MLPA illetve az MS-PCR. Az MS-MLPA módszer nemcsak a PWS igazolására ill. kizárására alkalmas, hanem egyben további információval szolgál a betegség molekuláris genetikai hátterét illetően, míg az MS-PCR esetében a betegség igazolására, illetve a diagnózis elvetésére van lehetőség. A HRM technika szintén elismert és támogatott a fent említett társaságok által. [27, 40].

A magyarországi Prader-Willi szindróma genetikai diagnosztikájában rendelkezésre áll a FISH, amely a deléció esetek igazolására és az MSA technika, amely a uniparentális diszómia, illetve az imprinting defektus igazolására alkalmas. Azonban egy nagy szenzitivitású, elsődleges igazolásra ill. kizárásra alkalmas, DNS metiláción alapuló metodika a hazai rutin diagnosztikában nem elérhető. A metilációs szenzitív nagy felbontású olvadáspont elemzés (MS-HRM) során a biszulfittal kezelt DNS szálak PCR

közben történő szétválását követjük nyomon. Ez a DNS szál metiláltságától illetve egyéb tulajdonságaitól függően más és más olvadáspontokon történik meg. A Prader-Willi szindrómában az anyai ill. az apai eredetű DNS szálak viselkedése megváltozik, az apai eredetű DNS szál olvadásgörbéje nem detektálható. Az MS-HRM betegség pontos genetikai hátteréről (pl.: deléción, UDP vagy imprinting defektus) ugyan nem ad információt, de egy egyszerű, könnyen hozzáférhető metodika, az igazoló- ill. kizáró eredmény pedig egy olvadásgörbe grafikonról egyszerűen leolvasható.



1. ábra: Prader-Willi-szindróma sémás diagnosztikus algoritmus

MS-MLPA: metiláció specifikus multiplex ligáció függő próba amplifikáció, HRM: nagyfelbontású olvadáspont-elemzés, MS-PCR: metiláció specifikus polimeráz láncreakció, MSA: mikroszatellita-elemzés

II. 1.2.2.3. A Prader-Willi like fenotípus

Azokban az esetekben, amikor a fenotípus PWS-ra utal, azonban nem mutatható ki a szindrómára jellemző egyik genetikai eltérés sem, Prader-Willi like szindrómáról (PWLS) van szó. Ennek hátterében az áll, hogy a PWLS kapcsán érintett gének a klasszikus PWS fenotípus kialakulásában szerepet játszó genetikai útvonalakon helyezkednek el. A PWLS genetikai hátterében számos gén meghibásodása, illetve hiánya állhat (pl.: 14. kromoszóma uniparentális diszómiaja, *MAGEL2* gén *de novo* mutációja, *LEPR* gén mutáció, *POMC* gén mutációja), amelyek azonosítása a legtöbb esetben diagnosztikus kihívás. A PWLS-ben legjellemzőbb

klinikai tünetek a hipotónia, a hyperphagia, az obezitás és a fejlődésmaradás. Azonban mind fenotípus alapján, mind pedig genetikailag igen heterogén a PWLS csoport [41].

II.1.2.2.4. A Prader-Willi-szindróma prognosztikája, kezelési lehetőségei

A tudomány jelen állása szerint PWS esetében tüneti kezelésre van lehetőség, azonban a korai diagnózis és megfelelően ütemezett terápia jelentősen javíthatja a betegek életminőségét. A szindróma tüneteinek hatékony kezelése, a betegség egészségügyi, pszichológiai, és szociális vonzatai következtében csakis multidiszciplináris csapatmunkával, kooperatív és támogató családi és iskolai környezet segítségével lehetséges [42, 43]. A gyermekkorban jelentkező csillapíthatatlan étvágy miatt, az élelmiszerekhez való hozzáférés szigorú szabályozása, és ellenőrzése szükséges, mindemellett az újszülött korban jelentkező hipotónia és táplálási nehezítettség miatt a csecsemőkori megfelelő táplálás kulcsfontosságú. Idővel a fizikai aktivitás kontrollált növelése segít az erőnlét fejlesztésében [26]. A PWS betegek közel 80%-ánál fordul elő eltérő mértékű növekedési hormon (GH) hiány, ezért a naponta alkalmazott alacsony dózisú rekombináns GH adagolás segíti a lineáris növekedést, növeli az izomtömeget, ezáltal pozitívan befolyásolja a testösszetétel alakulását [44-46].

A PWS-ben gyakori hipogonadizmus hormonális kezelése a pubertás indulására időzíthető, segítve a korai osteoporózis megelőzését. A súlyos elhízás következménye lehet az alvási apnoe, amely alvás közben használt pozitív légnyomást fenntartó (CPAP) készülékkel mérsékelhető. A scoliosis konzervatív módon, extrém esetben műtéti beavatkozással is kezelhető. A viselkedésbeli-, és pszichiátriai zavarok minél korábbi diagnosztizálása fontos, mivel ezen állapotok hatékony kezelésének legmeghatározóbb része a szakorvosi segítség mellett, a szülők betegséggel kapcsolatos felvilágosítása, oktatása és a mindennapok szigorú rendszerének kialakítása. Egyes esetekben a szerotonin agonisták csökkentették a dühkitörések és az agresszív viselkedés mértékét is [26].

II.1.3. A gyermekkori elhízás szövődményei

A gyermekkori elhízás jelentőségét az adja, hogy minél korábban jelentkezik és minél hosszabb ideig tart, annál nagyobb a valószínűsége a szövődmények kialakulásának, sőt ezek megjelenése egyre korábbi életkorra lesz tehető.

Az anyagcsere megváltozásának szempontjából a hipertónia és a diszlipidémia, a szénhidrát anyagcserezavarok a legjelentősebbek, mindezek mellett azonban a hiperurikémia, és a nem alkoholos zsírmáj (NAFL), lányok esetében pedig a menstruációs zavar is gyakori szövődmény.

Az elsődleges hipertónia korábban igen ritka volt gyermekkorban, mára azonban egyre gyakoribb jelenség elhízott gyermekek esetében. Jelen hazai gyakorlatban a 24 órás vérnyomásmérés (ABPM) és az eredmények percentilis táblázatok segítségével való kiértékelése effektív diagnosztikus módszernek bizonyult, bár a technika limitációja, hogy a vérnyomásmérő mandzsettáját megfelelően kell rögzíteni, és ez 6 éves kor alatt kifejezett technikai nehézségeket okoz. Magas vérnyomásról akkor beszélünk, amikor a gyermek vérnyomásértéke a 95. percentilis felett helyezkedik el [47]. Az elhízott gyermekeknek háromszor nagyobb esélyük van a magas vérnyomás kialakulására, mint normál testalkatú társaiknak. Egyes kutatások szerint az 5 és 11 év közötti korosztályban az elhízott gyermekek 20-30%-ánál figyelhető meg emelkedett szisztolés vagy diasztolés vérnyomásérték. Illetve a serdülőkori túlsúly nyolcszoros rizikót jelent a felnőttkori magasvérnyomás betegség kialakulásában [48-51].

A diszlipidémia nem más, mint a vérben található lipoproteinek arányának metabolikusan nem kedvező irányba való eltolódása, amely emelkedett összkoleszterin, low density lipoprotein (LDL) illetve triglicerid (TG) szintet és csökkent high density lipoprotein (HDL) szintet jelent. Ezen eltérések jelentőségét az adja, hogy a lipid-anyagcsere eltérések az atherosclerosis kialakulását segítik, amelynek kialakulása már gyermekkorban elkezdődhet. Az emelkedett TG szinttel, illetve csökkent HDL szinttel jellemezhető diszlipidémiákat atherogen diszlipidémiának hívjuk [52, 53].

A leggyakoribb szénhidrát anyagcserezavarok gyermekkori elhízásban az inzulin rezisztencia és a glükóz intolerancia, valamint egyre gyakoribb a már gyermekkorban megjelenő 2-es típusú diabetes mellitus (2TDM). A 2TDM kialakulását megelőzően az anyagcserezavart a glükóz tolerancia csökkenése (IGT) és az éhomi vércukorszint emelkedése jelzi. IGT esetében a glükóz bevitelhez kapcsolt inzulin válasz már nem elegendő a fennálló inzulinrezisztencia miatt, így a vércukorszint a fiziológiásnál nagyobb mértékben emelkedik. Nagy, átfogó külföldi tanulmányok során az elhízott gyermekeknél az esetek 10-25%-ában igazoltak IGT-t, míg 4%-ban tünetmentes, ún. „néma” diabetes igazolódott. Egy vizsgálat során összevetették az OGTT és az éhomi vércukorszint

meghatározás alapján történő szénhidrát anyagcserezavar szűrés hatékonyságát és a 2TDM betegek egy harmadában, illetve az IGT-s betegeknél az éhomi vércukorszint a normál határértéken belül volt. Ezt alátámasztva, több ajánlás a szénhidrát anyagcserezavar diagnosztizálására az orális glükóz-tolerancia tesztet (OGTT) javasolja, annak ellenére, hogy ez a módszer költségesebb az éhomi cukor mérésnél [54-56].

A húgysav egy antioxidáns molekula, amelynek megemelkedett vérszintjekor hiperurikaemiáról beszélünk. Ennek oka lehet a fokozott sejtszétérés, a vesén való kiürülés gátlása, illetve maga az inzulinrezisztencia is. Magas húgysavszint esetén a húgysav nem a vesén keresztül ürül ki, hanem az urát transzporter segítségével bejut a simaizomsejtbe vagy endothel sejtbe és sejt proliferációt, vazokonstriktiót, renin-angiotenzin rendszer fokozott aktivitását idézi elő. Következésképpen lehet fokozott oxidatív stressz, szénhidrát anyagcserezavarok, endothel-diszfunkció, magas vérnyomás, bal kamra hipertrófia, valamint meglévő vesebetegség progressziója is. Elhízott gyermekekben egyre gyakoribb a hiperurikémia előfordulása, ezáltal a metabolikus szövődmények súlyossága is fokozódhat [57, 58].

A nem alkoholos zsírmáj (NAFL) fogalma egy a steatosisról, a steatohepatosison és a steatohepatitisen át, egészen a májcirrhosisig tartó spektrumot ölel fel. Megemelkedett májenzim értékek, ultrahanggal vizsgálva hiperechogenitás jellemzi. Sokszor kizárásos diagnózisról van szó. Pathogenezisében az inzulin rezisztencia, a hiperlipidémia és a megemelkedett oxidatív stressz hatás jelentős, mivel az inzulin rezisztencia következtében megemelkedett vér inzulinszint zsírsav szintézist és lipolízist indukál a hepatocitákban, ami fokozott hipertrigliceridémiahoz és a májban fokozott zsírsav felvételhez vezet. A trigliceridek felhalmozódása a májban szabad oxigénradikálok keletkezését idézi elő, amelyek végső soron sejthalált illetve fibrózist indukálnak. Az NAFL az elhízás metabolikus következménye, amelynek kialakulása gyermekkorban elkezdődik és első jele lehet a májenzimek megemelkedése [59-61].

Az elhízott lányok esetében gyakori a korai (10 év előtti) menarche, azonban az elhízás mértékével mind az oligo-, mind pedig az amenorrhoea előfordulása pozitív összefüggést mutat. Gyakori eltérés a policisztás ovarium szindróma (PCOS) és hiperandrogenizmus is, amely a viscerális zsírszövet megnövekedett mennyisége miatti inzulinrezisztenciával is összefüggésbe hozható [62].

Az túlsúly következtében megjelenhetnek az ún. „mechanikus tünetek”, mint az orstruktvív alvási apnoe, a pseudotumor cerebri vagy az ortopédiai eltérések, mint pl. a scoliosis vagy a genu valgum. Valamint nagy jelentőséggel bírnak az elhízással összefüggő, korántsem látványos, ám annál nagyobb jelentőséggel bíró pszichoszociális következmények is, mivel az elhízott gyermekek érzelmi fejlődése a kortársaik általi diszkrimináció, az esetleges verbális bántalmazás, az elszigeteltség, a csökkent önértékelés következtében sérül [63-65].

A gyermekkori elhízás, mind a metabolikus, mind a mechanikus mind pedig pszichoszociális vonatkozásokat figyelembe véve, összességében negatívan befolyásolja a gyermekek életminőségét.

II.1.4. A gyermekkori elhízás kezelési lehetőségei

Az gyermekkori elhízás kezelésének alappillérei a korai felismerés, a magas intenzitású és megfelelő hosszúságú intervenció, amely a táplálkozásra, a fizikai aktivitásra, és a viselkedés megváltoztatására is hatással van. Mindez természetesen a kezelőorvos, a család, és a szülők közvetlen bevonásával, támogatásával és utánkövetéssel történik. Amennyiben a konzervatív, komplex terápia nem jár sikerrel, illetve az elhízás extrém mértékű, gyógyszeres terápia ill. műtéti megoldások is szóba jönnek, de ezen alternatívák és esetleges következményeik világszerte megosztják a szakértőket [66].

Az alapellátás feladata a gyermekkori túlsúllyal, ill. elhízással küzdők kiszűrése, és ezen személyek további ellátásában való segítése. Sajnos hazánkban az elhízott gyermekek alapellátásához illetve további komplex kezeléséhez nem áll rendelkezésre kidolgozott stratégia. Ideális esetben az alapellátás által kiszűrt gyermekek kórházi kivizsgálásra kerülnek az esetleges cardiovascularis ill. egyéb szövődmények felderítése, kezelése céljából. Itt dietetikai illetve életmódbeli tanácsadáson, tornán vesznek részt, ám megfelelő területi szervezettség, valamint utánkövetés hiányában a tartós súlycsökkenéssel járó, hosszú távú eredmények igen ritkák [47].

A nemzetközi szakirodalom sokat foglalkozik a hatékony és tartós gyermekkori testsúlycsökkentéssel és számos kutatás alátámasztja, hogy a legjelentősebb eredmények korai életkorban (2-6 éves kor), a család, azon belül is a szülők bevonásával érhetők el. Későbbi, adolescens életkorban az eredmények már nem ilyen egyértelműen sikeresek [67, 68]. Az intervenciók az egész család táplálkozását, életvitelét, fizikai aktivitását

célozzák meg, megváltoztatva a gyermek közvetlen környezetét. Mindehhez megfelelő szakemberek nyújtnak segítséget és ezen ún. „magas intenzitású intervenciónak” szerves része a folyamatos tanácsadás, külső segítség és követés [69-72].

Alapvetően a tápanyagok megfelelő minőségi és mennyiségi bevétele határozza meg az összes elhízás kezelésében használatos diétát. Az AHA táplálkozási alapelvei a magas zsír- és kalória tartalmú ételek bevitelének csökkentését, illetve a cukor alapú édesítést tartalmazó termékek fogyasztásának korlátozását hangsúlyozzák. Tehát a gyümölcsök, zöldségek, teljes kiőrlésű gabonafélék, az alacsony zsírtartalmú tejtermékek, hüvelyesek, halak és sovány húsok fogyasztása, ezzel együtt pedig a kissé csökkentett kalória bevitel helyeződik előtérbe [73, 74]. Fontos, hogy az extrém, nagyon alacsony kalória (500-800 kcal/nap) illetve nagyon magas fehérjét tartalmazó diétákat ebben az életkorban kerülni kell, mivel az ezek által okozott vitamin- illetve ásványianyag hiány a fejlődést, csont mineralizációt, növekedést, menstruációs ciklust is befolyásolhatja.

Kifejezetten gyakorlati segítséget nyújtó módszer az ún. „Traffic Light Plan”, azaz közlekedési lámpa módszer, amely a magas kalória tartalmú ételek bevitelének csökkentését és az alacsony energia tartalmú ételek bevitelének növelését hivatott segíteni. A módszer az ételeket, élelmiszereket a közlekedési lámpa színeinek megfelelően, három csoportra osztja: zöld színnel jelölt ételek alacsony energiataartalmúak, fokozott fogyasztásuk ajánlott, a sárga színnel jelöltek közepes energia tartalmúak, mérsékelt bevitelük javasolt, a piros színnel jelöltek pedig kifejezetten energia gazdagok, bevitelük nem vagy igen korlátozott mértékben javasolt. A legújabb kutatások alapján ez a jelölési módszer kifejezetten hasznos az egészséges táplálkozás gyakorlati kivitelezése szempontjából [75].

Magyarországon a Magyar Dietetikusok Országos Szövetsége nemrég „Okostányér” néven új hazai táplálkozási ajánlást adott ki. Az felnőtt és gyermek lakosságnak szánt útmutató a legfrissebb tudományos eredményeket figyelembe véve határozza meg, hogy a kiegyensúlyozott táplálkozáshoz naponta milyen élelmiszertípusoknak, milyen arányban kellene a tányérunkra kerülnie. Az „Okostányér” a korábbiaktól eltérően tápanyagalapú ajánlás helyett élelmiszercsoportokat és ezek megfelelő arányát adja meg, hiszen a köznapi életben sem fehérjét, zsírt vagy szénhidrátot fogyasztunk, hanem ezek értékes forrásait, például húst, tejet, kenyeret, zöldséget, gyümölcsöt. Az új ábrázolás, a mindennapi életben való könnyű alkalmazás céljából az eddigi piramis-

vagy házalak helyett az étkezéshez egyértelműen kapcsolható tányérformán jeleníti meg az egyes élelmiszertípusok egymáshoz viszonyított helyes arányát. Minden ábrázolt tányér mellett piktogram hívja fel a figyelmet a kevesebb só, cukor és zsiradék, valamint a fokozott folyadék bevitelének fontosságára. Így a vizuálisan is rögzülő arányok sokkal könnyebben betarthatók a gyakorlatban. A korcsoportok szerinti ajánlások, táblázatok és „okostányérok” a Magyar Dietetikusok Országos Szövetsége honlapján elérhetők (<http://mdosz.hu/uj-taplalkozasi-ajanlasok-okos-tanyer/>).

A szülők bevonásával történő életmód változtatás segít a látványos és tartós súlycsökkenés hosszú távú fenntartásában. A megfelelő, támogató környezetben a gyermek új, egészséges magatartásformákat sajátíthat el, az egészséges étkezés és életvitel előnyeit közvetlen közletről tapasztalhatja. Mindeközben kifejezetten fontos a példamutatás, a pozitív szülői megerősítés, bátorítás. Azonban fontos a minél korábbi beavatkozás, mivel családi közreműködéssel a legjelentősebb eredmények korai életkorban (2-6 éves kor), a pubertás beállta előtt érhetőek el [67, 76].

Az extrém mértékű gyermekkori elhízás kezelésekor alkalmazott gyógyszeres kezelések illetve műtéti megoldások világszerte vitatottak. Az Egyesült Államokban súlyos mértékben elhízott adolezscens korúaknál (12-16 éves kor), külön engedéllyel és szoros követéssel engedélyezettek a gasztrointesztinális zsírfelszívódást gátló orlisztát tartalmú készítmények, amelyek alkalmazásakor külső zsírban oldódó vitamin pótlás szükséges (A, E, D, K- vitaminok) és igen gyakoriak a gasztrointesztinális mellékhatások [77]. További ígéretes eredményeket mutattak a szibutraminnal folytatott felnőtteken végzett kísérletek, amelynek metabolitja gátolja a noradrenalin, szerotonin és a dopamin újrafelvételét, azonban egy 6 éves vizsgálat során jelentős fokban fokozott szív- és koszorúérrendszeri mellékhatások fordultak elő felnőttekben, így a szibutramin hatóanyag tartalmú készítmények forgalomba hozatalát felfüggesztették [70].

Az elhízás sebészi kezelési lehetőségeivel a bariátriai sebészet foglalkozik. Az adolezscens korban alkalmazható technikák közül a nemzetközileg a legelfogadottabb a „roux en Y” gasztrikus bypass (RYGB), a laparoszkóposan felhelyezett gasztrikus gyűrű és a csőgyomor (sleeve gastrectomy) képzése, illetve alkalmazása. Az American Society for Metabolic and Bariatric Surgery Pediatric Committee által kiadott legújabb ajánlás szerint a potenciális betegnek szigorú kritériumoknak kell megfelelniük. Az adolezscens korúak várható növekedésük 95%-át el kell érjék, posztpubertásban kell

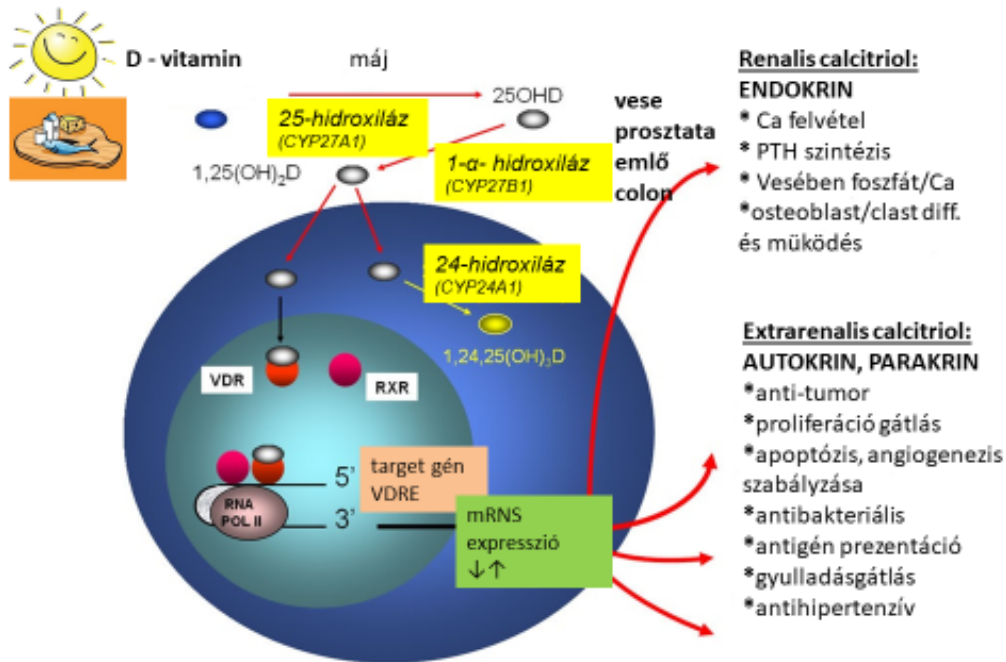
lenniük, illetve tájékoztatás utáni felelős döntéshozatalra is alkalmasnak kell lenniük. Ezen felül a $BMI \geq 35 \text{ kg/m}^2$ esetében legalább két major társbetegség fennállását (pl.: 2-es típusú diabetes mellitus, súlyos alvási apnoe, pszeudotumor cerebri, súlyos nem alkoholos zsírmáj), $BMI \geq 40 \text{ kg/m}^2$ esetében pedig a társbetegség fennállását (pl.: hipertónia, diszlipidémia, glükóz intolerancia) kell igazolni. Minden esetben szülői beleegyezés és támogatás szükséges, a műtétek pedig csakis az arra specializálódott centrumokban végezhetőek el [78]. Annak ellenére, hogy a bariátriai megoldások látványos eredménnyel járhatnak (egy éven belül akár $-17, 2 \text{ kg/m}^2$ BMI), és az elhízással kapcsolatos társbetegségekre gyors és pozitív befolyással vannak, az esetleges műtéti-, illetve posztoperatív időszakban jelentkező komplikációk nem elhanyagolhatók. A nem megfelelő műtét utáni életvitellel pedig a visszahízás esélye fokozott [79, 80]. A gyermekkori elhízás leghatékonyabb kezelése tehát a megelőzés. A már kialakult állapot kezelése többrétű, a kezelőorvos, valamint a család és a közvetlen környezet bevonásával hatásos lehet, ám radikális táplálkozási, életmódbeli és viselkedésbeli változásokat von maga után, amelyek hosszú távú kivitelezéséhez elengedhetetlen az együttműködés, a kitartás és a szakmai segítség igénybevétele.

II.2. A D-vitamin jelentősége

A klasszikus megközelítés szerint a D-vitamin endokrin szerepe az emberi szervezet kalcium- és foszforanyagcseréjének, ill. ezen ionok szérumszintjeinek szabályozása, valamint a fiziológiás csontanyagcsere biztosítása. A klasszikus D-vitamin-hatások a csontok, a vese, a mellékpajzsmirigy és a bélrendszer működését befolyásolják. A D-vitamin azonban számos más szövet működésének szabályzásában is szerepet játszik, hatással van a sejtciklus szabályzásra, a sejtproliferációra, ill. – differenciációra. Ezeket a nem klasszikus hatásokat az intracellularisan termelődő $1,25(\text{OH})_2 \text{ D}_3$ vitamin auto-ill. parakrin módon fejt ki. Egy másik felosztás szerint megkülönböztetünk lassan kialakuló, hosszú távú, megváltozott génműködésen keresztül ható genomiális – illetve gyorsan kialakuló, feedback mechanizmusokon keresztül szabályzott, nem genomiális D-vitamin hatást. Az elmúlt években pedig fény derült a D-vitamin epigenetikai szabályzásban betöltött fontos szerepére is. A D-vitamin ellátottság szerepe egyre nagyobb hangsúlyt kap számos kórképet tekintve, így az elhízásban, ezen belül a gyermekkori elhízásban is [81].

II.2.1. A D-vitamin metabolizmusa

A D-vitamin szervezetünkbe táplálékkal D2 vitamin (ergocalciferol) vagy D3 vitamin (cholecalciferol) formájában juthat, illetve a bőrünkben UVB sugárzás hatására először nem enzimatis úton pre-D3 vitamin szintetizálódik 7-dehydrocholesterolból, majd izomerizáció után jön létre a D3 vitamin. A D3 vitamin a D-vitamin kötő fehérje (vitamin D binding protein; DBP) segítségével jut el a májba, ahol citokróm P450 enzimek hatására (pl: CYP27A1–D3 vitaminra specifikus, CYP2R1–D2 és D3 vitamint egyaránt átalakít) 25OHD3 vitaminná alakul. A mindennapos klinikai gyakorlatban ezt a stabil és viszonylag könnyen mérhető forma használatos D-vitamin-szint meghatározásra. Az aktív 1,25(OH)2D3 vitaminformát a vese proximális tubulusában zajló újabb hydroxiláció révén nyeri el, ezért a folyamatért a CYP27B1 enzim felelős, amelynek aktivitását, mind a parathormon, mind az FGF23 mind pedig maga a hormonálisan aktív D3 vitamin, valamint a kalcium- és foszfát ionok vérszintje szabályozza. CYP27B1 nemcsak a vesében, hanem bőr-, tüdő-, mell-, bélrendszeri-prosztata epithelias sejtekben, számos immunsejtben és endokrin szervben is megtalálható [82, 83]. Az így kialakult aktív D-vitamin a célszerveket elérve a sejten belül a nukleáris D-vitamin-receptorhoz (VDR) kötődik, majd a VDR-ligand a retinoid – X receptorral (RXR) komplex heterodimert képezve kötődik a célgének promoter régiójához, befolyásolva ezzel az adott gén működését. A VDR számos extranukleáris, nem transzkripcionális gyors sejtválasz kialakításában is részt vesz. A VDR hatás szerteágazóságát bizonyítja, hogy megtalálható például endokrin mirigyekben, endothelsejtekben, erek simaizomsejtjeiben és cardiomyocytákban is [84]. Az aktív D3 vitamin inaktiválását a mitokondriális CYP24A1 citokróm P450 enzim végzi, amely aktivitását mind maga az aktív D-vitamin, mind a parathormon, mind pedig a FGF23 befolyásolja. Számos krónikus, illetve malignus betegség kialakulásában jelentőséget tulajdonítanak a megnövekedett CYP24A1 enzim aktivitásnak [85, 86] (2.ábra).



2.ábra: D-vitamin szintézis és jelátvitel

A klasszikus (renalis calcitriol) D-vitamin-hatások a csontok, a vese, a mellékpajzsmirigy és a gyomor-bélrendszer működését befolyásolják. A D-vitamin azonban számos más szövet működésének szabályozásában is szerepet játszik, hatással van a sejtciklus szabályzásra, a sejtproliferációra, ill. – differenciációra (extra renalis calcitriol hatás).

DBP: D-vitamin kötő fehérje, CYP27A1: 25-hidroxiláz, CYP27B1: 1- α - hidroxiláz, VDR: nukleáris D-vitamin-receptorhoz, RXR: VDR-ligand a retinoid – X receptor komplex, VDRE: target gének promoter régiójának D-vitamin rezponzív eleme

II.2.2. A D-vitamin és a gyermekkori elhízás kapcsolata

Az utóbbi évek egyik igen intenzíven kutatott területe a D-vitamin elhízásban játszott szerepe, illetve, hogy ok vagy következmény-e a több ízben megfigyelt alacsony D-vitamin-szint az elhízott egyéneknél. Mind a D-vitamin-hiány és mind pedig a gyermekkori elhízás előfordulása együttesen és külön-külön is nagymértékben megnövekedett világszerte, közös rizikófaktorai közé tartozik az egyoldalú, nem minőségi táplálkozás, illetve a fizikai inaktivitás [87, 88]. A D-vitamin-hiány definíciója nem egységes, országonként és kontinensenként is eltérést mutat. Például a több nemzetközi kutatás alapjául szolgáló Institute of Medicine (IOM) meghatározása szerint D-vitamin-hiány, ill. hipovitaminózis 50nmol/L (20ng/mL) S-25OHD3

vitamint-szint alatt áll fenn, míg az Endocrine Society ajánlása szerint 75 nmol/L és 250 nmol/L (30–100 ng/mL) közötti 25OHD3 vitamin vérkoncentráció esetén beszélhetünk megfelelő, a 52–72 nmol/L (21–29 ng/mL) közötti értékek esetén pedig elégtelen D-vitamint-szintről [89]. Magyarországon normál D- vitamint-szintről 30 ng/ml vagy 75 nmol/l felett, D-vitamin-hiányról 20 ng/ml vagy 50 nmol/l alatt, súlyos D-vitamin-hiányról pedig 10 ng/ml vagy 25 nmol/l alatt beszélünk. 2013-ban a Semmelweis Egyetem II.sz. Gyermekgyógyászati Klinikáján készült saját felmérésünk alapján a 3 éves kor alatti gyermekek 40%-a, míg összesítve, a 18 éves kor alatti betegek 60%-a rendelkezett nem megfelelő D-vitamint-szinttel (S-25OHD3 vitamint-szint <30 ng/ml).

Nemcsak az elhízás tényétől, de annak mértékétől is függ a D-vitamin-hiány jelenléte. Egy egyesült államokbeli több ezer gyermeket felmérő vizsgálat szerint a normál testsúlyúak körében 21%, a túlsúlyosak körében 29%, az elhízott gyermekek körében 34%, míg a morbid elhízott gyermekek körében 49% volt a D-vitamin-hiány előfordulási aránya. Ezzel párhuzamosan vizsgálták a rassz szerinti eloszlást is, amelynek eredményeképpen a morbid elhízott gyermekeknél a fehér bőrűek körében 27%-os, a latin származásúak körében 52%, míg az afroamerikaiak körében 87%-os volt a D-vitamin-hiány előfordulásának aránya. Összességében pedig az alacsonyabb D-vitamint-szint összefüggést mutatott az idősebb korról, a kisebbséghez való tartozással és a női nemmel [90].

Az alacsony D-vitamint-szint elhízással együtt való előfordulásával kapcsolatosan több teória is napvilágot látott. Egyik szerint a magas testzsír és az alacsony D-vitamint-szint közötti fordított összefüggés hátterében a D-vitamin zsírban való szekvesztrációja áll [91]. Más elképzelések szerint a megnövekedett testzsír befolyásolja a csontanyagcsere hormonális szabályozását, ezáltal közvetetten hat a D-vitamint-szintet meghatározó feedback mechanizmusokra [92]. Erre példa az adipocyták által termelt leptin, amely az csontépülésben szerepet játszó osteoblastokhoz kötődve a vesében történő D-vitamin aktiválást gátolja. Illetve mind az elhízás, mind pedig az alacsony D-vitamint-szint kialakulása visszavezethető a nem megfelelő táplálkozásra és a fizikai inaktivitásra is [93, 94].

Alacsony D-vitamint-szint esetén az elhízás szövődményei korábban jelentkezhetnek illetve súlyosabb formát is ölhetnek a normál D-vitamint-szinttel rendelkezőkhöz képest. Az elhízott egyéneknél gyakran megfigyelhető inzulin rezisztencia, és az ehhez kapcsolódó krónikus gyulladás kórjelzőek a később kialakuló metabolikus szindróma,

2-es típusú diabetes mellitus, cardiovascularis megbetegedés, osteopenia illetve osteoporosis szempontjából [95, 96]. Mindennek biológiai háttere még nem egészen tisztázott, az alacsony D-vitamint-szint feltehetően a glikémiás szabályzást a perifériás, ill. a máj általi glükóz felvételen, a krónikus gyulladás fokozásán illetve hasnyálmirigy β -sejtjei által történő az inzulinszintézis és inzulin-eválasztás moderálásán keresztül, komplex módon befolyásolja [97]. Az egyik legelső D-vitamint-szintet és az elhízás szövődményeit együttesen vizsgáló tanulmány szerint az inzulinrezisztencia és az IGT legnagyobb valószínűséggel már 50 nmol/L (20 ng/mL) S-25 (OH) D-vitamint-szintnél megfigyelhető az elhízott betegekben [98].

Tehát az összefüggés pontos részleteiben nem ismert, az egyes feltételezett mechanizmusok biológiai hátterének kutatása nemzetközi szinten folyamatosan zajlik, az egyes eredmények pedig sokszor igen ellentmondásosak.

II.3. Az epigenetikai szabályozás jelentősége

Az epigenetikai szabályozás olyan külső és belső környezeti hatások (pl. anyai hatás, táplálékbevitel, alvásmennyiség, dohányzás, stressz, mozgás, gyógyszerek) összességét foglalja magába, amelyek a DNS-szekvenciát nem változtatják meg, azonban kovalens, általában génexpresszióra ható változásokat idéznek elő (pl. DNS metiláció, hiszton acetiláció és metiláció, mikro RNS útvonal). Az epigenetikai hatások nyomán megvalósuló változások egy része mitotikusan és/vagy meiotikusan is átörökíthető folyamat.

Az epigenetika maga tehát a gének olyan öröklődési formájának vizsgálata, amely nem jár együtt a DNS nukleotid sorrendjének megváltozásával. Arra a kérdésre keres választ, hogy a környezeti tényezők szülőkre gyakorolt hatása, milyen molekulárisan igazolható változásokat okoz az utódok génkifejeződésében.

Illetve egy élőlény fejlődésének olyan folyamatait vizsgálja, mint az emlős nőstények egyik X kromoszómájának inaktivációja (imprinting) vagy a gén csendesítés (silencing). Mindkét esetben a vizsgálat tárgya azonos: egy gén információja hogyan kerül át egyik generációból a másikba a DNS-szekvencia megváltozása nélkül epigenetikai úton.

Mivel egy genom több epigenetikus útvonallal rendelkezik, a sejt ezen epigenetikai tényezőinek összességét epigenomnak nevezzük [99].

II.3.1. Az epigenetikai szabályozás szerepe, útvonalai

Az epigenetikai útvonalak döntő szerepet játszanak a génexpresszió szabályozásában, amelyek fő útvonalai a kovalens kötésekben alapuló DNS metiláció, a hiszton modifikáció (metiláció, acetiláció, foszforiláció, ubiquitináció), valamint a mikroRNS-ek által közvetített hatások (3.ábra).

Hiszton modifikáció

A hiszton fehérjék a kromatin elsődleges, „korongszerű” szerkezeti elemei, amelyek körül a DNS lánc feltekeredve, kompakt állapotban található. A hiszton fehérjék poszt-transzlációs módosulásai a hisztonok köré rendeződött DNS szerkezeti elrendeződését befolyásolják, ezáltal annak hozzáférhetőségét, és az arról történő átírást szabályozzák.

Például a génátírás inicializálásakor (pl.: hiszton fehérjék acetilálódásakor, amit a hiszton acetil transferáz végez a kromatin szerkezete lazul, eukromatinná alakulva, az adott DNS szakasz a transzkripciós faktorok és enzimek számára hozzáférhetővé válik, „aktiválódik”. Azonban, ha a kromatin feltekeredik, heterokromatin komplexet képezve a hiszton fehérjékkel, inaktív állapotba kerül, a transzkripció nem lehetséges (pl.: deacetilálódásakor- hiszton deacetiláz által). A hiszton fehérjék metilációja minden esetben gátlólag hat a génátíródásra. A kovalens hiszton modifikációkhoz tartozik még a foszforiláció és az ubiquitináció is [86, 99].

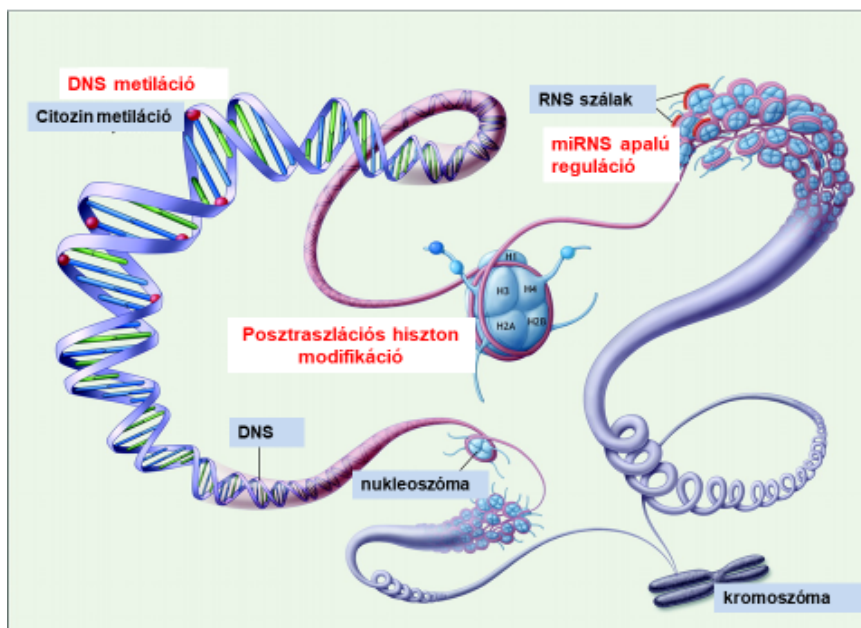
DNS metiláció

A DNS metiláció a legszélesebb körben vizsgált epigenetikai útvonal [100]. Valójában egy biokémiai folyamat, amely során a DNS meghatározott régióiban metil csoport kerül az örökítőanyag citozin pirimidin gyűrűjének ötödik szénatomjára (CpG). A sejtek osztódásakor a DNS metilációs mintázatát az utódsejtek általában megtartják, azonban aszimmetrikus osztódásnál, a sejtek differenciálódásakor, vagy egyéb környezeti hatásra ez a mintázat megváltozhat. Emlősöknél a DNS metiláció az X kromoszóma inaktivációjában, a genomiális imprintingben, az egyedfejlődés szabályozásában és a tumorok kialakulásában, illetve fejlődésében játszik szerepet. A CpG helyek metilációját a DNS metiltransferázok (DNMT) végzik. A CpG dinukleotidok általában a gének promoter régiójában ún. CpG szigetekbe tömörülnek. A metil csoport kapcsolódása során a DNS szerkezete génexpressziót gátló módon változik meg, tehát a DNS által kódolt

információ nem válik hozzáférhetővé. A DNS metilációs mintázat sejttípusonként, arra jellemző módon változik [101, 103].

Az mikroRNS útvonalak

A mikroRNS-ek (miRNS) génexpresszió finomhangolói, rövid, körülbelül 20-24 nukleotid hosszúságú, fehérjét nem kódoló, egyszálú RNS molekulák. Olyan alapvető, életfontosságú funkciók beállításában és szabályzásában vesznek részt, mint a mitózis-meiózis, az apoptózis illetve a sejt differenciálódás. Az emberi gének 40-50%-a egyidejűleg több miRNS összehangolt szabályzása alatt áll, ugyanakkor egy miRNS több génhez is kötődhet szabályzó funkciót betöltve. Az miRNS utak jelentősége bizonyítottá vált számos daganatos betegségben, mivel az onkogének, ill. tumorszuppresszor gének jelentős része miRNS szabályzás alatt áll. Ismertté vált az is, hogy a régóta ismert transzkripciós faktor-DNS kapcsolódás mellett a génműködés szabályozásában a mRNS-miRNS kölcsönhatás is szerepel, ami szelektíven gátolja, a mRNS-ek translációját. Utóbbi felfedezés újabb távlatokat nyitott a gén-csendesítés (gene silencing) génterápiás eljárás fejlődésében [99, 101].



3. ábra: Az epigenetikai szabályzás fő útvonalai

DNS metiláció: metil csoport kerül a DNS citozin pirimidin gyűrűjének ötödik szénatomjára, aposztranlációs hiszton modifikáció: metiláció, acetiláció, foszforiláció, ubiquitináció, miRNS-ek által közvetített hatások: közvetlenül a DNS szálhoz kötődnek az mi-RNS-ek [104]

II.3.2. Az epigenetika és az elhízás kapcsolata

A legfrissebb kutatások alapján az elhízás környezeti és genetikai hatások együttes eredménye, amelyeket epigenetikai mechanizmusok kapcsolnak össze [15, 16]. A szövetspecifikus epigenetikus mintázat DNS szekvencia módosítása nélkül befolyásolja egyes gének transzkripcióját és működését, így moderálva egyes sejtfunkciókat, molekuláris, ill. metabolikus folyamatokat [15]. Egyes táplálék összetevők epigenetikai módosítások révén képesek befolyásolni az elhízásban szerepet játszó egyes gének expresszióját. Ezt bizonyítja az a kísérlet is, amely során ártalmas környezeti hatásnak (biszfenol A-val való érintkezés) kitett, genetikailag azonos, vemhes egerek egyikének metildonor molekulákban szegény, míg másikának metildonor molekulákban gazdag táplálékot adtak. Az utódok közül a metilcsoporttal szupplementált anya utódai egészségesebbek és vékonyabbak voltak, míg a metildonor hiányos étrendű anyának kövér és számos metabolikus eltéréssel rendelkező utódai születtek. Mindez az *Agouti* gén metiláltsági fokára vezethető vissza [25]. Tehát az *in utero* történő elhízást befolyásoló epigenetikai módosulások nagyban függhetnek külső környezeti hatásoktól, meghatározhatják a születendő fenotípusát és a későbbi elhízás kialakulását is [16]. Utóbbi időben az „obezogén környezettel” összefüggő epigenetikai módosulások mellett, az elhízással kapcsolatba hozható ún. kandidáns gének vizsgálata (CGA) is nagy szerepet kapott az elhízás kutatásában. Ezek alapján az insulin-like growth factor 2 (*IGF2*) és proopiomelanokortin (*POMC*) gének expressziója közvetlen összefüggést mutatott a növekedéssel, az elhízással és testösszetétellel. Az *IGF2* és a *H19* imprintált gének, amelyek a növekedést és a testösszetételt szabályozzák. Az *IGF2* fő jelátviteli útvonala az *IGF1* receptoron keresztül valósul meg, amely anabolikus hatást közvetít. *Huang és munkatársai* eredményei alapján az *IGF2/H19* régió fokozott metiláltsága következtében kialakuló csökkent *IGF2* expresszió megnövekedett subcutan zsírszövethez vezet fiatal felnőttek körében. Az anorexigén neuropeptidet kódoló *POMC* gén központi szerepet játszik a testsúly szabályzásában a hipotalamikus teltségérzet és az energia hasznosítás szabályzásán keresztül. *Marco és munkatársai* szerint elhízásban ez a hipotalamikus jelátvitel karásodhat, mivel magas zsírtartalmú táplálékon tartott, elhízott patkányok körében a *POMC* gén promoter régiójának hipermetilációját figyelték meg. *Kuehnen és munkatársai* pedig a *POMC* gén 2-es intron és 3-as exon kapcsolódási szakaszának hipermetilációját hozták közvetlen összefüggésbe a gyermekkori elhízással [22-24]. Tehát

az elhízás és az epigenetikai útvonalak szövevényes kapcsolata csak kis részleteiben ismert, ám igen intenzíven kutatott terület.

II.3.3. Az epigenetika és a D-vitamin kapcsolata

A D-vitamin és az epigenom számos szinten kapcsolódik egymáshoz. A D-vitamin aktivációja és metabolizmusa egy összetett folyamat, amelyet a vesében, májban és más szervekben található citokróm P450 enzimek által megy végbe (pl.: 25-hidroxiláz (*CYP2R1*), 1 α -hidroxiláz (*CYP27B1*), 24-hidroxiláz (*CYP24A1*). Ezen enzimek aktivitását és kódoló géneik expresszióját olyan epigenetikai mechanizmusok is nagy mértékben befolyásolják, mint a DNS metiláció [105]. A D-vitamin nukleáris receptorán (*VDR*) keresztül olyan epigenetikai útvonalakat befolyásol, amelyek mind a metabolizmusban, mind pedig a sejt proliferációban lényeges szerepet játszanak. Ezeket a hatásokat a VDR/RXR komplex főként hiszton modifikáció, ezen belül is leggyakrabban hiszton acetiláció, tehát lényegében transzkripció aktiválás útján fejt ki, ám számos tanulmány számol be a *VDR* génen található DNS metilációs helyekről (ún. CpG szigetekről) és azok eltérő metilációs mintázatairól, amelyek a *VDR* gén működésére lehetnek hatással egyes metabolikus, ill. daganatos kórképekben [106, 107]. A legújabb kutatások alapján felnőttekben az alacsony 25OHD3 vitamint-szint megnövekedett testzsír mennyiséggel, BMI-vel, mortalitással, valamint gyakoribb 2-es típusú cukorbetegséggel, kardiovaszkuláris betegségekkel és diszlipidémiával hozható összefüggésbe [108-113]. Ezen megfigyelések összeségükben arra engednek következtetni, hogy az alacsony D-vitamint-szint és az azzal járó szövődmények közvetett összefüggésben állhatnak a D-vitamin metabolizmusában szerepet játszó enzimek epigenetikai szabályzásával, főként a DNS metilációval. A D-vitamin metabolizmushoz kapcsolt és a D-vitamin receptor gének expresszióját számos daganat-orientált tanulmányban vizsgálták, de a metabolikus eltérésekben, főként elhízott gyermekek körében szinte alig [114].

III. Célkitűzések

Célkitűzésünk volt az alábbi hipotézisek bizonyítása:

III.1. Mire az elhízott gyermekek kórházi kivizsgálásra és ellátásra kerülnek, jelentős részükben már kialakultak az elhízással összefüggő kóros laboreltérések és szövödmények.

III.2. Betegünkben a vérből meghatározható 25OHD3 vitamint-szint és az elhízás mértéke között kapcsolat áll fenn.

Mivel a D-vitamin anyagcsere jellegzetesen megváltozik az elhízásban és az alacsony D-vitamin-szint és inzulinrezisztencia gyakran fordul elő az elhízással együtt.

III.3. A D-vitamin aktivációjában és D-vitamin receptor mediált hatásában is szerepet játszó, *CYP27B1* és *VDR* gének DNS metiláltsági szintje és a gyermekkori elhízás mértéke összefügg. Mivel az aktív D-vitamin-szint kialakításában fontos 1-alfa-hidroxiáz génje, számos más génnel együtt része az „obez epigenetikus mintának”, a D-vitamin az epigenetikus szabályozáson keresztül kapcsolódik be az obezításban és metabolikus szindrómában jellemző mintázatba.

III.4. A metabolizmust közvetlenül befolyásoló *IGF2* illetve *POMC* gének metiláltsági szintje, egyben ennek gyermekkori elhízás mértékére gyakorolt hatása jelentős szereppel bír a gyermekkori elhízásban.

Mivel az „elhízásra hajlamos alkat” több komponensből tevődik össze, átörökítésében epigenetikai mechanizmusok fontos szerepet játszanak.

III.5. A Prader-Willi-szindrómás és a Prader-Willi like fenotípusú gyermekek esetében a Holm kritériumrendszer szerinti besorolás klinikailag hasznos.

III.6. Az SNRPN génlókuszt promotor régiójának DNS metilációs mintázata eltér a szindrómás és a nem szindrómás esetekben, ezért az általunk kidolgozott, a Prader-Willi-szindróma első vonalbeli szűrésére alkalmas.

Ez a DNS metiláción alapuló vizsgálati metodika validálható saját Prader-Willi-szindrómás betegek bevonásával.

IV. Módszerek

IV.1. Betegek

IV.1.1. Elhízott gyermekek

Összesen 82 (40 fiút és 42 lányt), 95. percentil feletti kor- és nem specifikus BMI-vel rendelkező, egyebekben egészséges, 3 és 18 év közötti gyermeket vontunk be vizsgálatunkba. Rögzítettük az antropometriai (magasság, testsúly, derékkörfogat, születési súly és -hossz) és a metabolikus paramétereiket (lipid profil, éhomi vércukor – és inzulin szint, orális glükóz tolerancia teszt eredményei), a D-vitamin (25OHD3 vitamin), a parathormon és a TSH szintjüket, a pubertárs státuszukat és 24 órás vérnyomásmérést is végeztünk. Minden egyes esetben BMI SDS-t számoltunk annak érdekében, hogy az elhízás mértékét relativizálni tudjuk. Meghatároztuk a kóros metabolikus eltéréseket, az elhízással kapcsolatban álló szövődmények jelenlétét (1. táblázat). Egy általunk összeállított kérdőív segítségével az anamnesztikus adatok felvételekor kitértünk a terhesség során felmerülő komplikációkra, anyai súlynövekedés mértékére, perinatális eseményekre, fejlődés menetére, a jelenlegi étkezési szokásokra és életmódra (1. melléklet). A gyermekek kivizsgálása és követése a Semmelweis Egyetem II.sz Gyermekgyógyászati Klinikáján történt.

Megfelelő tájékoztatás és szülői írásos bejegyzés után minden esetben perifériás vérmintát vettünk DNS izolálás céljából.

1. táblázat: Elhízással kapcsolatos szövődmények és megállapításukhoz alkalmazott határértékek

Az elhízással együtt szövődményként leggyakrabban a magas vérnyomás, a lipid profil eltérések, a magas húgysavszint és az szénhidrát anyagcsere zavarok fordulnak elő. Az alábbi táblázatban az általunk vizsgált gyermekek esetében használt, diagnosztikus határértékeket (cut off értékek) tüntettük fel.

Szövődmények	cut off értékek
Hipertónia	24 órás ABPM alapján szisztolés és /vagy disztolés átlag érték 95. pc felett
Hiperkoleszterinémia	összkoleszterin szint alapján 4,9 mmol/l <
Hiperurikémia	400 µmol/l <
Növekedett éhomi vércukor (IFG)	éhomii vércukor: 6,1 -6,9 mmol/l 120 perces vércukor: <7,8 mmol/l
Csökkent glükóztolerancia (IGT)	éhomii vércukor: <7mmol/l 120 perces vércukor: 7,8 -11 mmol/l
Diabetes mellitus (DM)	éhomii vércukor: 7mmol/l< 120 perces vércukor: 11,1 mmol/l <

IV.1.2. Prader-Willi-szindróma gyanús betegek

A markáns klinikai tünetek alapján (pl.: hipotonia, csecsemőkori táplálási nehézségek, hipogonadizmus, enyhe, ill. közepes fokú mentális retardáció, viselkedési zavarok, gyermekkori elhízás és hiperfágia) 17, a klinikánkon való megjelenéskor 18 év alatti, PWS gyanús gyermeket vizsgáltunk retrospektíven. Az anamnesztikus adatgyűjtés kiterjedt a perinatális anamnézisére, fejlődési adatokra, antropometriai paraméterekre, illetve a Holm szerinti major és minor kritériumok regisztrálására

Mind a 17 gyermektől és 3 szülőpártól friss vérmintát vettünk. Kontrollként két egészséges egyéntől származó DNS mintát használtunk. Minden esetben, az egészséges kontrollokban is, részletes tájékoztatáson alapuló, írásos, szülői beleegyezést kértünk a vizsgálathoz. A vizsgálat nem sértette a Helsinkii Deklaráció emberi DNS vizsgálatokra vonatkozó előírásait.

IV.1.2.1. Holm score megállapítása

A Prader-Willi-szindróma diagnóza fizikális vizsgálat során merül fel, amelynek igazolására további genetikai vizsgálat szükséges. A klinikai diagnóza a kor specifikus

tünetek regisztrálásából áll, amelyhez *Holm és munkatársai* dolgoztak ki egy pontozáson alapuló kritériumrendszert (2. táblázat).

2. táblázat: Holm szerinti major és minor kritériumok Prader–Willi szindróma klinikai diagnosztizálására

PWS diagnózisának kritériumai születéstől 3 éves korig: 5 pont pont elérése, amelyből 4 pontot a major kritériumoknak kell kitennie, 3 éves kortól felnőtt korig: 8 pont elérése, amelyből legalább 5 pontot a major kritériumoknak kell kitennie [27]

Major kritériumok (1 pont)	Minor kritériumok (0,5 pont)
újszülöttkori hipotónia	csökkent magzati aktivitás
csecsemőkori táplálási nehézségek	sűrű nyál
kifejezett súlynövekedés	alvászavarok / alvási apnoe
hipogonadizmus	viselkedésbeli problémák
megkésett fejlődés	alacsony termet
hiperfágia	kényszeres bőrcsipkedés
jellegetesen diszomorf arc	hipopigmentáció
	kicsi kezek és/vagy lábak
	szem rendellenességek (esptropia, myopia)
	artikulációs nehézségek
	keskeny kezek egyenes ulnaris szegéllyel

IV.2. Molekuláris genetikai vizsgálatok

IV.2.1 Elhízott és Prader-Willi-szindróma gyanús betegek mintáin elvégzett vizsgálatok

IV.2.1.1 DNS izolálás és biszulfid kezelés

Minden esetben a perifériás teljes vérmintából történő genomiális DNS izolálás High Pure PCR Template Preparation Kit-tel (Roche Biomedical Laboratories, Burlington, NC, USA), az ezt követő biszulfid konverzió EZ DNA Methylation™ Kit-tel (Zymo Research, Irvine, CA, USA) történt. 1 µg perifériás vérből izolált DNS került konverzióra, majd a biszulfid konvertált mintákat 10 µl-re hígítottuk a gyártó utasítása alapján. A biszulfid konvertált minták koncentrációját NanoDrop spektrofotométerrel határoztuk meg, 'ssDNA' beállítást használva.

IV.2.1.2 Biszulfít szekvenáló polimeráz láncreakció (BS-PCR)

Mind az elhízott gyermekben vizsgált gének (*POMC*, *IGF2*, *CYP27B1*, *VDR*), mind pedig a Prader-Willi-szindróma kialakulásáért felelős *SNRPN* (Small Nuclear Ribonucleoprotein-Associated Protein N) génlókus promóter régiójának metiláltságának becslésére alkalmaztuk a BS-PCR technikát.

In silico CpG sziget azonosításhoz CpG Plot EMBOSS Application

(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/index.html>) programot használtuk. Biszulfít-szekvenáló PCR reakciók a PyroMark Assay Design software (SW 2.0, Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) segítségével tervezett, a metilációs mintázatot leginkább mutató CpG régiókra fókuszáló primerekkel zajlottak (forward primer és biotinnal jelöl reverz primer). A primerek specificitását *in silico* BiSearch software-rel (<http://bisearch.enzim.hu>) teszteltük (3. táblázat).

A BS-PCR reakciókhoz AmpliTaq Gold 360 Master Mix-et (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), LightCycler® 480 ResoLight Dye (Roche, Bázél, Svájc) festéket használtunk, a primerek végkoncentrációja 0,2 μ M volt. 20–40 ng biszulfít konvertált DNS került reakciónként a 15 μ l-es végtérfogatba. Az MgCl₂ végkoncentrációja *SNRPN* gén esetében 3,5 mM, *CYP27B1* és az *IGF2* gén esetében 2,5 mM, a *VDR* és *POMC* gének esetében 1,5 mM volt. A valós idejű PCR során a következő LightCycler® 480 System beállításokat alkalmaztuk: 95 °C 10 percig, utána 95 °C 30 másodpercig, 60 °C 0,4 °C-os ciklusonkénti csökkenéssel 30 másodpercig, 72 °C 30 másodpercig 10 touchdown ciklus alatt, ezt követően amplifikáció: 95 °C 30 másodpercig, 56 °C 30 másodpercig, és 72 °C 30 másodpercig 50 cikluson keresztül. A PCR ciklusok befejeztével, a nagyfelbontású olvadáspont elemzés (HRM) a következőképpen zajlott: denaturáció 95 °C-on 1 percig, 40 °C-ra hűtés után a hőmérsékletet tartva 1 percig, utána folyamatos melegítés 95 °C-ra. Olvadáspont mérés során folyamatos melegítés közben fokenként 20 alkalommal detektáltuk a fluoreszcens jeleket.

A metiláltsági értékek becsléséhez a normalizált MS-HRM görbék negatív deriváltját vettük alapul, ezekhez a LightCycler® 480 Software 1.5.0 és a LightCycler® Gene Scanning software segítségével jutottunk hozzá.

Az MS-HRM assay-k kalibrálása *in vitro* biszulfít konverzió átesett teljesen metilált (100%) és metilálatlan (0%) standard DNS-ek keverékéből származó, különböző metiláltságú (0%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%) mintákkal történt, amelyek a MS-HRM vizsgálat során jelentették a viszonyítási pontokat. A metiláltsági szint megállapítása

minden vérminta esetében, a beteg és a standard minták vizuális összehasonlításával történt, két különböző szakértő bevonásával.

IV.2.2. Elhízott gyermekek mintáján elvégzett vizsgálatok

IV.2.2.1. Piroszekvenálás

A metabolizmussal kapcsolatos *POMC* és *IGF2*, valamint a D-vitamin anyagcserében és jelátvitelben jelentős szerepet játszó *CYP27B1* és *VDR* gének egzakt CpG metiláltsági mértékét határoztuk meg piroszekvenálással.

A heterogén BS-PCR termékek bázisösszetételét direkt szekvenálással határoztuk meg. Az eredetileg metilálatlan citozinok helyén timin, míg a metiláltak helyén citozin detektálható. Mivel csak a CpG citozinok metilálódhatnak, ezért ezek helyén a BS-PCR termékben citozin és timin is előfordulhat, DNS-en található összes többi citozin helyén timin marad. A Qiagen PyroMark System (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) általi piroszekvenálással megállapítottuk, hogy a vizsgált génszakaszokról amplifikált BS-PCR ampikonokban a CpG citozinok helyén milyen aránya a citozinoknak és a timineknek, ebből számítottuk ki az adott CpG metiláltságát. A maximum 100 bázispár hosszúságú szakaszok elemzése a PyroMark Q24 (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) szekvenáló géppel, PyroMark Gold Q24 Reagens-t (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) alkalmazva, a gyártó utasításainak megfelelően történt. A DNS tisztítás, valamint a biotinizált egyszálú DNS további vizsgálata a PyroMark Assay Design software, SW 2.0 (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) segítségével tervezett, speciális, CpG szigeteket lefedő szekvenáló primereket felhasználó reakciók során történt (3. táblázat). A szekvenálás során kapott eredményeket a PyroMark Q24 software v2.0.6 (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) segítségével értékeltük ki. A vizsgált DNS szakasz átlagolt százalékos metilációját határoztuk meg piroszekvenálás során.

3. táblázat: A biszulfít szekvenáló PCR reakció és a piroszekvenálás során vizsgált target gének, azokhoz tartozó assay-k és primerek

A BS-PCR során saját tervezésű, forward – és biotinnal jelölt reverz primereket, míg a piroszekvenálás kivitelezésekor szekvenáló primereket alkalmaztunk. Mind a VDR, mind pedig a CYP27 génekhez több Assayt terveztünk a promóter régió teljes lefedése érdekében. CYP27B1: 1-alfa-hidroxiláz gén, VDR: D-vitamin receptor gén, IGF2: insulin like growth factor gén, POMC: proopiomelanokortin gén, SNRPN: Small Nuclear Ribonucleoprotein-Associated Protein N gén

Target gén és assay	Forward primer	Reverse primer (biotinnal jelölt)	Szekvenáló primer
CYP27B1 Assay1	GGTTTTTGGGGGTA GAGAAGAT	CTCCCTATTCCCAAACCC AATCAA	GGGGGTAGAGAA GATTTA
CYP27B1 Assay2	AGAGGGGTTTGGG ATGTT	AACCCTCAAATACCCCT CCAAAATATTCCAT	GGGATGTTTGTT AAGTT
VDR Assay2	GGATTAGGGATTA GGGAAGTTGAGAT TTA	TACTACTACAAAACCCC AAAAAACTCAACCTAA	AGATTTAGTTTTT TTGGGTGA
VDR Assay3	ATTTTAATTTGTGG GATTAGGTTGAGT	TAATCCAAAATACAACC CCCACCCTTCCTAC	TGGAGTTTTGTA GTAGTAATAGG
IGF2 Assay1	GGGATTGGGTTAG GAGAAGT	CCCCCCCCAAAATAACC AACAAT	GGGTTAGGAGAA GTTTTA
POMC Assay7	GTTGGAAAGGGGT TGGAATTAGTA	ACACCCACAAAACCACT CCTAACTTCTAC	TTTAGGAAGAAT TTAATTATGGAT
SNRPN Assay1	GAGGGAGTTGGGA TTTTTGT	AATAACCCCTCCCCAAA CTATCTCTT	

IV.2.3. Prader-Willi-szindróma gyanús betegek mintáin elvégzett vizsgálatok

A PWS klinikai diagnózisát mutató betegeken végzett metiláció specifikus multiplex ligáció függő próba amplifikáció (MS-MLPA) segítségével mind a target 15q11q13 régió kópia száma, mind pedig a metilációs státusz megállapítható, tehát a betegség fennállása igazolható vagy elvethető volt. Az uniparentalis diszómia illetve az imprinting defektus további elkülönítésére, tehát a diagnózis genetikai hátterének pontosítására a mikroszatellita analízist (MSA) alkalmaztuk.

IV.2.3.1 Multiplex ligáció függő próba amplifikáció (MS-MLPA)

A SALSA ME028 (lot B2-0413 és B2-0811) MS-MLPA mixet az MRC-Holland-tól (Amszterdam, Hollandia) rendeltük. A próba mix 32 specifikusan a Prader-Willi-/Angelman- szindrómában érintett 15q11q13 régiót lefedő próbát tartalmazott. Ezek közül 5 MS-MLPA próba egy imprintált szekvenciára és egyben a metiláció érzékeny *HhaI* enzim felismerő helyére volt specifikus. 14 MLPA próba a PWS/Angelman régió mellett helyezkedett el és kontrollként funkcionált mind a kópiaszám kvantifikáció, mind pedig az MS-MLPA során történő *HhaI* enzim általi emésztés teljességének ellenőrzésére. Minden minta esetében 100ng genomialis DNS került reakciónként felhasználásra. A mintákat 60 °C-on történő 16 órás hibridizáció után két aliquot részre osztottuk. Az elsőt ligációnak, míg a másodikat ligációnak és enzimátikus emésztésnek vetettük alá. Ezek után PCR amplifikációt hajtottunk végre a mintákon. Minden PCR termékhez (1 µl) belső standardot (1 µl) és deionizált formamidot (20 µl) adtunk, majd ABI-3100 Genetic Analyzer DNS szekvenáló (Applied Biosystems, Life Technologies, Waltham, MA, USA) segítségével analizáltuk a kapott eredményeket.

IV.2.3.2. Mikroszatellita analízis (MSA)

MSA során mind a gyermekek, mind pedig a szülők DNS mintáit megvizsgáltuk. A 15q11q13 régióra specifikus 5 markert használtunk (*D15S541*, *D15S817*, *D15S128*, *D15S1234* és *D15S822*) a multiplex PCR után, amelyet a Qiagen Multiplex PCR Kit-tel (Qiagen, Valencia, CA, USA) végeztünk. A PCR reakció 25 µL végvolumene 100 ng DNS-t és minden primerből 2 uM-t tartalmazott. Az amplifikáció első lépése denaturáció volt, 95°C-on 15 percig, amelyet 35 ciklus követett (30 másodperc 94°C-on, 90 másodperc 58°C-on, 90 másodperc 72°C-on), végül 10 percig 72°C-on, majd 4°C-on hűtés).

Három, PWS/Angelman régió kivül eső lokusz (*D15S144*, *D15S1007* és *D15S642*) genotipizálása segített különbséget tenni a deléció és az uniparentális diszómia között: az apai kritikus régió hiánya és biparentális megjelenés a régió kivül együttesen delécióként jelentett, míg az uniparentális öröklődés mind a kritikus régióban, mind pedig azon kivül, uniparentális diszómiára utalt.

A MSA során a fluoreszcensen jelölt PCR termékeket ABI 3100 Automatic Capillary Genetic Analyzer, GeneScan és Genotyper software (Applied Biosystems, Life Technologies, Waltham, MA, USA) segítségével detektáltuk.

IV.3. Statisztikai módszerek

Az elhízott gyermekek esetében a vizsgált paraméterek jellemzésére leíró statisztikai módszert (átlag±SD) használtunk. Az elhízás mértékének, valamint a D-vitamin-szintnek és a gyermekek antropometriai, valamint metabolikus paramétereinek összefüggéseit páros Student *t*-tesztel és Pearson korrelációs analízissel vizsgáltuk. Az egyes gének DNS metilációjának az elhízással és a D-vitamin státusszal való kapcsolatát lineáris regressziós modellekkel írtuk le.

A Prader-Willi-szindrómás esetekben a kis elemszám miatt statisztikai analízis nem történt.

IV.4. Statisztikai szoftverek

Tudományos vizsgálataink elvégzéséhez szükséges statisztikai analízisek során GraphPad Prism 6 szoftvert (2015 GraphPad Software, Inc., California, USA) és SPSS 20.0 szoftvercsomagot (IBM Co., Armonk, NY, USA) használtunk.

IV.5. Etikai engedélyek

Az epigenetikai vizsgálatok az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottságának engedélyével történtek (5488/2012/EKU).

V. Eredmények

V.1. Az elhízott gyermekek metabolikus státuszának felmérése, illetve az esetükben előforduló, a metabolikus státusszal szorosan összefüggő szövődmények gyakoriságának leírása

Az antropometriai adatok elemzése során egy betegnél extrém túlsúlyt (159,2 kg) és BMI SDS (16,38) értékeket találtunk, ezért az adatorzítás elkerülése érdekében kizártuk a további vizsgálatokból.

A vizsgálatba történő beválasztásnál 42 lányból 33, 41 fiú közül pedig 27 volt a pubertás valamely stádiumában, a két nem átlag életkora közel állt egymáshoz (lányok: $12,5 \pm 3,1$, fiúk: $12,9 \pm 2,6$). Az antropometriai és metabolikus adatok nemek szerinti összehasonlításakor a lányok a fiúkhöz képest nagyobb BMI SDS-sel, bírtak ($4,5 \pm 0,3$ vs. $3,9 \pm 0,2$, $p = 0,1571$), a fiúk esetében a várandósság alatti anyai súlynövekedés nagyobbbnak bizonyult, mint a lányok esetében ($13,7 \pm 2,5$ vs $11,9 \pm 1,5$, $p = 0,5488$), ám ezen különbségek nem bizonyultak szignifikánsnak. A lányok glutamát-piruvát tanszamináz (GPT), valamint alkalikus foszfatáz (ALP) szérum szintjei szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyultak a fiúkénál ($28,1 \pm 3,8$ vs. $18,23 \pm 1,3$, $p = 0,0228$; $230,3 \pm 16,4$ vs. $184,2 \pm 15,6$, $p = 0,0452$) (4. táblázat).

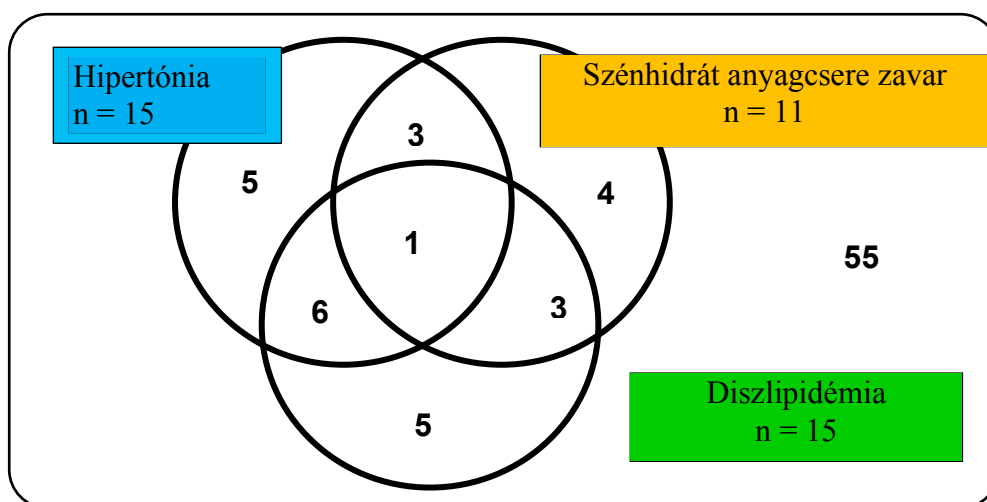
A 82 elhízott, de egyebekben látszólag egészséges gyermek közül 27-nél találtunk legalább egyet az alábbi három, elhízáshoz kapcsolható szövődmény közül: 24 órás vérnyomásmérés (ABPM) során megállapított hipertónia, szénhidrát anyagcserezavar (orális glükóz tolerancia teszt alapján – csökkent glükóz tolerancia), diszlipidémia (emelkedett összcholeszterin érték). Egy gyermeknél a megemelkedett húgysavszint mellett mind a három, már említett szövődmény egyszerre volt jelen. Eredményeink alapján a hipertónia és a diszlipidémia önállóan 18,29-18,29%-ban, míg a szénhidrát anyagcserezavar 13,41%-ban fordult elő. Az 55 vizsgált gyermek közül, akinél e három szövődmény nem volt kimutatható, 9 esetben igazoltunk izolált hiperurikémiát. Összesen 36 esetben volt jelen legalább egy, az elhízáshoz kapcsolható szövődmény (ez a vizsgált gyermek 43,9 %-a), 46 gyermeknél pedig nem volt kimutatható szövődmény (4. ábra).

4. táblázat: Az antropometriai és a metabolikus paraméterek nemek szerinti összehasonlítása

SD: standard deviáció, BMI SDS: body mass index standard deviation score, HDL: high-density lipoprotein, ALP: alkalikus foszfatáz, SGOT: szérum glutamát-oxálacetát aminosztransferáz, SGPT: szérum glutamát-piruvát aminosztransferáz

Paraméterek	Lányok (átlag±SD)	Fiúk (átlag±SD)	p érték
Pubertás státusz (pub / összes; %)	33/42 (78,57%)	27/40 (67,5 %)	
Kor (évek)	12,5±3,1	12,9±2,6	0,5819
BMI SDS	4,5±0,3	3,9±0,2	0,1571
Derékkörfogat (cm)	99,3±17,7	104,2±14,4	0,2547
Terhesség alatti anyai súlynövedés (kg)	11,9±1,5	13,7±2,5	0,5488
Összkoleszterin (mmol/l)	4,58± 0,9	4,55±0,9	0,2214
HDL (mmol/l)	1,15± 0,3	1,17±0,3	0,7863
Triglicerid (mmol/l)	1,4±0,6	1,46±0,7	0,6837
ALP (IU/l)	184,2±15,6	230,3±16,4	0,0452*
SGOT (IU/l)	20,29±6,1	22,17±7,1	0,3130
SGPT (IU/l)	18,23±1,3	28,10±3,8	0,0228*
éhomi vércukor (mmol/l)	4,97±0,4	5,11±0,5	0,1818
25OHD3 vitamin (ng/ml)	18,25±6,4	19,26±7,5	0,5146

*p< 0,005



4. ábra: A metabolikus szövődmények prevalenciája elhízott gyermekekben (N = 82)

V.2. A 25OHD3 vitamint-szint és a metabolikus paraméterek, valamint az elhízás mértékének és az általunk vizsgált gének metiláltsági fokának kapcsolata

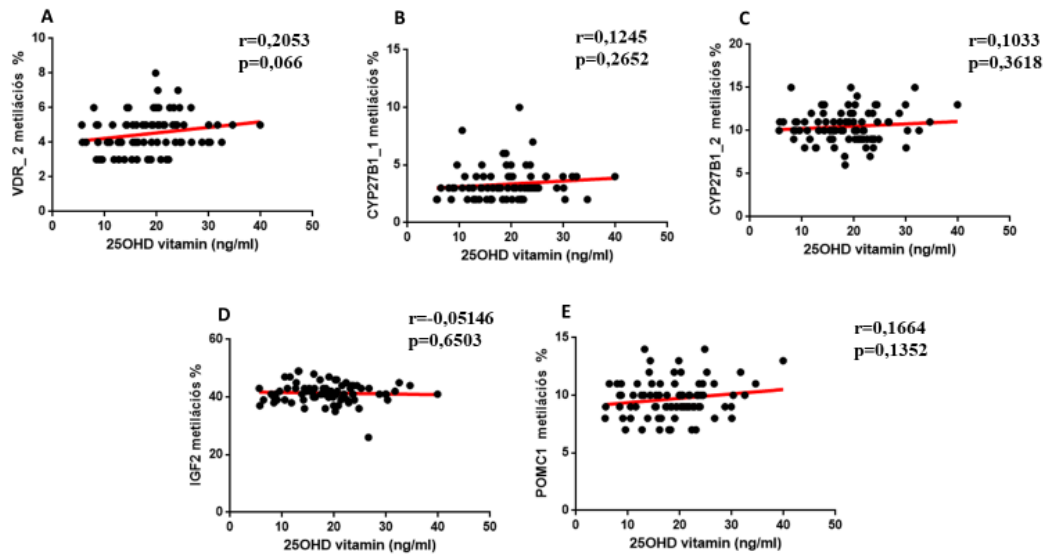
Megvizsgáltunk, hogy a szérumból legegyszerűbben vizsgálható 25OHD3 vitamint-szint illetve az általunk vizsgált metabolikus paraméterek, valamint az elhízás mértéke között fennáll-e szignifikáns pozitív vagy negatív irányú összefüggés, azonban közvetlen kapcsolatot statisztikailag igazolni nem tudtunk. Nem találtunk szignifikáns összefüggést sem a metabolizmust befolyásoló gének (*POMC*, *IGF2*), sem pedig a *CYP27B1* gén metiláltságának mértéke és a 25OHD3 vitamint-szint között sem, azonban a *VDR* gén metiláltsági foka tendenciózus pozitív összefüggést mutatott a szérum 25OHD3 vitamint-szintjével ($r = 0,2053$, $p = 0,066$) (5.táblázat).

5. táblázat: A 25OHD3 vitamint-szint összefüggése egyes antropometriai és metabolikus paraméterekkel, valamint a vizsgált DNS szakaszok metiláltsági szintjével

BMI SDS: body mass index standard deviation score, HDL: high-density lipoprotein, ALP: alkalikus foszfatáz, SGOT: Serum glutamic oxaloacetic transaminase, SGPT: Serum glutamate-pyruvate transaminase, VDR: D-vitamin receptor gén, CYP27B1:1-alfa-hidroxiáz gén, IGF2: insulin like growth factor gén, POMC: proopiomelanokortin gén

	összefüggésnél vizsgált paraméterek	r érték	p érték
25OHD3 vitamin (ng/ml)	BMI SDS	-0,1191	0,2866
	Derékkörfogat (cm)	-0,1193	0,3682
	Összkoleszterin (mmol/l)	-0,01635	0,8848
	HDL(mmol/l)	-0,1465	0,1946
	Triglicerid (mmol/l)	-0,0764	0,5061
	ALP (IU/l)	0,03449	0,7705
	SGOT (IU/l)	0,1546	0,2786
	SGPT (IU/l)	0,04095	0,787
	éhomei vércukor (mmol/l)	0,002146	0,9847
	éhomei inzulin (mIU/l)	-0,02664	0,8145
	HOMA index	-0,04825	0,6669
	húgysav (umol/l)	0,05179	0,6482
	<i>VDR</i> _2 metilációs %	0,2053	0,066
	<i>VDR</i> _3 metilációs %	0,1649	0,1388
	<i>CYP27B1</i> _1 metilációs%	0,1245	0,2652
	<i>CYP27B1</i> _2 metilációs %	0,1033	0,3618
	<i>IGF2</i> metilációs %	-0,05146	0,6503
<i>POMC</i> metilációs %	0,1664	0,1352	

$p < 0,05$



5.ábra: A 25OHD3 vitamint-szint összefüggése a vizsgált gének DNS metilációs mértékével

Szignifikáns correláció nem igazolódott a 25OHD vitamin szint és a DNS metiláltsági állapot között. Egyedül a VDR gén DNS metiláltsága mutatott tendenciózus összefüggést a D vitamin szinttel. ($p < 0,05$)

V.3. Az elhízás mértékének és a D-vitamin metabolizmussal kapcsolatos (*VDR*, *CYP27B1*) gének DNS metiláltsági fokának összefüggései

Az elhízás mértékét a BMI SDS értékek kiszámításával relativizáltuk. Ezután megvizsgáltuk, hogy milyen összefüggés figyelhető meg az elhízás mértéke és az általunk vizsgált gének DNS metiláltsági foka között (Pearson korrelációs analízis). A D-vitamin metabolizmusban szerepet játszó gének közül a VDR metiláltsága nem mutatott összefüggést az elhízással, azonban az 1-alfa-hidroxiláz aktivitásért felelős CYP27B1 gén metiláltsági szintje, az általunk vizsgált promóter régióban pozitív korrelációt mutatott az elhízás mértékével. Tehát minél nagyobb fokú volt az elhízás, annál nagyobb mértékben metilálódott az adott génszakasz (6. táblázat).

V.4. Az elhízás mértékének és a metabolizmussal kapcsolatos (*POMC*, *IGF2*) gének DNS metiláltsági fokának összefüggései

Az elhízás mértékét BMI SDS-ben fejeztük ki és megvizsgáltuk a metabolizmust befolyásoló gének metiláltsági szintjével való összefüggését (Pearson korrelációs analízis). Az anorexigén hatást közvetítő neuropeptidet kódoló *POMC* gén metiláltsági foka nem

mutatott kapcsolatot az elhízás mértékével, míg a növekedést közvetlenül befolyásoló *IGF2* gén esetében szignifikáns negatív összefüggést találtunk. Tehát minél nagyobb volt az elhízás mértéke, annál kevésbé volt metilált az *IGF2* génszakasz (6. táblázat, 6. ábra).

A statisztikai elemzések során a potenciális outlierok kizárása nem módosította a talált korrelációk szignifikanciáját.

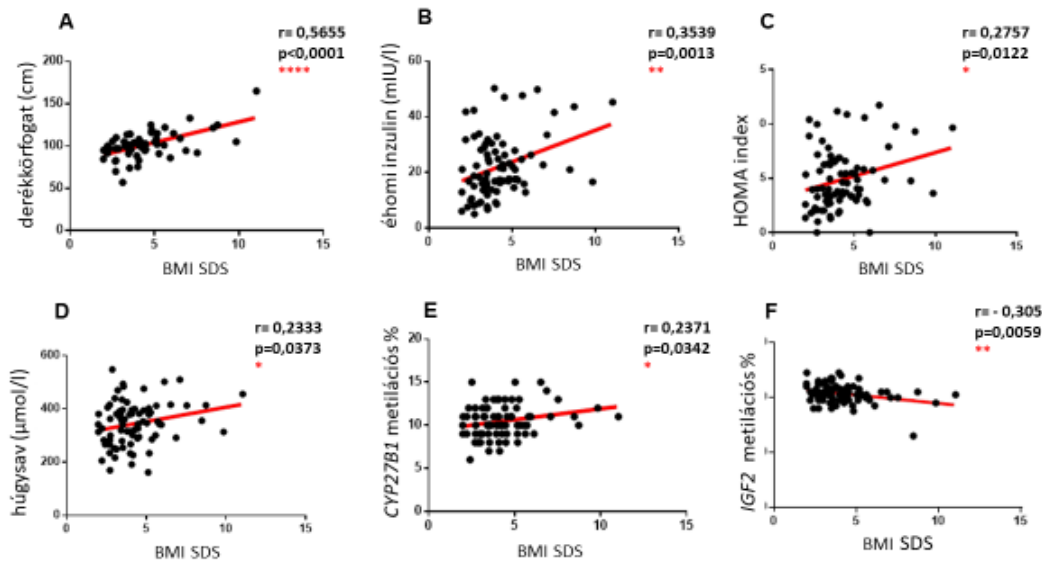
6. táblázat A BMI SDS és metabolikus paraméterek, valamint a DNS metiláció mértékének összefüggése

Szignifikáns pozitív korreláció igazolódott a BMI SDS és a derékkörfogat ($r = 0,5655$, $p < 0,0001$), az éhomi inzulinszint ($r = 0,3539$, $p = 0,0013$), a Homeostasis Model Assessment (HOMA) index ($r = 0,2757$, $p = 0,0122$), a húgysavszint ($r = 0,2333$, $p = 0,0373$), valamint a *CYP27B1* gén metiláltsági mértéke ($r = 0,2371$, $p = 0,0342$) között. Szignifikáns negatív korrelációt mutatott az elhízás mértéke és az *IGF2* gén metiláltsági státusza ($r = -0,305$, $p = 0,0059$).

BMI SDS: body mass index standard deviation score, HDL: high-density lipoprotein, ALP: alkalikus foszfatáz, SGOT: Serum glutamic oxaloacetic transaminase, SGPT: Serum glutamate-pyruvate transaminase, VDR: D-vitamin receptor gén, CYP27B1: 1-alfa-hidroxiáz gén, IGF2: insulin like growth factor gén, POMC: proopiomelanokortin gén

	összefüggésnél vizsgált paraméterek	r érték	p érték
BMI SDS	Derékkörfogat (cm)	0,5655	< 0,0001*
	Összkoleszterin (mmol/l)	0,1545	0,1684
	HDL(mmol/l)	-0,07089	0,532
	Triglicerid (mmol/l)	0,02641	0,8185
	ALP (IU/l)	-0,1698	0,1481
	SGOT (IU/l)	-0,0574	0,6891
	SGPT (IU/l)	0,01273	0,9331
	éhomi vércukor (mmol/l)	-0,1765	0,1127
	éhomi inzulin (mIU/l)	0,3539	0,0013*
	HOMA index	0,2757	0,0122*
	húgysav (umol/l)	0,2333	0,0373*
	<i>VDR_2</i> metilációs %	-0,06579	0,5595
	<i>VDR_3</i> metilációs %	-0,1531	0,1697
	<i>CYP27B1_1</i> metilációs%	0,1816	0,1025
	<i>CYP27B1_2</i> metilációs %	0,2371	0,0342*
	<i>IGF2</i> metilációs %	-0,305	0,0059**
<i>POMC</i> metilációs %	0,1334	0,2321	

* $p < 0,05$



6. ábra A BMI SDS és metabolikus paraméterek, valamint a DNS metiláció mértékének összefüggése

Szignifikáns pozitív korreláció igazolódott a BMI SDS és a derékkörfogat, az éhomi inzulinszint, a Homeostasis Model Assessment (HOMA) index, a húgysavszint, valamint a CYP27B1 gén metiláltsági mértéke között. Szignifikáns negatív korreláció mutatkozott az elhízás mértéke és az IGF2 gén metiláltsági státusza között. ($p < 0,05$)

A CYP27B1 és IGF2 gének metiláltsági mértékének és a 25OHD3 vitamin, valamint a BMI SDS kapcsolatának további elemzése céljából lineáris regressziós modellt alkalmaztunk. Mivel ismert, hogy az IGF2 befolyásolja a növekedést és a testösszetételt és a D-vitamin-hiány társulhat magasabb BMI-hez, a CYP27B1 pedig az 25OHD3 vitamin aktív 1,25(OH)₂ D-vitaminná alakítja, ezeket a változókat használtuk elemzésünk során. Lineáris regressziós modellünket lépésről lépésre (stepwise) bővítettük a fenti változókkal, ha egy változó nem javította a modell magyarázhatóságát, akkor kizárásra került (backward elimination) (7. táblázat). Tehát a végső modell alapján a BMI SDS és a CYP27B1 valamint az IGF2 gének metiláltsági státusza között statisztikailag igazolható a kapcsolat.

7. táblázat: Lineáris regressziós modellek összefoglalása

Az 1. modellben a CYP27B1, IGF2 metiláltsági szintje és a D-vitamint-szint szerepeltek változóként. A CYP27B1 és az IGF2 gének metilációs státusza szignifikáns összefüggést mutatott a BMI SDS-sel, míg a D-vitamint-szint és a BMI SDS között összefüggés nem volt igazolható. Tehát a D-vitamin nem javította a modell magyarázhatóságát, ezért kizárásra került ($\text{adjusted } R^2 = 0,96$ vs $0,98$). A végső, CYP27B1 és IGF2 gének metilációs státuszát és BMI SDS-t tartalmazó 2. modell a variancia 9,8%-át tette ki és statisztikailag szignifikáns volt ($F(2,78) = 5,246$ $p = 0,007$).

Modell	t	koefficiens szig.	regresszió F	regresszió szig.	R2	adjusted R2
1.						
BMI SDS (konstans)	2,735	0,007	3,766	0,014	0,130	0,096
IGF2 metilációs %	-2,423	0,018				
CYP27B1 metilációs %	1,899	0,061				
25OHD3 vitamin (ng/ml)	0,912	0,365				
2.						
BMI SDS (konstans)	2,899	0,005	5,246	0,007	0,121	0,098
IGF2 metilációs %	-2,329	0,023				
CYP27B1 metilációs %	2,032	0,046				

V.5. Prader-Willi-szindrómás, illetve Prader-Willi like fenotípusú gyermekeknél a Holm kritériumrendszer klinikai jelentőségének bizonyítása

A genetikai vizsgálatok eredményeit az általunk regisztrált Holm score-ral összevetve, a genetikailag igazolt PWS betegek esetében a kritériumrendszer szerinti pontszám nagyobbak bizonyult a Prader-Willi like fenotípussal rendelkező, de a Prader-Willi szindrómára jellemző genetikai eltérésekkel nem rendelkezők pontszámánál (8. táblázat). Felmértük azt is, hogy major és minor kritériumok az általunk vizsgált betegekben milyen gyakorisági sorrendben jelentkeztek (9. táblázat).

V.6. A Prader-Willi-szindróma elsődleges igazolására alkalmazható, általunk kidolgozott DNS metilációs vizsgálat eredményei

A BS-PCR és nagyfelbontású olvadáspont elemzés eredménye alapján egyértelműen elkülönült az SNRPN régió metilációs mintázata a PWS és a nem-PWS esetekben. (7. ábra). A saját tervezésű HRM és a nemzetközileg elterjedt MS-MLPA módszerekkel 17 PWS-gyanús beteg DNS mintáját teszteltük, Prader-Willi-szindróma 6 esetben igazolódott. Ezekben az esetekben a további besorolás érdekében MSA vizsgálatot végeztünk, amellyel 1 betegnél deléciót, 2 betegnél pedig uniparentális diszómiát igazoltunk. Egy beteg esetében az imprinting defektust az uniparentális diszómiától nem tudtuk elkülöníteni, mivel a hiányzó szülői DNS-minta miatt MSA nem volt kivitelezhető (8. táblázat). A HRM és az MS-MLPA vizsgálatok eredményei minden esetben megegyeztek.

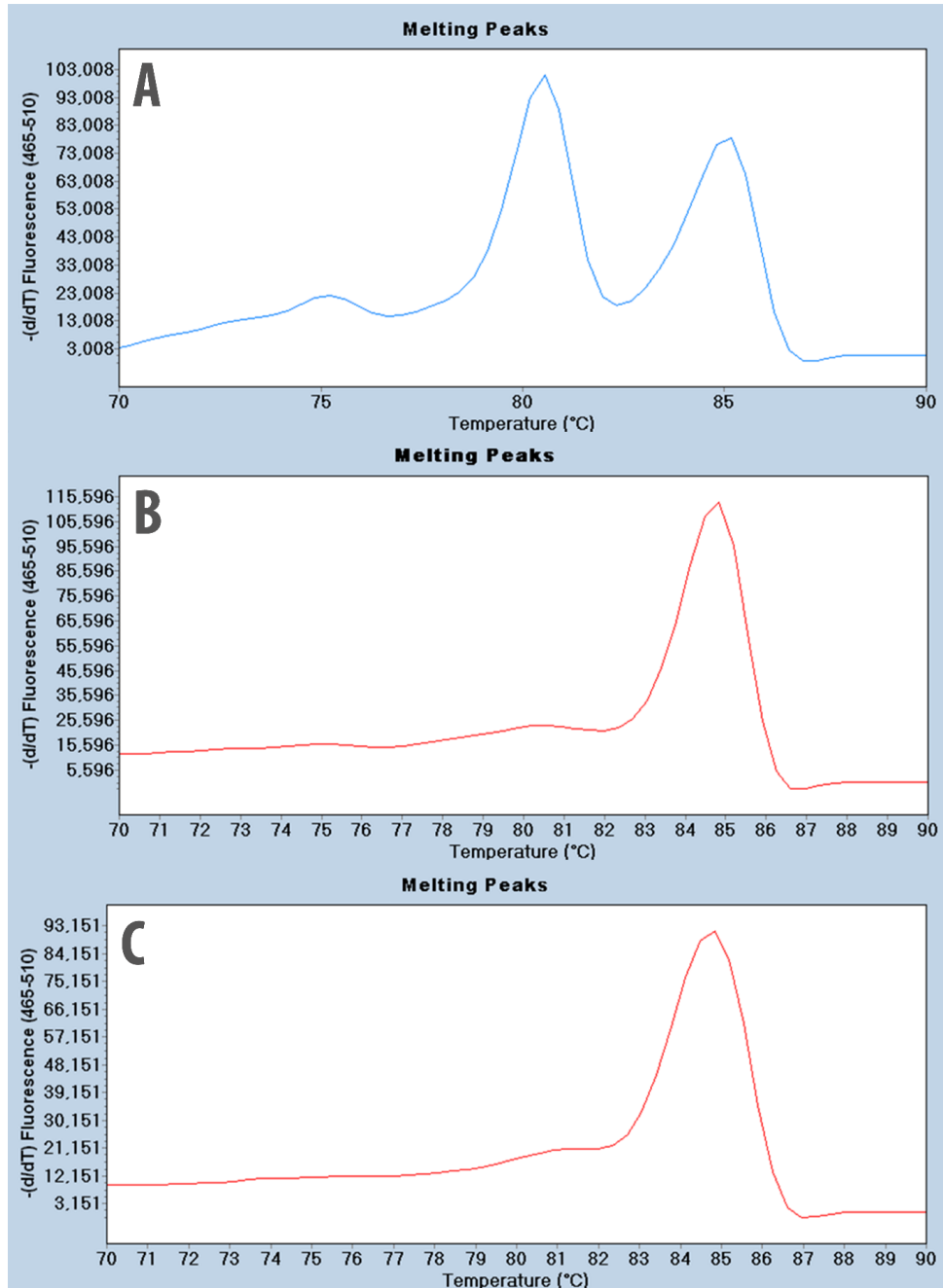
8.táblázat: Prader-Willi-szindróma gyanús betegek klinikai és molekuláris genetikai jellemzői

0: nem elvégzett vizsgálat, DEL-class1: class I deléció, DEL-class2: class II deléció, HRM: nagyfelbontású olvadáspont elemzés, ID: imprinting defektus, MSA: mikroszatellita analízis, MS-MLPA: metiláció függő multiplex ligáció függő próba amplifikáció, NEG: PWS nem igazolható, non-DEL: nincs deléció; POZ: igazolt PWS, PWS: Prader-Willi-szindróma upd(15)mat: maternális uniparentális diszómia

Beteg sorszám	HOLM pontszám	HRM	MS-MLPA	MSA
1	4	NEG	NEG	0
2	7,5	POZ	POZ DEL-class 2	0
3	3	NEG	NEG	0
4	4,5	NEG	NEG	0
5	2,5	NEG	NEG	0
6	5	NEG	NEG	0
7	3,5	NEG	NEG	0
8	2	NEG	NEG	0
9	11	POZ	POZ DEL-class1	DEL
10	2	NEG	NEG	0
11	3,5	NEG	NEG	0
12	2,5	NEG	NEG	0
13	0	NEG	NEG	0
14	7,5	POZ	POZ DEL-class1	0
15	7	POZ	POZ - non-DEL	upd(15) mat vagy ID
16	6	POZ	POZ - non-DEL	upd(15)mat
17	11	POZ	POZ - non-DEL	upd(15)mat

9. táblázat: Holm szerinti tünetek megjelenése gyakorisági sorrend alapján

Major kritériumok	Minor kritériumok
1. újszülöttkori hipotónia	1. viselkedési problémák
2. kifejezett súlynövekedés	2. hipogonadizmus
3. mégkésett fejlődés	3. alacsony termet
4. hiperfágia	4. alvászavarok / alvási apnoe
5. jellegetesen diszomorf arc	5. kicsi kezek és/vagy lábak
6. hipogonadizmus	6. sűrű nyál
7. csecsemőkori táplálási nehezítettség	7. artikulációs nehézségek
	8. szem rendellenességek (esotropia, myopia)
	9. csökkent magzati aktivitás
	10. keskeny kezek egyenes ulnaris szegéllyel
	11. kényszeres bőrcsipkedés



7. ábra SNRPN lókusz HRM vizsgálat során detektált metilációs görbéi

A BS-PCR és nagyfelbontású olvadáspont elemzés eredménye alapján : A: két olvadási csúcs (nem metilált apai: $T = 80,63 \pm 0,2^\circ\text{C}$, metilált anyai: $T_m = 84,97 \pm 0,35^\circ\text{C}$) detektálható egészségesekben, Járulékos minor olvadási csúcsok LIS1 lókuszra ($T_m = 76,0^\circ\text{C}$) illetve anyai és apai SNRPN heteroduplex produktumokra utalnak, B: Deléciós PWS ($T_m = 84,48 \pm 0,99^\circ\text{C}$), C: nem deléciós PWS ($T_m = 84,5 \pm 0,6^\circ\text{C}$), Minden Prader-Willi-szindrómás esetben hiányzik az apai (nem metilált) csúcs, BS-PCR: biszulfít szekvenáló ploimeráz lánreakció, T_m : olvadási hőmérséklet = melting temperature

VI. Megbeszélés

VI.1. Az idiopátiás gyermekkori elhízás, annak mértékének és szövődményeinek jelentősége

A gyermekkori elhízás előfordulásának gyakorisága az elmúlt években világszerte hatalmas léptékben emelkedett, Magyarországon az elmúlt 20 évben minden korcsoportban megháromszorozódott az elhízott gyermekek száma [115]. Nemzetközi felmérések alapján elsősorban az „obezogén környezet” játszik szerepet kialakulásában, amely számos tényezőt foglal magába, mint a kulturális- és környezeti jellemzőket, a megváltozott, mozgásszegény életmódot és ezzel párhuzamosan megnövekedett energiabevitelt. Ez az állapot már egész korai életkorban megjelenhet, ugyanakkor az elhízott gyermekek a későbbiekben is nagyobb mértékben vannak kitéve a közvetlenül elhízáshoz kapcsolható szövődmények, mint magas vérnyomás, diszlipidémia, 2-es típusú diabetes mellitus kialakulásának, mint normál testalkatú társaik. Ezek a kóros metabolikus eltérések hosszú évek alatt fejtik ki hatásukat és beavatkozás nélkül fiatal felnőttkorban már komoly, felnőttekre jellemző súlyosságú szövődményekkel kell számolnunk. Számos elhízott gyermeknél figyeltek meg közvetlenül a túlsúlyhoz kapcsolható, mechanikus eredetű eltéréseket, mint például a scoliosis, az arthropathia, vagy az obstruktív alvási apnoe. Tehát a komoly metabolikus eltérések mellett, a mindennapokat megnehezítő mechanikus eredetű panaszok is szerepet játszanak az elhízott gyermekek állapotának romlásában [51, 116]. A túlsúly mértékét többek között jelentősen befolyásolja a gyermek környezete, életvitele, az otthoni étkezési szokások, és ezáltal a szülők testalkata. Számos tanulmány során megfigyelték, hogy a korai gyermekkorban már túlsúlyos vagy elhízott gyermekek nagyobb valószínűséggel válnak elhízott és egyben betegebb felnőttekké [18, 117].

Saját eredményeink alapján a magyar, 3 és 18 év közötti elhízott gyermekekben a BMI SDS pozitív összefüggést mutatott a derékkörfogattal, éhomi vércukor- és inzulinszinttel, a HOMA indexszel, a húgysavszinttel valamint a vérnyomásértékekkel. Tehát minél nagyobb volt a túlsúly mértéke, annál inkább volt jellemző a kóros metabolikus értékek megjelenése. Mindemellett megvizsgálva, ezen gyermekek körében a leggyakoribb szövődmények előfordulását, a látszólag túlsúlyon kívül más problémával nem küzdő gyermekek igen nagy részében is már kialakultak kóros

metabolikus eltérések. Betegeink 18,9-18,9%-ában magas vérnyomás, illetve szénhidrát anyagcserezavar, 13,41%-ában diszlipidémia, míg 10,7%-ában hiperurikémia volt igazolható. Összesen tehát az általunk vizsgált, első kórházi megjelenéskor a súlytöbbleten kívül más panaszt nem említő gyermekek 43,9%-ában már kimutathatók voltak az elhízáshoz szorosan kapcsolható metabolikus szövődmények. Eredményeink azt bizonyítják, hogy a gyermekkorban kialakult elhízás során az azzal kapcsolatos szövődmények is hamarabb jelennek meg, korán megkezdve a szervezetre kártékony hatásuk kifejtését [118]. A gyermekkori elhízás esetében nagyon fontos az időben való felismerés, a már fennálló szövődmények azonosítása és lehetséges kezelése, valamint a még ki nem alakult szövődmények megelőzése. Mindemellett több tanulmány valószínűsíti, hogy az átlagosnál nagyobb testsúly kialakulásában, valamint abban, hogy mely gyermekben milyen szövődmények alakulnak ki, a környezeti faktorok mellett, mind a korai hatások által közvetített imprinting jelenség, mind pedig egyéb epigenetikai útvonalak (pl.: DNS metiláció) is szerepet játszanak [118-121].

VI.2. A D-vitamin vitatott szerepe a gyermekkori elhízásban

Az alacsony D-vitamint-szint és a gyermekkori elhízás egyre nagyobb mértékű elterjedése külön-külön és együttesen is világméreteket öltött. Ez a két állapot számos közös rizikófaktorttal rendelkezik, mint például az egyoldalú, nem megfelelő táplálkozás, valamint a fizikai inaktivitás. Mindazonáltal egy tanulmány sem tudott a két állapot között közvetlen ok-okozati kapcsolatot bizonyítani, illetve az sem egyértelmű, az egyik állapot változása, magával vonná a másik állapot változását is, például, hogy a magasabb 25OHD3 vitamint-szint a testsúly-, illetve a BMI csökkenésére közvetlen hatással lenne. Megfigyelték viszont, hogy nagyobb mértékű testsúlycsökkenés esetén, a szérumban mérhető 25OHD3 vitamint-szint átmenetileg emelkedik, de a hosszú távú hatások bizonyítása még várat magára. A fenti jelenség háttérében legnagyobb valószínűséggel a D-vitamin zsírban való szekvesztrációja állhat [87, 88, 122]. De számolni kell olyan lehetőséggel is, ami egymástól függetlenül mindkét paramétert befolyásolja. Ilyen lehet például az elhízáshoz vezető túlzott táplálékfelvétellel együttjáró túlzott foszfátbevitel is, ami viszont csökkenti a D-vitamint-szintet.

Több tanulmány is alátámasztotta, hogy alacsony D-vitamint-szinttel rendelkező elhízott egyéneknél az elhízás szövődményei korábban jelentkezhetnek, illetve súlyosabb formát

ölthetnek a normál D-vitamint-szinttel rendelkezőkhöz képest. Ezen elhízott betegeknél gyakran figyelhető meg inzulinrezisztencia, és az ehhez kapcsolódó krónikus gyulladás, amelyek előre vetíthetik a később kialakuló, súlyos szövödményeket, mint metabolikus szindróma, 2-es típusú diabetes mellitus, cardiovascularis megbetegedés, osteopenia, illetve osteoporosis kialakulását. Mindennek háttérében a D-vitamin vagy hiánya okozta immunmoduláló, ezáltal a nagy mennyiségű zsírszövetben fennálló krónikus gyulladást is fenntartó szerepe feltételezhető [95, 96].

Saját vizsgálatunk során a szérumban 25OHD₃ vitamint-szint illetve az általunk vizsgált metabolikus paraméterek, vérnyomásértékek, valamint az elhízás mértéke (BMI SDS) között közvetlen szignifikáns pozitív vagy negatív irányú összefüggést igazolni nem tudtunk. Tehát az alacsony D-vitamint-szint feltételezett negatív metabolikus hatását nem sikerült alátámasztanunk [123]. Pusztán a *VDR* gén metiláltsági foka mutatott tendenciózus pozitív összefüggést a szérumban 25OHD₃ vitamin szintjével, ami annyit jelent, hogy minél magasabb a D-vitamin szérumszintje, annál inkább metilált a D-vitamin receptor gén, tehát annál kevesebb hozzáférhető a DNS polimerázok számára és végeredményben kevesebb D-vitamin receptor kerül a véráramba. Ez a folyamat teljesen beleillik a D-vitamin receptor mennyiségét moduláló epigenetikai útvonalon történő feedback mechanizmusába.

Azonban az általunk vizsgált 25OHD₃ vitamin aktivációjában szerepet játszó 1- α -hidroxiláz enzimet kódoló *CYP27B1* gén DNS metiláltsági szintje közvetlen pozitív összefüggést mutatott az elhízás mérték mutató BMI SDS-sel. Tehát minél nagyobb mértékű volt az elhízás, a *CYP27B1* gén metilációja annál kifejezettebb volt, csökkentve illetve megakadályozva az általa kódolt átíró 1- α -hidroxiláz enzim termelődését, amely közvetlenül csökkent aktív 1,25(OH)₂ D-vitamint-szinthez vezethet. A nemzetközi irodalom alapján eddig nem vizsgálták a *CYP27B1* gén DNS metiláltsági állapotának és a többlet testsúly mértékének kapcsolatát elhízott gyermekekben. *Wamberg és munkatársai* csökkent *CYP27B1* expressziót figyeltek meg felnőtt, elhízott egyének szubkután zsírszövetében [105]. Ezen eredmények arra engednek következtetni, hogy a szérumból nagyon nehezen, és költségesen kimutatható, gyulladás moduláló - adipogenezist befolyásoló hatással bíró és adipocyták szekrécióját szabályzó aktív 1,25 (OH)₂ D-vitamint-szintje mind elhízott felnőttek, mind pedig elhízott gyermekek esetében csökkent lehet.

VI.3. Epigenetikai mechanizmusok jelentősége a gyermekkori idiopátiás elhízás kialakulásában

Világszerte egyre inkább elfogadott nézet, hogy az idiopátiás elhízás környezeti és genetikai hatások együttes eredménye, amelyeket a DNS szekvenciát közvetlenül nem befolyásoló epigenetikai mechanizmusok kapcsolnak össze [15, 16]. Az epigenetikai útvonalak (pl.: DNS metiláció, hiszton modifikáció, mikroRNS útvonalak) döntő szerepet játszanak a génextpresszió szabályozásában, ezáltal a metabolikus állapotot, növekedést és testösszetételt moduláló gének működését is nagymértékben befolyásolhatják. Az epigenetikai útvonalakat olyan külső tényezők is befolyásolhatják, mint például az elfogyasztott ételösszetevők, azok mennyisége, a fizikai aktivitás, a napfény, a stressz, az intrauterin hatások. Mindezen behatások módosítják az adott egyén epigenetikus mintázatát, amely a következő generációra átörökíthető, így például az elhízott gyermekek esetében nemcsak a szülői életvitel mintája, de annak epigenetikai hatásai is jelentős szereppel bírnak.

Azokat a géneket, amelyek feltételezetten közvetlen szereppel bírnak az elhízás kialakulásában, kandidáns géneknek nevezzük. Ezen gének vizsgálata alapján az insulin-like growth factor 2 (*IGF2/H19*) és proopiomelanokortin (*POMC*) gének expressziója közvetlen összefüggést mutatott a növekedéssel, az elhízással és a testösszetétellel. Fiatal felnőttekben az *IGF2* gén hipermetilációját nagy mennyiségű szubkután zsírszövettel hozták összefüggésbe, mindemellett azonban a BMI, a magasság, a testsúly, a derékkörfogat és a visceralis zsírszövetre nem volt hatással [22]. *Chen és munkatársai* eredményei alapján elhízott hölgyek *IGF2* metilációs szintjét vizsgálva, a szubkután zsírszövetben volt a legalacsonyabb, a viscerális zsírszövethez, illetve az izomszövethez képest [124]. *Hernandez-Valerio és munkatársai* elhízott és normal testalkatú mexikói-amerikai gyermekek vizsgálatakor megfigyelték, hogy azok a gyerekek, akiknél a *IGF2/H19* régió metiláltsága alacsonyabb volt, nagyobb születési súllyal rendelkeztek, mint a magasabb metiláltsági szinttel rendelkező társaik [125]. *Heijmans és munkacsoportja* pedig negatív összefüggést igazolt a *H19* régió metiláltsága és az elhízás között [126].

A fenti eredményeket megerősítve, jelen vizsgálatunk során szignifikáns, negatív összefüggést találtunk az *IGF2* metilációs szintje és a túlsúly mértéke (BMI SDS) között. Tehát az elhízás mértéke fordítottan arányosnak bizonyult a *IGF2* metiláltságával, amely a

régió génátírási aktivitásának megnövekedésére utal. Így az *IGF2* gén alacsonyabb metiláltsági státusza nemcsak a születési súlyt, hanem a testösszetétel és a növekedés befolyásolásán keresztül, a későbbi gyermekkorban BMI SDS-sel kifejezhető elhízás mértékét is befolyásolhatja [125].

Vizsgáltuk továbbá az anorexigén neuropeptidet kódoló, és egyben a hipotalamusz általi testsúly szabályzásban részt vevő *POMC* gén metiláltságának és a BMI SDS mértékének összefüggését is, de közvetlen kapcsolatot igazolni nem tudtunk. Ennek háttérében az állhat, hogy egy génen belül a különböző CpG szigetek eltérő metiláltságúak lehetnek, jelen vizsgálatunk során a gén 1-es exon régióját vizsgáltuk, míg más vizsgálatok, ahol a *POMC* gén és az elhízás mértéke között összefüggést igazoltak, a gén 2-es és 3-as exon közötti régiójára fókuszáltak [60].

A *CYP27B1* és az *IGF2* gének DNS metiláltsági fokának BMI SDS-re gyakorolt esetleges hatását a lineáris regresszió során elemeztük. *CYP27B1* és *IGF2* metiláltsági státusza és a BMI SDS között szignifikáns összefüggés mutatkozott, míg a 25OHD3 vitamin szint és az elhízás mértéke között ilyen kapcsolat nem volt megfigyelhető. A fentiek alapján tehát az *IGF2* gén hipometiláltsága és a *CYP27B1* gén hipermetiláltsága pozitívan befolyásolja a BMI SDS mértékét elhízott gyermekekben. Mindez összefügg azzal, hogy az *IGF2* gén hipometilációja megnövekedett IGF2 expresszióhoz vezet, amely mind a növekedést, a testi fejlődést befolyásolja és kapcsolatban hozható a megnövekedett viscerális zsírszövet mennyiséggel is [22]. Feltevésünk szerint a *CYP27B1* gén hipermetiláltságából fakadó alacsonyabb aktív 1,25 (OH)₂ D-vitamintszint és megemelkedett IGF2 szint együttesen olyan módon módosítják a zsírszövet működését és metabolizmusát, hogy az végeredményben a BMI és közvetetten a BMI SDS növekedéséhez vezet [129].

VI.4. Epigenetikai vizsgáló módszerek Prader-Willi-szindróma igazolására, hazai lehetőségeink

A Prader–Willi szindróma diagnózisa a korcsoport specifikus tüneteken és a genetikai vizsgálaton alapszik. A European Molecular Genetics Quality Network (EMQN), a United Kingdom External Quality Assessment Scheme (UKNEQAS), valamint a UK Clinical Molecular Genetics Society (UKCMGS) konszorzusa alapján az SNRPN génlókus promotor régiójának DNS metilációs vizsgálata jelenleg a legérzékenyebb és

leghatékonyabb kezdeti lépés a Prader-Willi-szindróma gyanús betegek genetikai vizsgálatakor. Ezen módszerek szenzitivitása 99%-os. Mind a nyugat-európai országokban, mind pedig az Amerikai Egyesült Államokban a legelterjedtebb DNS metilációs vizsgálat az MS-MLPA illetve az MS-PCR. Az MS-MLPA módszer nemcsak a PWS igazolására, ill. kizárására alkalmas, hanem egyben további információval szolgál a betegség molekuláris genetikai hátterét illetően, míg az MS-PCR esetében a betegség igazolására, illetve a diagnózis elvetésére van lehetőség. A HRM technika szintén elismert és támogatott a fent említett társaságok által [27, 40]. Jelen munkánk egy alternatív metilációs specifikus HRM technikát mutat be PWS igazolására, valamint alátámasztja a *Holm* szerinti kritériumrendszer klinikai használatának jelentőségét.

A klinikai tünetek alapján 17 PWS gyanús betegből 6 esetben igazoltuk a betegség jelenlétét mind a saját tervezésű HRM, mind pedig az általánosan elfogadott MS-MLPA technikával. A két módszer során kapott eredmények minden esetben megegyeztek. Az MS-MLPA során egyszerre volt detektálható mind a kópiaszám-változás (delécióval csökkent), mind pedig a 15q11q13 target régió metilációs státusza (imprinting defektus, uniparentalis diszómia), ám a módszer hazánkban – technikai és anyagi források hiányában – nehezen hozzáférhető.

Eredményeink alapján, az általunk tervezett primereket és módosított biszulfitszekvenáló PCR technikát használva, a HRM egyszerű, gyors, költséghatékony, kis mennyiségű DNS rendelkezésre állása esetén is kivitelezhető, megbízható és hatékony módszernek látszik a Prader-Willi-szindróma igazolására. Vizsgálatunk alapján a HRM megfelelő elsődleges genetikai vizsgálat lehet, amennyiben az MS-MLPA technikai vagy anyagi okok miatt nem elérhető [40, 127, 128].

A genetikai vizsgálatok eredményeit az általunk regisztrált Holm score-ral összevetve, a genetikailag igazolt PWS betegek esetében a kritérium rendszer szerinti pontszám nagyobbak bizonyult a nem betegek pontszámánál. Tehát a Holm score szerinti besorolás valóban segítség lehet a klinikai diagnózis felállításában és abban, hogy a továbbiakban mely betegeknél szükséges a genetikai vizsgálat elvégzése [130].

A vizsgált minták mennyiségét figyelembe véve, mivel ritka betegségről van szó, további nagyobb elemszámú, statisztikai elemzéseknek is alávetendő vizsgálatokra van szükség az általunk javasolt vizsgálat hatékonyságának bizonyítására.

VI.5. Limitációk

A DNS metilációs vizsgálatok során a genomiális DNS-t perifériás vérmintából izoláltuk, ami több különféle sejtípust is tartalmaz és az egyes minták pontos sejtösszetétele nem volt ismert. Mivel a DNS metiláció szövetspecifikus, a zsírsejtek metilációs mintázata eltérhet az általunk vizsgált vérsejtektől. Az elhízás kialakulásában szerepet játszó epigenetikai mechanizmusok közül mi csak a DNS metilációt vizsgáltuk, ám egyéb epigenetikai útvonalak, úgymint, hiszton modifikáció, ill. miRNS általi szabályzás is szerepet játszhatnak a pathogenezisben. Az általunk vizsgált elemszám relatív kicsi, illetve a D-vitamint-szint jelentősen függ az évszaktól és az etnikai hovatartozástól, ezért további, nagyobb elemszámú vizsgálatok szükségesek eredményeink alátámasztására. A PWS genetikai diagnosztikájára kidolgozott metodikánk szintén nagyobb elemszámú vizsgálatban történő ellenőrzése javasolt.

VII. Következtetések

1. Jelen munkánk során vizsgált elhízott gyermekek mire kórházi kivizsgálásra és ellátásra kerültek, jelentős részükben már kialakultak az elhízással összefüggő kóros laboreltérések és szövödmények. Eredményeink alapján a hipertónia és a diszlipidémia önállóan 18,29-18,29% -ban, míg a szénhidrát anyagcserezavar 13,41%-ban fordult elő. Összesen 36 esetben, tehát az összes általunk vizsgált elhízott gyermek 43,9%-ában volt jelen legalább egy, elhízáshoz kapcsolható szövödmény.

2. Annak tényét, hogy bár a D-vitamin anyagcsere jellegzetesen megváltozik elhízásban és az alacsony D-vitamint-szint gyakran fordul elő elhízással együtt, valamint, hogy a betegekben a vérből meghatározható 25OHD3 vitamin szintje és az elhízás mértéke között szignifikáns kapcsolat áll fenn, nem sikerült bizonyítanunk.

3. A D-vitamin aktivációjában szerepet játszó *CYP27B1* gén DNS metiláltsági szintje szignifikánsan pozitív korrelációt mutatott a gyermekkori elhízás mértékével. Tehát az aktív D-vitamint-szint kialakításában fontos 1-alfa-hidroxiláz génje (*CYP27B1*), számos más génnel együtt részét képezheti az „obez epigenetikus mintának”. Ezáltal a D-vitamin az epigenetikus szabályozáson, ezen belül is a DNS metilációs útvonalon keresztül kapcsolódhat be az obezításban és metabolikus szindrómában jellemző mintázatba. A D-vitamin receptor (*VDR*) gén DNS metiláltsági szintje és az elhízás mértéke között szignifikáns összefüggést igazolni nem tudtunk.

4. A metabolizmust, a növekedést és a testösszetételt közvetlenül befolyásoló *IGF2* gén metiláltsági szintje és a gyermekkori elhízás mértéke között szignifikáns negatív összefüggést igazoltunk, így az *IGF2* metiláltsági foka jelentős szereppel bírhat a gyermekkori elhízásban. Tehát az „elhízásra hajlamos alkat” több komponensből tevődik össze, átörökítésében epigenetikai mechanizmusok is fontos szerepet játszanak. Az anorexigén neuropeptidet kódoló *POMC* gén metiláltsága és a gyermekkori elhízás mértéke között szignifikáns összefüggést igazolni nem tudtunk.

5. A Prader-Willi-szindrómás és a Prader-Willi like fenotípusú gyermekek esetében a Holm kritériumrendszer klinikai hasznosságát igazolni tudtuk azáltal, hogy a genetikailag igazolt Prader-Willi-szindrómás betegek összesített pontszáma lényegesen

magasabbnak bizonyult, a Prader–Willi like fenotípussal rendelkező, ám PWS-re jellemző genetikai eltérést nem mutató betegeknél.

6. A SNRPN génlókuszt promotor régiójának DNS metilációs mintázata magas olvadáspont elemzés során egyértelműen elkülönült a Prader-Willi-szindrómás és a nem Prader–Willi szindrómás esetekben. Az általunk kidolgozott, magas olvadáspont elemzésen (HRM) alapuló molekuláris biológiai eljárás a Prader-Willi-szindróma első vonalbeli szűrésére alkalmas. Validálás során a nagy pontosságú, nemzetközileg elterjedt a multiplex ligáció függő próba amplifikáció (MS-MLPA) metodika eredményeit vetettük össze saját eredményeinkkel, ennek során a diagnózis minden esetben megegyezett.

VIII. Összefoglalás

A legfrissebb kutatások alapján az elhízás környezeti és genetikai hatások együttes eredménye, amelyeket epigenetikai mechanizmusok kapcsolnak össze. A kandidáns génvizsgálatok szerint az insulin-like growth factor 2 (*IGF2*) és proopiomelanokortin (*POMC*) gének expressziója közvetlen összefüggést mutatott a növekedéssel, az elhízással és a testösszetétellel. A D-vitamin nukleáris receptorán (*VDR*) keresztül epigenetikai útvonalakat szabályoz és részt vesz a metabolizmus szabályzásában. Vizsgálatunk során célunk volt választ találni, hogy az elhízás mértéke (BMI SDS) és a D-vitamin metabolizmusában részt vevő (*CYP27B1* és *VDR*), valamint a metabolikus státuszt befolyásoló (*IGF2*, *POMC*) gének DNS metiláltsági szintje között megfigyelhető-e összefüggés elhízott gyermekekben. Továbbá célul tűztük ki az elhízással kapcsolatos leggyakoribb szövődmények gyakoriságának felmérését az elhízott, de egyebekben egészségesnek gondolt gyermekekben. Összesen a vizsgált gyermekek 43,9 %-ában volt jelen legalább egy, elhízáshoz kapcsolható szövődmény. A *CYP27B1* gén DNS metiláltsága pozitív, az *IGF2* gén DNS metiláltsága pedig negatív összefüggést mutatott a magasabb BMI SDS-sel. Az *IGF2* gén hipometilációja és a *CYP27B1* gén hipermetilációja tehát jelentős szereppel bírhat a gyermekkori elhízás mértékének alakulásában. Feltevésünk szerint a *CYP27B1* gén hipermetiláltságából fakadó alacsonyabb aktív 1,25 (OH)₂ D-vitamint-szint és megemelkedett *IGF2* szint együttesen, olyan módon módosítják a zsírszövet működését és metabolizmusát, hogy az a BMI SDS növekedéséhez vezet. A Prader-Willi-szindróma (PWS) lehetősége a klinikai tünetek alapján merül fel, amelynek igazolásához elengedhetetlen a genetikai vizsgálat. Erre az *SNRPN* génlókuszs promotor régiójának DNS-metilációs vizsgálata jelenleg a legérzékenyebb és leghatékonyabb kezdeti lépés. Célunk a Holm szerinti pontrendszer klinikai hasznosságának bizonyítása, valamint a PWS igazolására egy egyszerű, megbízható, könnyen hozzáférhető, elsődlegesen diagnosztikus eljárás kidolgozása volt. Eredményeink alapján az általunk módosított, költséghatékony, metilációszenzitív, nagy felbontású olvadáspont-elemzéses (HRM) megfelelő elsődleges genetikai vizsgálatnak bizonyult. Az általunk regisztrált Holm score, a genetikailag igazolt betegek esetében nagyobbak bizonyult a nem betegek pontszámánál. Tehát valóban segítség lehet a klinikai diagnózis felállításában és abban, hogy a továbbiakban mely betegeknél szükséges genetikai vizsgálat.

IX. Summary

Recent studies show that obesity results mainly from interactions between environmental and genetic factors, which are linked together by epigenetic mechanisms. According to candidate gene approach, expression of insulin-like growth factor 2 (*IGF2*) and proopiomelanocortin (*POMC*) genes correlate directly with growth, obesity and body composition. Vitamin D through its nuclear receptor (*VDR*) regulates epigenetic pathways and transcription of a number of genes involved in regulating metabolism. Therefore the aim of our study was to investigate whether there is a correlation between the rate of obesity (Body Mass Index (BMI) and Standard Deviation Score (SDS) and the methylation status of genes related to vitamin D metabolism (*CYP27B1*, *VDR*) and metabolic status (*IGF2*, *POMC*) in children with obesity. We also aimed to estimate the prevalence of the most frequent obesity associated comorbidities in these obese, but otherwise healthy considered children. According to our results 43.9% of the examined children presented at least one of obesity associated comorbidities. Our results did not show any significant correlations between 25OHD and BMI SDS, metabolic status describing parameters, blood pressure increasement or *VDR* or *POMC* methylation status. However the increased methylation of 25OHD activating *CYP27B1* enzyme's gene and the decreased DNA methylation of *IGF2* gene was associated with higher BMI SDS. Hypomethylation of *IGF2* and hypermethylation of *CYP27B1* genes might positively influence the rate of obesity in obese children. We speculate that potential lower active vitamin D and increased IGF2 levels alter adipose tissue function and metabolism towards the direction of increasing BMI SDS. The diagnosis of Prader-Willi syndrome (PWS) is based on age-specific clinical features and it should be confirmed by genetic analysis. DNA methylation analysis of the promoter region of *SNRPN* locus is the most efficient way to start genetic investigation. Our aim was to prove the clinical use of Holm score and to develop a simple, reliable first-tier diagnosis to confirm PWS. According to our results high-resolution melting analysis (HRM) could be used as a rapid, first-tier genetic analysis. While comparing the results of genetic analysis and Holm scores, we found that patients with proved Prader-Willi syndrome scored higher. Therefore we claim, that using Holm's diagnostic criteria to establish the clinical diagnosis of PWS could be helpful to decide, which patients should undergo further genetic investigation.

X. Irodalomjegyzék

- 1 Choudhury M, Friedman JE. (2011) Obesity: Childhood obesity-methylate now, pay later? *Nat Rev Endocrinol*, 7:439-440.
- 2 Flodmark CE, Lissau I, Moreno LA, Pietrobelli A, Widhalm K. (2004) New insights into the field of children and adolescents' obesity: The european perspective. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 28:1189-1196.
- 3 Institute of Medicine Committee on Prevention of Obesity in Children and Youth: The national academies collection: Reports funded by national institutes of health; in Koplan JP, Liverman CT, Kraak VI (eds): Preventing childhood obesity: Health in the balance. Washington (DC), National Academies Press (US), 2005,1.
- 4 Krebs NF, Himes JH, Jacobson D, Nicklas TA, Guilday P, Styne D. (2007) Assessment of child and adolescent overweight and obesity. *Pediatrics*, 120:193-228.
- 5 Poskitt EM. (1995) Defining childhood obesity: The relative body mass index (BMI). European childhood obesity group. *Acta Paediatr*, 84:961-963.
- 6 Lobstein T, Frelut ML. (2003) Prevalence of overweight among children in Europe. *Obes Rev*, 4:195-200.
- 7 Kovács VA FZ, Gábor A, Martos É. (2005) Changes in body composition improves insulin sensitivity in obese children. *Obesity Reviews*, 380:239-242.
- 8 Savva SC, Tornaritis M, Savva ME, Kourides Y, Panagi A, Silikiotou N, Georgiou C, Kafatos A. (2000) Waist circumference and waist-to-height ratio are better predictors of cardiovascular disease risk factors in children than body mass index. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 24:1453-1458.
- 9 Freedman DS, Kahn HS, Mei Z, Grummer-Strawn LM, Dietz WH, Srinivasan SR, Berenson GS. (2007) Relation of body mass index and waist-to-height ratio to cardiovascular disease risk factors in children and adolescents: The Bogalusa heart study. *Am J Clin Nutr*, 86:33-40.
- 10 Wells JC, Fewtrell MS. (2006) Measuring body composition. *Arch Dis Child*, 91:612-617.
- 11 McCarthy HD, Cole TJ, Fry T, Jebb SA, Prentice AM. (2006) Body fat reference curves for children. *Int J Obes*, 30:598-602.

- 12 Mercedes de Onis MB, Borghi E. (2010) Global prevalence and trends of overweight and obesity among preschool children. *Am J Clin Nutr*, 92:1257-1264.
- 13 Molnár D. (2011) A gyermekkori elhízás „járványa” és következményei. *Gyermek-gyógyászati továbbképző szemle*, 16:10-13.
- 14 Kelly T, Yang W, Chen CS, Reynolds K, He J. (2008) Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *Int J Obes*, 32:1431-1437.
- 15 Herrera BM, Keildson S, Lindgren CM. (2011) Genetics and epigenetics of obesity. *Maturitas*, 69:41-49.
- 16 Drummond EM, Gibney ER. (2013) Epigenetic regulation in obesity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 16:392-397.
- 17 Speiser PW, Rudolf MCJ, Anhalt H, Camacho-Hubner C, Chiarelli F, Eliakim A, Freemark M, Gruters A, HersHKovitz E, Iughetti L, Krude H, Latzer Y, Lustig RH, Pescovitz OH, Pinhas-Hamiel O, Rogol AD, Shalitin S, Sultan C, Stein D, Vardi P, Werther GA, Zadik Z, Zuckerman-Levin N, Hochberg Z. (2005) Childhood obesity. *J Clin Endocrinol Metab*, 90:1871-1887.
- 18 Serdula MK, Ivery D, Coates RJ, Freedman DS, Williamson DF, Byers T. (1993) Do obese children become obese adults? A review of the literature. *Prev Med*, 22:167-177.
- 19 Huvenne H, Dubern B. (2016) Rare Genetic Forms of Obesity: Clinical Approach and Current Treatments in 2016. *Obes Facts*, 9:158-173.
- 20 Chung WK, Leibel RL. (2005) Molecular physiology of syndromic obesities in humans. *Trends Endocrinol Metab*, 16:267-272.
- 21 Hebebrand J, Friedel S, Schauble N, Geller F, Hinney A. (2003) Perspectives: Molecular genetic research in human obesity. *Obes Rev*, 4:139-146.
- 22 Huang RC, Galati JC, Burrows S, Beilin LJ, Li X, Pennell CE, van Eekelen J, Mori TA, Adams LA, Craig JM. (2012) DNA methylation of the IGF2/h19 imprinting control region and adiposity distribution in young adults. *Clin Epigenetics*, 4:21.
- 23 Kuehnen P, Mischke M, Wiegand S, Sers C, Horsthemke B, Lau S, Keil T, Lee YA, Grueters A, Krude H. (2012) An alu element-associated hypermethylation variant of the POMC gene is associated with childhood obesity. *PLoS Genet*, 8:e1002543.

- 24 Marco A, Kisliouk T, Weller A, Meiri N. (2013) High fat diet induces hypermethylation of the hypothalamic pomc promoter and obesity in post-weaning rats. *Psychoneuroendocrinology*, 38:2844-2853.
- 25 Junien C, Nathanielsz P. (2007) Report on the IASO stock conference 2006: Early and lifelong environmental epigenomic programming of metabolic syndrome, obesity and type II diabetes. *Obes Rev*, 8:487-502.
- 26 Cassidy SB, Schwartz S, Miller JL, Driscoll DJ. (2012) Prader-Willi syndrome. *Genet Med*, 14:10-26.
- 27 Holm VA, Cassidy SB, Butler MG, Hanchett JM, Greenswag LR, Whitman BY, Greenberg F. (1993) Prader-Willi syndrome: Consensus diagnostic criteria. *Pediatrics*, 91:398-402.
- 28 Rocha CF, Paiva CL. (2014) Prader-Willi-like phenotypes: A systematic review of their chromosomal abnormalities. *Genet Mol Res*, 13:2290-2298.
- 29 Bittel DC, Butler MG. (2005) Prader-willi syndrome: Clinical genetics, cytogenetics and molecular biology. *Expert Rev Mol Med*, 7:1-20.
- 30 Cavaille J, Buiting K, Kiefmann M, Lalande M, Brannan CI, Horsthemke B, Bachellerie JP, Brosius J, Huttenhofer A. (2000) Identification of brain-specific and imprinted small nucleolar rna genes exhibiting an unusual genomic organization. *Proc Natl Acad Sci*, 97:14311-14316.
- 31 Runte M, Huttenhofer A, Gross S, Kiefmann M, Horsthemke B, Buiting K. (2001) The ic-snurf-snrpn transcript serves as a host for multiple small nucleolar RNA species and as an antisense rna for ube3a. *Hum Mol Genet*, 10:2687-2700.
- 32 Buiting K, Saitoh S, Gross S, Dittrich B, Schwartz S, Nicholls RD, Horsthemke B (1995) Inherited microdeletions in the Angelman and Prader-Willi syndromes define an imprinting centre on human chromosome 15. *Nat Genet*, 9:395-400.
- 33 Knoll JH, Nicholls RD, Magenis RE, Graham JM, Jr., Lalande M, Latt SA. (1989) Angelman and Prader-Willi syndromes share a common chromosome 15 deletion but differ in parental origin of the deletion. *Am J Med Genet*, 32:285-290.
- 34 Mascari MJ, Gottlieb W, Rogan PK, Butler MG, Waller DA, Armour JA, Jeffreys AJ, Ladda RL, Nicholls RD. (1992) The frequency of uniparental disomy in Prader-Willi syndrome. Implications for molecular diagnosis. *N Engl J Med*, 326:1599-1607.

- 35 Goldstone AP. (2004) Prader-Willi syndrome: Advances in genetics, pathophysiology and treatment. *Trends Endocrinol Metab*, 15:12-20.
- 36 Varela MC, Fridman C, Koiffmann CP. (2002) Diagnosis of patients with Prader-Willi and Angelman syndromes: The importance of an overall investigation. *Genetics and Molecular Biology*, 25:07-12.
- 37 Wang W, Law HY, Chong SS. (2009) Detection and discrimination between deletional and non-deletional Prader-Willi and Angelman syndromes by methylation-specific PCR and quantitative melting curve analysis. *J Mol Diagn*, 11:446-449.
- 38 Maria Puiu NC. Prader–willi syndrome, from molecular testing and clinical study to diagnostic protocols. In: Ikehara K (ed), *Advances in the Study of Genetic Disorders*, InTechOpen, Japan, 2011:409-430.
- 39 Varjas T, Nadasi E, Kovacs E, Molnar J, Melegh B, Kosztolanyi G. (1998) Diagnosis of Prader-Willi syndrome by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Orv Hetil*, 139:1685-1687.
- 40 Ramsden SC, Clayton-Smith J, Birch R, Buiting K. (2010) Practice guidelines for the molecular analysis of Prader-Willi and Angelman syndromes. *BMC Med Genet*, 11:70.
- 41 Hosoki K, Kagami M, Tanaka T, Kubota M, Kurosawa K, Kato M, Uetake K, Tohyama J, Ogata T, Saitoh S. (2009) Maternal uniparental disomy 14 syndrome demonstrates Prader-Willi syndrome-like phenotype. *J Pediatr*, 155:900-903.e901.
- 42 Elena G, Bruna C, Benedetta M, Stefania DC, Giuseppe C. (2012) Prader-Willi syndrome: Clinical aspects. *J Obes*, 2012:473941.
- 43 Bakker NE, Kuppens RJ, Siemensma EP, Tummers-de Lind van Wijngaarden RF, Festen DA, Bindels-de Heus GC, Bocca G, Haring DA, Hoorweg-Nijman JJ, Houdijk EC, Jira PE, Lunshof L, Odink RJ, Oostdijk W, Rotteveel J, Schroor EJ, Van Alfen AA, Van Leeuwen M, Van Pinxteren-Nagler E, Van Wieringen H, Vreuls RC, Zwaveling-Soonawala N, de Ridder MA, Hokken-Koelega AC. (2013) Eight years of growth hormone treatment in children with Prader-Willi syndrome: Maintaining the positive effects. *J Clin Endocrinol Metab*, 98:4013-4022.

- 44 Davies PS, Evans S, Broomhead S, Clough H, Day JM, Laidlaw A, Barnes ND. (1998) Effect of growth hormone on height, weight, and body composition in Prader-Willi syndrome. *Arch Dis Child*, 78:474-476.
- 45 Carrel AL, Myers SE, Whitman BY, Allen DB. (2002) Benefits of long-term Gh therapy in Prader-Willi syndrome: A 4-year study. *J Clin Endocrinol Metab*, 87:1581-1585.
- 46 Deal CL, Tony M, Hoybye C, Allen DB, Tauber M, Christiansen JS. (2013) Growthhormone research society workshop summary: Consensus guidelines for recombinant human growth hormone therapy in Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 98:1072-1087.
- 47 Sallai Á. (2001) Gyermekkori obesitas. *Hippocrates*, 285-287.
- 48 Sorof J, Daniels S. (2002) Obesity hypertension in children: A problem of epidemic proportions. *Hypertension*, 40:441-447.
- 49 Figueroa-Colon R, Franklin FA, Lee JY, Aldridge R, Alexander L. (1997) Prevalence of obesity with increased blood pressure in elementary school-aged children. *South Med J*, 90:806-813.
- 50 Srinivasan SR, Bao W, Wattigney WA, Berenson GS. (1996) Adolescent overweight is associated with adult overweight and related multiple cardiovascular risk factors: The Bogalusa heart study. *Metabolism*, 45:235-240.
- 51 Freedman DS, Khan LK, Dietz WH, Srinivasan SR, Berenson GS. (2001) Relationship of childhood obesity to coronary heart disease risk factors in adulthood: The Bogalusa heart study. *Pediatrics*, 108:712-718.
- 52 Steinberger J, Moorehead C, Katch V, Rocchini AP. (1995) Relationship between insulin resistance and abnormal lipid profile in obese adolescents. *J Pediatr*, 126:690-695.
- 53 Jiang X, Srinivasan SR, Webber LS, Wattigney WA, Berenson GS. (1995) Association of fasting insulin level with serum lipid and lipoprotein levels in children, adolescents, and young adults: The Bogalusa heart study. *Arch Intern Med*, 155:190-196.
- 54 Sinha R, Fisch G, Teague B, Tamborlane WV, Banyas B, Allen K, Savoye M, Rieger V, Taksali S, Barbetta G, Sherwin RS, Caprio S. (2002) Prevalence of

- impaired glucose tolerance among children and adolescents with marked obesity. *N Engl J Med*, 346:802-810.
- 55 Goran MI, Ball GD, Cruz ML. (2003) Obesity and risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease in children and adolescents. *J Clin Endocrinol Metab*, 88:1417-1427.
- 56 Rosenbloom A, Arslanian S, Brink S, Jones KL, Klingensmith G, Neufeld N, White N. (2000) Type 2 diabetes in children and adolescents. American diabetes association. Consensus statement. *Diabetes Care*, 23:381-389.
- 57 Aggoun Y. (2007) Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *Pediatr Res*, 61:653-659.
- 58 Uslu Gokceoglu A, Akman S, Koyun M, Comak E, Dogan CS, Akbas H, Dinckan A. (2013) Hyperuricemia in pediatric renal transplant recipients. *Exp Clin Transplant*, 11:489-493.
- 59 Nanda K. (2004) Non-alcoholic steatohepatitis in children. *Pediatr Transplant*, 8:613-618.
- 60 Angulo P. (2002) Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med*, 346:1221-1231.
- 61 Rashid M, Roberts EA. (2000) Nonalcoholic steatohepatitis in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 30:48-53.
- 62 Sagodi L, Barkai L. (2013) Diagnostic difficulties of polycystic ovarian syndrome in adolescent girls. *Orv Hetil*, 154:136-142.
- 63 Griffiths LJ, Wolke D, Page AS, Horwood JP. (2006) Obesity and bullying: Different effects for boys and girls. *Arch Dis Child*, 91:121-125.
- 64 Zeller MH, Roehrig HR, Modi AC, Daniels SR, Inge TH. (2006) Health-related quality of life and depressive symptoms in adolescents with extreme obesity presenting for bariatric surgery. *Pediatrics*, 117:1155-1161.
- 65 Schwimmer JB, Burwinkle TM, Varni JW. (2003) Health-related quality of life of severely obese children and adolescents. *Jama*, 289:1813-1819.
- 66 Coppock JH RD, Hayes JF, St Paul M, Wilfley DE. (2014) Current approaches to the management of pediatric overweight and obesity. *Current treatment options in cardiovascular medicine*, 16:343.

- 67 Quattrin T, Roemmich JN, Paluch R, Yu J, Epstein LH, Ecker MA. (2012) Efficacy of family-based weight control program for preschool children in primary care. *Pediatrics*, 130:660-666.
- 68 Epstein LH, Valoski A, Wing RR, McCurley J. (1990) Ten-year follow-up of behavioral, family-based treatment for obese children. *Jama*, 264:2519-2523.
- 69 Wilfley DE, Stein RI, Saelens BE, Mockus DS, Matt GE, Hayden-Wade HA, Welch RR, Schechtman KB, Thompson PA, Epstein LH. (2007) Efficacy of maintenance treatment approaches for childhood overweight: A randomized controlled trial. *Jama*, 298:1661-1673.
- 70 McGovern L, Johnson JN, Paulo R, Hettinger A, Singhal V, Kamath C, Erwin PJ, Montori VM. (2008) Clinical review: Treatment of pediatric obesity: A systematic review and meta-analysis of randomized trials. *J Clin Endocrinol Metab*, 93:4600-4605.
- 71 Snethen JA, Broome ME, Cashin SE. (2006) Effective weight loss for overweight children: A meta-analysis of intervention studies. *J Pediatr Nurs*, 21:45-56.
- 72 Tsiros MD, Sinn N, Coates AM, Howe PR, Buckley JD. (2008) Treatment of adolescent overweight and obesity. *Eur J Pediatr*, 167:9-16.
- 73 Gidding SS, Dennison BA, Birch LL, Daniels SR, Gillman MW, Lichtenstein AH, Rattay KT, Steinberger J, Stettler N, Van Horn L. (2006) Dietary recommendations for children and adolescents: A guide for practitioners. *Pediatrics*, 117:544-559.
- 74 Barlow SE. (2007) Expert committee recommendations regarding the prevention, assessment, and treatment of child and adolescent overweight and obesity: Summary report. *Pediatrics*, 120:164-192.
- 75 Larrivee S, Greenway FL, Johnson WD. (2015) A statistical analysis of a traffic-light food rating system to promote healthy nutrition and body weight. *J Diabetes Sci Technol*, 9:1336-1341.
- 76 Wilfley DE, Tibbs TL, Van Buren DJ, Reach KP, Walker MS, Epstein LH. (2007) Lifestyle interventions in the treatment of childhood overweight: A meta-analytic review of randomized controlled trials. *Health Psychol*, 26:521-532.
- 77 Chanoine JP, Hampl S, Jensen C, Boldrin M, Hauptman J. (2005) Effect of orlistat on weight and body composition in obese adolescents: A randomized controlled trial. *Jama*, 293:2873-2883.

- 78 Michalsky M, Reichard K, Inge T, Pratt J, Lenders C. (2012) Asmb's pediatric committee best practice guidelines. *Surg Obes Relat Dis*, 8:1-7.
- 79 Karmali S, Brar B, Shi X, Sharma AM, de Gara C, Birch DW. (2013) Weight recidivism post-bariatric surgery: A systematic review. *Obes Surg*, 23:1922-1933.
- 80 Messiah SE, Lopez-Mitnik G, Winegar D, Sherif B, Arheart KL, Reichard KW, Michalsky MP, Lipshultz SE, Miller TL, Livingstone AS, de la Cruz-Munoz N. (2013) Effect of ethnicity on weight loss among adolescents 1 year after bariatric surgery. *World J Diabetes*, 4:202-209.
- 81 Lips P. (2006) Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol*, 92:4-8.
- 82 Kim MS, Fujiki R, Kitagawa H, Kato S. (2007) 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ -induced DNA methylation suppresses the human CYP27B1 gene. *Mol Cell Endocrinol*, 265-266:168-173.
- 83 Zhu J, DeLuca HF. (2012) Vitamin D 25-hydroxylase - four decades of searching, are we there yet? *Arch Biochem Biophys*, 523:30-36.
- 84 Garg M, Lubel JS, Sparrow MP, Holt SG, Gibson PR. (2012) Review article: Vitamin D and inflammatory bowel disease--established concepts and future directions. *Aliment Pharmacol Ther*, 36:324-344.
- 85 Zierold C, Reinholz GG, Mings JA, Prahl JM, DeLuca HF. (2000) Regulation of the porcine 1,25-dihydroxyvitamin D $_3$ -24-hydroxylase (cyp24) by 1,25-dihydroxyvitamin D $_3$ and parathyroid hormone in aok-b50 cells. *Arch Biochem Biophys*, 381:323-327.
- 86 Schuster I, Egger H, Bikle D, Herzig G, Reddy GS, Stuetz A, Stuetz P, Vorisek G. (2001) Selective inhibition of vitamin D hydroxylases in human keratinocytes. *Steroids*, 66:409-422.
- 87 Wang Y, Lim H. (2012) The global childhood obesity epidemic and the association between socio-economic status and childhood obesity. *Int Rev Psychiatry*, 24:176-188.
- 88 Holick MF, Chen TC. (2008) Vitamin D deficiency: A worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr*, 87:1080-1086.
- 89 Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, Murad MH, Weaver CM. (2011) Evaluation, treatment, and prevention of

- vitamin D deficiency: An endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*, 96:1911-1930.
- 90 Turer CB, Lin H, Flores G. (2013) Prevalence of vitamin D deficiency among overweight and obese us children. *Pediatrics*, 131:152-161.
- 91 Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF. (2000) Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr*, 72:690-693.
- 92 Tsuji K, Maeda T, Kawane T, Matsunuma A, Horiuchi N. (2010) Leptin stimulates fibroblast growth factor 23 expression in bone and suppresses renal 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ synthesis in leptin-deficient mice. *J Bone Miner Res*, 25:1711-1723.
- 93 Harel Z, Flanagan P, Forcier M, Harel D. (2011) Low vitamin D status among obese adolescents: Prevalence and response to treatment. *J Adolesc Health*, 48:448-452.
- 94 Dong Y, Pollock N, Stallmann-Jorgensen IS, Gutin B, Lan L, Chen TC, Keeton D, Petty K, Holick MF, Zhu H. (2010) Low 25-hydroxyvitamin D levels in adolescents: Race, season, adiposity, physical activity, and fitness. *Pediatrics*, 125:1104-1111.
- 95 Morrison JA, Friedman LA, Gray-McGuire C. (2007) Metabolic syndrome in childhood predicts adult cardiovascular disease 25 years later: The Princeton lipid research clinics follow-up study. *Pediatrics*, 120:340-345.
- 96 Morrison JA, Friedman LA, Wang P, Glueck CJ. (2008) Metabolic syndrome in childhood predicts adult metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus 25 to 30 years later. *J Pediatr*, 152:201-206.
- 97 Peterson CA, Tosh AK, Belenchia AM. (2014) Vitamin D insufficiency and insulin resistance in obese adolescents. *Ther Adv Endocrinol Metab*, 5:166-189.
- 98 Alemzadeh R, Kichler J, Babar G, Calhoun M. (2008) Hypovitaminosis D in obese children and adolescents: Relationship with adiposity, insulin sensitivity, ethnicity, and season. *Metabolism*, 57:183-191.
- 99 Falus A, Tóth S, Oberfrank F, Pap E, Szalai Cs. *Epigenetika*. In: Falus A. (szerk.). *Genetika és genomika*, Typotex eKiadó, Budapest, 2014
- 100 Esteller M. (2008) Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*, 358:1148-1159.
- 101 Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. (2004) Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 429:457-463.

- 102 Jones PA, Baylin SB. (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*, 3:415-428.
- 103 Robertson KD. (2002) DNA methylation and chromatin - unraveling the tangled web. *Oncogene*, 21:5361-5379.
- 104 Matouk CC, Marsden PA. (2008) Epigenetic regulation of vascular endothelial gene expression. *Circ Res*, 102:873-887.
- 105 Wamberg L, Christiansen T, Paulsen SK, Fisker S, Rask P, Rejnmark L, Richelsen B, Pedersen SB. (2013) Expression of vitamin D-metabolizing enzymes in human adipose tissue -the effect of obesity and diet-induced weight loss. *Int J Obes*, 37:651-657.
- 106 Haussler MR, Jurutka PW, Mizwicki M, Norman AW. (2011) Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1 α ,25(OH)₂vitamin D₃: Genomic and non-genomic mechanisms. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 25:543-559.
- 107 Fetahu IS, Hobaus J, Kallay E. (2014) Vitamin D and the epigenome. *Front Physiol*, 5:164.
- 108 Parikh SJ, Edelman M, Uwaifo GI, Freedman RJ, Semega-Janneh M, Reynolds J, Yanovski JA. (2004) The relationship between obesity and serum 1,25-dihydroxy vitamin D concentrations in healthy adults. *J Clin Endocrinol Metab*, 89:1196-1199.
- 109 Carlin AM, Rao DS, Meslemani AM, Genaw JA, Parikh NJ, Levy S, Bhan A, Talpos GB. (2006) Prevalence of vitamin D depletion among morbidly obese patients seeking gastric bypass surgery. *Surg Obes Relat Dis*, 2:98-103.
- 110 Snijder MB, van Dam RM, Visser M, Deeg DJ, Dekker JM, Bouter LM, Seidell JC, Lips P. (2005) Adiposity in relation to vitamin D status and parathyroid hormone levels: A population-based study in older men and women. *J Clin Endocrinol Metab*, 90:4119-4123.
- 111 Vilarrasa N, Maravall J, Estepa A, Sanchez R, Masdevall C, Navarro MA, Alia P, Soler J, Gomez JM. (2007) Low 25-hydroxyvitamin D concentrations in obese women: Their clinical significance and relationship with anthropometric and body composition variables. *J Endocrinol Invest*, 30:653-658.

- 112 Stein EM, Strain G, Sinha N, Ortiz D, Pomp A, Dakin G, McMahon DJ, Bockman R, Silverberg SJ. (2009) Vitamin D insufficiency prior to bariatric surgery: Risk factors and a pilot treatment study. *Clin Endocrinol*, 71:176-183.
- 113 Jorde R, Grimnes G. (2011) Vitamin D and metabolic health with special reference to the effect of vitamin D on serum lipids. *Prog Lipid Res*, 50:303-312.
- 114 Hobaus J, Hummel DM, Thiem U, Fetahu IS, Aggarwal A, Mullauer L, Heller G, Egger G, Mesteri I, Baumgartner-Parzer S, Kallay E. (2013) Increased copy-number and not DNA hypomethylation causes overexpression of the candidate proto-oncogene CYP24A1 in colorectal cancer. *Int J Cancer*, 133:1380-1388.
- 115 Wijnhoven TM, van Raaij JM, Spinelli A, Rito AI, Hovengen R, Kunesova M, Starc G, Rutter H, Sjoberg A, Petrauskiene A, O'Dwyer U, Petrova S, Farrugia Sant'angelo V, Wauters M, Yngve A, Rubana IM, Breda J. (2013) Who european childhood obesity surveillance initiative 2008: Weight, height and body mass index in 6-9-year-old children. *Pediatr Obes*, 8:79-97.
- 116 Freedman DS, Dietz WH, Srinivasan SR, Berenson GS. (2009) Risk factors and adult body mass index among overweight children: The Bogalusa heart study. *Pediatrics*, 123:750-757.
- 117 Whitaker RC, Wright JA, Pepe MS, Seidel KD, Dietz WH. (1997) Predicting obesity in young adulthood from childhood and parental obesity. *N Engl J Med*, 337:869-873.
- 118 Lillycrop KA, Burdge GC. (2011) Epigenetic changes in early life and future risk of obesity. *Int J Obes*, 35:72-83.
- 119 Pinnick KE, Karpe F. (2011) DNA methylation of genes in adipose tissue. *Proc Nutr Soc*, 70:57-63.
- 120 Champion J, Milagro F, Martinez JA. (2010) Epigenetics and obesity. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 94:291-347.
- 121 Lavebratt C, Almgren M, Ekstrom TJ. (2012) Epigenetic regulation in obesity. *Int J Obes*, 36:757-765.
- 122 Mutt SJ, Hypponen E, Saarnio J, Jarvelin MR, Herzig KH. (2014) Vitamin D and adipose tissue-more than storage. *Front Physiol*, 5:228.

- 123 Wong KE, Szeto FL, Zhang W, Ye H, Kong J, Zhang Z, Sun XJ, Li YC. (2009) Involvement of the vitamin D receptor in energy metabolism: Regulation of uncoupling proteins. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 296:820-828.
- 124 Chen M, Macpherson A, Owens J, Wittert G, Heilbronn LK. (2012) Obesity alone or with type 2 diabetes is associated with tissue specific alterations in DNA methylation and gene expression of PPARGC1A and IGF2. *J Diab Res Clin Metab*, 1:16
- 125 Hernandez-Valero MA, Rother J, Gorlov I, Frazier M, Gorlova O. (2013) Interplay between polymorphisms and methylation in the h19/IGF2 gene region may contribute to obesity in mexican-american children. *J Dev Orig Health Dis*, 4:499-506.
- 126 Heijmans BT, Kremer D, Tobi EW, Boomsma DI, Slagboom PE. (2007) Heritable rather than age-related environmental and stochastic factors dominate variation in DNA methylation of the human IGF2/h19 locus. *Hum Mol Genet*, 16:547-554.
- 127 Smith A, Hung D. (2017) The dilemma of diagnostic testing for Prader-Willi syndrome. *Transl Pediatr*, 6:46-56.
- 128 Monaghan KG, Wiktor A, Van Dyke DL. (2002) Diagnostic testing for Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome: A cost comparison. *Genet Med*, 4:448-450.
- 129 Ács O, Péterfia B, Hollósi P, Luczay A, Török D, Szabó A. (2017) Methylation status of CYP27B1 and IGF2 correlate to BMI SDS in children with obesity. *Obes Facts*, 10:353-362.
- 130 Ács OD, Péterfia B, Hollósi P, Haltrich I, Sallai Á, Luczay A, Buiting K, Horsthemke B, Török D, Szabó A, Fekete Gy. (2018) Rapid first-tier genetic diagnosis in patients with Prader–Willi syndrome. *Orv Hetil*, 159: 64–69.

XI. Saját publikációk jegyzéke

A disszertáció témájához kapcsolódó publikációk:

Ács O, Péterfia B, Hollósi P, Luczay A, Török D, Szabó A. (2017) Methylation Status of CYP27B1 and IGF2 Correlate to BMI SDS in Children with Obesity. *Obes Facts*, 10:353-362.

Ács OD, Péterfia B, Hollósi P, Haltrich I, Sallai Á, Luczay A, Buiting K, Horsthemke B, Török D, Szabó A, Fekete Gy. (2018) Rapid first-tier genetic diagnosis in patients with Prader–Willi syndrome. *Orv Hetil*, 159: 64–69.

A disszertáció témájához NEM kapcsolódó publikációk:

Grolmusz VK, Acs OD, Feldman-Kovács K, Szappanos Á, Stenczer B, Fekete T, Szendei G, Reismann P, Rác K, Patócs A. (2014) Genetic variants of the HSD11B1 gene promoter may be protective against polycystic ovary syndrome. *Mol Biol Rep*, 41:5961-9.

Pap D, Sziksz E, Rokonay R, Ács O, Szabó A. (2014) D-vitamin szerepe a vesefibrózis patomechanizmusában. *Gyermekgyógyászat*, 65: 137-139.

Ács TB, Szappanos Á, Likó I, Majnik J, Ács O, Boyle B, Tóth M, Rác K, Patócs A. (2011) Glükokortikoidok iránti rezisztencia: új molekuláris mechanizmusok, új klinikai ismeretek. *Magy Bel Arch*, 64: 257-265.

XII. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom mindazoknak, akik az elmúlt években tudományos pályafutásom elindulásától kezdve segítségemre voltak.

Köszönöm témavezetőmnek, Szabó András professzor úrnak, a belém vetett bizalmát, a kutatás lehetőségének megteremtését, folyamatos támogatását és hasznos tanácsait. Köszönöm témavezetőmnek, dr. Török Dórának a kutatás megtervezésétől és kivitelezésén át, a publikációk és jelen értekezés megszületésében nyújtott segítségét, értékes, jobbító kritikáit és tanácsait.

Köszönettel tartozom Fekete György professzor úrnak, akinek segítségével bepillantást nyerhettem nemzetközi szinten elismert labordiagnosztikába. Köszönöm biztatását, hasznos észrevételeit, precíz hozzáállását és útmutatását.

Köszönöm dr. Luczay Andreának és dr. Sallai Ágnesnek a klinikai gyakorlatban, valamint a betegekkel való kommunikációban nyújtott segítségét. Köszönöm dr. Haltrich Irénnek a publikációk írása során nyújtott támogatását és útmutatását.

Szeretnék köszönetet mondani, korábbi tudományos diákköri témavezetőmnek, dr. Patócs Attilának, akinek a labormunka és a tudományos élet alapjainak megismerését köszönhetem. Köszönöm a laboratóriumi munkában való közreműködését dr. Nyíró Gábornak és dr. Baghy Kornéliának. Köszönöm Kovalszky Ilona professzor asszonynak a kutatási hely biztosítását, a szakszerű körülményeket és a technikai segítséget. Köszönöm dr. Hollósi Péternek és dr. Péterfia Bálintnak a kutatólabor jó hangulatát, a közös munkát, tanácsaikat, lelkesedésüket, és magas színvonalú szakmai hozzáállásukat.

Köszönettel tartozom Bernhard Horsthemke és Karin Buiting professzoroknak a korszerű Prader-Willi-szindróma diagnosztikának megismertetésért, a németországi Duisburg-Essen Egyetemen töltött időért és szíves vendéglátásukért, valamint hasznos, elméleti és gyakorlati tanácsaikért.

Köszönöm dr. Horváth Klárának, dr. Németh Krisztinának és Staub Krisztinának a sokat jelentő statisztikai, technikai és emberi segítséget.

Hálával tartozom férjemnek, dr. Varsányi Péternek és gyermekeinknek, Varsányi Fülöp Bencének és Varsányi Lenkének lelkes támogatásukért, türelmükért és szeretetükért.

Köszönöm Szüleimnek a belém vetett rendíthetetlen bizalmukat, tanácsaikat és lelkesítésüket. Köszönöm bátyámnak, dr. Ács Tamás Bencének, hogy első tudományos szárnyesapásaimtól kezdve támogatott, hitt bennem és bár már nem lehet közöttünk, tanácsai, példamutató szorgalma és élete jelentős erőforrást jelent mind a mai napig.

XIII. Mellékletek

XIII. 1. A vizsgált gyermekek szülei által kitöltött kérdőív

Tisztelt Szülő!

A kérdőív kitöltésével a Semmelweis Egyetem II. sz. Gyermekklinikán folyó, a célzott és hatékony gyógyítást segítő kutatáshoz járul hozzá. Az adatokat bizalmasan kezeljük, az adatvédelmi szabályokat és a betegjogokat mindvégig figyelemben tartjuk.

Köszönjük közreműködését!

Gyermek neve:

Születési dátuma:

A TERHESSÉG ALATT AZ ÉDESANYA

1. Volt-e beteg?
 Igen (Mi:)
 Nem

2. Volt-e magasabb vérnyomása?
 Igen (Mennyi:)
 Nem

3. Mérték-e magasabb vércukrot?
 Igen (Mennyi:)
 Nem

4. Voltak-e gyakori hányásai?
 Igen
 Nem

5. Szedett-e gyógyszert?

Igen (Mit:)

Nem

6. Szedett-e terhesvitamint?

Igen

Nem

7. Szedett-e folsavat?

Igen

Nem

8. Szedett-e vasat?

Igen

Nem

9. Szedett-e D-vitamint?

Igen

Nem

10. Dohányzott-e?

Igen

Nem

11. A kismama környezetében dohányoztak-e?

Igen

Nem

12. a) Mennyi volt a terhesség alatti testsúlynövekedése?

..... kg

b) Sikerült-e leadni?

Igen

Mennyi idő alatt?

Nem

13. Szülés módja:

sima (hüvelyi)

császármetszés

egyéb:

14. Ha nem sima, hüvelyi szülés volt, miért, milyen beavatkozásra volt szükség?

.....

.....

AZ ÚJSZÜLÖTT

1. Mennyi időre született?

súlya:

hossza:

Apgar érték:

2. Hányadik napon adták haza a kórházból?

3. a) Besárgult?

Igen

Nem

b) Ha igen, igényelt-e kezelést?

Igen

Nem

4. Az első órákban, napokban volt-e szükség orvosi beavatkozásra
(PIC, oxigén, gyógyszer, stb)?

Igen

Nem

5. Mióta észlelik, hogy túlsúlyos a gyermek?

6. Mi történt ekkor a gyermek életében (pl. költözés, iskolaváltás, stb)?

.....
.....
.....
.....
.....
.....

A GYERMEK JELENLEG

1. a) Sportol-e a tornaórán kívül?

Igen

Nem

b) Ha igen: Mit, mennyit?

2. Hányszor eszik egy nap?.....

3. Írja le a gyermek tipikus étkezéseit!

REGGELI:

TÍZÓRAI:

EBÉD:

UZSONNA:

VACSORA:

EGYÉB:

.....

A CSALÁDBAN FORDULT ELŐ/VAN-E?

a) Magas vérnyomás:

Igen (Ki:.....)

Nem

b) Cukorbetegség:

Igen (Ki:.....)

Nem

c) Szívinfarktus:

Igen (Ki:.....)

Nem

d) Agyvérzés:

Igen (Ki:.....)

Nem

e) Érszűkület:

Igen (Ki:.....)

Nem

f) Túlsúly:

Igen (Ki:.....)

Nem

g) Dohányzás:

Igen (Ki:.....)

Nem

dátum:

XIV. 2. A gyermekek szüleinek szóló betegtájékoztató

BETEGTÁJÉKOZTATÓ

A téma címe:

Biomarkerek összefüggése a metabolikus és kardiovaszkuláris szövődeményekkel gyermekkori elhízásban. Epigenetikai tényezők és a D-vitamin szerepe.

Vizsgálóhely neve: Semmelweis Egyetem, II. számú Gyermekklinika

Vizsgálóhely címe: Budapest, 1094, Tűzoltó u. 7-9.

Projektvezető: Prof. Dr. Szabó András intézetvezető

Tisztelt Szülők!

Az elhízás, ezen belül a gyermekkori elhízás egyre több gyermeket érint, akik már korai életkortól ki vannak téve az elhízás káros, végső soron az életet megrövidítő egészségi következményeinek (magas vérnyomás, cukorbetegség, érbetegségek, szívinfarktus). A mindennapi tapasztalat is azt mutatja, hogy az elhízás kialakulásában nem csak életmódbeli, hanem „alkati” tényezők is szerepet játszanak. A közelmúlt genetikai vizsgálatai azonosítottak örökletes elemeket, amik az elhízás nagyobb rizikójához hozzájárulnak, de az „elhízásra hajlamos alkat” egzakt, természettudományok számára megfogható biokémiai alapja részleteiben ismeretlen.

Kutatásaink a testsúly szabályozásának és az elhízás folyamatának jobb megismerését célozzák. A Klinikánkon folyó kutatás keretében arra a kérdésre szeretnénk választ kapni, van-e összefüggés egyes anyagcsere-paraméterek, D-vitamint-szint és genetikai tényezők között. Eredményeinkkel az elhízás és annak szövődeményeinek megelőzéséhez, gyógyításához, a túlsúlyos gyermekek jobb ellátásához szeretnénk további tudást gyűjteni. Ehhez a munkához szükségünk van arra, hogy a klinikai, betegellátási célú vizsgálatok után megmaradó vérvételi mintából DNS-t vonhassunk ki, és ezt kutatási célokra felhasználhassuk.

Az így nyert DNS-t kizárólag kutatási célokra kívánjuk felhasználni, új orvosi eljárások és gyógyszerek kifejlesztésére.

A kutatások eredményeiből előreláthatólag betegeinknek azonnali közvetlen előnye nem származik, hosszútávon remélhető az eredmények gyakorlati hasznosítása.

A vizsgálat betegeinknek plusz megterhelést vagy kockázatot nem jelent, mivel egyébként megsemmisítésre kerülő, maradék vérmintát használunk fel.

A Nyilatkozat aláírásával Ön hozzájárul ahhoz, hogy kezelőorvosa az alábbi személyes adatokat összegyűjtse: a gyermek születési dátuma, neme, korábbi és jelenlegi betegségeire vonatkozó adatok, családban előforduló betegségek.

A DNS-minták egy kóddal lesznek védve, személyes adatok a mintavételi csövekre nem kerülnek. Betegeink adatait a hatályos adatvédelmi jogszabályoknak megfelelően kezeljük. A vizsgálat eredményei a szakirodalomban megjelenhetnek, de a betegek személye nem lesz azonosítható. A DNS-mintát anonimizált módon tároljuk és a fentiekől eltérő célra nem használhatjuk az Ön írásbeli beleegyezése nélkül.

Kérjük, hogy a mellékelt Beleegyező nyilatkozat aláírásával adja hozzájárulását a maradék vérminta kutatási célú felhasználásához, DNS kivonásához, valamint a minta tárolásához az elhízás jövőbeni gyógyításának támogatása céljából.

Hozzájárulásával a „Biomarkerek összefüggése a metabolikus és kardiovaszkuláris szövődeményekkel gyermekkori elhízásban. Epigenetikai tényezők és a D-vitamin szerepe” című 2012-2017 között zajló kutatási témát támogatja.

A vizsgálatban való részvételről Ön dönt. Ha úgy dönt, hogy visszautasítja a vizsgálatban való részvételt, semmilyen hátránya nem fog származni, gyermeke továbbra is jogosult marad az Öt megillető orvosi ellátásra.

Beleegyezését később is bármikor visszavonhatja akár szóban, akár írásban, indoklás nélkül is anélkül, hogy ebből gyermekének hátránya származna.

A résztvevő számára a kutatással összefüggő kár bekövetkezése esetén nyújtandó kezelést, kártérítést és kártalanítást a Semmelweis Egyetem Allianz Biztosítóval kötött felelősség-biztosítása fedezi.

A vizsgálat során a Helsinki Deklaráció elvét minden tekintetben betartjuk.

A fenti vizsgálatok az Egészségügyi Tudományos Tanács Kutatásetikai Bizottság engedélyével történnek.

A Semmelweis Egyetem Intézményi Kutatásetikai Bizottság elnöke Prof. Sótonyi Péter, telefon: +36 1 215-7300

Független orvos: Dr. Veres Gábor egyetemi docens, telefon: +36 1 459-1500/52650
Segítségét nagyon köszönjük!

Budapest, 201.....

Tájékoztatást végző orvos aláírása

Prof. Dr. Szabó András
kutatásvezető
Semmelweis Egyetem
II. sz. Gyermekklinika Igazgatója

XV. 3. A gyermekek szülei által aláírt beleegyező nyilatkozat

BELEEGYEZŐ NYILATKOZAT

A mellékelt betegtájékoztatót elolvastam és hozzájárulok, hogy gyermekem vizsgálata során megmaradó vérmintából kinyert DNS a „Biomarkerek összefüggése a metabolikus és kardiovaszkuláris szövődményekkel gyermekkori elhízásban. Epigenetikai tényezők és a D-vitamin szerepe” című 2012-2017 között zajló kutatási téma megvalósítása során, kutatási célra való felhasználásához

b, a minták tárolásához anonimizált formában

c, a vizsgálatokra a Semmelweis Egyetem II. számú Gyermekklinikán kerül sor

d, a kutatás vezetője Prof. Dr. Szabó András klinika igazgató

A mintát adó neve (nyomtatott betű):

Anyja neve:

Születési helye, ideje:

TAJ szám:

Kijelentem, hogy a kutatásban történő részvételre vonatkozó beleegyezésem a fenti kutatási témára vonatkozó tájékoztató elolvasását követően, önként, befolyástól mentesen adom, annak tudatában, hogy az bármikor, szóban vagy írásban, indoklás nélkül visszavonható.

Budapest, 201.....

Tájékoztatót végző orvos aláírása

A szülő, vagy törvényes képviselő
Aláírása

Neve nyomtatott betűkkel

Születési helye, ideje

A két példányban aláírt Tájékoztató és Beleegyező Nyilatkozat egyik példánya az Öné, a másikat a vizsgálóhely őrzi.