Eltérő életkori sajátságokat mutató neurológiai kórképek genetikai vizsgálata

Doktori (Ph.D.) értekezés

Török Nóra

Témavezetők: Dr. Vécsei László MD., Ph.D., DSc., tanszékvezető egyetemi tanár
Dr. Klivényi Péter MD., Ph.D., DSc., egyetemi tanár

Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar, Neurológiai Klinika,
MTA-SZTE Idegtudományi Kutatócsoport

Biológia Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar

2019

Szeged

Tartalomjegyzék 1

Rövidítések jegyzéke 3
1. Bevezetés 4
1.1 Parkinson-kór és a kinurenin rendszer ismertetése 4
1.2 Amiotrófiás laterálszklerózis ismertetése, a betegség kapcsolata a D-vitaminnal 9
1.3 A CCR5 lókusz és a szklerózis multiplex betegség kapcsolata, a betegség jellemzése 12
2. Célkitűzések 16
2.1 Célkitűzések a Parkinson-kór és a kinurenin útvonal vizsgálatban 16
2.2 Célkitűzések az amiotrófiás laterálszklerózis vizsgálatban 17
2.3 Célkitűzések a szklerózis multiplex vizsgálatban 17
3. Anyag és módszer 21
3.1 A biobank létrehozása 19
3.2 Vérminragyűjtés és tárolás 19
3.3 Beteg és kontroll minták a három genetikai elemzésben 20
3.3.1 A beteg és kontroll minták összegzése a Parinson-kór tanulmányban 20
3.1.2 A beteg és kontroll minták összegzése az amiotrófiás laterálszklerózis vizsgálat kapcsán 21
3.3.3 A beteg és kontroll minták jellemzői a szklerózis multiplex vizsgálatban 22
3.4 DNS izolálás 24
3.5 Genotipizálás 25
3.5.1 Genotipizálás a Parkinson-kór vizsgálatban 26
3.5.2 Genotipizálás az amiotrófiás laterálszklerózis tanulmányban 27
3.5.3 Genotipizálás a szklerózis multiplex kutatásban 30
3.6 Statisztika 32
4. Eredmények 33
4.1 Parkinson-kór és a kinurenin rendszer kapcsolata 33
4.2 Amiotrófiás laterálszklerózisban a D vitamin szerepe 38
4.3 A CCR5 lókusz szerepe a szklerózis multiplexben 45
5. Diszkusszió 56
5.1 A Parkinson-kór vizsgálat eredményeinek elhelyezése a szakirodalomban 56

5.2 Az amiotrófiás laterálszklerózis kutatás eredményeinek elhelyezése a szakirodalomban 57
5.3 A szklerózis multiplex tanulmány eredményeinek elhelyezése a szakirodalomban 60
6. Köszönetnyilvánítás 69
7. Irodalomjegyzék 71
8. Összefoglaló 82
9. Summary 87
10. Publikációs lista 92
11. Függelék 94
12. A tézishez köthető publikációk 97

Rövidítések jegyzéke

AD: Alzheimer's disease, Alzheimer-kór

ALS: amyotrophic lateral sclerosis, amiotrófiás laterálszklerózis

BMI: body mass index, testtömeg-index

CCR5: chemokine receptor V, kemokin receptor V

CNS: central nervous system, központi idegrendszer

DBS: deep brain stimulation, mély agyi stimuláció

EDSS: expanded disability status scale, rokkantság mértékét jelző skála (lásd Függelék)

3-HK: 3-hydroxykynurenine, 3-hidroxi kinurenin

5-HT: 5-hydroxytryptamine, 5-hidroxi triptamin, serotonin

HIV: human immunodeficiency virus, emberi immunhiány-előidéző vírus, HIV vírus

HUSRB: Hungary-Serbia IPA Cross-border co-operation Programme, Magyarország-Szerbia IPA Határonátnyúló Együttműködési Program

HWE: Hardy-Weinberg equilibrium, Hardy-Weinberg egyensúly

IDO: indolamine-2,3-dioxygenase, indolamin-2,3-dioxigenáz

KAT: kynurenine aminotransferase, kinurenin aminotranszferáz

KMO: kynurenine-3-monooxygenase, kinurenin-3-monooxigenáz

KP: kynurenine pathway, kinurenin útvonal

KYN: kynurenine, kinurenin

KYNA: kynurenic acid, kinurénsav

MHC: major histocompatibility complex, fő hisztikompatibilitási faktor

NAD: nicotinamide adenine dinucleotide, nicotinsavamid-adenin-dinukleotid

PD: Parkinson's disease, Parkinson-kór

QUIN: quinolinic acid, kvinolénsav

RFLP: restriction fragment lenght polymorphism. restrikciós fragment hossz polimorfizmus

RR: relapsing/remitting, relapszáló-remittáló

SM: multiple sclerosis, szklerózis multiplex

SNP: single nucleotide polymorphism, egy nukleotid polimorfizmus

SP: secunder progressive, szekunder progresszív

TDO: tryptophan dioxygenase, triptofán-2,3-dioxigenáz

VDR: vitamin D receptor, D-vitamin receptor

1. Bevezetés

Doktori értekezésemben három neurodegeneratív betegségtípus, a Parkinson-kór (PD), a szklerózis multiplex (SM) és az amiotrófiás laterálszklerózis (ALS) genetikai hátterének vizsgálata során nyert eredményeinket mutatom be.

A PD bármely életkorban előfordulhat, akár igen fiatal felnőtt korban is, azonban az ismeretlen eredetű ("idiopátiás") PD az idős, 60 év feletti populáció betegsége. Férfiaknál valamivel gyakoribb a megjelenése. Magyarországon a becslések alapján 16-20.000 beteg él.

Az ALS szintén bármely életkorban előfordulhat (fiatalabb korban megjelenő betegségnél döntő szerepe van a genetikai érintettségnek), azonban a szórványos esetek leginkább 40 és 60 éves kor között jelennek meg. A betegség előfordulása 5,40/100.000 fő, ami Magyarországra vetítve (10 milliós népességét alapul véve) 540 új eset megjelenését jelenti évente.

A SM a világon körülbelül 2,5 millió embert érint. A kórkép egyre súlyosbodó (progrediáló) betegség, mely a fiatal felnőtt populáció leggyakoribb idegrendszeri bántalma. A nők érintettsége magasabb, hajlamosabbak a betegség kialakulására. Jellemzően az első tünetek a 20. és az 50. életév között jelennek meg. Az SM esetében jellegzetes földrajzi megoszlást is megfigyelhetünk, ugyanis az egyenlítőtől a sarkok felé haladva nő az előfordulási gyakorisága. Léteznek azonban olyan népcsoportok, akik északabbra élnek, de a betegség kockázata náluk mégis alacsony. Ilyenek a lappok (Pugliatti, Sotgiu, and Rosati 2002), kanadai inuitok (Milo and Kahana 2010). Azonban délebbre, ahol a betegség kockázata alacsony, is élnek olyan népek, palesztinok és a párszik (Pugliatti, Sotgiu, and Rosati 2002), akiknél magasabb a betegségkockázat. A földrajzi megoszlás oka nem egyértelműen tisztázott (Milo and Kahana 2010), de kimutatták, hogy a D vitamin koncentráció késői kamaszkorban és kisgyermekkorban meghatározó protektív szereppel bír (Ascherio, Munger, and Simon 2010). A rasszok közül az europid rassz érintettsége magasabb, így a fehér emberek betegségének tartják. Európában átlagosan 10.000 emberből 5-20 betegszik meg SM-ben. Magyarországon körülbelül 7-8000-re tehető a betegek száma.

1.1. Parkinson-kór és a kinurenin rendszer ismertetése

A kór első leírójáról, James Parkinsonról kapta a nevét (Kempster, Hurwitz, and Lees 2007). A PD főleg az idős populációt érintő krónikus, progresszív neurológiai kórkép, melynek patológiai jellemzői: a substantia nigra pars compacta területére összpontosuló dopaminerg sejtelhalás, valamint Lewy testek jelenléte az agyszövetben. A betegség kialakulásában és patológiájában szerepet játszó főbb mechanizmusok az oxidatív stressz, a

mitokondriális zavar, a fehérje aggregációk, az excitotoxicitás, a különböző immunológiai elváltozások, valamint a genetikai hajlam (Greenamyre et al. 1999; Blandini 2010; Jenner 2003; Oczkowska, Kozubski, and Dorszewska 2014; Caudle and Zhang 2009; Reale et al. 2009; Spatola and Wider 2014). Jellegzetes tünetei: a nyugalmi remegés (tremor), izommerevség (rigor), meglassultság (bradikinézia), a kenőcsös arc (seborrhoea), csökkent arcmimika (hipomimia) és a tartási instabilitás (Majlath et al. 2016). A betegek számára a mozgások elkezdése, a felállás, elindulás a legnehezebb. A betegséget gyakran kíséri depresszió és a gondolkodás meglassulása. A tudomány jelenlegi állása szerint gyógyíthatatlan, de kezelhető kórkép. Terápiás palettáján a gyógyszeres kezelés, a műtéti megoldások, a gyógytorna és a fizikoterápia szerepel. A dopamin gyógyszeres pótlásával a tünetek éveken keresztül csökkenthetőek. A dopaminpótlás kétféle megközelítéssel történhet: dopaminagonistákkal (dopaminhatást kifejtő gyógyszerek) és levodopával (dopamintermelés előanyaga). A gyógyszeres kezelés mellett idővel mellékhatások jelentkeznek, mint például a jó és a meglassult állapot váltakozása (fluktuáció) vagy a túlmozgások (diszkinézia), melyek erősen kihatnak a betegek életminőségére. Amikor a gyógyszeres terápiás lehetőségek kimerülnek, az orvosok kétféle műtéti megoldást javasolnak: az ablációs - roncsolásos és a stimulációs kezeléseket. Az utóbbi években a mély agyi stimuláció (deep brain stimulation, DBS) jelentős teret nyert a betegség idegsebészeti kezelésében, mivel kevesebb szövődmény kíséri, mint a kétoldali roncsolásos műtéteket. A DBS műtét során egy- vagy kétoldali elektródát ültetnek be a kórosan működő agyterületre, amelynek a speciális ingerlése a kóros működést csillapítja, így eredményezve a tünetek javulását.

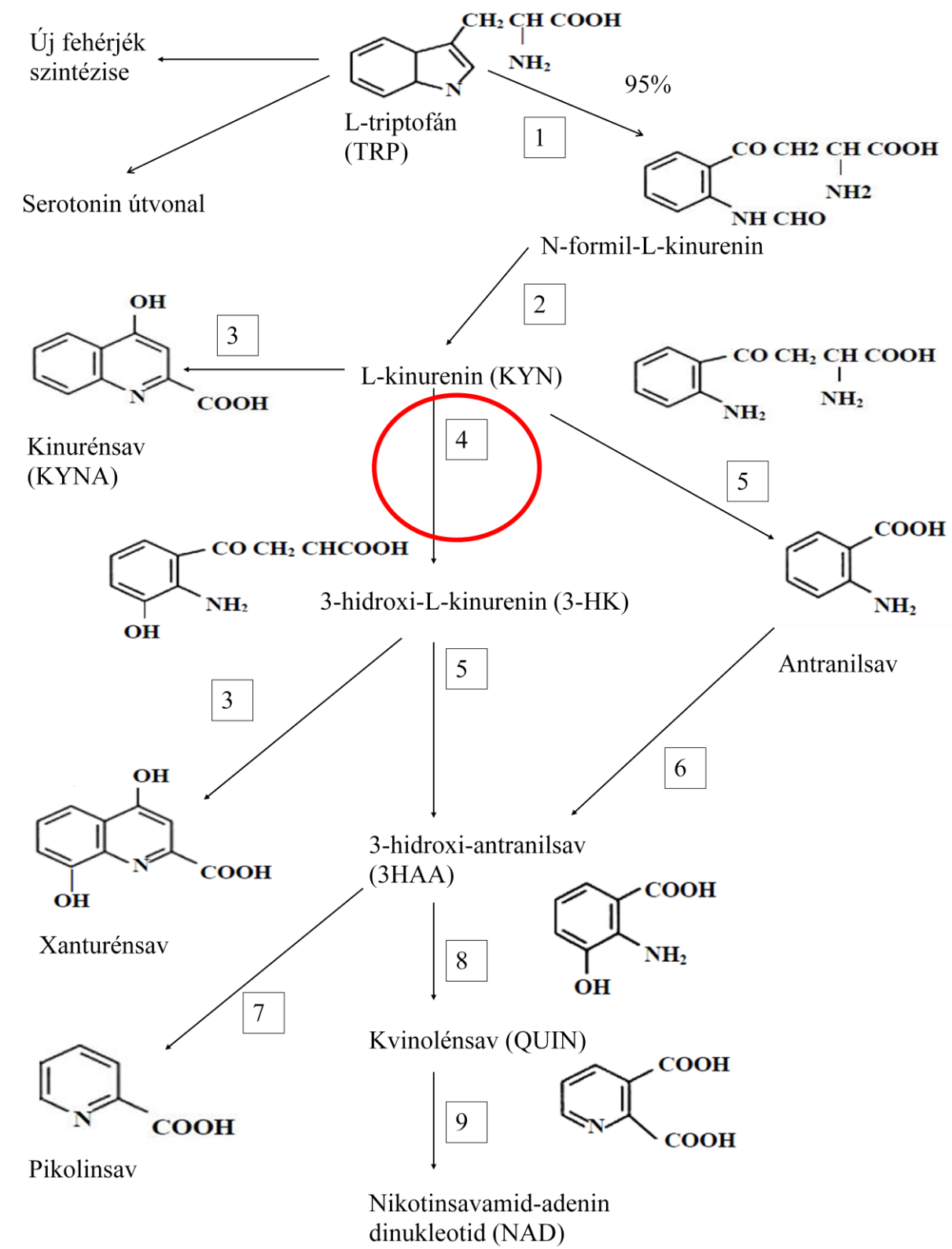
Korábbi vizsgálatok felvetették a triptofán rendszer megváltozott működésének szerepét PD kapcsán (Schwarcz et al. 2012; Vecsei et al. 2013; Stayte and Vissel 2014). Az emberi agyban a triptofán nagy része (95%) a kinurenin-rendszerbe (KP) kerülve hasznosul, míg kisebb része (5%) a szerotonin-rendszerbe jut, illetve az új fehérjék építőköveiként kerül felhasználásra (1. ábra) (Schwarcz 1993). A KP egy olyan enzimatikus útvonal, mely a nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD) és a NAD foszfát szintéziséért felelős. A központi idegrendszer nem minden sejtje tartalmazza azonban a teljes enzimatikus útvonalat, az infiltrálódó makrofágokban, az aktivált mikroglia sejtekben és a neuronokban teljes az enzimatikus útvonal, míg az asztrocitákban és az oligodendrocitákban hiányzik az útvonal első enzime az indolamin-2,3-dioxigenáz (IDO) és a kaszkád egyik központi enzime a kinurenin-3-monooxigenáz (KMO) (Guillemin et al. 2000). Ennek a két enzimnek a hiányában ezekben a sejtekben nem képződik a neurotoxikus kvinolénsav (QUIN) (Guillemin et al. 2000). A kinurenin rendszer központi metabolitja a kinurenin (KYN), melynek

képződéséért két egymást követő enzimatikus reakció felel. Ezen két enzimatikus lépés végrehajtásában három enzim vesz részt. Az első lépésben az IDO és a triptofán-2,3-dioxigenáz (TDO) enzimek, a másodikban pedig a formamidáz enzim jut szerephez. A kutatócsoportunk által sokat vizsgált kinurénsavhoz (KYNA) egy irreverzibilis transzaminációs reakció után jutunk, melyért a kinurenin aminotranszferázok (KAT) a felelősek. Mind ez idáig négy ilyen KAT enzimet sikerült izolálni (Vecsei et al. 2013; Han, Li, and Li 2004). A KP másik fő ága a neurotoxikus 3-hidroxi kinurenin (3-HK) közti termékkel kezdődik, melyet a KMO enzim alakít át a központi kinurenin vegyületből. A KMO enzim a mitokondrium külső membránjában helyezkedik el (Okamoto et al. 1967). A szerepe kitüntetett, hiszen hiánya esetén az útvonal neurotoxikus termékei nem képződnek, emellett azonban indirekt módon a neuroprotektív kinurénsav koncentrációja is függ az enzim aktivitásától. A kaszkád következő enzime, a kinurenizáz, mely a 3-HK-t konvertálja a szintén neurotoxikus QUIN-vá. Mindkét neurotoxikus vegyület szabadgyök képző, emelett a 3-HK szerepet játszik immunfolymatokban is, míg a QUIN egy NMDA (N-metil-D-aszparaginát) receptor agonista (Vecsei et al. 2013).

Már az 1990-es évek elején megjelentek olyan szakirodalmi adatok, melyek felvetették a PD és a megváltozott, zavart mutató kinurenin és szerotonin útvonalak kapcsolatát. Ilyen bizonyíték például, hogy az alacsony szerotonin (5-HT), KYN, és kinurénsav koncentrációkat mértek a frontális cortex, putamen és substantia nigra pars compacta régiókban a PD-os betegek mintáiban egészséges kontrollokéhoz képest (Ogawa et al. 1992), míg a 3-HK szintje pedig emelkedettebb volt a beteg csoportban (Ogawa et al. 1992). Továbbá igazolt, hogy a szerotoninerg axonok károsodottak (Azmitia and Nixon 2008) és az 5-HT mennyisége is csökkent az agy-gerincvelői folyadékban (Tohgi et al. 1993). Két Parkinson állatmodellben is kimutattak eltéréseket az enzimatikus útvonalban (Knyihar-Csillik et al. 2004; Luchowski et al. 2002; Knyihar-Csillik et al. 2006). A KP-ben eltérések figyelhetőek meg továbbá a perifériás szervek esetében is a vizsgált betegmintákban, mely változások egy protektív mechanizmus részei lehetnek (Hartai et al. 2005). A KYNA neuroprotektív szerepét *in vitro* (Lee et al. 2008) és *in vivo* (Miranda et al. 1997; Butler et al. 1997) kísérleti adatok igazolják.

Az általunk vizsgált KMO gén az 1q42 kromoszóma régióra lokalizálódik és a korábban említett neurotoxikus 3-HK szintézését végzi (Ogawa et al. 1992). Az enzim farmakológiai gátlása elősegíti a neuroprotektív KYNA szintézisét (Samadi et al. 2005), a KMO gén polimorfizmusai pedig befolyással lehetnek a kinurenin metabolizmus neuroprotektív vagy neurotoxikus irányba való eltolódására. Korábban a PD és a KMO gén polimorfizmusai közötti kapcsolatot nem vizsgálták, azonban a skizofrénia és a bipoláris betegség esetében

igen (Holtze et al. 2012; Johansson et al. 2013; Wonodi et al. 2011; Lavebratt et al. 2014). A dopaminerg rendszer és a KP zavara már igazolt skizofrénia kapcsán, hasonlóan a PD-hoz, ez vezetett minket ahhoz, hogy a korábban skizofréniában vizsgált egy nukleotid eltérések (single nucleotide polimorphism, SNP) szerepét megvizsgáljuk PD esetén is.



1. ábra. A triptofán lebontásának kinurenin útvonala és az abban részt vevő enzimek. A módosított ábra forrása: (Torok, Majlath, et al. 2016)

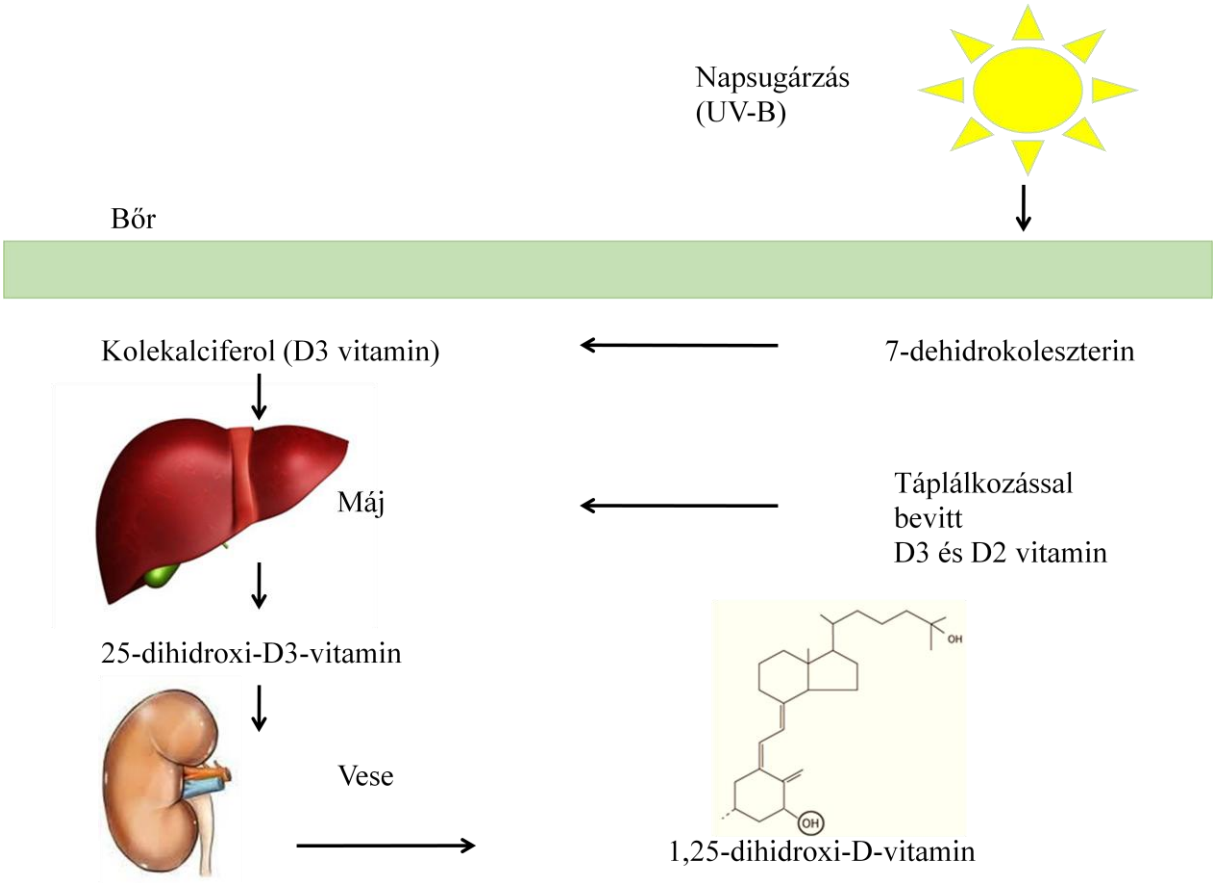
1: triptofán-2,3-dioxigenáz (TDO) és az indolamin-2,3-dioxigenáz (IDO), 2: formamidáz, 3: kinurenin aminotranszferázok (KAT), 4: kinurenin-3-monooxigenáz (KMO), 5: kinurenináz, 6: nem specifikus hidroxiláció, 7: 2-amino-3-carboximuconát-semialdehid decarboxiláz, 8: 3-hidroxiantranilsav dioxigenáz, 9: kvinolénsav-foszforiboziltranszferáz

1.2. Az amiotrófiás laterálszklerózis ismertetése, a betegség kapcsolata a D-vitaminnal

Az ALS egy olyan végzetes neurológiai kórkép, melyben a felső (kortikális) és alsó (spinális és ponto-bulbáris) motoneuronok degenerációja néhány hónap, illetve pár év alatt halált okoz. A betegség diagnózisának kritériumait El Escorialban a World Federation of Neurology határozta meg (lásd Függelék). A betegség gyógyíthatatlan. Az egyetlen gyógyszeres kezelés, a riluzol terápia, csak kismértékű késleltetést eredményez a betegség progressziójában (Jenkins, Hollinger, and McDermott 2014). Az ALS ritka kórkép, incidenciája 2,8/100.000, a prevalenciája pedig 5,40/100.000 Európában (Chio et al. 2013). Magyarországon összesen 600-800 fő közé tehető a betegek száma. Az eseteknek mindössze 10%-a mutat családi halmozódást, a maradék sporadikus előfordulású (Renton, Chio, and Traynor 2014). A genetikai hajlam szerepét a familiáris esetek kapcsán körülbelül ~65%-ra, míg a sproradikus esetek kapcsán ~11%-ra becsülik (Renton, Chio, and Traynor 2014). A nagy kockázatú, a betegség kialakulásáért felelős, illetve az alacsony kockázatú, hajlamot fokozó génekről pontos leírást ad két nemrégiben megjelent tanulmány (Renton, Chio, and Traynor 2014; Marangi and Traynor 2015). A genetikai vizsgálatok hozzájárultak ahhoz, hogy az ALS etiológiájában szerepet játszó mechanizmusokról, szignalizációs útvonalakról pontosabb képet kapjunk. Felvetődött a glutamát excitotoxicitás, a szabadgyökök káros hatása, a mitokondriális zavar, az intracelluláris fehérje aggregáció, a fokozott poli(ADP ribóz) polimeráz aktiváció, az autoimmun gyulladásos folyamatok és az intracelluláris kálcium felhalmozódás szerepe. A glutamát excitotoxicitás, a szabadgyökök károsító hatása és az autoantitestek egyaránt hozzájárulnak az intracelluláris kálcium felhalmozódáshoz a motoneuronokban, ami sejtelhalálhoz vezethet ALS-ben és a betegség állatmodelljeiben (Torok, Torok, et al. 2016). A motoros neuronok sebezhetőségének egyik feltételezett oka, hogy a kálcium kötő fehérjéik szintje (parvalbumin és calbindin-D28K) alacsonyabb, amit génterápia segítségével (Das et al. 2013) vagy D-vitamin pótlással lehet megemelni (Karam et al. 2013; Gianforcaro, Solomon, and Hamadeh 2013).

A D-vitamin a bőrben napfény hatására prohormonjából szintetizálódik (2. ábra). A D-vitamin aktív formája az 1α-25-$(OH)_2D$, ami a nukleáris receptorához (VDR) kötődik és így modulálja az általa befolyásolt gének transzkripcióját, illetve hatással van az ásványi anyag homeosztázisra. A D-vitamin regulálja a szérum kálcium szintjét, mely kihathat különböző immunfunkciókra (Basit 2013). Azok a gének, melyek a hormon metabolizációban vesznek részt kifejeződnek az agyban is. A D-vitamin felelős többek között a neutrópikus faktorok és az indukálható nitrogén-oxid szintáz bioszintéziséért, valamint emeli a glutation szintet. Ezek

mindegyike pedig szerepet játszik az ALS és más neurológiai betegségek pathomechanizmusában.

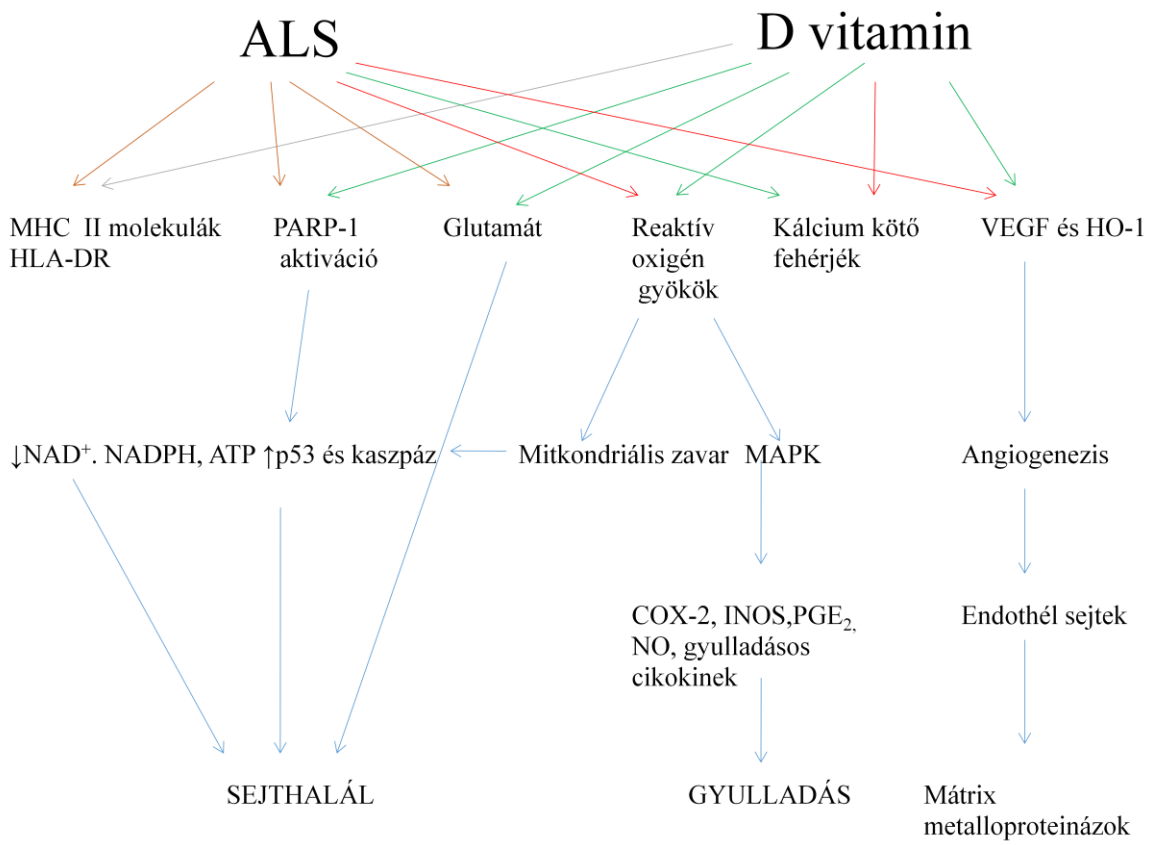


2. ábra. A D-vitamin szintézise. Forrás: (Molnárné Pásztor Gréta 2014)

A bőr koleszterin-anyagcseréje során 7-dehidrokoleszterin keletkezik, mely vegyület a bőrt érő ultraibolya sugarak hatására fotokémiai bomlást szenved. A szteránváz B-gyűrűje felhasad, és több köztes lépés után kolekalciferollá, D_3-vitaminná alakul. A 7-dehidrokoleszterin nagy része a bőrben marad, míg a kolekalciferolt a vérkeringés elszállítja. A D-vitamin eredetileg egyetlen OH-csoportot tartalmazó szteroidszármazék, mely hidroxilációs lépéseken megy keresztül. Az első hidroxilációs lépés helye a máj, ahol a kolekalciferol 25-dihidroxi-D3-vitaminná alakul. A második hidroxilációs lépés helye a vese, ahol a hidroxilációért a proximalis kanyarulatos csatornák sejtjeiben lévő 1α-hidroxiláz enzim a felelős. Ez az enzim hozza létre a 25-OH-kalciferolból 1,25-$(OH)_2$-kalciferolt (más néven kalcitriolt), mely vegyület a biológiailag hatásos hormon, amit helyenként, mint D-vitamin hormont említenek.

Általánosságban elmondható, hogy a D-vitamin csökkentheti a gyulladásos folyamatokat, ami jelentős szerepet játszik a neurodegenerációban, azáltal, hogy modulálja az antigén prezentációt és hatással van a T sejt proliferációra és fenotípusra (Chun et al. 2014). Long és Nguyen a D-vitamin feltételezett genetikai és sejtszignalizációs szerepét vizsgálták ALS-ben, és a betegség G93A transzgenikus egérmodelljében (Long and Nguyen 2013). Genetikai szempontból a D vitamin hatásmechanizmusát az MHC II molekulákkal, a Toll-like

receptorokkal, a poly(ADP-ribóz) polimerázokkal (PARPs), Heme oxygenáz-1-gyel, a kálcium-kötő fehérjékkel és a NADPH oxidáz (Nox) enzim komplexszel hozták összefüggésbe. A sejtszignalizációs szerepénél pedig a glutamátra, a mátrix metalloproteinázokra, a mitogén-akitivált protein kinázokra (MAPKs), a wnt/β-catein szignalizációs útvonalra, a prosztaglandinokra, a reaktív oxigén gyökökre (ROS) és a nitrogén-monoxidra (NO) kifejtett hatásait foglalták össze (3. ábra).



3. ábra. A D vitamin kedvező hatásai ALS-ben (Long and Nguyen 2013)
Jelmagyarázat: ↑: aktivált, emelkedett, ↑: csillapított, csökkent

A VDR gén a 12q13.11 kromoszóma régióra lokalizálódik, és a D vitamin nukleáris hormon receptorát kódolja. A VDR gén és egyes neurológiai kórképek kapcsolatáról számos szakirodalmi adat áll rendelkezésre (Torok et al. 2013; Chen et al. 2017; Abdollah Zadeh et al. 2017; Bettencourt et al. 2017; Laczmanski et al. 2015), azonban az ALS-el összefüggésben limitált az adatok mennyisége (Kamel et al. 2003).

1.3. A CCR5 lókusz és a szklerózis multiplex betegség kapcsolata, a betegség jellemzése

Az SM egy olyan autoimmun központi idegrendszert érintő neurodegeneratív kórkép, mely főleg a fiatal felnőtt populációt érinti és az esetek felében a visszafordíthatatlan szövetkárosodás miatt rokkantsághoz vezet. Elnevezése és első leírása a híres francia neurológus, Dr. Jean Martin Charcot nevéhez köthető. A betegség kiváltója a központi idegrendszer fehérállományának gyulladása, melynek következtében károsodnak az idegsejtek és az őket körülvevő mielin. A kórkép a fiatal felnőttek leggyakoribb idegrendszeri megbetegedése, a világon 2,5 millió embert érint, a nők körében gyakoribb előfordulású. Földrajzi eloszlására jellemző, hogy egyenlítőtől a sarkok felé haladva nő az előfordulási gyakorisága. Tünetei leggyakrabban a 20. és az 50. életév között jelennek meg, majd elindul a kórképre jellemző progresszió. Jellemzően a következő tünetekkel jelentkezik: homályos látás, izomgyengeség, szédülés, zsibbadás, kettőslátás. A Csongrád megyében élők standardizált prevalenciája 83,7/100.000 (Zsiros et al. 2014). Magyarországon 7-8000-re tehető a SM-es betegek száma. Csongrád megyében 20 év alatt a klinikán kezelt SM betegek 64 százaléka az SM-hez köthető halálok miatt hunyt el (Sandi et al. 2016).

Az SM kórlefolyása változó, a tünetek gyakorisága és mintázata alapján kezdetben négy kórformát különítettek el (Lublin and Reingold 1996). A betegek kb 85%-a az úgynevezett intermittáló kórformákba sorolható (relapszáló-remittáló, szekunder progresszív vagy relapszáló progresszív), míg a 15%-ukra a primer progresszív forma jellemző. Később pedig további két további kórformával bővítették a csoportosítást, emellett (????) bevezették a klinikailag és a radiológiailag izolált szindróma fogalmát (Lublin et al. 2014). A most elfogadott és alkalmazott gyakorlat szerint legalább két, időben és térben elkülöníthető, neurológiai tünetekkel járó állapotrosszabbodás, illetve góc kimutatásával adható klinikailag határozott, egyértelmű diagnózis a kórképről.

I. <u>Relapszáló-remittáló SM (RRSM):</u>

A leggyakoribb kórforma, az újonnan diagnosztizált esetek 65-80%-a sorolható ebbe a csoportba. Általában az első tünetek 20-40 éves kor között jelentkeznek. Az első időszakban a betegek állapotában egy hullámzás figyelhető meg, leromlás (relapszus, shub) és javulás (remisszió) fázisai váltakoznak. A kezdeti tünetek 1-2 hét alatt spontán javulhatnak, ennek oka a remyelinizáció. Idővel az állapot-romlások már maradványtüneteket eredményeznek. A relapszusokkal és remissziókkal jellemezhető időszak néhány évtől akár egy-két évtizedig is

eltarthat. Kezelés nélkül azonban a betegek mintegy 40%-a 10 év után szekunder krónikus progresszív stádiumba kerül.

II. Primer progresszív SM (PPSM):

A betegek kisebb részénél, kb 15%-ánál a betegség kezdetétől a klinikai tüneteket lassú és folyamatos progressziója figyelhető meg legalább egy éven keresztül. Ennél a kórformánál az első tünetek 40 éves kor felett jelentkeznek és a nőket ugyanolyan arányban érinti, mint a férfiakat.

III. Szekunder progresszív SM (SPSM):

Az RRSM betegek 90%-a az évek során a maradványtünetek felhalmozódása következtében ebbe a kórformába lép. Ekkorra már irreverzibilis idegrendszeri károsodások történnek, visszafordíthatatlan rokkantság alakul ki.

IV. Relapszáló-progresszív SM (RPSM):

A legritkább forma, a betegek alig 5%-ra sorolható ide. Jellemzi a progresszív lefolyás, de előfordulhatnak akut relapszusok is, melyek után a kezdeti állapot nem áll helyre.

V. Klinikailag izolált szindróma (CIS):

A CIS az SM első fázisa, az első SM-re utaló demielinizációs tünet utáni állapot. Ha a klinikai tünet térben és időben elválik egymástól, akkor a McDonald kritériumok szerint a klinikailag definitív SM igazolódik (Polman et al. 2011).

VI. Radiologiailag izolált szindróma (RIS):

Azokat a betegeket sorolják ebbe a kórformába, akinek a koponya MRI vizsgálata sclerosis multiplexre jellemző eltéréseket mutat, ugyanakkor sem anamnézisük, sem klinikai állapotuk nem utal sclerosis multiplex fennállására.

A betegség etiológiája csak részben ismeretes, a genetikai hajlam egyértelmű szerepet játszik a kialakulásában, azonban felmerül eddigiekben nem azonosított környezeti tényezők és autoimmun gyulladás szerepe. A genetika háttér bizonyított szerepe ellenére (Willer et al. 2003; Hansen et al. 2005; Ebers, Sadovnick, and Risch 1995), azonban csak a fő hisztokompatibilitás komplexet (MHC) sikerült azonosítani, mint hajlamosító lókuszt mind az eset-kontroll, mind pedig a familiáris vizsgálatok kapcsán (Oksenberg and Barcellos 2005; Sawcer et al. 1996; Haines et al. 1996). Azonban az MHC lókusz szerepe nem csak kizárólag

a SM-re, hanem az összes autoimmun betegségre jellemző, ezért olyan hajlamosító és protektív lókuszok azonosítása, melyek SM specifikusak, a kutatás középpontjába kerültek.

Széleskörben ismert, hogy az SM-re jellemző központi idegrendszeri gyulladás velejárója a mielinhüvely elvesztése, az axonális károsodás és a gliózis, melyek együttesen okozzák a progresszív neurológiai működés zavart. A kemokinek (kemoatraktáns citokinek) és a kemokin receptorok kulcsszerepet játszanak a gyulladásos folyamatokban, mivel irányítják az immunsejtek vándorlását, így többek között a T-sejtek vér-agy gáton történő átjutását is, ami feltételezhetően az első lépések egyike az SM kialakulása felé (Matsui 2013; Jatczak-Pawlik et al. 2016).

A kemokin receptor V (CCR5), a kemokin receptor család tagja és a receptora a MIP-1a/CCL3, MIP-1b/CCL4 és a RANTES/CCL5 ligandoknak, nemrégiben az SM vizsgálatok középpontjába került. Humán SM minták vizsgálata kimutata, hogy a receptor kifejeződése a gyulladást mutató agyi régiókban megemelkedik (Baranzini et al. 2000; Simpson et al. 2000; Zang et al. 2000). Ugyanezt tapasztalták a kísérletes autoimmun enkefalomielitiszben, ami az SM állatmodellje (Rajan et al. 2000; Eltayeb et al. 2003).

A CCR5 gén, mely számos néven ismert (CKR5, CCR-5, CD195, CKR-5, CCCKR5, CMKBR5, IDDM22 and CC-CKR-5), a 3p21.31 kromoszóma régióban található (Liu et al. 1996), 3 exonból és 2 intronból áll, egy 352 aminosavból álló fehérjét kódol. A génhez két promóter régió tartozik up- és downstream az 1. exontól (Mummidi et al. 1997), emelett két transzkript variánst igazoltak, melyek ugyanazt a fehérjét kódolják. A kódolt fehérje a G-protein kapcsolt receptorok családjába tartozik, 7 transzmembrán hidrofób α-hélixből, egy intracelluláris carboxi- és egy extracelluláris aminoterminális részből tevődik össze, utóbbin glikolizációs hely található (Mueller and Strange 2004). A CCR5 főleg a memória és az effektor T-limfocitákban, monocitákban, makrofágokban, az éretlen dendritikus sejtekben és a természetes ölő sejekben fejeződik ki, melyekben a sejtaktivációt és a kemotaxist irányítja (Oppermann 2004; Balistreri et al. 2007). A központi idegrendszerben (CNS) a receptor a neuronokban, asztrocitákban és a mikrogliában található meg (Mueller and Strange 2004; Bajetto et al. 2002). A lehetséges fehérje interakciók és funkciók a CNS-ben egy közleményben összegezve lettek (Sorce, Myburgh, and Krause 2011).

Széleskörben bizonyított, hogy a deléciók képesek lehetnek befolyásolni a fehérjék funkcióit. A CCR5 gén esetében a legjobban tanulmányozott polimorfizmus a gén 32 bp-os deléciója, mely egy frame shift (kereteltolódást okozó) mutációt hoz létre az 1. exonban. Ennek a mutációnak az érdekessége, hogy védettséget eredményez az emberi immunhiány-előidéző (HIV) vírusfertőzéssel szemben homozigóta formában, míg heterozigóta formában

lassítja a progresszió mértékét, valamint csökkenti a szervezetben található vírusmennyiséget (Deng et al. 1996; Dragic et al. 1996; Alkhatib et al. 1996). Maga a deléció egy csonkolt fehérjét eredményez, amely nem képes beinszertálódni a membránba, mivel a vad típusú fehérjére jellemző 352 aminosav helyett csak 215 aminosavat tartalmaz (Liu et al. 1996; Sorce, Myburgh, and Krause 2011; Samson et al. 1996). A HIV vírus ezért nem tud penetrálni a gazda sejtekbe, így a deléció homozigóta formája védelmet nyújt a vírus ellen. A Δ32 bp deléció vizsgálata SM és kontroll mintákon ellentmondó eredményeket tárt fel. Néhány vizsgálat szerint az allél egy kockázati faktor (Gade-Andavolu et al. 2004; Luomala et al. 2003; Pulkkinen et al. 2004; Shahbazi et al. 2009), míg más vizsgálatok protektív szerepét tárták fel (Barcellos et al. 2000; D'Angelo et al. 2011; van Veen et al. 2007; Kaimen-Maciel et al. 2007), de akadtak olyan eredmények is melyek szerint se nem kockázati se nem protektív szerep nem köthető az allél hordozásához (Motsinger et al. 2007; Ristic et al. 2006; Brassat et al. 2006; Song and Lee 2014). Rendkívül nagyszámú vizsgálat történt tehát az SM és a CCR5 gén és a Δ32 bp allél vonatkozásában, de mindössze néhány vizsgálat alapult nagyobb mintaszámon. Ezért–vizsgálatainkban nagyobb mintaszám elérését tűztük ki legfontosabb célul.

2. Célkitűzések

A további vizsgálatokhoz a Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Neurológiai Klinikájának (későbbiekben a Klinika) biobankjából három betegségcsoportból összegyűjtött vérmintákat választottunk ki. A betegségtípusok kiválasztásánál meghatározó szempont volt, hogy ne csak egy korosztályra jellemző kórképeket tanulmányozzunk, hanem az emberi élet különböző szakaszaiban kialakuló betegségeket vizsgáljuk. A választás másik fontos szempontja az volt, hogy a biobankban az adott kórkép mintáiból kellő mintaszám álljon már rendelkezésre, vagy további mintagyűjtéssel, együttműködésekkel könnyedén elérjük a viszgálni kívánt mintaszámot. Választásunk így esett a PD, ALS és SM kórképekre. Ezen kórképek közös jellemzője, hogy a neurodegeneráció és a gyulladás része a patomechanizmusnak (Joshi and Singh 2017; Andres-Benito et al. 2017; Matute-Blanch, Montalban, and Comabella 2017; Kori et al. 2016). Továbbá mindhárom kórkép krónikus és jelen állás szerint gyógyíthatatlan.

2.1. Célkitűzések a Parkinson-kór és a kinurenin útvonal vizsgálatban:

Korábban nem készítettek tanulmányt a PD és a kinurenin útvonal enzimeinek polimorfizmusai közötti kapcsolatról, így ez a téma új megvilágításban vizsgálja a kórkép és a kaszkád útvonal esetleges kapcsolatát.

A vizsgálatban alkalmazott statisztika megbízhatóságának érdekében bevontuk az összes PD beteg mintát, amikhez pedig nemben-korban illesztett kontroll mintákat társítottunk.

A KMO gén 4 SNP-jét választottuk ki vizsgálatunkban (rs2050518, rs6661244, rs2275163, és az rs1053230). Az rs1053230 SNP egy arginin (hidropátiás index: −4.5) és cisztein (hidropátiás index: 2.5) cseréjét jelenti, ami hatással lehet az enzimfunkcióra és a szubsztrátkötő képességre (Azmitia and Nixon 2008). A T allél hordozói az rs2275163 SNP-nek egy emelkedettebb KMO mRNS szintjét mutatják (Wonodi et al. 2011). Ez talán magyarázat lehet arra, hogy a T allél hordozóknál csökkent KYNA koncentrációt mértek (Johansson et al. 2013). A másik két vizsgálni kívánt SNP a gén intronikus részében található. Ezek az SNP-k a génműködést szabályózó regulátor fehérjék kötőhelyeit érinthetik, vagy a génműködés szabályozásában is részt vehetnek a mikroRNS-ek által.

Ha beigazolódna, hogy a KP eltérése hozzájárul a PD pathogeneziséhez, az a kaszkád terápiás felhasználásának adhatna teret (Moroni 1999; Zadori et al. 2012; Stone 2000; Zwilling et al. 2011; Graham et al. 1990).

Célkitűzéseink a vizsgálat során:

1. Van-e kapcsolat az rs2050518, rs6661244, rs2275163 és az rs1053230 azonosítójú SNP-k és a betegség kialakulása között?
2. Van-e az rs2050518, rs6661244, rs2275163 és az rs1053230 azonosítójú SNP-nek betegségkezdetet befolyásoló hatása?

2.2. Célkitűzések az amiotrófiás laterálszklerózis vizsgálatban:

Korábban mindösszesen egy vizsgálatot készítettek az ALS és a VDR gén polimorfimusainak esetleges kapcsolatáról (az kizárólag az rs1544410 (BsmI) SNP-t vizsgálta), így munkánkkal feltárhatunk egy újabb aspektust a D-vitamin és az ALS közötti kapcsolatban.

A vizsgálatba bevontuk az összes ALS beteg mintát a Klinika biobankjából, amikhez pedig nemben-korban illesztett kontroll mintákat választottunk. Az így kapott mintaszám a magyarországi betegminták körülbelül 20%-át érte el ritka kórkép kapcsán.

Az ALS tanulmányban kiválasztott és tanulmányozott SNP-k a VDR gén 4 polimorfizmusát fedik le: rs1544410 (BsmI), rs7975232 (ApaI), rs731236 (TaqI) és az rs2228570 (FokI). Az irodalomban ezen SNP-k gyakran a restrikciós fragment hossz polimorfizmus (RFLP) vizsgálatban alkalmazott enzimek azonosítójával vannak jelölve, így a könnyebb összevetés miatt adjuk meg az rs számok mellett ezeket is.

Célkitűzéseink a vizsgálat során:

1. Összefüggésbe hozható-e a VDR gén általunk vizsgált 4 SNP-a a betegség kialakulásával?
2. Van-e kapcsolat az egyes allélek és a betegségkezdet között?

2.3. Célkitűzések a szklerózis multiplex vizsgálatban:

A nagyszámú vizsgálat ellenére a CCR5 Δ32 bp allél szerepe az SM kialakulásában kérdéses maradt a sok ellentmondó eredmény miatt. Az ellentmondásos adatok hátterében pedig sok esetben az alacsony mintaszám, vagy a nem megfelelően kiválasztott beteg és kontroll csoport állhat. Ezért vizsgálatunkban meghatorozó szempont volt a magas beteg és hozzá nemben-korban illesztett kontroll mintaszám elérése, illetve a betegcsoport megfelelő kiválasztása. Fontosnak tartottuk továbbá, hogy olyan populáción végezzük el a vizsgálatokat, melyet korábban még nem vontak be ilyen jellegű tanulmányba. Csoportunk az eddigi RFLP technika helyett, elsőként Taqman próbás allél elkülönítéssel tervezte meg a kísérleteket, mellyel a nagyszámú minta hatékonyabb, gyorsabb vizsgálatát értük el.

Célkitűzéseink a vizsgálat során:

1. Van-e szerepe a CCR5 Δ32 deléciónak az SM kialakulásában?
2. Az allélok befolyásolják-e a betegségkezdetet?
3. Az allélok befolyásolják-e az Expended Disability Status Scale (EDSS) értéket, ami a rokkantság mérőszáma?
4. Az allélok és a környezeti faktorok (dohányzás, BMI, alkoholfogyasztás) együttesen hatással vannak-e a betegségkezdetre, EDDS értékre?
5. A vizsgált környezeti faktorok (dohányzás, BMI, alkoholfogyasztás) önmagukban befolyásolják-e a betegségkezdetet vagy az EDSS értéket?

3. Anyag és módszer

3.1. A biobank létrehozása

A tervezett kísérletekhez szükséges vérminták összegyűjtéséhez és biztonságos tárolásához a Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Neurológiai Klinikáján létrehoztunk egy biobankot. A biobank létrehozása, annak gépparki felszerelése, az engedélyek beszerzése az én feladatom volt.

A vérmintákat négy mélyfagyasztó hűtőben -80 °C-on tároltuk. A biztonság érdekében a négy hütő közé telefon alapú riasztási láncot alakítottunk ki.

A technikai feltételek megteremtése után, a biobank megkapta a helyi Állami Népegészségügyi és Tisztiorvosi Szolgálat és a Szegedi Tudományegyetem Szentgyörgyi Albert Klinikai Központ Regionális Humán Orvosbiológiai Kutatásetikai Bizottság engedélyeit is.

Ezt követően kezdhettük meg a 2008. évi XXI. törvény alapján (amely a humángenetikai adatok védelméről, a humángenetikai vizsgálatok és kutatások, valamint a biobankok működésének szabályairól rendelkezik) a minták gyűjtését, katalogizálását és tárolását.

A csoportunk által végzett genetikai kutatások engedélyezését a helyi etikai biztottság, Szegedi Tudományegyetem Szentgyörgyi Albert Klinikai Központ Regionális Humán Orvosbiológiai Kutatásetikai Bizottsága és az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága engedélyezte (engedélyszámok lásd az adott vizsgálat leírásánál).

3.2. Vérmintagyűjtés és tárolás

A minták gyűjtését a klinikán megforduló és a mintaadásba írásban beleegyező páciensek (SM, PD, Huntington-kór, epilepszia, sztrók, ALS és migrén betegek) és az ő egészséges, nem vérrokon (férj-feleség) hozzátartozóik bevonásával kezdtük meg.

Később helyi, országos és nemzetközi együttműködések keretében további minták gyűjtését is megszerveztük.

Anonim mintagyűjtés keretében a szegedi véradó állomásról egészséges kontroll mintákkal is bővítettük biobankunkat.

Professzor Dr. Ádány Rózával való együttműködés keretében pedig további egészséges kontroll minták és a roma kisebbséghez tartozó minták érkeztek Debrecenből.

Nemzetközi együttműködés keretében, Magyarország-Szerbia IPA Határonátnyúló Együttműködési Program (HUSRB) program részeként, pedig további SM páciens és

egészséges kontroll minták kerülhettek a szerbiai észak-bácska régióból a szegedi klinikán működő biobankba.

A jelenleg tárolt minták számát betegségtípusonként összesítve az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat. A Klinika biobankjában tárolt minták típusai és darabszáma.

Betegségtípusok	Minta darabszám
Parkinson-kór	133
Amiotrófiás laterálszklerózis	95
Szklerózis multiplex	592
Egészséges kontroll	680
Miaszténia grávisz	47
Huntington-kór	15
Sztrók	45
Migrén	196
Epilepszia	51

3.3. Beteg és kontroll minták a három genetikai elemzésben

A vizsgálati protokolljainkat az Orvostudományi Tanács, Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága jóváhagyta a PD, az ALS (470663/2013 / EKU (556/2013)) és az SM vizsgálatokban (No.35764 / 2012 / EKU (566 / PI12)), továbbá a protokollok összhangban vannak a Helsinki nyilatkozattal.

3.3.1. Beteg és kontroll minták összegzése a Parkinson-kór tanulmányban

A vizsgálatban összesen 105 sporadikus PD-os páciens (57 nő és 48 férfi; átlag életkor: 66,42±9,236 év; átlagos betegségkezdet ideje: 58,81±10,97 év) és 131 nemben-korban egyeztetett kontroll (71 nő és 60 férfi; átlag életkor: 65,21±8,072 év) került bevonásra. A munkába bevont beteg és kontroll minták a szegedi Neurológiai Klinika biobankjából, illetve a gyulai Pándy Kálmán megyei kórház Neurológiai és Cerebrovaszkuláris Betegségek Tanszékéről származtak. A PD-os beteg és az egészséges kontroll csoport nem különbözött a nemek arányában (P=0,989), illetve az átlag életkorban (P=0,069). A betegségkezdet szerint, a PD-os csoportot két részre osztottuk annak érdekében, hogy vizsgálni tudjuk az egyes polimorfizmusok betegségkezdetet befolyásoló hatását. Az első csoportba azok a páciensek

kerültek, akiknél hatvan éves koruk előtt már megjelent a kórkép (1 csoport: Betegségkezdet <60, Betegségkezdet átlaga: 50,27±7,734), míg a másik csoportba a 60 és annál idősebb betegségkezdetet mutató alanyok kerültek (2 csoport: Betegségkezdet ≥60, Betegségkezdet átlaga: 67,70±5,281). Részletes szociáldemográfiai adatok a 2. és a 3. táblázatban szerepelnek.

2. táblázat. A szociáldemográfiai adatok összegzése a Parkinson-kór és a kinurenin rendszer kapcsolatát tanulmányozó munkában. N: elemszám, Medián: egy adatsor középső értéke, amelynél az ennél kisebb és nagyobb adatok száma azonos, Min: A legkisebb életkor a csoportban, Max: a legidősebb életkor a csoportban.

Csoportok (N)	Férfi	Nő	Átlag életkor (SD)	Medián	Min	Max	Betegségkezdet (SD)
Parkinson betegek (105)	48	57	66,42 ± 9,236	68	34	84	58,81 ± 10,970
Kontrollok (131)	60	71	65,21 ± 8,072	63	53	87	-

3. táblázat. A szociáldemográfiai adatok összegzése a Parkinson-kóros beteg csoportban a betegségkezdet szerinti csoportbontásban. (Két beteg esetében nem állt rendelkezésre adat a betegségkezdet vonatkozásában)

Csoportok	Elemszám	Férfi	Nő	Átlag életkor (SD)	Betegségkezdet (SD)
Parkinson betegek (<60)	53	29	24	60,74 ± 8,797	50,27 ± 7,734
Parkinson betegek (≥60)	50	19	31	72,16 ± 5,312	67,70 ± 5,281

3.3.2. A beteg és kontroll minták összegzése az amiotrófiás laterálszklerózis vizsgálat kapcsán

Összesen 75 - a Klinikán megjelenő - sporadikus ALS beteg és hozzájuk nemben, korban illesztett 97 kontroll került bevonásra a vizsgálatba. Vérmintákat a szegedi Neurológiai Klinikán megjelenő személyektől gyűjtöttük. Mivel az ALS ritka kórkép ez a mintamennyiség a magyarországi ALS betegek nagyjából 20%-át reprezentálja. A vizsgált

beteg és a kontroll csoport nem tért el nembeli (P=0,976) és korbeli (P=0,935) megoszlásban egymástól. A beteg csoportban 47 nő és 28 férfi vállalta a vizsgálatban való részvételt. A csoportra vonatkozó átlag életkor 60,3±11,0 év volt, míg az átlagos betegségkezdet 58,9±11,8 év. A betegségkezdet meghatározását az orvosi feljegyzések alapján végeztük, és az eseteket korai (60 vagy 60 éves kor előtt diagnosztizáltak) vagy későn megjelenő (60 évesnél idősebb) kategóriákba soroltuk (az életkor mediánja a betegcsoportban 60 év volt). A diagnózist az El-Escorial-kritériumok alapján határoztuk meg (10) (lásd Függelék). A kontroll csoport 97 egészséges önkéntesből állt, közülük 61 nő és 36 férfi, a csoport átlag életkora 60,1±11,3 év. A szociodemográfiai adatokat a 4. és 5. táblázat foglalja össze.

4. táblázat. Az ALS vizsgálat szociodemográfiai adatainak összegzése. SD: standard deviáció, Medián: az átlag életkorhoz tartozó medián érték a csoportban, Min: A legkisebb életkor a csoportban, Max: a legidősebb életkor a csoportban.

Csoportok	Férfi	Nő	Átlag életkor (SD)	Medián	Min	Max	Betegség-kezdet (SD)	Betegség-kezdet mediánja
ALS betegek (75)	28	47	60,3±11,0	61	33	86	58,9±11,8	60
Kontrollok (97)	36	61	60,1±11,3	62	33	84	-	-

5. táblázat. Az ALS betegek kor szerinti csoportbontása.

Csoportok	Elemszám	Férfi	Nő	Átlag életkor (SD)	Betegség-kezdet (SD)
ALS betegek (≤ 60)	38	19	19	51,82±7,787	49,79±8,473
ALS betegek (>60)	37	9	28	68,92±5,857	68,30±5,920

3.3.3. A beteg és kontroll minták jellemzői a szklerózis multiplex vizsgálatban

A vizsgálatba 428 sporadikus SM beteget vontunk be, melyek mindegyike relapszáló-remittáló (RRSM) vagy secunder progresszív (SPSM) kórformáját mutatta a betegségnek. Hozzájuk egészséges, nemben-korban illesztett 831 kontroll mintát illesztettünk a magyarországi Csongrád megyéből, egy debreceni biobankból és a szerbiai Észak-Bácska régióból. A beteg és az önkéntes kontroll minták 3 intézményből származtak (a Szegedi Tudományegyetem Orvostudományi Kar, Neurológiai Klinika; a Debreceni Egyetem,

Közegészségügyi Kar Prevenciós Orvostudományi Intézet és a szerbiai Szabadkai Kórház Neurológiai Intézet). A demográfiai adatokat egy kérdőív segítségével gyűjtöttük össze. A tanulmányban résztvevő összes SM beteg megfelelt a McDonald-kritériumoknak (Polman et al. 2011). A páciens és kontroll csoportok nem különböztek egymástól a nemi arány (P=0,942) vagy az átlagéletkor (P=0,414) tekintetében. Az SM betegcsoport 106 férfiból és 322 nőből állt, akiknek az átlag életkora 43,74±11,97 év volt, átlag életkoruk a betegség kezdetén pedig 32,17±9,80 év volt. Az átlagos Expanded Disability Status Scale (EDSS) pontszámuk 2,54±1,92 volt. Az SM-csoport 377 RRSM kórformájú (91 férfi és 286 nő, átlagéletkor 42,56±11,70 év) és 51 SPSM kórformájú betegből tevődött össze (15 férfi és 36 nő, átlagéletkor 52,49±10,35 év). A betegcsoport EDSS és betegségkezdet adatai nemi bontásban a 8. táblázatban láthatóak. A 831 kontroll személy közül 204 volt a férfi és 626 pedig nő. Az ő átlag életkoruk 44,34±13,20 év. Az általános szociodemográfiai adatok a 6., 7., és a 8. táblázatban láthatók.

A Debrecenből származó 3 kontroll minta esetében az allél-diszkriminációs protokollnak nem volt megfelelő mennyiségű DNS-minta, és 1 minta esetén a nemi információ hiányzott.

6. táblázat. A szklerózis multiplex vizsgálat szociodemográfiai adatai.

Csoportok (N)	Férfi (%)	Nő (%)	Átlag életkor (SD)	EDSS pontszám (SD)	Betegségkezdet (SD)
SM betegek (428)	106 (24,8)	322 (75,2)	43,74±11,97	2,54±1,92	32,17±9,80
Kontrollok (831)	204 (24,6)	626 (75,4)	44,34±13,20	-	-

7. táblázat. Az RR és SP kórformájú szklerózis multiplexes betegek szociodemográfiai adatai.

Csoportok (N)	Férfi (%)	Nő (%)	Átlag életkor (SD)	EDSS pontszám (SD)	Betegségkezdet (SD)
RR SM betegek (377)	91 (24,1)	286 (75,09)	42,56±11,70	2,09±1,52	32,07±9,58
SP SM betegek (51)	15 (29,4)	36 (70,6)	52,49±10,35	5,87±1,20	32,92±11,32

8. táblázat. Az SM betegek EDSS és betegségkezdet adatai nemi bontás szerint.

SM betegek (N)	EDSS (SD)	Betegségkezdet (SD)
Férfi (106)	2,580±1,954	30,61±10,101
Nő (322)	2,536±1,920	32,68±9,9662

3.4. DNS izolálás

A klinikán megjelenő PD-os és ALS betegektől és egészséges, nem vérrokon hozzátartozóiktól írásos beleegyezésük után periferiás vérvétel során nyertünk mintákat a vizsgálatainkhoz. A genomi DNS izolálásához ezt a mintát használtuk, melyet a Miller–féle izolálással (kisózási technika lásd lentebb) nyertünk ki a vérszövetben található fehérvérsejtekből (Miller, Dykes, and Polesky 1988). A kitisztított genomi DNS ezután -20 és

-80 °C fokon került tárolásra további felhasználásig a Neurológiai Klinika biobankjában (biobank engedély: Regional Human Biomedical Research Ethics Committee:135/2008).

A klinikán megjelenő SM betegektől és egészséges, nem vérrokon hozzátartozóiktól a másik két vizsgálathoz hasonlóan gyűjtöttük a vért. További kontroll mintákat a szegedi véradó állomásról kaptunk anonim módon az ott megjelent és a véradás előtti vizsgálatokon megfelelt személyektől, amenyiben ehhez írásos hozzájárulásukat adták. Néhány további kontroll mintát bevontunk a vizsgálatba azért, hogy nemben-korban megfelelő legyen az illesztés, ezek a minták a Debreceni Egyetem, Közegészségügyi Kar Prevenciós Orvostudományi Intézet biobankjából érkeztek, mely az ország egész területéről tárol mintákat. A szerbiai Észak-Bácska régióból származó beteg és kontroll mintákat egy határon átnyúló együttműködés, Magyarország-Szerbia IPA Határonátnyúló Együttműködési Program, egy az EU által támogatott projekt keretében gyűjtöttük (HUSRB/1002/214/082/01). A genomi DNS izolálásához ezeket a mintákat használtuk, melyekből az előző két vizsgálathoz hasonlóan, a Miller–féle izolálással nyertük ki az örökítő anyagot a vérszövetben található fehérvérsejtekből (Miller, Dykes, and Polesky 1988). A genomi DNS-t ebben az esetben is -20 és -80 °C fokon tároltuk további felhasználásig.

A Miller-féle DNS kisózási technika ismertetése:

Az etilén-diamin-tetraecetsavat (EDTA) tartalmazó vérvételi csőben érkezett vérmintákat frissen, vagy akár -80°C-os fagyasztás után (kiolvasztást követően) is fel tudjuk használni a metodika során. A preparálás első lépéseként magas fruktóz tartalmú vörösvértest lízis pufferrel a sejteket lizáljuk, majd többszörös desztillált vizes mosási lépésben megszabadulunk a PCR hatékonyságát csökkentő anyagoktól például a hem csoporttól. Ezután enzimatikus úton, proteináz K-val történő emésztéssel roncsoljuk a fehérjéket, köztük a DNS-t bontó nukleázokat. Nátrium-dodecil-szulfáttal (SDS) a membránlipideket roncsoljuk tovább. A proteináz K-val történő emésztést over night, 37 °C-os termosztátban végezzük. Ezt követően telített NaCl oldatot felhasználva csapjuk ki a roncsolt fehérjéket. A centrifugálást követően, az így kapott felülúszóban található DNS-t előhűtött izopropanollal precipitáljuk. Majd etanolos mosást alkalmazzunk a tisztított DNS-en, végezetül pedig Tris-EDTA (TE) pufferben oldjuk vissza, és -20/-80 °C-on tároljuk felhasználásig.

3.5. Genotipizálás

3.5.1. Genotipizálás a Parkinson-kór vizsgálatban

A genotipizálást Taqman próbás polimeráz láncreakciós módszerrel végeztük. Fluoreszcensen jelölt Taqman próbákat (Nucleotest Bio Kft, Budapest, Magyarország) használtunk az allélok elkülönítésére. A reakciókban részt vevő primerek és próbák listája a 9. táblázatban összefoglalva látható. a PCR amplifikáció lépései: 95 °C 3 perc, majd 49 cikluson keresztül 95 °C 10 másodperc, majd 58 °C 50 másodperc (kivéve rs2050518 számú SNP esetében, ahol 59 °C 50 másodperc). A genotipizáláshoz specifikus master mixet alkalmaztunk (2x PCR Bio Genotyping mix Lo-ROX, PCR Biosystems, London, Anglia). A kísérleti munkát a BioRad CFX96 C1000 valós idejű PCR gép alkalmazásával végeztük el, az adatok elemzésését pedig a géphez való BioRad szoftver segítségével értékeltük ki (BioRad CFX Manager version1.6).

9. táblázat. Primerek és próbák összesítése a Parkinson vizsgálatban.

SNP azonosító	Primerek	Próbák
rs2050518	F: 5'-TCA TAT CAT ATC TCA CTG TGT GAA-3' R: 5'-CCA GGT TGT TCA GTG TAG T-3'	A allél: 5'-Fam-TCG TTC ATT CCA CTC TGA TAG TC-BHQ-1-3' T allél: 5'-Hex-TCG TTC ATT CCT CTC TGA TAG TC-BHQ-1-3'
rs6661244	F: 5'-CAT GGC AAA TAC AAT GGC T-3' R: 5'-ACA AAC ATA AAT CCT CTC TGG A-3'	C allél: 5'-Fam-AAT CTG AGG CCT ATG GTG ATG T-BHQ-1-3' T allél: 5'-Hex-AAT CTG AGG CTT ATG GTG ATG T-BHQ-1-3'
rs2275163	F: 5'-ACG ATG GAT CAT GCA GTA A-3' R: 5'-CGT CAA GGG TGT TTT TCA G-3'	C allél: 5'-Fam-TAG AGC AAA AGT CTA AGT GGA TAT TG-BHQ-1-3' T allél: 5'-Hex-TAG AGC AAA AGT TTA AGT GGA TAT TG-BHQ-1-3'
rs1053230	F:5'-TTT GCT ACC ACA AAA CCT TT-3' R:5'-TCA GCA GTA CCT ACC TAC TTA TA-3'	A allél: 5'-Fam-CCT CTC AAG CAG AGG AAA GAT C-BHQ-1-3' G allél: 5'-Hex-CTT CTC AAG CGG AGG AAA GAT C-BHQ-1-3'

3.5.2. Genotipizálás az amiotrófiás laterálszklerózis tanulmányban

Az általunk vizsgálni kívánt négy polimorfizmus közül három intron variáns, míg egy misszensz mutáció.

rs1544410 (BsmI): Az SNP körüli DNS régió amplifikálásához a következő primer párt terveztük:

Forward primer: 5'-CAA CCA AGA CTA CAA GTA CCG CGT CAG TGA-3'
Reverse primer: 5'-AAC CAG CGG GAA GAG GTC AAG GG-3'
Az allélek elkülönítését restrikciós fragment hossz polimorfizmus vizsgálattal végeztük, melyhez ebben az esetben Mva1269I (BsmI) enzimet alkalmaztuk (10 U/µl) (Thermo Scientific Baltic, Vilnius, Litvánia) a gyártó leírásának megfelelően. A PCR reakció estében alkalmazott beállítások a következők voltak: 95 °C 5 percig, melyet egy 44 ciklusból álló ismétléses rész követet 95 °C fokon 30 másodpercig, majd 60 °C 30 másodpercig, végezetül 72 °C 1 perc. A ciklus végeztével pedig időt hagytunk, hogy az enzim megszintetizálhassa a be nem fejezett szálakat 72 °C 5 percig.

rs731236 (TaqI): Az rs731236 intron polimorfizmus körüli DNS régiót a következő primer párral sokszoroztuk fel:

Forward primer: 5'-CAG AGC ATG GAC AGG GAG CAA-3'
Reverse primer: 5'-CAC TTC GAG CAC AAG GGG CGT TAG C-3'
Az allélok szeparálásához a TaqI enzimet alkalmaztuk (10 U/µl) (Thermo Scientific, Vilnius, Litvánia) a gyártó leírásának megfelelően. A PCR reakció lépései a következők voltak: 95 °C 5 percig, ezt követte a 44 ciklus, mely három hőfokon zajlott 95 °C-on 30 másodpercig, 60 °C-on 30 másodpercig, utolsó lépésben pedig 72 °C-on 1 percig. A ciklus végezetével pedig egy 72 °C 5 perces beállítást alkalmaztunk.

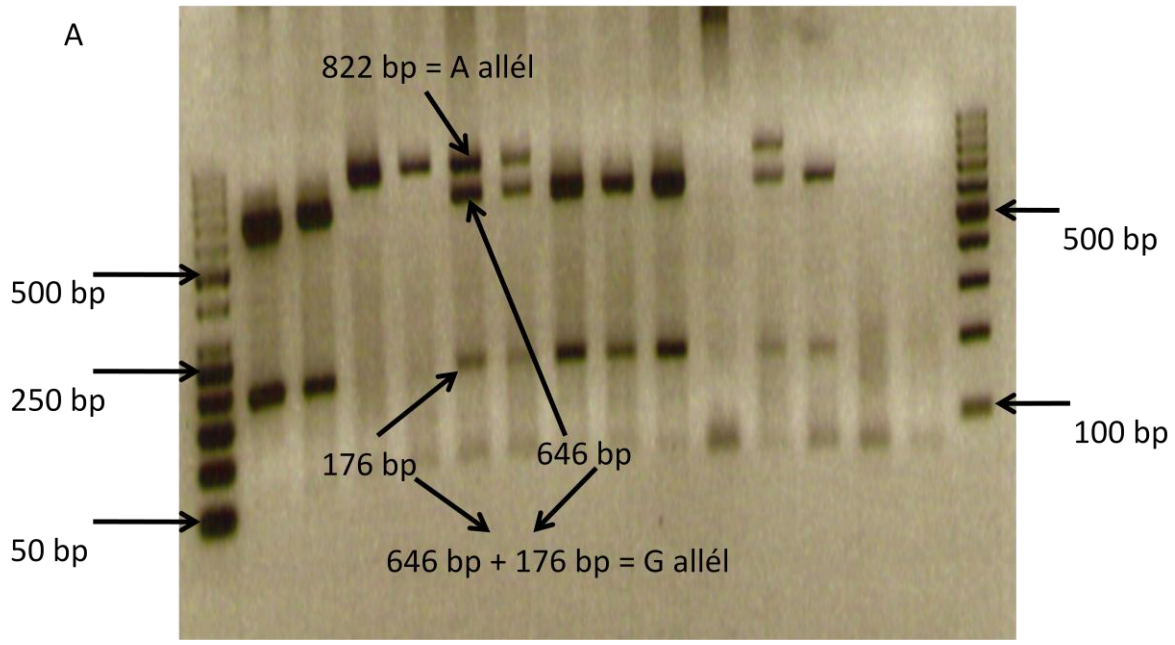
rs2228570 (FokI): Az rs2228570 azonosítójú misszensz mutáció körüli DNS régió felsokszorozásához a következő primer párt terveztük:

Forward primer: 5'-AGC TGG CCC TGG CAC TGA CTC TGC TCT-3'
Reverse primer: 5'-ATG GAA ACA CCT TGC TTC TTC TCC CTC-3'
Az emésztéshez használt enzim a BseGI (BtsCI) (10 U/µl) (Thermo Scientific, Vilnius, Litvánia) volt, melyet a gyártói leírás szerint alkalmaztunk. A PCR reakció paraméterei: 95 °C 5 perc; majd 95 °C 30 másodperc, 60 °C 30 másodperc, 72 °C 1 perc 44-szer ismételve; 72 °C 5 perc.

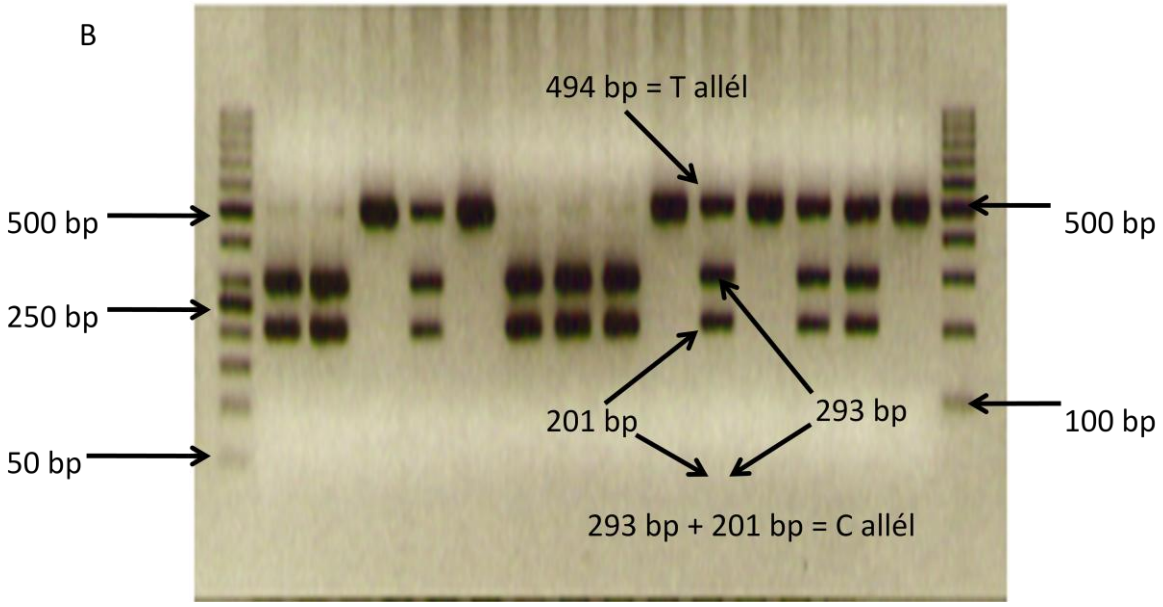
rs7975232 (ApaI): A 12. kromoszómán található rs7975232 számú SNP esetében a következő primer párt használtuk:

Forward primer: 5'-CAG AGC ATG GAC AGG GAG CAA-3'
Reverse primer: 5'-CAC TTC GAG CAC AAG GGG CGT TAG C-3'
A PCR során kapott amplikont az ApaI enzimmel (10 U/µl) (Thermo Scientific, Vilnius, Litvánia) emésztettük az alléldiszkrimináció érdekében. A PCR amplifikáció beállításai: 95 °C 5 perc; ezután 44 cikluson keresztül 95 °C 30 másodperc, 60 °C 30 másodperc, 72 °C 1 perc; végezetül pedig 72 °C 5 perc.

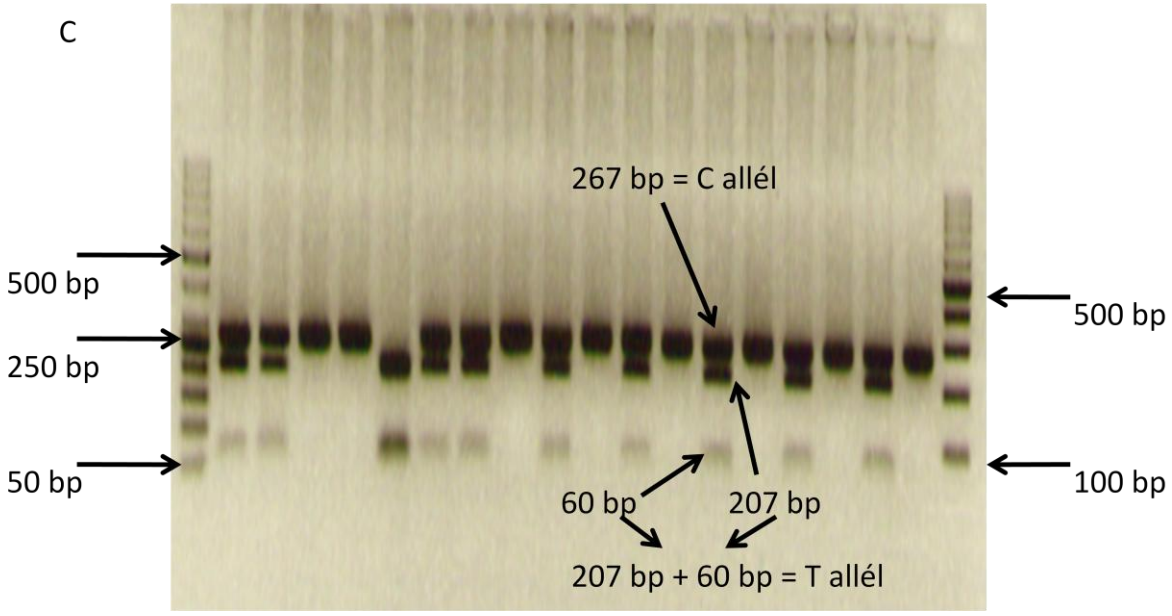
A PCR-kísérleteket Bio-Rad CFX96 C1000 valós idejű PCR készülékkel végeztük. Az alkalmazott primerek a Nucleotest Bio Kft.-től (Budapest, Magyarország) érekeztek. A PCR után a mintákat megfelelő enzimekkel emésztettük, és a kapott restrikciós fragmenteket gélelektroforézissel a hosszúságuk szerint szétválasztottuk (4. ábra). A gélelektroforézis során 2%-os agaróz gélt késztettünk 3 g agarózzal (SeaKem LE agaróz, Lonza, Basel, Svájc), 150 ml 1x TBE pufferrel (500 mg/ml, Sigma, St. Louis, USA) és 15 µl etidium-bromiddal (koncentráció: 0,5 µg/ml). A gélelektroforézishez az alkalmazott feszültség 120 V volt. A DNS fragmentek méretmeghatározásához Gene Ruler DNS létrákat alkalmaztunk a Thermo Scientific-tól (Vilnius, Litvánia) (bal oldalon 50 bp /fokai: 1000, 900, 800, 700, 600, **500**, 400, 300, **250**, 200, 150, 100, 50/, a gélek jobb oldalán pedig 100 bp /fokai: 1000, 900, 800, 700, 600, **500**, 400, 300, 200, 100/). A BsmI SNP allélei az A allél (822 bp) és a G allél (646 bp és 176 bp) volt. A TaqI SNP allelei a C allél (293 bp, 201 bp, 7 bp) és T allél (494 bp, 7 bp) volt. A FokI SNP alléljai a C allél (267 bp) és T allél (207 bp, 60 bp) volt. Az utoljára vizsgált VDR SNP, az ApaI esetében az elválasztott allélok pedig a C allél (284 bp, 217 bp) és az A allél (501 bp) volt.

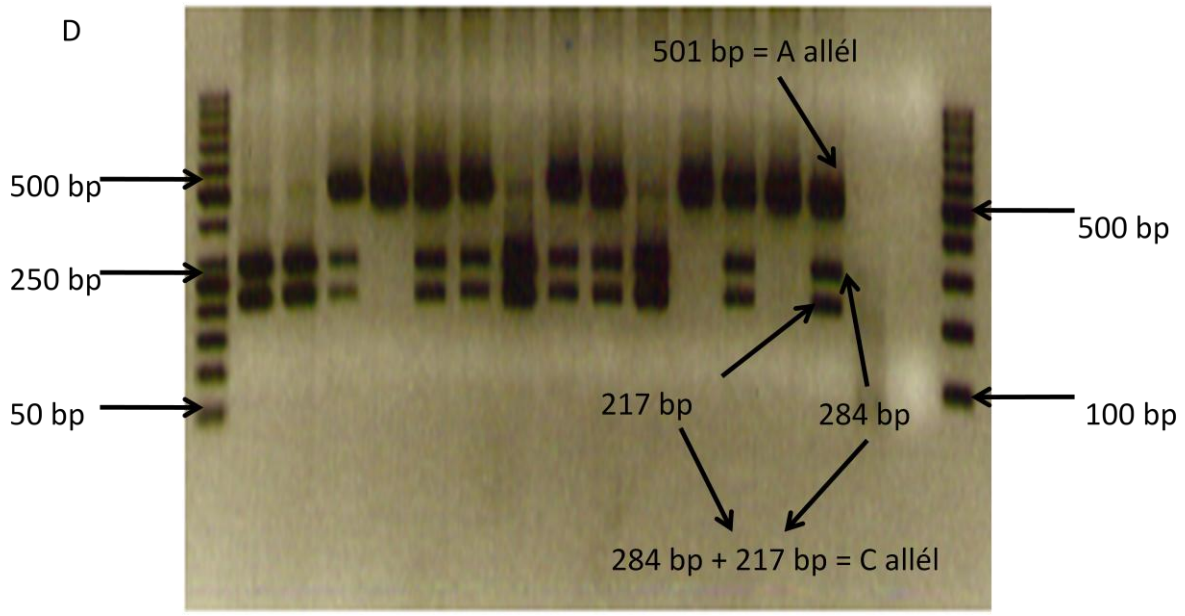


B


494 bp = T allél
500 bp
250 bp
50 bp
500 bp
100 bp
201 bp
293 bp
293 bp + 201 bp = C allél

C


267 bp = C allél
500 bp
250 bp
50 bp
500 bp
100 bp
60 bp
207 bp
207 bp + 60 bp = T allél



4. ábra. Gélelektroforézis módszer alkalmazása az ALS vizsgálatban.

Jelmagyarázat:

A. BsmI SNP: AA: 822 bp; AG: 822 bp, 646 bp, 176 bp; GG: 646 bp, 176 bp
B. TaqI SNP: CC: 293 bp, 201 bp, 7 bp; CT: 494 bp, 293 bp, 201 bp, 7 bp; TT: 494 bp, 7 bp
C. FokI SNP: CC: 267 bp; CT: 267 bp, 207 bp, 60 bp; TT: 207 bp, 60 bp
D. ApaI SNP: CC: 284 bp, 217 bp; AC: 501 bp, 284 bp, 217 bp; AA: 501 bp

3.5.3 Genotipizálás a szklerózis multiplex kutatásban

Az allélok elkülönítésére polimeráz láncreakciót terveztünk Taqman próbákkal. Ez a technika gyorsabb, mint a standard PCR és gélelektroforézis módszerek, emellett pedig kevesebb veszélyes hulladék keletkezik és biztonságosabb, mert nem igényel etidium-bromidot vagy más interkalálódó festéket. A DNS-chip kísérletekkel összehasonlítva pedig sokkal olcsóbb, de csak egy SNP vizsgálható, ellentétben a DNS-chipekkel.

Az rs333 SNP (CCR5 Δ32bp deléció) közelében lévő DNS-régió amplifikációjához a következő primereket (Nucleotest Bio Kft, Budapest, Magyarország) használtuk (lásd 5. ábra). Az ábrán világos és sötétzöld kiemeléssel jelöltük a forward és reverse primereket. A deléciós és a vad allélhez tartozó próbákat világoskék és rózsaszín kiemelés jelzi, míg lila szín jelöli a két próba átfedő részét. Az ábrán piros betűkkel jelöltük azt a 32 bp régiót, amely a deléciót hordozó allél esetében deletálódik.

<u>A vizsgálathoz tervezett primer pár:</u>

Forward primer: 5’-AAG AAG GTC TTC ATT ACA CC-3’
Reverz primer: 5'-AGC AGA GTT TTT AGG ATT CC-3'

Az allél diszkriminációra a következő próbákat készítettük:

Vad típusú allél: 5'-Fam-CAT ACA GTC AGT ATC AAT TCT GGA A-BHQ-1-3'

Deléciós allél: 5'-Hex-CTC TCA TTT TCC ATA CAT TAA AGA TAG-BHQ-1-3'

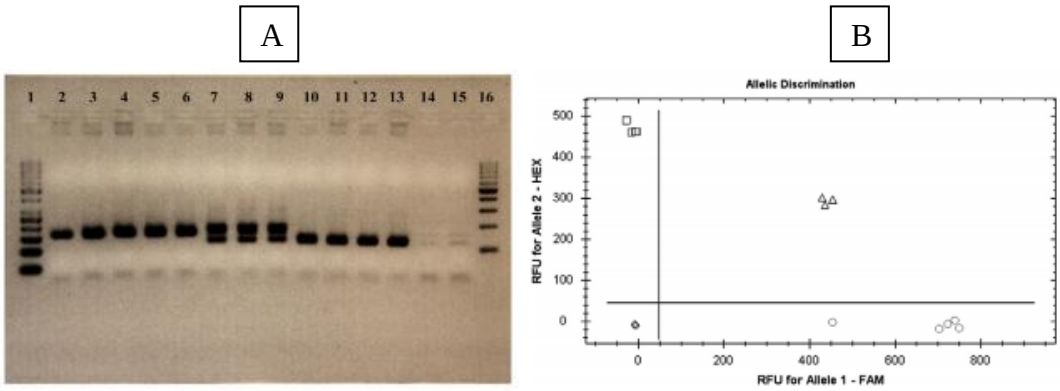
GGTGGTGGCTGTGTTTGCGTCTCTCCCAGGAATCATCTTTACCAGATCTCAAAAA
GAAGGTCTTCATTACACCTGCAGCTCTCATTTTCCATACAGTCAGTATCAATTCTG
GAAGAATTTCCAGACATTAAAGATAGTCATCTTGGGGCTGGTCCTGCCGCTGCTT
GTCATGGTCATCTGCTACTCGGGAATCCTAAAAACTCTGCTTCGGTGTCGAAATG
AGAAGAAGAGG

Jelmagyarázat:

- forward primer
- deléciós allélhez tartozó próba
- vad allélhez tartozó próba
- átfedő rész a két allélhez tartozó próbákon
- reverse primer

5. ábra. Primerek és próbák elhelyezkedése a CCR5 rs333 SNP tanulmányozásakkor.

A PCR amplifikációt a következő paraméterekkel végeztük: 95 °C 3 percig, majd 49 ciklus 95 °C-on 10 másodpercig, majd 56 °C-on 50 másodpercig. A genotipizáláshoz specifikus master mix keveréket alkalmaztuk (PCR Biosystem 2PCR Bio Genotyping Mix Lo-ROX, London, Anglia). A PCR-kísérleteket egy BioRad CFX96 C1000 valós idejű PCR berendezéssel végeztük, és a genotípuselemzést a BioRad egyik saját szoftverével (BioRad CFX Manager Version 1.6) végeztük. A kapott alléldiszkriminációs eredményeket kezdetben agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük, pontosan ugyanolyan eredménnyel, mint a szoftveres kiértékelés során (154 bp-es sávok a vad típusok esetében, 154 és 122 bp érték a heterozigóták esetében, valamint 122 bp homozigóta mutánsok esetében) (5. ábra).



6. ábra. A CCR5 rs333 SNP gélelektroforézis és Taqman próbás alléldiszkriminációs képe.

Jelmagyarázat: A, Gél elektroforézis: 1: Thermo Scientific Gene Ruler DNS Létra 50 bp /1000, 900, 800, 700, 600, **500**, 400, 300, **250**, 200, 150, 100, 50/, 2: vad genotípusú homozigóta, 3: vad genotípusú homozigóta, 4: vad genotípusú homozigóta, 5: vad genotípusú homozigóta, 6: vad genotípusú homozigóta, 7: heterozigóta, 8: heterozigóta, 9: heterozigóta, 10: Δ32/Δ32 deléciós homozigóta, 11: Δ32/Δ32 deléciós homozigóta, 12: Δ32/Δ32 deléciós homozigóta, 13: Δ32/Δ32 deléciós homozigóta, 14: templát DNS nélküli kontroll, 15: templát DNS nélküli kontroll, 16: Thermo Scientific Gene Ruler DNS Létra 100 bp /1000, 900, 800, 700, 600, **500**, 400, 300, 200, 100./; B, Taqman allél diszkrimináció: □: Δ32/Δ32 homozigóta deléció (minta: 10, 11, 12, 13), Δ: heterozigóta (minta: 7, 8, 9), ○: vad típusú homozigóta (minta: 2, 3, 4, 5, 6), ◊: DNS templát nélküli kontroll (minta: 14, 15).

3.6. Statisztika

Az adatok értékeléséhez az SPSS szoftver 20. verzióját használtuk. X-négyzet tesztet alkalmaztunk a genotípusok és az allélok megoszlásának a vizsgálatára, a *t*-próbát pedig az átlagok összevetésére két csoport között mindhárom analízis során.

A vizsgálatainkban szereplő beteg és a kontroll csoportok között a megfigyelt genotípus-frekvenciák összhangban voltak a Hardy-Weinberg egyensúllyal (HWE). Ezt a vizsgálatot Michael H. Court által készített (2005-2008) HWE calculator segítségével ellenőriztük.

A VDR és az ALS kockázat közötti kapcsolat vizsgálatára az esélyhányados (OR) és a 95% -os konfidencia intervallum (CI) került kiszámításra. Szignifikáns értéknek a $P<0,05$ értéket tekintettük.

Az SM kísérletekben varianciaanalízist akkor alkalmaztuk, ha több mint két csoport átlagát kellett figyelembe venni, míg a kétirányú varianciaanalízist, ha több mint két csoportosítási kritérium volt. Az SM adatok kiértékelésénél Dr. Lencsés Gyula egyetemi adjunktus volt segítségünkre.

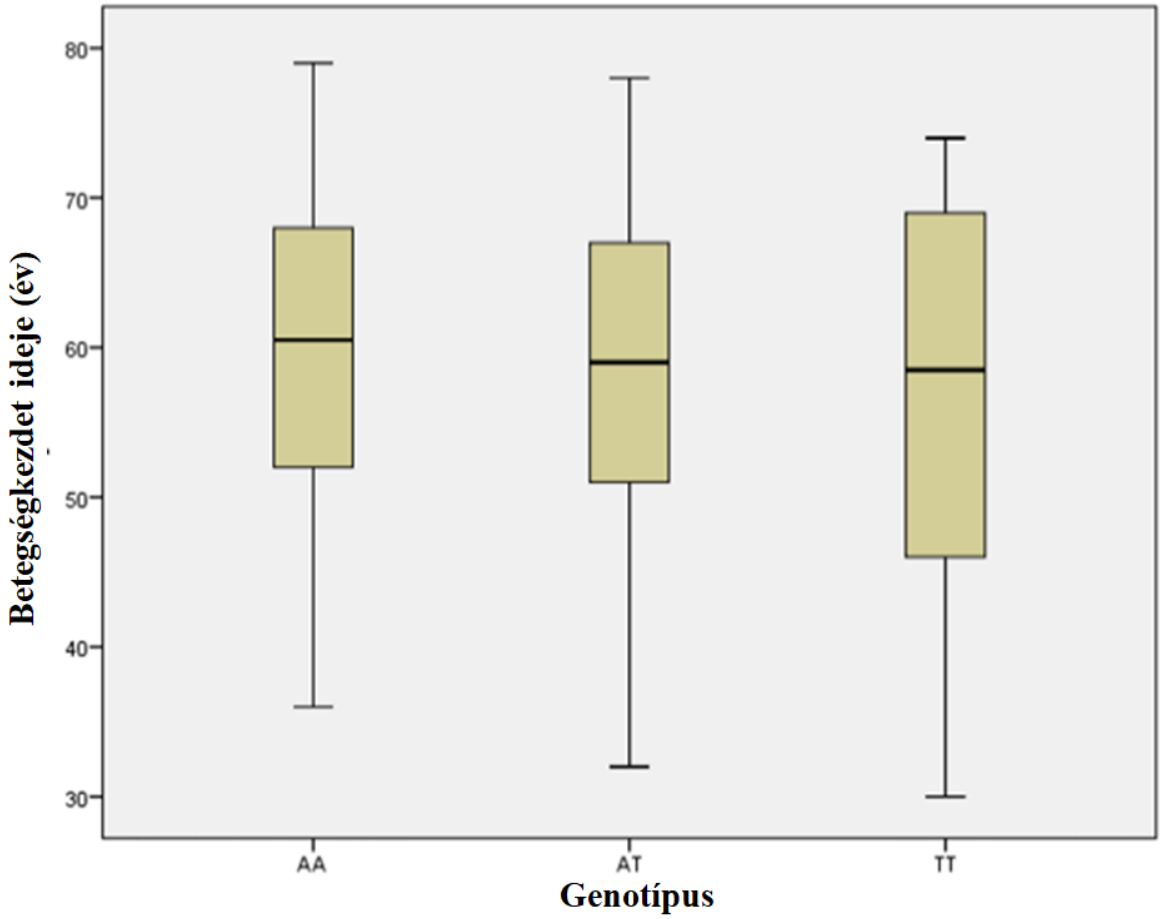
4. Eredmények

4.1. Parkinson-kór és a kinurenin rendszer kapcsolata

A vizsgálatba 105 Parkinson beteget és hozzájuk nemben-korban egyeztetve 131 egészséges kontroll személyt sikerült bevonni a Taqman próbákkal megtervezett alléldiszkriminációs vizsgálatunkba. Az általunk vizsgált négy SNP-ből három intron variáns volt, a negyedik pedig egy misszensz mutáció.

rs2050518 SNP:

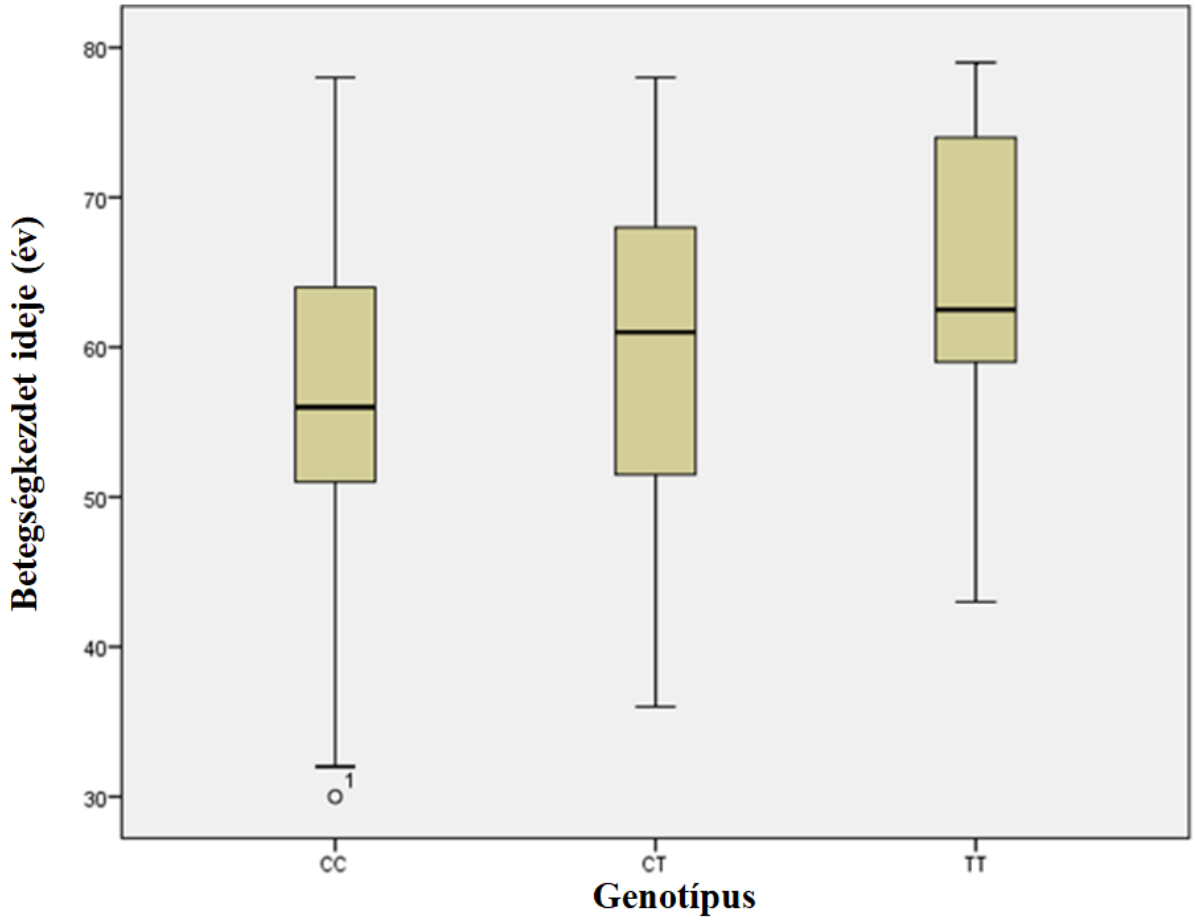
Ez a genomi eltérés egy A/T csere, mely a KMO gén intron részére lokalizálódik. A genotípus megoszlás a beteg csoportban a következőnek adódott: 35 AA, 60 AT, és 10 TT, a kontroll csoportban pedig: 54 AA, 60 AT, és 17 TT. Az allél frekvenciák a két csoportban hasonlóak voltak (10. táblázat). Ez az SNP variáns az eredményeink alapján nem hozható összefüggésbe a PD-vel (genotípus: *P*=0,218, allélfrekvencia: *P*=0,620) és nem volt hatással a betegségkezdetre sem (genotípus: *P*=0,977) (7. ábra). A férfiak és nők közötti genotípus-megoszlásban sem találtunk szignifikáns eltérést (P=0,879).



7. ábra. A betegségkezdet alakulása az rs2050518 SNP genotípusainál. X tengely: genotípus, Y tengely: életkor a betegség manifesztációjakor (évek).

rs6661244 SNP:

Ez a polimorfizmus szintén intronikus régióban található a KMO génben és egy C/T cserét okoz. A genotípus megoszlás a beteg csoportban 37 CC, 58 CT, és 10 TT, ugyanez a kontroll csoportban 54 CC, 61 CT, és 15 TT volt. Az allélfrekvenciák a Parkinson csoportban 62,85% C allél és 37,14% T allél a kontroll csoportban pedig 64,88% C allél és 35,11% T allél (10. táblázat). Eredményeink alapján ezen SNP és a PD között nincs összefüggés (genotípus: *P*=0,481, allélfrekvencia: *P*=0,648), valamint az SNP nem volt hatással a betegségkezdetre sem (genotípus: *P*=0,425) (8. ábra). A férfiak és nők közötti genotípus-megoszlásban itt sem találtunk szignifikáns eltérést (P=0,247).

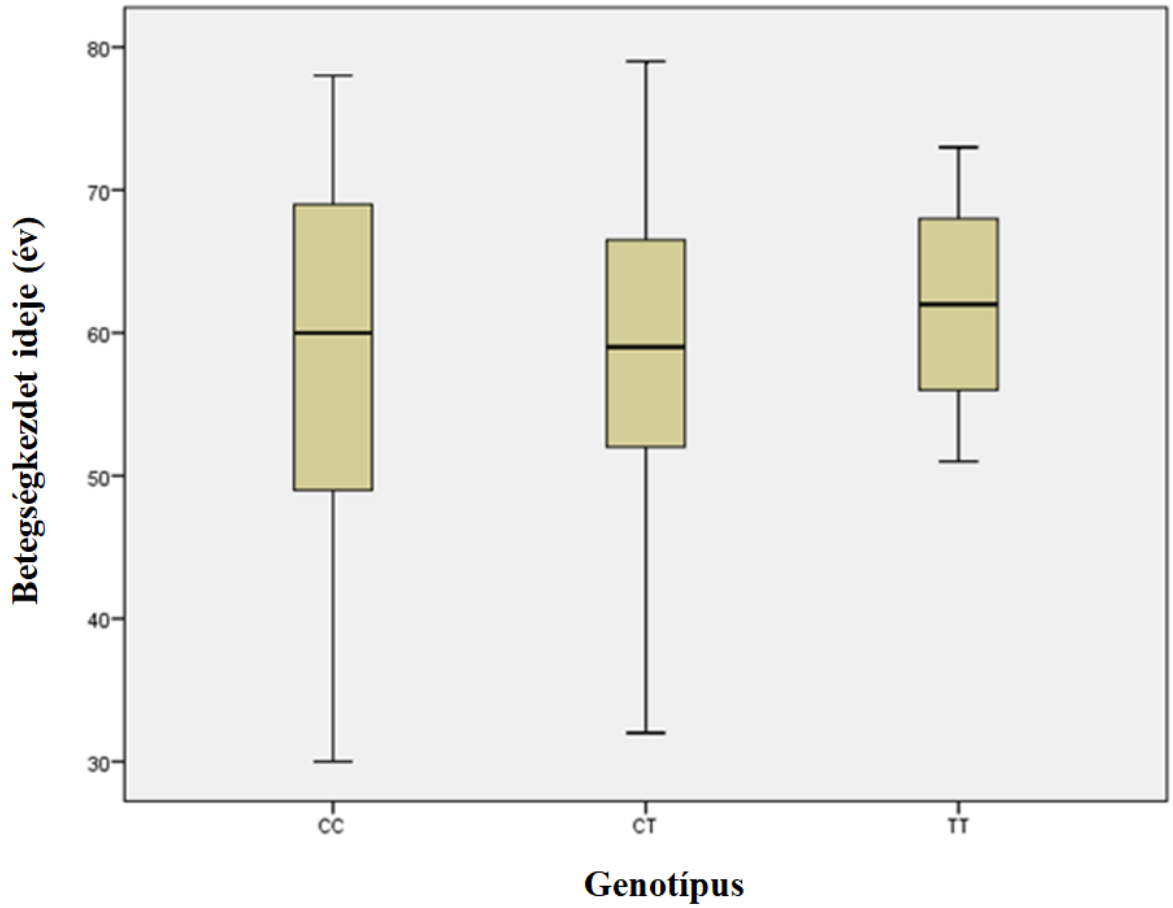


8. ábra. A betegségkezdet alakulása az rs6661244 SNP genotípusainál. X tengely: genotípus, Y tengely: életkor a betegség manifesztációjakor (évek).

rs2275163 SNP:

Ez a polimorfizmus is egy C/T csere a KMO gén intronjában. A genotípus megoszlás ez esetben a PD-os csoportban 39 CC, 56 CT és 10 homozigóta TT-nek adódott, míg a kontrollban pedig 55 CC, 61 heterozigóta és 15 TT homozigóta volt a megoszlás. Az allélfrekvenciák a következő értékeket mutatták: 63,80% C allél a beteg versus 65,26% C allél

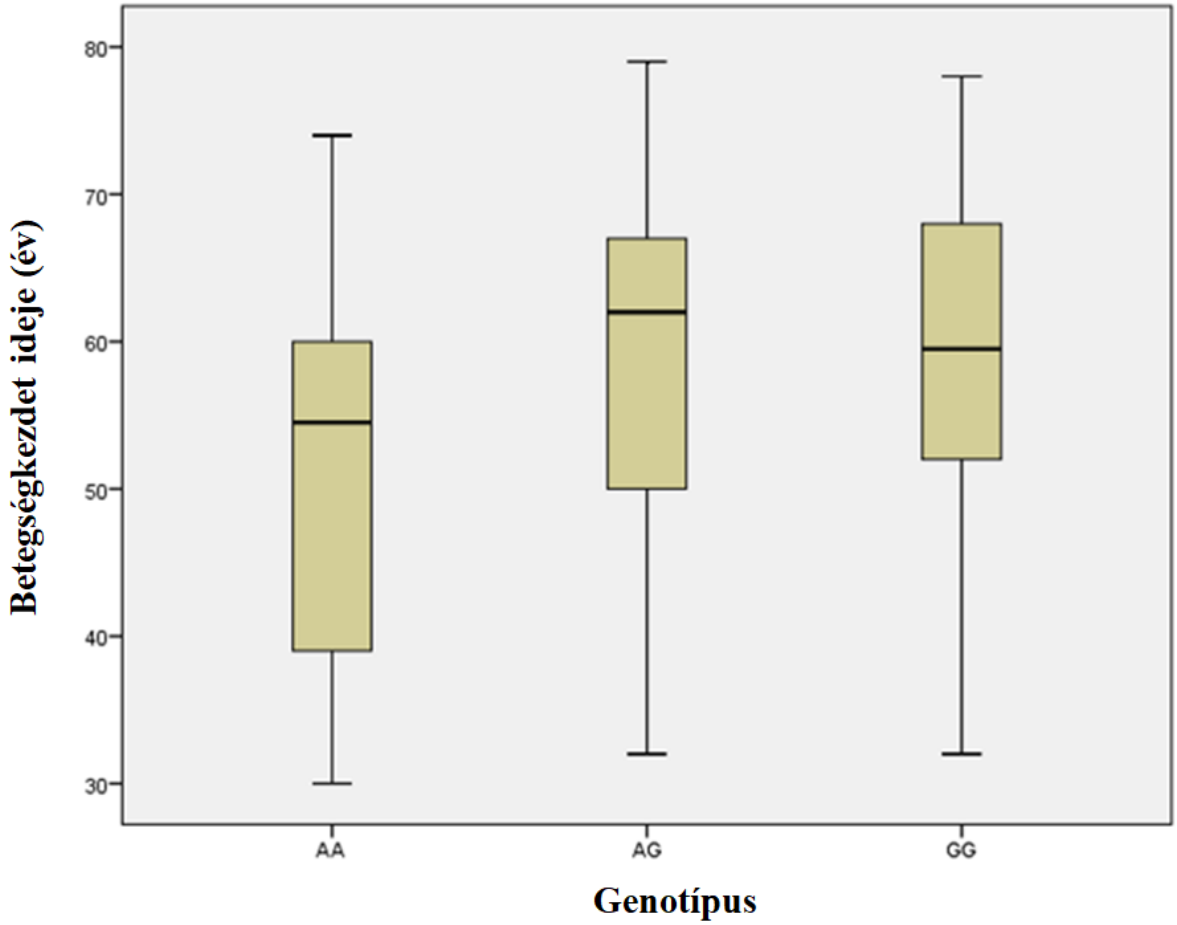
a kontroll csoportban, 36,19% T allél a beteg versus 34,73% T allél a kontroll csoportban. Ez a C/T csere sem mutatott kapcsolatot a PD-ral (genotípus: *P*=0,581, allélfrekvencia: *P*=0,742) és nem befolyásolta a betegségkezdetet sem (genotípus: *P*=0,612) (9. ábra). A férfiak és nők közötti genotípus-megoszlásban viszont szignifikáns eltérést találtunk (P=0,011) (7. táblázat).



9. ábra. A betegségkezdet alakulása az rs2275163 SNP genotípusainál. X tengely: genotípus, Y tengely: életkor a betegség manifesztációjakor (évek).

rs1053230 SNP:

A vizsgálatunkba bevont utolsó polimorfizmus egy misszensze mutáció volt a KMO gén 15. exonjában, mely egy A/G cserét okoz. Ez a csere aminosav szinten egy arginin-cisztein cserét eredményez, mely a mitokondrium külső membránjában lévő enzim külső felére lokalizálódik (https://www.predictprotein.org/). Ez a fehérje felszín pedig feltételezhetően a szubsztrát interakciók helye, így a mutáció érintheti a szubsztrát-kötő képességét a fehérjének. Eredményeink azt mutatták, hogy az rs1053230 és a PD között nincs összefüggés (genotípus: *P*=0,771, allélfrekvencia: *P*=0,568), a mutáció nem befolyásolta a betegségkezdetet sem (genotípus: *P*=0,714) (10. ábra). A férfiak és nők közötti genotípus-megoszlásban itt sem találtunk szignifikáns eltérést (P=0,570).



10. ábra. A betegségkezdet alakulása az rs1053230 SNP genotípusainál. X tengely: genotípus, Y tengely: életkor a betegség manifesztációjakor (évek).

Az általunk vizsgált négy KMO polimorfizmus nem hozható összefüggésbe a PD-ral, illetve nem befolyásolták a betegség kialakulásának kezdetét sem. Az rs22751163 SNP esetében szignifikánst eltérést tapasztaltunk a genotípus nemek közötti eloszlásában (10. táblázat).

10. táblázat. Genotípus és allél frekvencia megoszlások adatai a Parkinson vizsgálatban.

Csoportok	Genotípus				Allél frekvencia		
rs2050518	AA (%)	AT (%)	TT (%)	p	A (%)	T (%)	p
PD beteg	35 (33,3%)	60 (57,1%)	10 (9,5%)	0,218	130 (61,90%)	80 (38,09%)	0,620
Kontroll	54 (41,2%)	60 (45,8%)	17 (12,9%)		168 (64,12%)	94 (35,87%)	
Betegségkezdet <60 év	18 (33,9%)	30 (56,6%)	5 (9,4%)	0,977			
Betegségkezdet ≥60 év	16 (32%)	29 (58%)	5 (10%)				
Férfi	17 (35,4%)	27 (56,3%)	4 (8,3%)	0,879			
Nő	18 (31,6%)	33 (57,9%)	6 (10,5%)				
rs6661244	CC (%)	CT (%)	TT (%)	p	C (%)	T (%)	p
PD beteg	37 (35,2%)	58 (55,2%)	10 (9,5%)	0,481	132 (62,85%)	78 (37,14%)	0,648
Kontroll	54 (41,2%)	62 (47,3%)	15 (11,4%)		170 (64,88%)	92 (35,11%)	
Betegségkezdet <60 év	22 (41,5%)	27 (50,9%)	4 (7,5%)	0,425			
Betegségkezdet ≥60 év	15 (30%)	29 (58%)	6 (12%)				
Férfi	15 (31,3%)	26 (54,2%)	7 (14,6%)	0,247			
Nő	22 (38,6%)	32 (56,1%)	3 (5,3%)				
rs2275163	CC (%)	CT (%)	TT (%)	p	C (%)	T (%)	p
PD beteg	39 (37,1%)	56 (53,3%)	10 (9,5%)	0,581	134 (63,80%)	76 (36,19%)	0,742
Kontroll	55 (41,9%)	61 (46,5%)	15 (11,4%)		171 (65,26%)	91 (34,73%)	
Betegségkezdet <60 év	18 (33,9%)	31 (58,4%)	4 (7,5%)	0,612			
Betegségkezdet ≥60 év	19 (38%)	25 (50%)	6 (12%)				
Férfi	13 (27,1%)	33 (68,8%)	2 (4,2%)	0,011			
Nő	26 (45,6%)	23 (40,4%)	8 (14,0%)				

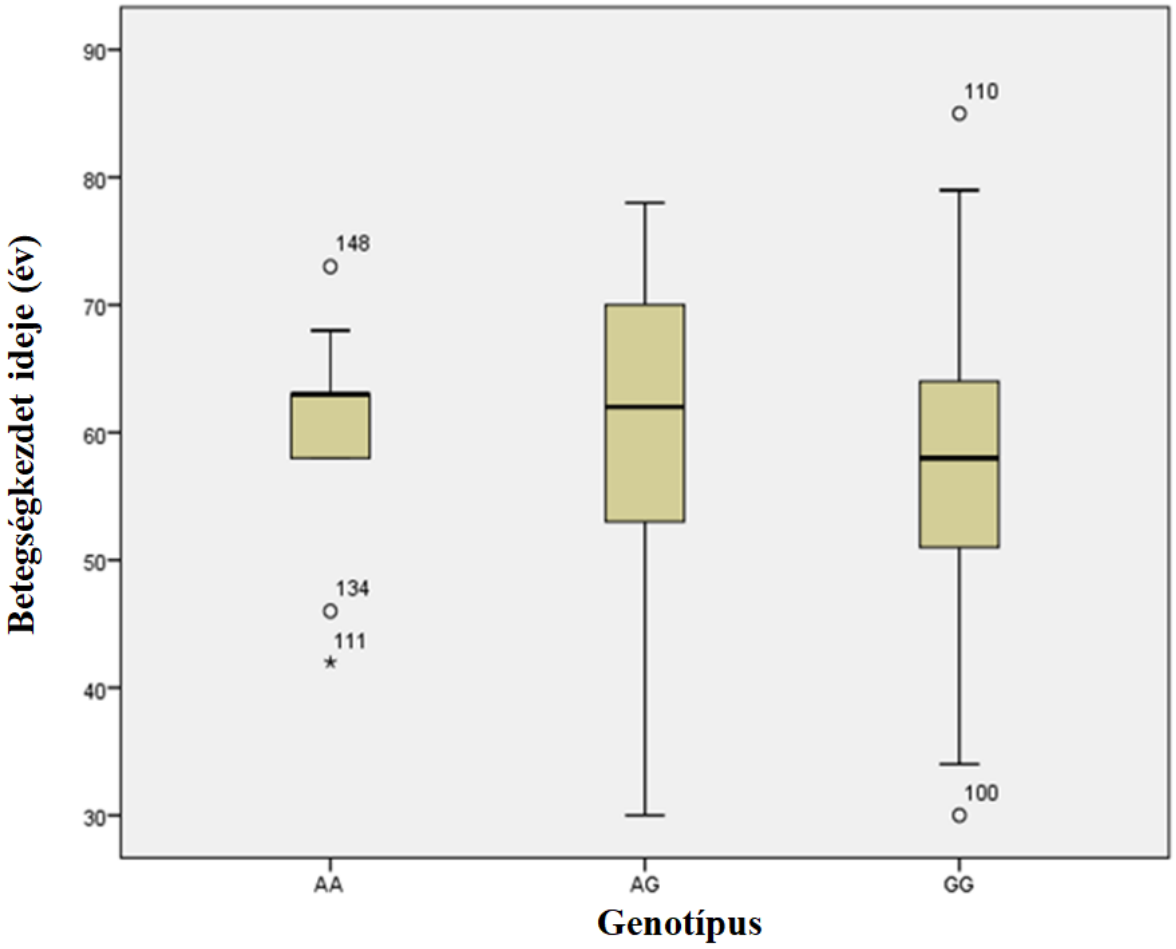
Csoportok	Genotípus				Allél frekvencia		
rs1053230	AA (%)	AG (%)	GG (%)	p	A (%)	G (%)	p
PD beteg	7 (6,6%)	38 (36,1%)	60 (57,1%)	0,771	52 (24,765)	158 (75,23%)	0,568
Kontroll	6 (4,5%)	47 (35,8%)	78 (59,5%)		59 (22,51%)	203 (77,48%)	
Betegségkezdet <60 év	4 (7,5%)	18 (33,9%)	31 (58,4%)	0,714			
Betegségkezdet ≥60 év	2 (4%)	19 (38%)	29 (58%)				
Férfi	2 (4,2%)	19 (39,6%)	27 (56,3%)	0,570			
Nő	5 (8,8%)	19 (33,3%)	33 (57,9%)				

4.2. A VDR gén polimorfizmusainak vizsgálata amiotrófiás laterálszklerózisban

A vizsgálatunkba 75 sporadikus ALS beteget és hozzájuk nemben-korban illesztve 97 egészséges kontroll személyt vontunk be. A vizsgálatot RFLP technikával végeztük a VDR gén 4 SNP-jén, melyből 3 intronikus, míg 1 misszensze mutáció volt. Ezek az SNP-k az irodalomban más kórképek kapcsán széleskörűen vizsgáltak, és sok esetben az alkalmazott hasítási enzim nevével jelöltek. Ennek megfelelően a továbbiakban mind az rs azonosító, mind pedig az alkalmazott hasító enzim neve megadásra kerül a könnyebb összevetés érdekében.

rs1544410 (BsmI) SNP:

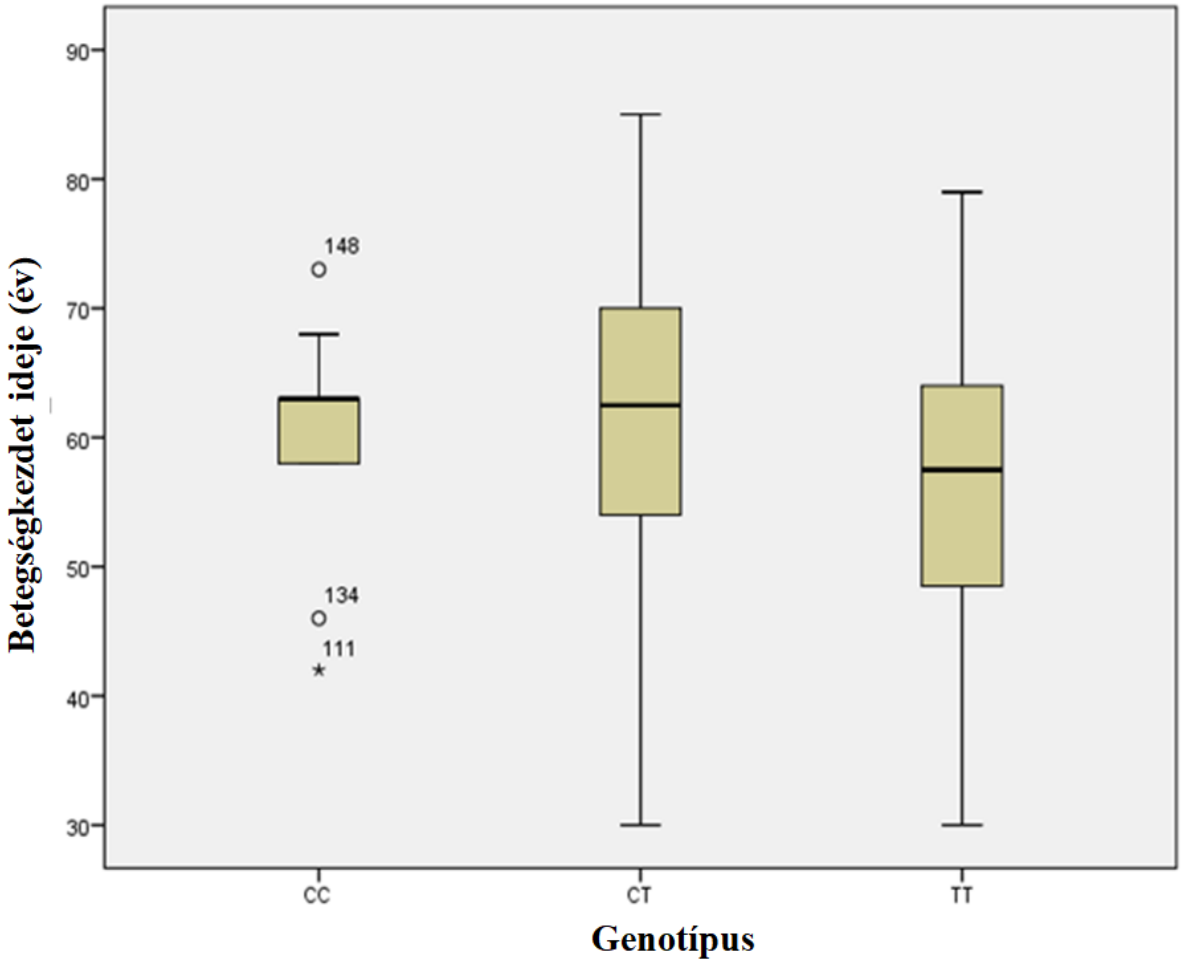
Az rs1544410 SNP a VDR gén intronikus régiójában található és egy A/G cserét takar. A genotípus megoszlása az ALS csoportnak 9 AA, 35 AG és 31 GG volt, míg a kontroll csoportban ugyanez a megoszlás 19 AA, 37 AG és 41 GG volt. Az allélfrekvenciái a két csoportban hasonlóak voltak (11. táblázat). Ez az SNP variáns nem hozható összefüggésbe a betegséggel (genotípus: P=0,327, allél frekvencia: P=0,527) vagy a betegségkezdettel (genotípus: P=0,244) (11 .ábra). Továbbá nem találtunk szignifikáns eltérést az SNP és a nemi megoszlás között az ALS csoportban (P=0,074) (11. táblázat).



11. ábra. Az rs154410 SNP genotípusainak betegségkezdet szerinti megoszlása. X tengely: genotípus, Y tengely: életkor a betegség manifesztációjakor (évek).

<u>rs731236 (TaqI) SNP:</u>

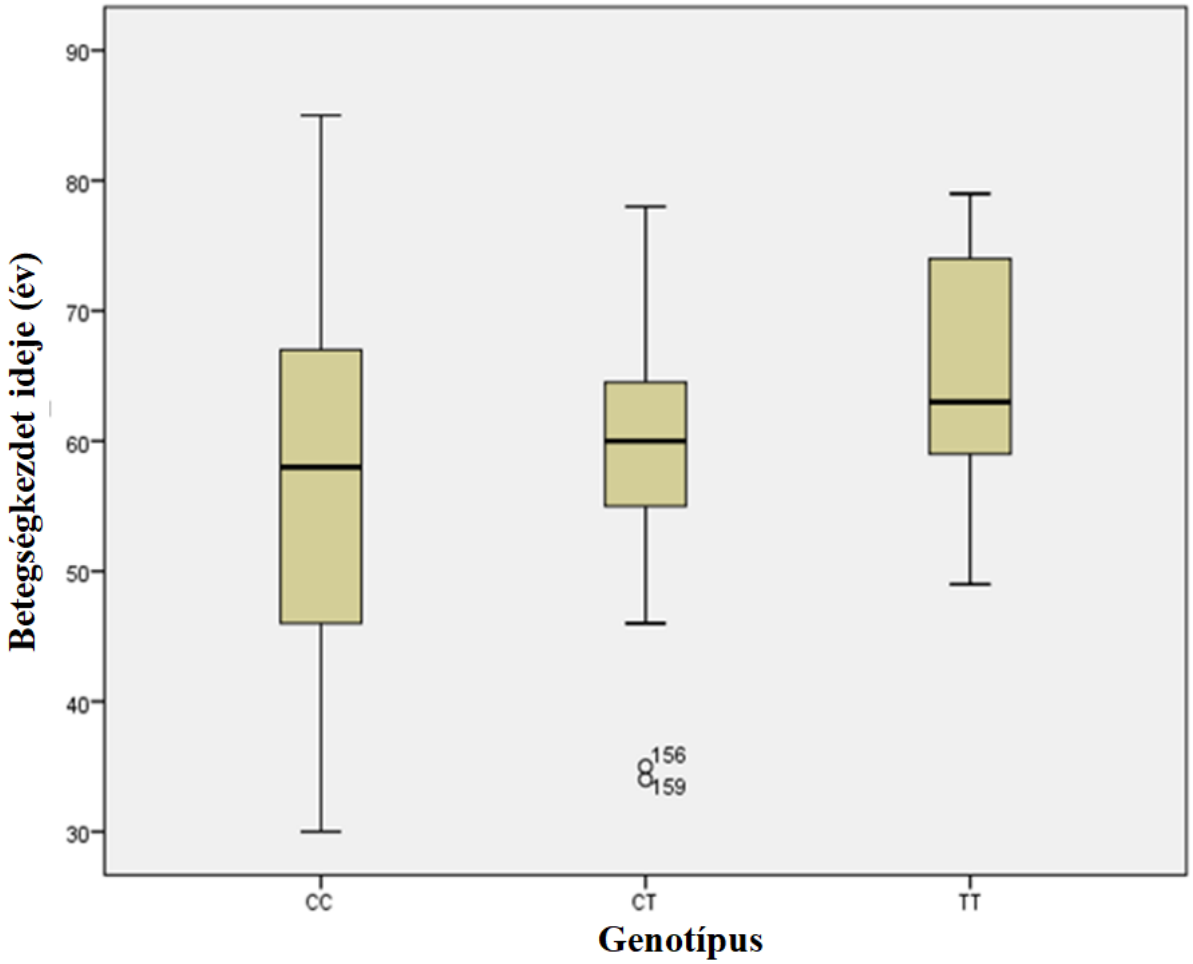
A TaqI SNP egy C/T eltérés a VDR génben, annak intronikus szakaszában helyezkedik el. A genotípus megoszlás a beteg csoportban 9 CC, 34 CT and 32 homozigóta TT volt. A kontroll csoportban pedig 18 CC, 38 heterozigóta és 41 TT homozigóta genotípus fordult elő. Az allél frekvencia az ALS és a kontroll csoportban a következőnek adódott: 35% C allél a beteg vs 38% C allél a kontroll csoportban, 65% T allél az ALS vs 62% T allél a kontroll csoportban. A TaqI SNP és az ALS között eredményeink alapján nem mutatható ki kapcsolat (genotípus: P=0,462, allél frekvencia: P=0,507), az SNP nem volt befolyással a betegségkezdetre (genotípus P=0,328) (12. ábra), illetve a férfi-nő arányban sem mutattunk ki szignifikáns eltérést (P=0,134) (11. táblázat).



12. ábra. Az rs731236 SNP genotípusainak betegségkezdet szerinti megoszlása. X tengely: genotípus, Y tengely: életkor a betegség manifesztációjakor (évek).

<u>rs2228570 (FokI) SNP:</u>

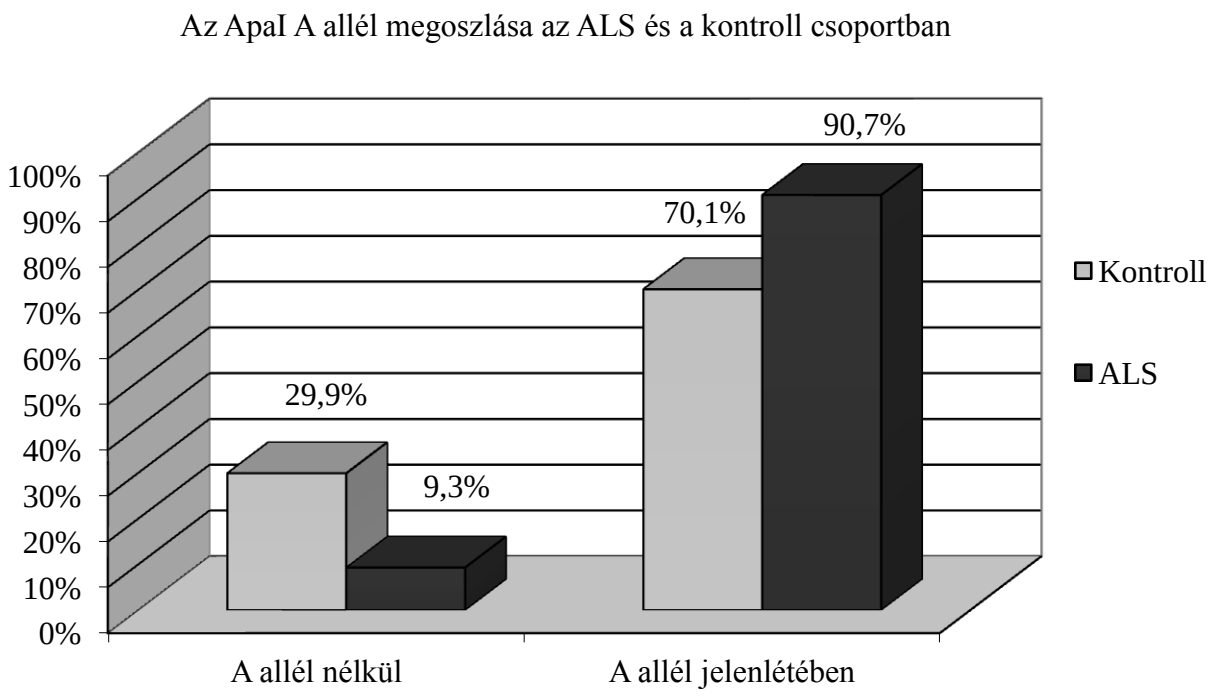
A FokI SNP egy C/T misszensz mutáció, amely érinti a fehérje struktúráját és funkcióját. A két exonikus SNP variáns eltérő struktúrájú receptor fehérjét kódol. A vad-típusú C allél egy 424 aminosavból álló fehérjét, míg a T allél egy 427 aminosavból álló receptort kódol. Ez a két VDR receptor fehérje különböző kötődést mutat a II B transzkripciós faktorral (Colombini et al. 2015), ezáltal pedig a két fehérje különböző mértékben képes indukálni a D-vitaminfüggő gének transzkripcióját. Eredményeink alapján nem mutatható ki összefüggés az ALS betegség és az rs2228570 SNP között (genotípus: P=0,801, allél frekvencia: P=0,542), továbbá nem befolyásolta a genomi eltérés a betegségkezdetet (genotípus: P=0,341) (13. ábra) és a nemi megoszlást az ALS csoportban (genotípus: P=0,982) (11. táblázat).



13.ábra. Az rs2228570 SNP genotípusainak betegségkezdet szerinti megoszlása. X tengely: genotípus, Y tengely: életkor a betegség manifesztációjakor (évek).

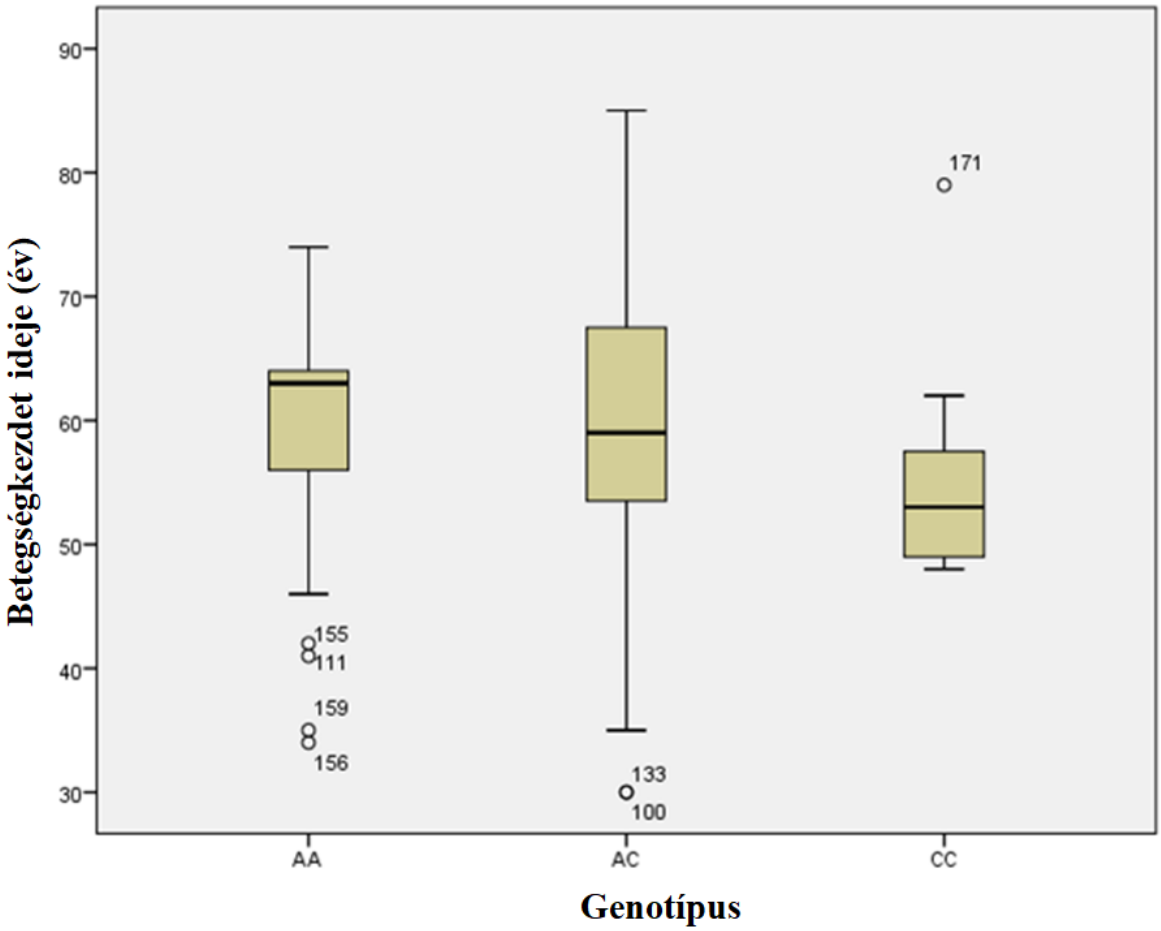
<u>rs7975232 (ApaI) SNP:</u>

Az rs7975232 (ApaI) SNP egy A/C eltérés a VDR génben, annak intronikus szegmensében. Az általunk kapott genotípus megoszlás az ALS csoportban a következő volt: 25 AA, 43 AC és 7 CC genotípus. A kontroll csoportban 28 AA, 40 AC és 29 CC genotípusú személy került bevonásra. Az allél frekvencia 62% A allél és 38% C allél a beteg és 49,5% A és 50,5% C allél a kontroll csoportban (11. táblázat). Szignifikáns eltérést találtunk a genotípus megoszlásban a beteg és a kontroll csoport között (χ^2=11,09; P=0,004). Az A allélt tartalmazó genotípusok frekvenciája (AA+AC) vs CC szignfikánsan magasabb volt az ALS betegek között, mint a kontroll csoportban (χ^2=10,807, df=1, P=0,001, OR:4,143 és 95% CI=1,699–10,100) (14. ábra). Továbbá az A allél szignifikánsan mérhetően összefüggésbe hozható az ALS beteg csoporttal (χ^2=5,352, df=1, P=0,021). A vizsgált két allél azonban nem volt hatással a betegségkezdetre (genotípus: P=0,289) (14. ábra), továbbá nem volt szignifikáns különbség az SNP és a nemi megoszlás között az ALS csoportban (P=0,327) (11. táblázat).



14. ábra. Az ApaI A allél megoszlása az ALS és a kontroll csoportban.

Az ábra az ApaI A allél megoszlását mutatja a beteg és a kontroll csoportban. Az ábrán láthatjuk az ApaI A allél megoszlás különbségét (százalékosan) a beteg és a kontroll csoport között. Az A (AA+AC) genotípus gyakorisága az ALS-betegekben szignifikánsan magasabb volt, mint a kontrollokban (($\chi 2$=10,807, df=1, P=0,001, OR: 4,143 és 95% CI=1,699-10,100) AA+AC vs CC), míg az A allél nélkül az arány ellentétes volt.



15. ábra. Az rs7975232 SNP genotípusainak betegségkezdet szerinti megoszlása. X tengely: genotípus, Y tengely: életkor a betegség manifesztációjakor (évek).

11. táblázat. Az ALS vizsgálat eredményeinek összegzése.

Csoportok	Genotípus				Allél frekvencia		
rs1544410 (BsmI)	AA (%)	AG (%)	GG (%)	p	A (%)	G (%)	p
ALS beteg	9 (12%)	35 (46,7%)	31 (41,3%)	0,327	53 (35,3%)	97 (64,7%)	0,527
Kontroll	19 (19,6%)	37 (38,1%)	41 (42,3%)		75 (38,7%)	119 (61,3%)	
Betegségkezdet ≤60 év	3 (7,9%)	16 (42,1%)	19 (50%)	0,244			
Betegségkezdet >60 év	6 (16,2%)	19 (51,4%)	12 (32,4%)				
Férfi	5 (17,9%)	16 (57,1%)	7 (25%)	0,074			
Nő	4 (8,6%)	19 (40,4%)	24 (51%)				

Csoportok	Genotípus				Allél frekvencia		
rs731236 (TaqI)	CC (%)	CT (%)	TT (%)	p	C (%)	T (%)	p
ALS beteg	9 (12%)	34 (45%)	32 (43%)	0,462	52 (34,7%)	98 (65,3%)	0,507
Kontroll	18 (18,6%)	38 (39,2%)	41 (42,3%)		74 (38,1%)	120 (61,9%)	
Betegségkezdet ≤60 év	3 (7,9%)	16 (42,1%)	19 (50%)	0,328			
Betegségkezdet >60 év	6 (16,2%)	18 (48,7%)	13 (35,1%)				
Férfi	5 (17,9%)	15 (53,6%)	8 (28,6%)	0,134			
Nő	4 (8,5%)	19 (40,4%)	24 (51,1%)				
rs2228570 (FokI)	CC (%)	CT (%)	TT (%)	p	C (%)	T (%)	p
ALS beteg	30 (40%)	35 (46,7%)	10 (13,3%)	0,801	95 (63,3%)	55 (36,7%)	0,542
Kontroll	42 (43,3%)	45 (46,4%)	10 (10,3%)		129 (66,5%)	65 (33,5%)	
Betegségkezdet ≤60 év	17 (44,7%)	18 (47,4%)	3 (7,9%)	0,341			
Betegségkezdet >60 év	13 (35,1%)	17 (46%)	7 (18,9%)				
Férfi	11 (39,3%)	13 (46,4%)	4 (14,3%)	0,982			
Nő	19 (40,4%)	22 (46,8%)	6 (12,8%)				
rs7975232 (ApaI)	AA (%)	AC (%)	CC (%)	p	A (%)	C (%)	p
ALS beteg	25 (33,3%)	43 (57,3%)	7 (9,3%)	0,004	93 (62%)	57 (38%)	0,021
Kontroll	28 (28,9%)	40 (41,2 %)	29 (29,9%)		96 (49,5%)	98 (50,5%)	
Betegségkezdet ≤60 év	10 (26,3%)	23 (60,5%)	5 (13,2%)	0,289			
Betegségkezdet >60 év	15 (41%)	20 (54%)	2 (5%)				
Férfi	12 (42,9%)	13 (46,4%)	3 (10,7%)	0,327			
Nő	13 (27,7%)	30 (63,8%)	4 (8,5%)				

Összefoglalásképp a vizsgált négy SNP estében egynél mutattunk ki szignifikáns összefüggést a kórképpel kapcsolatban (ApaI), de egyik polimorfizmus sem befolyásolta a betegségkezdetet és a nemi megoszlást a beteg csoportban (11. táblázat).

4.3. A CCR5 lókusz szerepe a szklerózis multiplexben

A CCR5 rs333 SNP vizsgálatába 428 SM beteget és 831 kontroll személyt vontunk be. A kontroll minták esetében 3 mintánál nem állt rendelkezésre elegendő örökítő anyag a vizsgálathoz, egy esetben pedig hiányzott a nemre vontakozó információ. Az SM betegek közül pedig egy személy nem töltötte ki a vérvételkor csatolt kérdőivet, melyen többek között az alkoholfogyasztási és dohányzási szokásokról és a BMI adatokról gyűjtöttünk össze információkat.

A 428 SM betegből 352 volt vad típusú, 71 heterozigóta és 5 homozigóta Δ32 deléciót hordozott. Így a Δ32 allél frekvenciája 9,46% volt. A kontroll személyek közt 670 vad típust, 146 heterozigótát és 12 homozigóta deléciós genotípust azonosítottunk. A minor allél frekvencia a csoportban 10,26% volt. A genotípus megoszlás és az allélfrekvencia értékek a CCR5 rs333 polimorfizmusra az SM és a kontroll csoportban összesítve megtalálhatók a 12.-13. táblázatokban.

12. táblázat. Genotípus és allélfrekvencia megoszlások az SM vizsgálatban.

Csoportok (N)	+/+ (%)	+/Δ32 (%)	Δ32/Δ32 (%)	p	+ (%)	Δ32 (%)	p
SM beteg (428)	352 (82,2)	71 (16,6)	5 (1,2)	0,817	775 (90,53)	81 (9,46)	0,525
Kontroll (828)	670 (81,4)	146 (17,6)	12 (1,4)		1486 (89,73)	170 (10,26)	

Jelmagyarázat: N: elemszám, +/+: vad típus, +/Δ32: heterozigóta, Δ32/Δ32: homozigóta, +: vad allél, Δ32: deléciós allél

13. táblázat. Deléciós és vad allél hordozásának vizsgálata az SM vizsgálatban.

Csoportok (N)	Δ32 nincs (%)	Δ32 van (%)	p	Csoportok (N)	+ nincs (%)	+ van (%)	p
SM beteg (428)	352 (82,24)	76 (17,75)	0,568	SM beteg (428)	5 (1,16)	423 (98,83)	0,683
Kontroll (828)	670 (80,91)	158 (19,08)		Kontroll (828)	12 (1,44)	816 (98,55)	

Nem találtunk szignifikáns eltérést az SM beteg és a kontroll csoport között sem a genotípus megoszlásban (OR=1,092, 95% CI=0,807-1,478, p=0,568 wt/wt vs wt/Δ32, Δ32/Δ32) sem az allél frekvenciákban (OR=0,914, 95% CI=0,692-1,207, p=0,525), sem az allélmegoszlásban (p=0,817).

Ezek után megvizsgáltuk nemi bontásban is a genotípust és az allélfrekvenciát, de szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk (14. táblázat).

14. táblázat. Genotípus és allélgyakoriság adatok a beteg és a kontroll csoportban nemi bontásban az SM vizsgálatban.

Csoportok (N)	+/+ (%)	+/Δ32 (%)	Δ32/Δ32 (%)	p	+ (%)	Δ32 (%)	p
SM beteg férfi (106)	87 (82,07)	19 (17,92)	0 (0)	0,363	193 (91,03)	19 (8,96)	0,969
Kontroll férfi (203)	170 (83,74)	30 (14,77)	3 (1,47)		370 (91,13)	36 (8,86)	

Csoportok (N)	+/+ (%)	+/Δ32 (%)	Δ32/Δ32 (%)	p	+ (%)	Δ32 (%)	p
SM beteg nő (320)	265 (82,81)	52 (16,25)	5 (1,56)	0,646	582 (90,93)	62 (9,68)	0,453
Kontroll nő (624)	499 (79,96)	116 (18,58)	9 (1,44)		1114 (89,26)	134 (10,73)	

A nemi megoszlás vizsgálata után a betegcsoportban megnéztük, hogy a genotípusmegoszlás és a betegekre jellemző SM kórfomák között van-e összefüggés (15. táblázat). Ebben a vizsgálatban sem kaptunk szignifikáns eltérést (p=0,440).

15. táblázat. Az RR és SP kórformájú SM betegek genotípusmegoszlása.

Csoportok (N)	+/+ (%)	+/Δ32 (%)	Δ32/Δ32 (%)	p
RR SM beteg (377)	312 (82,75)	60 (15,91)	5 (1,32)	0,440
SP SM beteg (51)	40 (78,43)	11 (21,56)	0 (0)	

Ezek után azt szerettük volna tisztázni, hogy a genotípus vagy az allélek befolyásolják-e a betegség súlyosságát jelző EDSS értéket vagy a betegségkezdetet (16., 17. táblázat).

16. táblázat. Az EDSS és betegségkezdet adatok genotípus szerinti bontásban.

Csoportok	+/+ (N)	+/Δ32 (N)	Δ32/Δ32 (N)	p
EDSS	(352) 2,514±1,927	(71) 2,697±1,970	(5) 2,700±1,350	0,755
Betegségkezdet	(352) 31,97±9,840	(71) 33,13±9,493	(5) 32,60±12,720	0,660

17. táblázat. A deléciós és a vad allél hatása az EDSS értékre és betegségkedetre.

Csoportok	+ allél		p	Δ32 allél		p
	Nincs (N)	Van (N)		Nincs (N)	Van (N)	
EDSS	(352) 2,514±1,927	(76) 2,697±1,928	0,453	(5) 2,700±1,350	(423) 2,545±1,933	0,858
Betegség-kezdet	(352) 31,97±9,840	(76) 33,09±9,631	0,365	(5) 32,60±12,720	(423) 32,16±9,781	0,921

Nem befolyásolta az rs333 polimorfizmus az EDSS pontszámott (F=0,282; p=0,755), vagy a betegségkezdetet (F=0,416; p=0,660). Sem a deléciós, sem a vad típusú (+) allél nem befolyásolta az EDSS értékét (+ allél: F=0,032, p=0,858; Δ32 allél: F=0,564; p=0,453), vagy a betegségkezdetet (+ allél: F=0,010, p=0,921; Δ32 allél: F=0,821, p=0,365).

Mivel az SM kialakulásában nem csak a genetikai hajlam, hanem a környezeti faktorok is kritikus hatással vannak ezért, az általunk gyűjtött alkoholfogyasztási és dohányzási szokásokkal és a testtömeg-index-szel (BMI) kapcsolatos adatokat is felhasználtuk a következő vizsgálatban. Azt vizsgáltuk, hogy ezek a környezeti faktorok és a vad valamint a deléciós allél együttesen fejt-e ki hatást az EDSS értékre vagy a betegségkezdetre (18.-20. táblázat).

18. táblázat. Az alkoholfogyasztás és a vad és a deléciós allél együttes hatásának vizsgálata SM-ben.

Alkoholfogyasztás	EDSS		Betkezd	
	vad allél		vad allél	
	nincs (N)	van (N)	nincs (N)	van (N)
Nem	2,700±1,350 (5)	2,583±1,955 (386)	32,60±12,720 (5)	32,48±9,643 (386)
Igen	- (0)	2,069±1,604 (36)	- (0)	28,50±10,676 (36)
p érték	-		-	
Alkoholfogyasztás	EDSS		Betkezd	
	Δ32 bp allél		Δ32 bp allél	
	nincs (N)	van (N)	nincs (N)	van (N)
Nem	2,548±1,953 (323)	2,757±1,926 (68)	32,23±9,687 (323)	33,72±9,545 (68)
Igen	2,138±1,586 (29)	1,786±1,776 (7)	29,10±11,194 (29)	26,00±8,426 (7)
p érték	0,509		0,287	

19. táblázat. A dohányzás és a vad és a deléciós allél együttes hatásának vizsgálata SM-ben.

Dohányzás	EDSS		Betkezd	
	vad allél		vad allél	
	nincs (N)	van (N)	nincs (N)	van (N)
nem	2,125±0,478 (4)	2,519±2,034 (279)	32,25±14,660 (4)	32,46±10,073 (279)
alkalmanként	- (0)	2,552±1,787 (48)	- (0)	33,35±9,295 (48)
rendszeresen	5,000±0 (1)	2,374±1,679 (95)	34,00±0 ()	30,72±9,111 (95)
p érték	0,154		0,752	
Dohányzás	EDSS		Betkezd	
	Δ32 bp allél		Δ32 bp allél	
	nincs (N)	van (N)	nincs (N)	van (N)
nem	2,610±2,045 (237)	2,457±1,905 (46)	32,49±10,12 (237)	32,28±10,169 (46)
alkalmanként	2,372±1,645 (39)	3,333±2,250 (9)	32,28±8,498 (39)	38,00±11,608 (9)
rendszeresen	2,289±1,659 (76)	2,825±1,786 (20)	30,17±9,473 (76)	32,95±7,112 (20)
p érték	0,237		0,252	

20. táblázat. A két allél és a testömeg-index együttes hatásának vizsgálata SM-ben.

BMI	EDSS		Betkezd	
	vad allél		vad allél	
	nincs (N)	van (N)	nincs (N)	van (N)
sovány	- (0)	2,460±1,936 (25)	- (0)	28,48±7,875 (25)
normál testsúly	1,500±0 (1)	2,545±1,978 (232)	14,00±0 (1)	31,54±10,317 (232)
túlsúlyos	3,333±1,443 (3)	2,652±2,018 (115)	35,67±9,609 (3)	32,90±8,914 (115)
elhízott	2,000±0 (1)	2,286±1,479 (49)	42,00±0 (1)	35,57±8,991 (49)
p érték	0,723		0,142	
BMI	EDSS		Betkezd	
	Δ32 bp allél		Δ32 bp allél	
	nincs (N)	van (N)	nincs (N)	van (N)
sovány	2,219±1,769 (16)	2,889±2,246 (9)	26,81±7,977 (16)	31,44±7,161 (9)
normál testsúly	2,513±1,977 (198)	2,700±1,986 (35)	31,21±10,240 (198)	32,91±11,049 (35)
túlsúlyos	2,646±2,040 (96)	2,773±1,881 (22)	33,24±9,155 (96)	31,82±7,768 (22)
elhízott	2,341±1,472 (41)	2,000±1,479 (9)	35,10±8,703 (41)	38,44±10,051 (9)
p érték	0,824		0,481	

A vizsgálatunkban egyik kombináció sem bizonyult szignifikánsnak a beteg csoportban az EDSS-re és a betegségkezdetre vonatkozóan. Eredményeink azt mutatják, hogy nincs

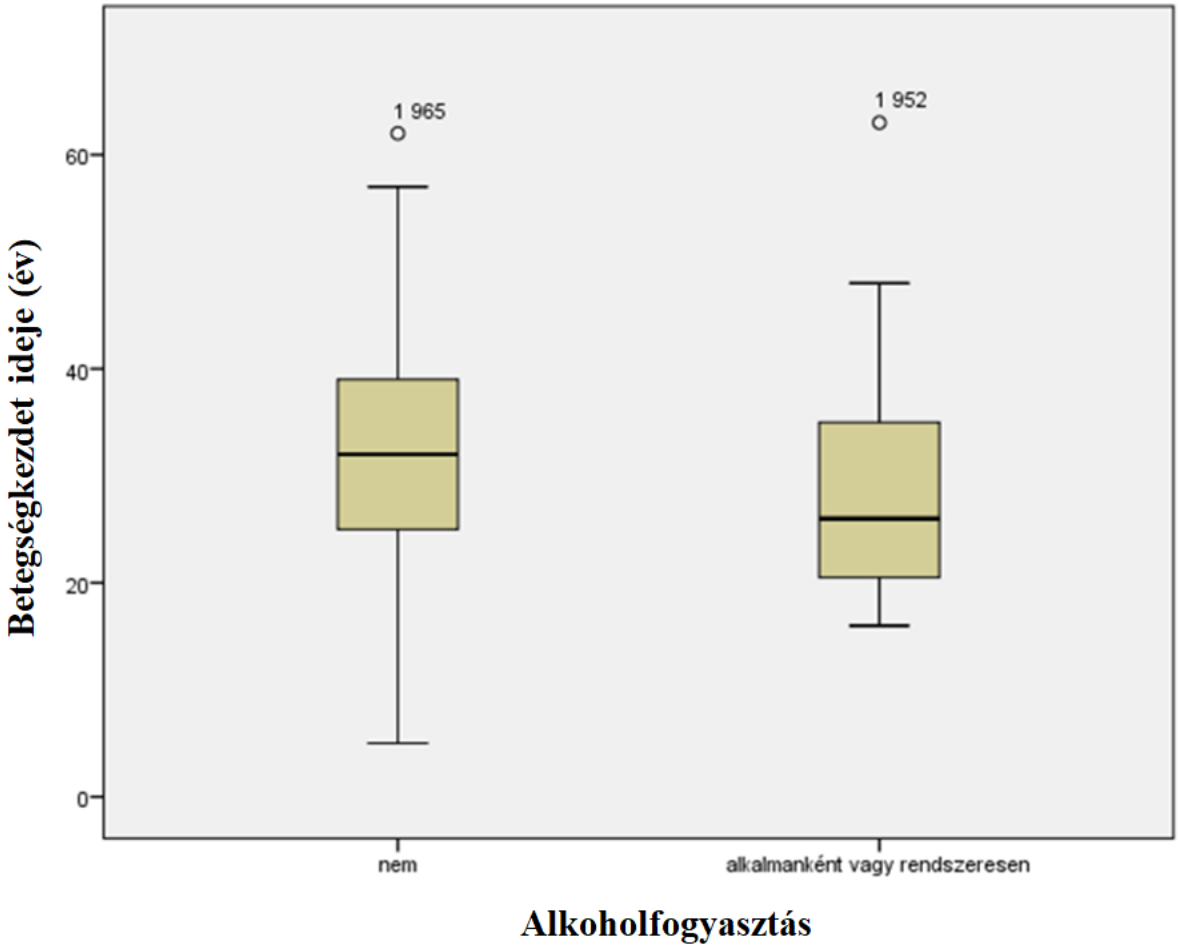
összefüggés a CCR5 Δ32 allél és az SM hajlam között a csongrád megyei és az észak-bácskai populációban.

Utolsó vizsgálatunkban pedig arra kerstük a választ, hogy az általunk vizsgált környezeti faktorok önmagukban befolyásolják-e a betegségkezdetet, vagy a betegség súlyosságát.

Elsőként az alkohol hatását elemeztük az EDSS és a betegségkezdet vonatkozásában. Nem kaptunk szignifikáns eltérést az EDSS tekintetében, azonban az alkoholnál szignifikáns negatív hatást mértünk a betegségkezdet tekintetében (P=0,019). Tehát az SM hajlamot hordozó személyeknél az alkoholfogyasztás korábban előidézheti a betegség kialakulását (16. ábra), (21.táblázat).

21. táblázat. Az alkohol hatása az EDSS értékre és betegségkezdetre.

Alkoholfogyasztás	EDSS (N)	p	Betkezd (N)	p
nem	2,584±1,948 (391)	0,125	32,49±9,667 (391)	0,019
igen	2,069±1,604 (36)		28,50±10,676 (36)	



16. ábra. Az alkoholfogyasztás hatása a betegségkezdetre az SM vizsgálatnál.

Ezután a dohányzási szokások összevetése következett a súlyossággal és a betegségkezdettel. Ebben a vizsgálatban nem kaptunk szignifikánst értéket (P=0,721. P=0,229) (22. táblázat).

22. táblázat. A dohányzási szokások hatása az EDSS értékre és betegségkezdetre.

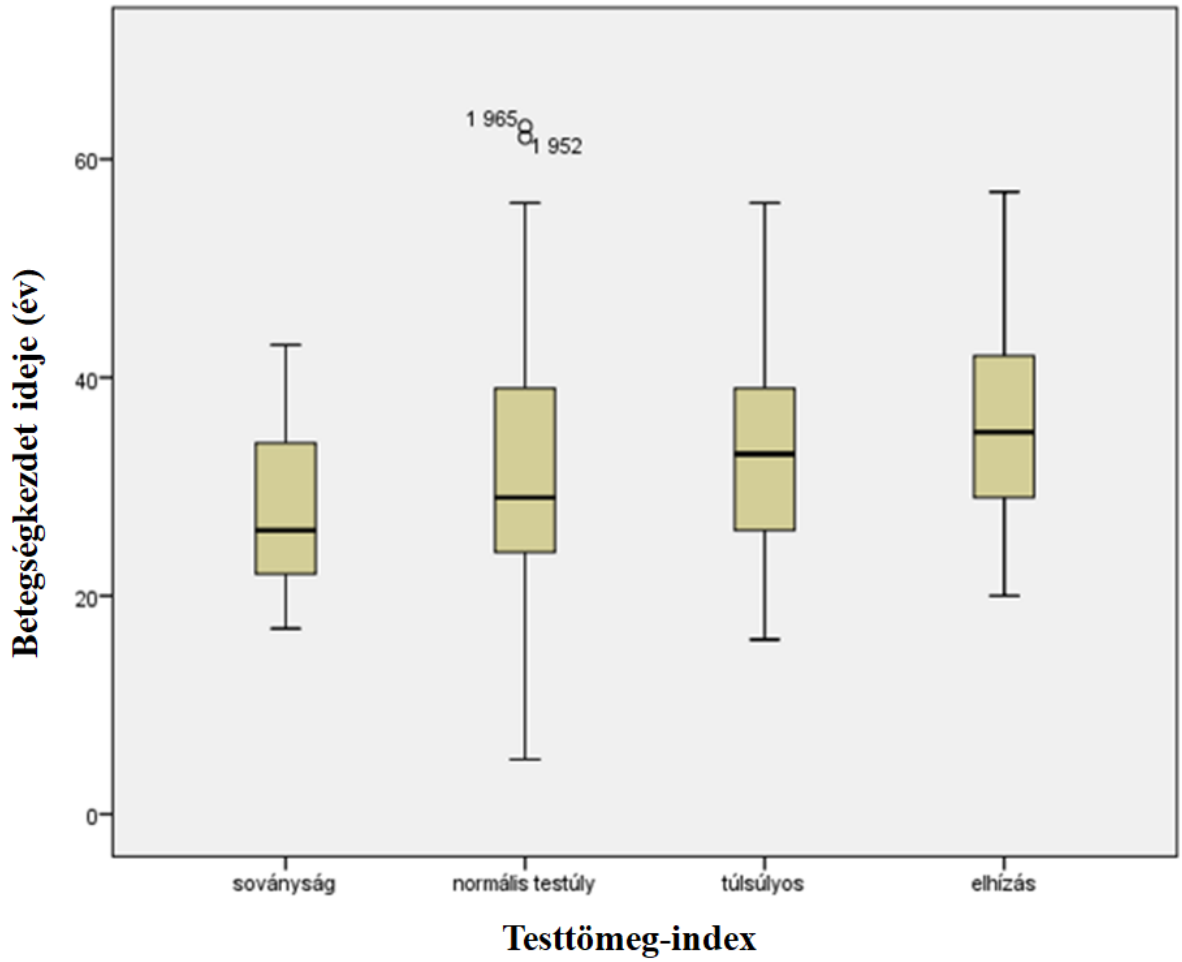
Dohányzás	EDSS (N)	p	Betkezd (N)	p
nem	2,585±2,201 (283)	0,721	32,46±10,115 (283)	0,229
alkalmanként	2,552±1,787 (48)		33,35±9,295 (48)	
rendszeresen	2,404±1,691 (96)		30,75±9,096 (96)	

Végezetül pedig a BMI adatokat elemeztük, hogy befolyásolják-e az EDSS vagy a betegségkezdtet értkeket (23. táblázat).

23. táblázat. A testtömeg-index hatása az EDSS értékre és betegségkezdetre.

BMI	EDSS (N)	p	Betkezd (N)	p
sovány	2,460±1,936 (25)	0,686	28,48±7,875 (25)	0,007
normál testsúly	2,541±1,975 (233)		31,46±10,359 (233)	
túlsúlyos	2,669±2,004 (118)		32,97±8,899 (118)	
elhízott	2,280±1,464 (50)		35,70±8,945 (50)	

Ennél a vizsgálatnál szignifikáns eltérést kaptunk a betegségkezdetre vonatkózóan (p=0,007). A táblázatból kitűnik, hogy a BMI érték növekedésével (soványtól az elhízott kategória felé) kitolódik a betegségkezdet. Ezt az összefüggést a 17. ábrán is szemléltettük.



17. ábra. A testömeg-index és a betegségkezdet kapcsolatának vizsgálata SM-ben.

5. Diszkusszió

5.1. Parkinson-kór vizsgálat eredményeinek elhelyezése a szakirodalomban

Munkánk célja a KMO gén SNP-inek vizsgálata PD-vel összefüggésben. Napjainkig nem volt olyan genetikai vizsgálat, mely a KP szerepét tanulmányozta a PD pathogenezise kapcsán.

A Miller-féle kisózási technika segítségével kapott DNS mintákat Taqman próbás alléldiszkriminációs eljárással vizsgáltuk. A kapott adatokat SPSS szotver 20. verziójával értékeltük ki.

Az általunk vizsgált négy polimorfizmus nem hozható összefüggésbe a PD-vel és nem voltak hatással a betegségkezdetre sem.

A KMO gén polimorfizmusainak hatását korábban skizofréniában, bipoláris betegségben és szkelrózis multiplexben vizsgálták.

Skizofréniában a post-mortem szövetvizsgálatok a KMO gén expressziójának és a KMO enzimaktivitásnak a szignifikáns csökkenését mutatták (Wonodi et al. 2011). További vizsgálatok pedig emelkedett KYNA koncentrációt mértek a prefrontális cortexben és az agyvízben (Linderholm et al. 2012; Kegel et al. 2014; Plitman et al. 2017). Skandináv populáción végzett tanulmányban nem találtak összefüggést a skizofrénia és a 15 vizsgált KMO SNP között (Holtze et al. 2011). Holtze és munkatársai azonban a 2012-ben szintén skandináv populáción végzett vizsgálatukkal felvetették a kapcsolatot az rs1053230 és az agyvízben mért KYNA koncentráció között (Holtze et al. 2012). Az SNP T allélje 45 %-kal megemelte a KYNA szintjét mind a beteg mind a kontroll mintáknál (Holtze et al. 2012). Japán populáción végzett vizsgálatok felvetették az rs2275163-as SNP szerepét skizofréniában mind az SNP, mind a haplotípus vizsgálat során, de a független mintákkal végzett második vizsgálat nem erősítette ezt meg (Aoyama et al. 2006). Oroszországi populáción végzett vizsgálat, mely az rs2275163 (C/T) és az rs1053230 (A/G) SNP-ket vizsgálta, kimutatta, hogy a GG genotípus és a T*GG diplotípus sokkal gyakrabban fordul elő a betegek körében, rizikófaktornak tekinthetők (Golimbet et al. 2014). Az rs2275163 SNP esetében a TT és a CT genotípusokat hordozó személyeknél kissé magasabb KMO mRNS szintet mértek a CC genotípusúakhoz képest. Mind az rs2275163, mind pedig az rs1053230 esetében leírták, hogy a CC genotípus összevetve a TT és CT genotípussal szemben szignifikánsan rosszabbul teljesít a neurokognitív feladatokat tartalmazó teszteken (Wonodi et al. 2014).

A pszichotikus tüneteket mutató 1 típusú bipoláris betegségben, csakúgy, mint a skizofréniában magasabb KYNA szintet és csökkent KMO gén expressziót mértek a betegek agyvizében (Lavebratt et al. 2014). Emellett a KMO gén rs1053230 SNP C aléllját (Arg(452)) magasabb KYNA CSF szinttel, csökkent KMO aktivitással hozták összefüggésbe valamint a mániás epizódok során pszichotikus tulajdonságokkal társították (Lavebratt et al. 2014).

Szklerózis multiplexszel összefüggésben a KMO gén két SNP-jét azonosították, az rs1053221 és az rs1053183 SNP-t, egy GWAS vizsgálat során (McCauley et al. 2009).

Eredményeink alapján a vizsgált négy polimorfizmus feltehetően nem hozható összefüggésbe a PD-vel, és nagy valószínűséggel nincsenek befolyással a betegségkezdetre sem. A genetikai kapcsolat a PD és a kinurenin rendszer között még továbbra sem igazolt. A vizsgált SNP-k nagy valószínűséggel nincsenek hatással a KMO gén funkciójára, nem részei a regulátor fehérjék kötőhelyeinek, melyek relevánsak a PD tekintetében.

A jövőben további vizsgálatok szükségesek, melyek nagyobb mintaszámon vizsgálják a kinurenin rendszer enzim polimorfizmusainak és alléljainak szerepét, valamint az enzimek epigenetikai szabályozását PD-ban. Munkánk ráirányította a figyelmet erre a korábban nem tanulmányozott területre. A KP zavara összefüggésbe hozható számos neurológiai kórképpel, ilyen az Alzheimer-kór (AD), a depresszió és a PD (Stayte and Vissel 2014). Ezért ez az enzimatikus útvonal befolyásolásának lehetősége terápiás jelentőséggel bírhat ezen betegség kapcsán.

5.2. Amiotrófiás laterálszklerózis kutatás eredményeinek elhelyezése a szakirodalomban

Korábbi tanulmányok felvetették a 25-hidroxi-D-vitamin szintjének csökkenését különböző neurológiai rendellenességek esetében, köztük a SM-ben (Niino et al. 2015; Duan et al. 2014), AD-ban (Sakurai, Ogama, and Toba 2014; Littlejohns et al. 2014) és PD-ban (Liu and Zhang 2014). Ennek ellenére csak néhány tanulmány foglalkozott a D-vitamin szerepével az ALS esetében (Karam et al. 2013; Gianforcaro, Solomon, and Hamadeh 2013; Kamel et al. 2003; Solomon, Gianforcaro, and Hamadeh 2011; Gianforcaro and Hamadeh 2014; Sato et al. 1997). Ezen kevés tanulmányból az egyik felvetette, hogy a 25-hidroxi D-vitamin szintje alacsonyabb az ALS betegek estében (Sato et al. 1997). A D-vitamin pótlása, mely a normál tartomány alsó határát érte el, képes volt kismértékű lassulást eredményezni a betegség progressziójában az ALSFRS-R pontszámok alapján egy 9 hónapos vizsgálati periódusban (Karam et al. 2013). Egy másik tanulmány bizonyította, hogy a krónikus D-vitamin kezelés véd a glutamát által okozott neurotoxicitással szemben, miközben fokozza a VDR gén mRNS

szintjét patkány agykérgi idegsejtekben (Taniura et al. 2006). Az ALS továbbá pathofiziológiai hasonlóságokat mutat más neurodegeneratív kórképekkel, mint például a SM, AD és a PD. Mindhárom kórkép kapcsán felmerül ugyanis az oxidatív stressz, a neurodegeneráció, a gyulladás, az apoptózis és a mitokondriális zavar szerepe. Újabb tanulmányok felvetették, hogy a D-vitamin javítani képes ezeket a pathofiziológiás eltéréseket ezen betegségek állatmodelljeiben és humán vizsgálatokban (Gianforcaro and Hamadeh 2014; Cantorna, Hayes, and DeLuca 1996; Wang et al. 2001; de Viragh, Haglid, and Celio 1989). Továbbá genetikai vizsgálatok a VDR gén SNP-in felvetik a gén szerepét ezen neurológiai betegségekben (Gezen-Ak et al. 2007; Lehmann et al. 2011; Liu et al. 2013; Torok et al. 2013; Tizaoui et al. 2015), míg minimális adat áll rendelkezésre a VDR és SNP-i szerepéről ALS-ben. Ezért kutatócsoportunk azt a célt tűzte ki, hogy vizsgáljuk a VDR gén és az ALS lehetséges kapcsolatát.

Vizsgálatunk során az ApaI A allél gyakoribbnak bizonyult az ALS csoportban, mint az egészséges kontrollokban, ami azt sugallja, hogy az ALS-ben kockázati hatást fejthet ki. Ez a munka az első genetikai bizonyíték, mely felveti, hogy a VDR gén szerepet játszhat az ALS-ben. Kamel és munkatársai korábban vizsgálták a VDR gén BsmI SNP-jét, de ez nem volt összefüggésben a kórképpel vagy a kórokozó ólomszinttel (Kamel et al. 2003). Tanulmányunkban igazoltuk ezt a megfigyelést, mert nem találtunk szignifikáns kapcsolatot a BsmI SNP-vel. Nem találtunk továbbá szignifikáns különbséget a FokI vagy a TaqI SNP estében az ALS-kontroll csoport vizsgálatakor.

Nemrégiben számos tanulmány készült a VDR SNP-k PD-ben kifejtett hatásáról. Például a VDR gén különböző SNP-inak védő vagy káros szerepét vizsgálták a Feröer-szigeteken (ahol a PD előfordulási gyakorisága kétszerese a többi európai országnak). Kiderült, hogy a PD betegek genotípus-frekvenciái statisztikailag nem különböztek a kontroll csoportéitól a három vizsgált SNP esetében (ApaI, BsmI és TaqI) (Petersen et al. 2014). Egy kínai vizsgálatban azonban a TaqI kockázati tényezőt jelentett a hordozó Parkinsonos férfiakra (Torok et al. 2013). Kutatócsopotunk egy másik tanulmányában pedig a PD betegeknél a Fokl C allél gyakorisága volt szignifikánsan magasabb, összeveteve a kontroll csoporttal (Torok et al. 2013). Egy frissen publikált meta-analízis pedig a VDR gén 4 SNP-jét vizsgálta (rs2228570, rs731236, rs7975232, rs1544410), melyek közül az rs2228570 rizikó faktorként lett azonosítva az ázsiai populációknál, míg a kaukázusinál nem volt kimutatható szignifikáns kapcsolat (Wang et al. 2019). Az rs731236 SNP szintén emelkedett rizikófaktorként jelent meg, habár ez esetben az eredmény nem volt megismételhető A másik két SNP esetében pedig nem találtak szignikáns kapcsolatot a betegséggel (Wang et al. 2019).

A VDR gén SNP-k AD való kapcsolatát három független csoport figyelte meg. Az Apal Aa genotípus (AC genotípus) gyakorisága szignifikánsan magasabb volt az AD betegeknél, mint az egészséges egyéneknél (Gezen-Ak et al. 2007). Egy viszonylag nagy vizsgálatban az ApaI T és a TaqI G az AD kockázatával járt együtt, különösen 75 évnél idősebb betegeknél (Lehmann et al. 2011). A VDR SNP-k (ApaI és TaqI) és a gyulladási folyamatokban is szerepet játszó interleukin-10 (rs1800896) és a dopamin-β-hidroxiláz (rs1611131) gének SNP-inek együttes vizsgálatakor szignifikáns adatokat kaptak, de ezek az eredmények nem ismétlődtek meg a többszörös tesztelések során (Lehmann et al. 2011).

Ezen túlmenően több SNP esetében is megfigyelték, hogy hatással van a betegség kezdetére AD és PD betegeknél (Gezen-Ak et al. 2007; Han et al. 2012). Tanulmányunk nem mutatott ki összefüggést a VDR SNP-k és az ALS betegség kezdete között az ALS csoportban.

A VDR gén szerepét a SM-ben eddig csak kevéssé vizsgálták, de számos olyan bizonyíték van, amelyek azt mutatják, hogy egyes VDR SNP-k kockázati tényezők a SM-ben (Tizaoui et al. 2015).

Összességében ezért érdemes volt megvizsgálni, hogy a VDR génben lévő SNP-k szerepét ALS kapcsán, hiszen PD-ra, AD-ra és SM-re vonatkozóan már voltak adatok, de ALS-re vonatkozóan még nem. Természetesen munkánkat korlátozza az alacsony mintaszám, de ez az első bizonyíték arra, hogy a VDR gén szerepet játszhat az ALS-ben. További vizsgálatokra van szükség független betegcsoportokkal, hogy igazolják az általunk kapott eredményeket.

5.3. Szklerózis multiplex tanulmány eredményeinek elhelyezése a szakirodalomban

Ebben a tanulmányban vizsgáltuk a CCR5 Δ32 deléció szerepét SM betegség kapcsán, ehhez nagyszámú beteg és a második legnagyobb kontroll populációt gyűjtöttük össze. A minták Csongrád megyéből és Észak-Bácska (Szerbia) régióból származnak. Ez a népesség korábban nem vett részt a CCR5 kísérletben. Az eredményeink azt mutatják, hogy nincs összefüggés a CCR5 Δ32 allél és a SM kockázata között.

Ezek a megállapítások összhangban vannak számos korábbi vizsgálat adataival (Motsinger et al. 2007; Ristic et al. 2006; Brassat et al. 2006; Song and Lee 2014; Bennetts et al. 1997; Haase, Schmidt, and Faustmann 2002; Kantarci et al. 2005; Arababadi et al. 2010) (24. táblázat).

Azonban számos tanulmány azt a következtetést vonta le, hogy ez a mutáció védő tényező (Barcellos et al. 2000; D'Angelo et al. 2011; van Veen et al. 2007; Kaimen-Maciel et al. 2007; Favorova et al. 2002; Otaegui et al. 2007; Schreiber et al. 2002; Kantor, Bakhanashvili, and Achiron 2003) (24. táblázat). Ezen vizsgálatok közül csak egy olyan volt, melyben a deléciós allél gyakoribb volt a kontroll populációban, amely adat az allél protektív szerepét jelezné (Otaegui et al. 2007). A cikkek túlnyomó többségében a védelema betegség kialakulásának későbbre tolódásában (Barcellos et al. 2000; Favorova et al. 2002), a súlyosság mértékének csökkenésében (Kantor, Bakhanashvili, and Achiron 2003; D'Angelo et al. 2011) vagy a jobb MRI leletekben (van Veen et al. 2007; Kaimen-Maciel et al. 2007; Schreiber et al. 2002) tükröződött. Az egyik tanulmány felvetette azt is, hogy egyfajta protektív prognosztikai faktor szerepe van a deléciónak (Kantor, Bakhanashvili, and Achiron 2003). A CCR5 Δ32 deléciós allélhez kapcsolódó erős protektív hatás hiánya vagy gyengesége azt sugallja, hogy a CCR5 receptor nem játszik fontos, központi szerepet az immunsejtek központi idegrendszerbe történő migrációjában SM-ben.

Fontos azonban, hogy számos tanulmány a CCR5 Δ32 allélt, mint az SM rizikó faktora veti fel (Gade-Andavolu et al. 2004; Luomala et al. 2003; Pulkkinen et al. 2004; Shahbazi et al. 2009) (24. táblázat). Például egy iráni populáció vizsgálatakor, mint lehetséges hajlamosító faktor merült fel (Shahbazi et al. 2009). Az ellentmondásos eredmények mögött állhat a beteg és kontroll csoportok (Pulkkinen et al. 2004) vagy mindkettő (Shahbazi et al. 2009) nem megfelelő kiválasztása. Ezekben a vizsgálatokban a genotípus eloszlás nem volt összhangban a HWE-val. Egy vizsgálatban, melybe 89 SM beteget és 119 kontrollt vontak be (Pulkkinen et al. 2004) az SM-betegek közül 71 vad típusú homozigótát, 12 heterozigótát és 6 homozigóta a

deléciós személyt azonosítottak a beteg csoportban, míg a kontrollok esetében 88 vad típusú homozigótát, 30 heterozigótát és 1 homozigóta delécióst. A betegcsoport HWE vizsgálatának eredménye χ^2=15,85, p=0,000068. Mivel a p értéke <0,05, a csoport nem volt összhangban a HWE-vel, a kiválasztott csoport nem reprezentálta megfelelően a populációt. A kontroll csoportban egy kategóriában (homozigóta deléció) kevesebb, mint 5 személy került, ami azt jelenti, hogy a kapott érték statisztikailag nem teljesen megbízható (χ^2=0,822, p=0,364). Az iráni populációban 254 beteg és 380 kontroll személy eredményeit elemezték (Shahbazi et al. 2009). Az SM-csoport genotípus-eloszlása 201 vad típusú homozigóta, 16 heterozigóta és 37 homozigóta a deléciós volt. A kontroll csoportban ugyan ezek a számok 323, 49 és 8 voltak. Az SM-csoport HWE tesztjének eredménye χ^2=156,100, p<0,000001, és a kontroll csoport esetében χ^2=11,724, p<0,001, így sem az SM, sem a kontroll csoport nem felelt meg a HWE-nek. Egy másik vizsgálatban nem figyeltek meg szignifikáns különbséget az allél gyakoriságban vagy a genotípus előfordulásában a beteg és a kontroll csoport között, és az allél nem befolyásolta a betegség kialakulásának kezdetét sem (Arababadi et al. 2010). További vizsgálatok viszont azt mutatták, hogy a deléciót hordozó SM betegek átlagosan 8,44 évvel korábban haltak meg (Gade-Andavolu et al. 2004). Ezek a megfigyelések szignifikánsabbnak bizonyultak a nőknél, és a szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy a deléció prognosztikai markerként szolgálhat az SM számára. Azonban a kontroll csoportot nem vizsgálták, és fennáll annak a lehetősége, hogy az allél hasonló hatást gyakorol az egészséges kontrollokra is. A szerzők egy csoportjának két tanulmányából kétféle eredmény mutatkozott (Favorova et al. 2002; Favorova et al. 2006). A korábbi tanulmányban arra a következtetésre jutottak, hogy az allél védő tényező (CCR5 Δ32, DR4), mivel a pozitív fenotípus negatív összefüggést mutatott a korai SM-es kezdettel (Favorova et al. 2002), míg később azonosítottak egy kétallélos kombinációt, amely SM-hez társult (Favorova et al. 2006). E különböző eredmények magyarázata az átfedő populációkban az alkalmazott statisztikai módszerek vagy a vizsgált SM altípusok közötti különbségben rejlik. Csak egy olyan tanulmány volt, amelyben az allél a PPSM altípushoz asszociált, de a PPSM betegek száma csak 30 volt, ezért ez az eredmény egy független nagyobb minta számú csoporton megerősítésre vár. A PPSM altípus egy másik betegség entitás az RR/SP SM altípusoktól, és talán a legjobb, ha figyelmen kívül hagyjuk a PPSM eredményeket az RR/SP SM altípusok vizsgálatakor.

Összességében valószínűnek tűnik, hogy ez a receptor nem befolyásolja jelentősen az immunsejtek CNS-be történő migrációját SM-ben, vagy más receptorok képesek átvenni ezt a funkciót. Csekély hatása van ugyanis, ha a receptor nem működik (homozigóta Δ32 bp

deléció), hiszen az eredmények csak enyhe protekciót vagy a befolyás hiányát jeleztek. Az immunsejtek központi idegrendszerbe történő bejutását szabályozó fő receptor azonosítása fontos kérdés az SM patomechanizmusa kapcsán. A központi mechanizmus feltárása és az immunsejtek központi idegrendszeri migrációjának irányára vonatkozó részletek kétségtelenül fontosak a jövőbeli SM kutatásban.

Vizsgálatunkban arra is kerestük a választ, hogy az alkoholfogyasztási, dohányzási szokások és a testtömeg-index kombinálva a vad és deléciós alléllel befolyásolja-e az EDSS értékeket vagy a betegségkezdetet. Egyik párosításban sem kaptunk szignifikáns eltérést.

Összefoglalva az eredményeket további megerősítést nyert, hogy a CCR5 receptor csak gyenge szerepet játszik SM-ben. Ez a tanulmány nem azonosított a CCR5 gén Δ32-deléciója és a SM között összefüggést. A deléció nem jelent nagyobb kockázatot a betegség kialakulására, nem nevezhető biomarkernek, hiszen nem fordult elő nagyobb számban a beteg csoportban. Nincs protektív szerepe, hiszen nem jelent meg nagyobb számban a kontroll csoportban. Továbbá nincs prognosztikai faktor szerepe, hiszen nem befolyásolta sem az EDSS értéket sem a betegségkezdetet. Eredményeink nagyszámú SM beteggel és a második legnagyobb kontroll mintaszámmal végzett vizsgálat adatai. A cikkünk publikálását megelőzően megjelent a témában egy meta-analízis Song és Lee munkájaként, mely más vizsgálatok adatait összegezve és új statisztikai vizsgálattal a legtöbb beteg és kontroll minta adatait elemezte újra (Song and Lee 2014). Ezen metaanalízis eredménye megegyezett a mi vizsgálatunk eredményével.

A szkerózis multiplex a központi idegrendszer autoimmun rendellenessége, melynek kialakulása a genetikai hajlam mellett számos környezeti faktor szerepétől is függ. Jelen vizsgálatunkban az alkoholfogyasztási, dohányzási szokásokat és a testtömeg-indexet vizsgáltuk a betegséggel összefüggésben. Arra kerestük a választ, hogy ezek a tényezők befolyásolják-e a betegség súlyosságát vagy a betegségkezdetet.

Az SM súlyosságát jelző EDSS értékkel egyik viszgálat során sem kaptunk szignifikáns eltérést, tehát eredményeink szerint a betegség súlyosságát nem befolyásolta az alkohol a dohányzás vagy a testtömeg-index.

A betegségkezdet tekintetében azonban két vizsgálat során is szignifikáns eredményt kaptunk. Az alkoholfogysztás káros hatása igazolódott, mivel korban korábbra hozta a betegség kialakulását. A testtömeg-index viszgálatnál pedig azt az eredményt kaptuk, hogy minél inkább obez valaki, annál későbbre tolódott a betegségkezdet.

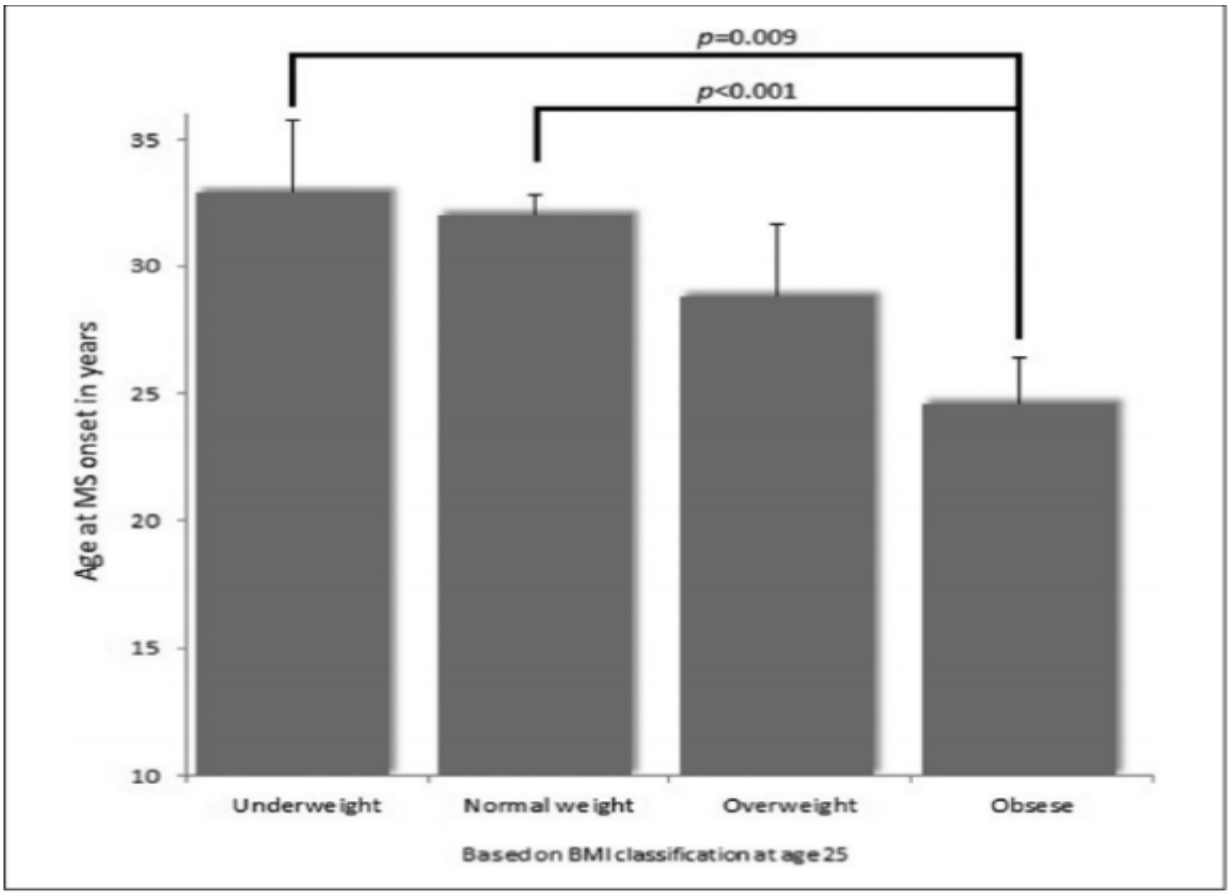
Az alkoholfogyasztás és az SM kapcsolata árnyalt kérdés. Fontos szempont lehet ugyanis, hogy mit, milyen mértékben fogyasztunk. Foster és D'Hooge felvetik

tanulmányaikban, hogy az alkoholfogyasztásnak U-alakú hatása lehet az EDSS értékekre (D'Hooghe M et al. 2012; Foster et al. 2012). Az alkohol és a dohányzás káros hatását egy belgrádi eset-kontroll vizsgálat igazolja, melyben az erős likőrt napi szinten fogyasztók, valamint a dohányzók és az SM rizikó között egyértelmű kapcsolatokat találtak (Pekmezovic et al. 2006). Egy svéd tanulmányban azonban dózisfüggő inverz hatását írták le az alkoholfogysztásnak az SM hajlamra mindkét nem esetében, sőt az alkohol képes volt a dohányzás káros hatását is csillapítani (Hedstrom et al. 2014). Az alkoholt heti 4 alkalomnál többször fogyasztók, illetve a heti több, mint 3 alkalommal vörösbort fogyasztó páciensek kedvezőbb progressziót mutattak egy amerikai tanulmányban (Diaz-Cruz et al. 2017). Egy másik tanulmányban a mérsékelt alkohol- és vörösbor fogyasztás csökkentette az eselyét a 6-os EDSS érték elérésének, míg ugyanakkor a dohányzás fokozta (D'Hooghe M et al. 2012). A dohányzás káros hátásáról 2011-ben Handel és munkatársai tették közzé meta-analízisük eredményét. Ebbe a viszgálatba korábbi 14 vizsgálat adatait elemezték újra. Igazolódott, hogy az SM kialakulásában fontos rizikó faktor a dohányzás, de hatása a betegség progressziójára már kevésbé volt tisztázott (Handel et al. 2011). Egy későbbi, az Egyesült Királyságból származó vizsgálat adatai már felvetik a dohányzás káros hatását a progresszióra is, hiszen vizsgálatukban a dohányzást abbahagyó betegek progressziója lassult, nem különbözött a nemdohányzókétól, míg a dohányzást folytató csoport gyorsabb mértékben mutatott állapot-rosszabbodást (Manouchehrinia et al. 2013). Egy 2017-es utánkövetéses tanulmányban a szerzők már javasolják a dohányzás és az alkoholfogyasztás elhagyását, mivel azok a betegség progresszióját fokozzák (Paz-Ballesteros et al. 2017).

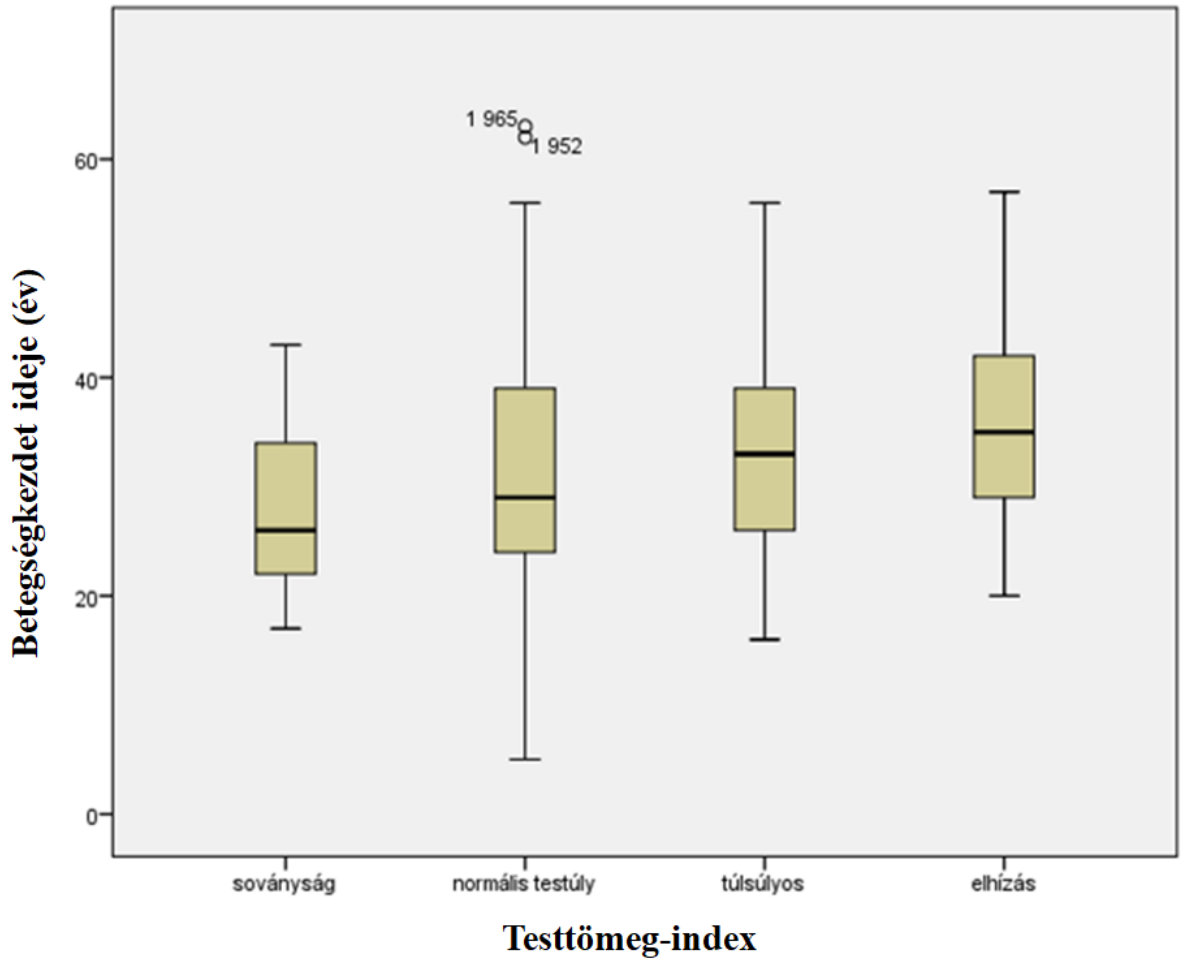
Vizsgálatunkban a felnőttkori testtömeg-index egyenesen arányos volt a betegségkezdettel, vagyis az alacsony BMI esetében korai, magas BMI esetében későbbi betegségkezdet értékeket kaptunk. Egy svéd tanulmányban a kamaszkori magas BMI korai betegségkezdettel társult nők esetében (Hedstrom, Olsson, and Alfredsson 2016). Hasonló eredménnyel végződött egy az amerikai nőket vizsgáló tanulmány, melyben a kamaszkori és a korai felnőttkori magas testtömeg-index asszociált a korai betegségkezdettel (Kavak et al. 2015). Amennyiben a Kavak és munkatársai cikkéből vett ábrát (18. ábra) és az SM vizsgálat BMI vizsgálatát ábrázoló 17. ábrát egymás mellé helyezzük, akkor feltételezhető a testtömeg-indexnek egy U alakú hatása a betegségkezdetre. Ennek megerősítésére egy független populáción végzett gyerekkortól induló utánkövetéses vizsgálatra lenne szükség. Több tanulmány viszont azt már igazolta, hogy a kora gyermekkori és kamaszkori magas tetsttömegindex körölbelül kétszeresére növeli az SM kockázatát (Munger et al. 2013; Hedstrom, Olsson, and Alfredsson 2012; Gianfrancesco et al. 2014). Hedstrom és

munkatársai későbbi vizsgálatukban pedig már kritikusabbnak találták a kamaszkori, mint a gyermekkori testtömeg-index adatokat az SM kockázat tekintetében (Hedstrom, Olsson, and Alfredsson 2016). A BMI rizikó faktor szerepéről további bizonyítékot jelent egy 2016-os vizsgálat, melyben megnézték, hogy azok a genomi eltérések, melyek emelkedett BMI-hez társulnak kockázati faktort jelentenek-e SM-ben. Ezt a vizsgálatot Mokry és munkatársai végezték el, és eredményeikben igazolódott, hogy a genetikailag emelkedett BMI rizikó faktort jelent SM-re nézve (Mokry et al. 2016). Az elhízás azonban nem csak rizikó faktor és betegségkezdet befolyásoló környezeti tényező, hanem a betegség progressziójára is negatívan hat (Novo and Batista 2017). Ezek az eredmények a gyermekkori és korai felnőttkori elhízás fontos, káros következményeit sugallják, ami viszont mozgás terápiával és speciális diétákkal karban tartható, így mód nyílhat a prevencióra.

A környezeti tényezők vizsgálatánál kapott adataink felvetik egy részletesebb, gyermekkort, kamaszkort és a felnőttkort is felívelő kérdőív szükségességet az alkoholfogyasztás, dohányzás és a BMI tekintetében. Csoportunk tervezi ezen kérdőív összeállítását és újbóli kitöltését a viszgálatban résztvevő beteg és kontroll személyekkel.



18. ábra. A betegségkezdet és a BMI kapcsolata SM-ben (Kavak et al. 2015).



17. ábra. A testömeg-index és a betegségkezdet kapcsolatának vizsgálata SM-ben.

24. táblázat. Szakirodalmi adatok összegzése a CCR5 rs333 szerepéről szklerózis multiplexben.

Populáció	SM beteg (% Nő)	Kontroll (% Nő)	Eredmények	Referenciák
USA (II), Amerika	sporadikus 299 (~71%)	147	A betegségkezdet kb 3 évvel magasabb a deléciót hordozó betegeknél	(Barcellos et al. 2000)
USA (I), Amerika	index esetek 120 (~75%)	147	A betegségkezdet kb 3 évvel magasabb a deléciót hordozó betegeknél	(Barcellos et al. 2000)
Ausztrália	120	168	Nincs szignifikáns különbség az allél vagy a genotípus gyakoriságában	(Bennetts et al. 1997)
Olaszország (Szicília)	180 (73%)	213 (71%)	Az allél jelenléte hozzájárul a lassabb betegség progresszióhoz (EDSS)	(D'Angelo et al. 2011)
Oroszország	219 (57%)	354 (62%)	(CCR5Δ32, DR4) pozitív fenotípus negatívan társul a korai SM betegségkezdettel	(Favorova et al. 2002)
Oroszország átfedő populáció Favorova et al, 2002	286 (61.5%)	362 (43.9%)	Két-allélos kombináció társul a betegséggel (CCR5Δ32, DRB1*04)	(Favorova et al. 2006)
USA, Amerika	132 (64%)	163 (52%)	Korai halálozással társult (a hatás szignifikánsabb a nőknél)	(Gade-Andavolu et al. 2004)
Finnország	116 (57.7%)	109	A CCR5 deléciós allélt hordozók gyakoribbak a PPSM betegek körében, mint a kontrollok között	(Luomala et al. 2003)

Populáció	SM beteg (% Nő)	Kontroll (% Nő)	Eredmények	Referenciák
USA, átfedő populáció Barcellos et al, 2000, Amerika	421	96	Nincs szignifikáns különbség az allél vagy a genotípus gyakoriságában	(Motsinger et al. 2007)
Spanyolország (nem Baszk eredetű)	102	210	A deléció gyakoribb a kontroll csoportban, ami esetleges védőhatást jelez	(Otaegui et al. 2007)
Spanyolország (Baszk)	62	139	A deléció gyakoribb a baszk kontroll csoportban, ami esetleges védőhatást jelez	(Otaegui et al. 2007)
Finnország, átfedő populáció Luomala et al, 2003	89	119	A Δ32/Δ32-es genotípus frekvencia gyakoribbá vált az összes SM-beteg esetében; A Δ32/Δ32 genotípus a PPSM csoportban megemelkedett	(Pulkkinen et al. 2004)
Horvátország és Szlovénia	325 (71%)	356	Nincs szignifikáns különbség az allél vagy a genotípus gyakoriságában	(Ristic et al. 2006)
Dánia, átfedő populáció Sellebjerg et al, 2007	70	0	CCR5Δ32 egy trendet mutat a kisebb léziók felé	(Schreiber et al. 2002)
Dánia	148 (73%)	151	A betegségkezdet alacsonyabb a betegeknél (akiknek intratekális szintézise van az IgG oligoklonális sávnak), akik hordozzák a deléciót	(Sellebjerg et al. 2000)
Dánia	109 (75%)	105 (70%)	A CCR5Δ32 allél nem hordozott kockázatot az IFN-β-vel kezelt betegeknél; A betegeknél a CCR5-pozitív monociták nagyobb arányban fordultak elő, mint a kontrolloknál	(Sellebjerg et al. 2007)
Írország	439	230	A populáció alapú RR/SP SM csoport alacsonyabb betegségkezdettel társult	(Silversides et al. 2004)

Populáció	SM beteg (% Nő)	Kontroll (% Nő)	Eredmények	Referenciák
Hollandia	637 (66%)	177 (54%)	CCR5 +303*G és Δ32 alacsony T1 léziós térfogat, CCR5Δ32 alacsony fekete lyuk arány (T1/T2 léziós térfogatok), CCR5Δ32 magas százalékos remielinizációs léziók	(van Veen et al. 2007)
USA, Amerika (afrikai eredet)	442	293	Nincs szignifikáns különbség az allél vagy a genotípus gyakoriságában	(Brassat et al. 2006)
Irán	254 (83.46%)	380	A Δ32 allél gyakoribb a betegek körében; A Δ32/Δ32 genotípus frekvenciája magasabb a betegeknél, mint a kontrollokban feltételezhető kockázati tényező	(Shahbazi et al. 2009)
Brazília	124 (68.5%)	127 (44.1%)	A Δ32 allélos SM betegek alacsonyabb pozitív gadolínium-fokozó képalkotást mutattak	(Kaimen-Maciel et al. 2007)
Izrael	256	0	A CCR5 Δ32 homozigótákban és heterozigótákban a rokkantság progressziója elnyúlik a vad genotípusú SM-betegekhez képest	(Kantor, Bakhanashvili, and Achiron 2003)
Németország	253	0	Nincs különbség az életkorban, nemben, EDSS pontszámban és a betegség időtartamában az allélt hordozó vagy nem hordozó betegek között; Nincs korreláció a CCR5Δ32 és a G-protein β3 alegység 825T polimorfizmus között	(Haase, Schmidt, and Faustmann 2002)
Németország	221 (71.04%)	0	Nincs összefüggés a betegség súlyosságával, a betegségkezdettel, a nemmel vagy a betegség lefolyásával	(Kantarci et al. 2005)
Németország	94 agy biopszia beteg (83 SM)	0	A hordozó státusz nincs összefüggésben az SM immunpatológiai mintájával. Nincs összefüggés a betegség súlyosságával vagy a betegségkezdettel	(Kantarci et al. 2005)
Európa	1666	2203	Nincs összefüggés a betegséggel vagy a betegség altípusával	(Song and Lee 2013)
Irán	100	300	Nincs összefüggés	(Arababadi et al. 2010)

6. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Professzor Dr. Vécsei Lászlónak, hogy az SZTE ÁOK Neurológiai Klinikán helyet biztosított számomra a szakmai tapasztalatszerzéshez, valamint a munkám során nyújtott szakmai irányításért és támogatásért.

Hálás vagyok továbbá Dr. Klivényi Péternek, Dr. Bencsik Krisztinának és Dr. Engelhardt Józsefnek, hogy iránymutatásukkal elmélyültebben tanulmányozhattam a Parkinson-kór, szklerózis multiplex és az amiotrófiás laterálszklerózis betegségek genetikai hátterét.

Köszönöm a Richter Gedeon Talentum Alapítványnak, hogy ösztöndíjasként végezhettem a doktori éveim.

Ezúton szeretném megköszönni a legközelebbi munkatársaimnak a baráti légkört és segítséget, mellyel munkám során támogattak. Közülök is, kiemelve Dr. Magyarné Majláth Zsófiát, akivel megszerettem a review írást.

Külön köszönöm Dr. Somogyvári Ferencnek, hogy pályakezdő koromban megtanította nekem a kutatáshoz szükséges alapvető kísérletes technikákat.

Köszönöm Gonda Tibornak a cikkeinkben található illusztrációk elkészítésében nyújtott türelmes segítségét.

Külön kiemelném Dr. Szalárdy Levente és David Durham szakmai segítségét, akik cikkeink lektorálását végezték el, amiért hálával tartozom.

Hálásan köszönöm Dr. Lencsés Gyulának a statisztikai kérdésekben nyújtott segtíségét a szklerózis multiplexhez köthető vizsgálatainkban.

Hálával tartozom együttműködő partnereinknek, akik lehetővé tették a közös cikkek létrejöttét. Köszönet illeti Dr. Széll Mártát, Tripolszki Kornéliát, Dr. Toldi Józsefet, Dr. Fülöp Ferencet, Dr. Szolnoki Zoltánt, Dr. Ádány Rózát, Dr. Fiatal Szilviát és Dr. Stojiljković Oliverát.

Köszönöm barátaimnak Dr. Walter Fruzsinának (aki lektorálta is ezt a munkát), Kiss Viktóriának, Dr. Kalapis Dorottyának és Dr. Molnár Juditnak, hogy az egyetemi és a doktori évek alatt támogattak, erőt adtak és biztattak.

Végül pedig a hálával tartozom Édesanyámnak és a családomnak, hogy mindvégig minden lehetséges módon támogatták és támogatják, hogy megvalósítsam önmagam és az álmaimat.

Vőlegényemet, Tibort külön köszönet illeti, hiszen mindig kiállt mellettem, támogatása és bíztatása nélkül nem értem volna a sokszor rögös út végére.

Végezetül pedig köszönöm ikergyermekeinknek, Liliennek és Martinnak, hogy értelmet és célt adtak az életben.

7. Irodalomjegyzék

Abdollah Zadeh, R., P. Moradi Pordanjani, F. Rahmani, F. Mashayekhi, A. Azarnezhad, and Y. Mansoori. 2017. 'Association of VDR gene polymorphisms with risk of Relapsing-remitting multiple sclerosis in an Iranian Kurdish population', *Int J Neurosci*: 1-17.

Alkhatib, G., C. Combadiere, C. C. Broder, Y. Feng, P. E. Kennedy, P. M. Murphy, and E. A. Berger. 1996. 'CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1', *Science*, 272: 1955-8.

Andres-Benito, P., J. Moreno, R. Dominguez, E. Aso, M. Povedano, and I. Ferrer. 2017. 'Inflammatory Gene Expression in Whole Peripheral Blood at Early Stages of Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis', *Front Neurol*, 8: 546.

Aoyama, N., N. Takahashi, S. Saito, N. Maeno, R. Ishihara, X. Ji, H. Miura, M. Ikeda, T. Suzuki, T. Kitajima, Y. Yamanouchi, Y. Kinoshita, K. Yoshida, N. Iwata, T. Inada, and N. Ozaki. 2006. 'Association study between kynurenine 3-monooxygenase gene and schizophrenia in the Japanese population', *Genes Brain Behav*, 5: 364-8.

Arababadi, M. K., G. Hassanshahi, H. Azin, V. A. Salehabad, M. Araste, R. Pourali, and Z. Nekhei. 2010. 'No Association Between CCR5-Delta 32 Mutation and Multiple Sclerosis in Patients of Southeastern Iran', *Labmedicine*, 41: 31-33.

Ascherio, A., K. L. Munger, and K. C. Simon. 2010. 'Vitamin D and multiple sclerosis', *Lancet Neurol*, 9: 599-612.

Azmitia, E. C., and R. Nixon. 2008. 'Dystrophic serotonergic axons in neurodegenerative diseases', *Brain Res*, 1217: 185-94.

Bajetto, A., R. Bonavia, S. Barbero, and G. Schettini. 2002. 'Characterization of chemokines and their receptors in the central nervous system: physiopathological implications', *J Neurochem*, 82: 1311-29.

Balistreri, C. R., C. Caruso, M. P. Grimaldi, F. Listi, S. Vasto, V. Orlando, A. M. Campagna, D. Lio, and G. Candore. 2007. 'CCR5 receptor: biologic and genetic implications in age-related diseases', *Ann N Y Acad Sci*, 1100: 162-72.

Baranzini, S. E., C. Elfstrom, S. Y. Chang, C. Butunoi, R. Murray, R. Higuchi, and J. R. Oksenberg. 2000. 'Transcriptional analysis of multiple sclerosis brain lesions reveals a complex pattern of cytokine expression', *J Immunol*, 165: 6576-82.

Barcellos, L. F., A. M. Schito, J. B. Rimmler, E. Vittinghoff, A. Shih, R. Lincoln, S. Callier, M. K. Elkins, D. E. Goodkin, J. L. Haines, M. A. Pericak-Vance, S. L. Hauser, and J. R. Oksenberg. 2000. 'CC-chemokine receptor 5 polymorphism and age of onset in familial multiple sclerosis. Multiple Sclerosis Genetics Group', *Immunogenetics*, 51: 281-8.

Basit, S. 2013. 'Vitamin D in health and disease: a literature review', *Br J Biomed Sci*, 70: 161-72.

Bennetts, B. H., S. M. Teutsch, M. M. Buhler, R. N. Heard, and G. J. Stewart. 1997. 'The CCR5 deletion mutation fails to protect against multiple sclerosis', *Hum Immunol*, 58: 52-9.

Bettencourt, A., D. Boleixa, A. L. Guimaraes, B. Leal, C. Carvalho, S. Bras, R. Samoes, E. Santos, P. P. Costa, B. Silva, and A. M. da Silva. 2017. 'The vitamin D receptor gene FokI polymorphism and Multiple Sclerosis in a Northern Portuguese population', *J Neuroimmunol*, 309: 34-37.

Blandini, F. 2010. 'An update on the potential role of excitotoxicity in the pathogenesis of Parkinson's disease', *Funct Neurol*, 25: 65-71.

Brassat, D., A. A. Motsinger, S. J. Caillier, H. A. Erlich, K. Walker, L. L. Steiner, B. A. Cree, L. F. Barcellos, M. A. Pericak-Vance, S. Schmidt, S. Gregory, S. L. Hauser, J. L. Haines, J. R. Oksenberg, and M. D. Ritchie. 2006. 'Multifactor dimensionality

reduction reveals gene-gene interactions associated with multiple sclerosis susceptibility in African Americans', *Genes Immun*, 7: 310-5.

Butler, E. G., D. W. Bourke, D. I. Finkelstein, and M. K. Horne. 1997. 'The effects of reversible inactivation of the subthalamo-pallidal pathway on the behaviour of naive and hemiparkinsonian monkeys', *J Clin Neurosci*, 4: 218-27.

Cantorna, M. T., C. E. Hayes, and H. F. DeLuca. 1996. '1,25-Dihydroxyvitamin D3 reversibly blocks the progression of relapsing encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 7861-4.

Caudle, W. M., and J. Zhang. 2009. 'Glutamate, excitotoxicity, and programmed cell death in Parkinson disease', *Exp Neurol*, 220: 230-3.

Chen, X. L., M. L. Zhang, L. Zhu, M. L. Peng, F. Z. Liu, G. X. Zhang, L. M. Wang, and J. Zhao. 2017. 'Vitamin D receptor gene polymorphisms and the risk of multiple sclerosis: An updated meta-analysis', *Microb Pathog*, 110: 594-602.

Chio, A., G. Logroscino, B. J. Traynor, J. Collins, J. C. Simeone, L. A. Goldstein, and L. A. White. 2013. 'Global epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review of the published literature', *Neuroepidemiology*, 41: 118-30.

Chun, R. F., P. T. Liu, R. L. Modlin, J. S. Adams, and M. Hewison. 2014. 'Impact of vitamin D on immune function: lessons learned from genome-wide analysis', *Front Physiol*, 5: 151.

Colombini, A., M. Brayda-Bruno, L. Ferino, G. Lombardi, V. Maione, G. Banfi, and S. Cauci. 2015. 'Gender differences in the VDR-FokI polymorphism and conventional non-genetic risk factors in association with lumbar spine pathologies in an Italian case-control study', *Int J Mol Sci*, 16: 3722-39.

D'Angelo, R., C. Crisafulli, C. Rinaldi, A. Ruggeri, A. Amato, and A. Sidoti. 2011. 'CCR5Delta32 Polymorphism Associated with a Slower Rate Disease Progression in a Cohort of RR-MS Sicilian Patients', *Mult Scler Int*, 2011: 153282.

D'Hooghe M, B., P. Haentjens, G. Nagels, and J. De Keyser. 2012. 'Alcohol, coffee, fish, smoking and disease progression in multiple sclerosis', *Eur J Neurol*, 19: 616-24.

Das, A., G. th Wallace, R. J. Reiter, A. K. Varma, S. K. Ray, and N. L. Banik. 2013. 'Overexpression of melatonin membrane receptors increases calcium-binding proteins and protects VSC4.1 motoneurons from glutamate toxicity through multiple mechanisms', *J Pineal Res*, 54: 58-68.

de Viragh, P. A., K. G. Haglid, and M. R. Celio. 1989. 'Parvalbumin increases in the caudate putamen of rats with vitamin D hypervitaminosis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86: 3887-90.

Deng, H., R. Liu, W. Ellmeier, S. Choe, D. Unutmaz, M. Burkhart, P. Di Marzio, S. Marmon, R. E. Sutton, C. M. Hill, C. B. Davis, S. C. Peiper, T. J. Schall, D. R. Littman, and N. R. Landau. 1996. 'Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1', *Nature*, 381: 661-6.

Diaz-Cruz, C., A. S. Chua, M. T. Malik, T. Kaplan, B. I. Glanz, S. Egorova, C. R. G. Guttmann, R. Bakshi, H. L. Weiner, B. C. Healy, and T. Chitnis. 2017. 'The effect of alcohol and red wine consumption on clinical and MRI outcomes in multiple sclerosis', *Mult Scler Relat Disord*, 17: 47-53.

Dragic, T., V. Litwin, G. P. Allaway, S. R. Martin, Y. Huang, K. A. Nagashima, C. Cayanan, P. J. Maddon, R. A. Koup, J. P. Moore, and W. A. Paxton. 1996. 'HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5', *Nature*, 381: 667-73.

Duan, S., Z. Lv, X. Fan, L. Wang, F. Han, H. Wang, and S. Bi. 2014. 'Vitamin D status and the risk of multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis', *Neurosci Lett*, 570: 108-13.

Ebers, G. C., A. D. Sadovnick, and N. J. Risch. 1995. 'A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Canadian Collaborative Study Group', *Nature*, 377: 150-1.

Eltayeb, S., D. Sunnemark, A. L. Berg, G. Nordvall, A. Malmberg, H. Lassmann, E. Wallstrom, T. Olsson, and A. Ericsson-Dahlstrand. 2003. 'Effector stage CC chemokine receptor-1 selective antagonism reduces multiple sclerosis-like rat disease', *J Neuroimmunol*, 142: 75-85.

Favorova, O. O., T. V. Andreewski, A. N. Boiko, M. A. Sudomoina, A. D. Alekseenkov, O. G. Kulakova, A. V. Slanova, and E. I. Gusev. 2002. 'The chemokine receptor CCR5 deletion mutation is associated with MS in HLA-DR4-positive Russians', *Neurology*, 59: 1652-5.

Favorova, O. O., A. V. Favorov, A. N. Boiko, T. V. Andreewski, M. A. Sudomoina, A. D. Alekseenkov, O. G. Kulakova, E. I. Gusev, G. Parmigiani, and M. F. Ochs. 2006. 'Three allele combinations associated with multiple sclerosis', *BMC Med Genet*, 7: 63.

Foster, M., R. Zivadinov, B. Weinstock-Guttman, M. Tamano-Blanco, D. Badgett, E. Carl, and M. Ramanathan. 2012. 'Associations of moderate alcohol consumption with clinical and MRI measures in multiple sclerosis', *J Neuroimmunol*, 243: 61-8.

Gade-Andavolu, R., D. E. Comings, J. MacMurray, M. Rostamkhani, L. S. Cheng, W. W. Tourtellotte, and L. A. Cone. 2004. 'Association of CCR5 delta32 deletion with early death in multiple sclerosis', *Genet Med*, 6: 126-31.

Gezen-Ak, D., E. Dursun, T. Ertan, H. Hanagasi, H. Gurvit, M. Emre, E. Eker, M. Ozturk, F. Engin, and S. Yilmazer. 2007. 'Association between vitamin D receptor gene polymorphism and Alzheimer's disease', *Tohoku J Exp Med*, 212: 275-82.

Gianforcaro, A., and M. J. Hamadeh. 2014. 'Vitamin D as a potential therapy in amyotrophic lateral sclerosis', *CNS Neurosci Ther*, 20: 101-11.

Gianforcaro, A., J. A. Solomon, and M. J. Hamadeh. 2013. 'Vitamin D(3) at 50x AI attenuates the decline in paw grip endurance, but not disease outcomes, in the G93A mouse model of ALS, and is toxic in females', *PLoS One*, 8: e30243.

Gianfrancesco, M. A., B. Acuna, L. Shen, F. B. Briggs, H. Quach, K. H. Bellesis, A. Bernstein, A. K. Hedstrom, I. Kockum, L. Alfredsson, T. Olsson, C. Schaefer, and L. F. Barcellos. 2014. 'Obesity during childhood and adolescence increases susceptibility to multiple sclerosis after accounting for established genetic and environmental risk factors', *Obes Res Clin Pract*, 8: e435-47.

Golimbet, V. E., T. V. Lezheiko, M. V. Alfimova, L. I. Abramova, and N. V. Kondrat'ev. 2014. '[Association of kynurenine-3-monooxygenase gene with schizophrenia]', *Genetika*, 50: 724-8.

Graham, W. C., R. G. Robertson, M. A. Sambrook, and A. R. Crossman. 1990. 'Injection of excitatory amino acid antagonists into the medial pallidal segment of a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) treated primate reverses motor symptoms of parkinsonism', *Life Sci*, 47: PL91-7.

Greenamyre, J. T., G. MacKenzie, T. I. Peng, and S. E. Stephans. 1999. 'Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease', *Biochem Soc Symp*, 66: 85-97.

Guillemin, G. J., D. G. Smith, S. J. Kerr, G. A. Smythe, V. Kapoor, P. J. Armati, and B. J. Brew. 2000. 'Characterisation of kynurenine pathway metabolism in human astrocytes and implications in neuropathogenesis', *Redox Rep*, 5: 108-11.

Haase, C. G., S. Schmidt, and P. M. Faustmann. 2002. 'Frequencies of the G-protein beta3 subunit C825T polymorphism and the delta 32 mutation of the chemokine receptor-5 in patients with multiple sclerosis', *Neurosci Lett*, 330: 293-5.

Haines, J. L., M. Ter-Minassian, A. Bazyk, J. F. Gusella, D. J. Kim, H. Terwedow, M. A. Pericak-Vance, J. B. Rimmler, C. S. Haynes, A. D. Roses, A. Lee, B. Shaner, M. Menold, E. Seboun, R. P. Fitoussi, C. Gartioux, C. Reyes, F. Ribierre, G. Gyapay, J.

Weissenbach, S. L. Hauser, D. E. Goodkin, R. Lincoln, K. Usuku, J. R. Oksenberg, and et al. 1996. 'A complete genomic screen for multiple sclerosis underscores a role for the major histocompatability complex. The Multiple Sclerosis Genetics Group', *Nat Genet*, 13: 469-71.

Han, Q., J. Li, and J. Li. 2004. 'pH dependence, substrate specificity and inhibition of human kynurenine aminotransferase I', *Eur J Biochem*, 271: 4804-14.

Han, X., L. Xue, Y. Li, B. Chen, and A. Xie. 2012. 'Vitamin D receptor gene polymorphism and its association with Parkinson's disease in Chinese Han population', *Neurosci Lett*, 525: 29-33.

Handel, A. E., A. J. Williamson, G. Disanto, R. Dobson, G. Giovannoni, and S. V. Ramagopalan. 2011. 'Smoking and multiple sclerosis: an updated meta-analysis', *PLoS One*, 6: e16149.

Hansen, T., A. Skytthe, E. Stenager, H. C. Petersen, H. Bronnum-Hansen, and K. O. Kyvik. 2005. 'Concordance for multiple sclerosis in Danish twins: an update of a nationwide study', *Mult Scler*, 11: 504-10.

Hartai, Z., P. Klivenyi, T. Janaky, B. Penke, L. Dux, and L. Vecsei. 2005. 'Kynurenine metabolism in plasma and in red blood cells in Parkinson's disease', *J Neurol Sci*, 239: 31-5.

Hedstrom, A. K., J. Hillert, T. Olsson, and L. Alfredsson. 2014. 'Alcohol as a modifiable lifestyle factor affecting multiple sclerosis risk', *JAMA Neurol*, 71: 300-5.

Hedstrom, A. K., T. Olsson, and L. Alfredsson. 2012. 'High body mass index before age 20 is associated with increased risk for multiple sclerosis in both men and women', *Mult Scler*, 18: 1334-6.

Hedstrom, A. K., T. Olsson, and L. Alfredsson. 2016. 'Body mass index during adolescence, rather than childhood, is critical in determining MS risk', *Mult Scler*, 22: 878-83.

Holtze, M., P. Saetre, G. Engberg, L. Schwieler, T. Werge, O. A. Andreassen, H. Hall, L. Terenius, I. Agartz, E. G. Jonsson, M. Schalling, and S. Erhardt. 2012. 'Kynurenine 3-monooxygenase polymorphisms: relevance for kynurenic acid synthesis in patients with schizophrenia and healthy controls', *J Psychiatry Neurosci*, 37: 53-7.

Holtze, M., P. Saetre, S. Erhardt, L. Schwieler, T. Werge, T. Hansen, J. Nielsen, S. Djurovic, I. Melle, O. A. Andreassen, H. Hall, L. Terenius, I. Agartz, G. Engberg, E. G. Jonsson, and M. Schalling. 2011. 'Kynurenine 3-monooxygenase (KMO) polymorphisms in schizophrenia: an association study', *Schizophr Res*, 127: 270-2.

Jatczak-Pawlik, I., D. Ksiazek-Winiarek, D. Wojkowska, K. Jozwiak, K. Jastrzebski, M. Pietruczuk, and A. Glabinski. 2016. 'The impact of multiple sclerosis relapse treatment on migration of effector T cells--Preliminary study', *Neurol Neurochir Pol*, 50: 155-62.

Jenkins, T. M., H. Hollinger, and C. J. McDermott. 2014. 'The evidence for symptomatic treatments in amyotrophic lateral sclerosis', *Curr Opin Neurol*, 27: 524-31.

Jenner, P. 2003. 'Oxidative stress in Parkinson's disease', *Ann Neurol*, 53 Suppl 3: S26-36; discussion S36-8.

Johansson, A. S., B. Owe-Larsson, L. Asp, T. Kocki, M. Adler, J. Hetta, R. Gardner, G. B. Lundkvist, E. M. Urbanska, and H. Karlsson. 2013. 'Activation of kynurenine pathway in ex vivo fibroblasts from patients with bipolar disorder or schizophrenia: cytokine challenge increases production of 3-hydroxykynurenine', *J Psychiatr Res*, 47: 1815-23.

Joshi, N., and S. Singh. 2017. 'Updates on immunity and inflammation in Parkinson disease pathology', *J Neurosci Res*.

Kaimen-Maciel, D. R., E. M. Reiche, D. G. Brum Souza, E. R. Frota Comini, F. Bobroff, H. K. Morimoto, M. A. Ehara Watanabe, J. Carvalho De Oliveira, T. Matsuo, J. Lopes,

and E. A. Donadi. 2007. 'CCR5-Delta32 genetic polymorphism associated with benign clinical course and magnetic resonance imaging findings in Brazilian patients with multiple sclerosis', *Int J Mol Med*, 20: 337-44.

Kamel, F., D. M. Umbach, T. A. Lehman, L. P. Park, T. L. Munsat, J. M. Shefner, D. P. Sandler, H. Hu, and J. A. Taylor. 2003. 'Amyotrophic lateral sclerosis, lead, and genetic susceptibility: polymorphisms in the delta-aminolevulinic acid dehydratase and vitamin D receptor genes', *Environ Health Perspect*, 111: 1335-9.

Kantarci, O. H., Y. Morales, P. A. Ziemer, D. D. Hebrink, D. J. Mahad, E. J. Atkinson, S. J. Achenbach, M. De Andrade, M. Mack, R. M. Ransohoff, H. Lassmann, W. Bruck, B. G. Weinshenker, and C. F. Lucchinetti. 2005. 'CCR5Delta32 polymorphism effects on CCR5 expression, patterns of immunopathology and disease course in multiple sclerosis', *J Neuroimmunol*, 169: 137-43.

Kantor, R., M. Bakhanashvili, and A. Achiron. 2003. 'A mutated CCR5 gene may have favorable prognostic implications in MS', *Neurology*, 61: 238-40.

Karam, C., M. J. Barrett, T. Imperato, D. J. MacGowan, and S. Scelsa. 2013. 'Vitamin D deficiency and its supplementation in patients with amyotrophic lateral sclerosis', *J Clin Neurosci*, 20: 1550-3.

Kavak, K. S., B. E. Teter, J. Hagemeier, K. Zakalik, B. Weinstock-Guttman, and Consortium New York State Multiple Sclerosis. 2015. 'Higher weight in adolescence and young adulthood is associated with an earlier age at multiple sclerosis onset', *Mult Scler*, 21: 858-65.

Kegel, M. E., M. Bhat, E. Skogh, M. Samuelsson, K. Lundberg, M. L. Dahl, C. Sellgren, L. Schwieler, G. Engberg, I. Schuppe-Koistinen, and S. Erhardt. 2014. 'Imbalanced kynurenine pathway in schizophrenia', *Int J Tryptophan Res*, 7: 15-22.

Kempster, P. A., B. Hurwitz, and A. J. Lees. 2007. 'A new look at James Parkinson's Essay on the Shaking Palsy', *Neurology*, 69: 482-5.

Knyihar-Csillik, E., Z. Chadaide, A. Mihaly, B. Krisztin-Peva, R. Fenyo, and L. Vecsei. 2006. 'Effect of 6-hydroxydopamine treatment on kynurenine aminotransferase-I (KAT-I) immunoreactivity of neurons and glial cells in the rat substantia nigra', *Acta Neuropathol*, 112: 127-37.

Knyihar-Csillik, E., B. Csillik, M. Pakaski, B. Krisztin-Peva, E. Dobo, E. Okuno, and L. Vecsei. 2004. 'Decreased expression of kynurenine aminotransferase-I (KAT-I) in the substantia nigra of mice after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) treatment', *Neuroscience*, 126: 899-914.

Kori, M., B. Aydin, S. Unal, K. Y. Arga, and D. Kazan. 2016. 'Metabolic Biomarkers and Neurodegeneration: A Pathway Enrichment Analysis of Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Amyotrophic Lateral Sclerosis', *OMICS*, 20: 645-61.

Laczmanski, L., M. Jakubik, G. Bednarek-Tupikowska, J. Rymaszewska, N. Sloka, and F. Lwow. 2015. 'Vitamin D receptor gene polymorphisms in Alzheimer's disease patients', *Exp Gerontol*, 69: 142-7.

Lavebratt, C., S. Olsson, L. Backlund, L. Frisen, C. Sellgren, L. Priebe, P. Nikamo, L. Traskman-Bendz, S. Cichon, M. P. Vawter, U. Osby, G. Engberg, M. Landen, S. Erhardt, and M. Schalling. 2014. 'The KMO allele encoding Arg452 is associated with psychotic features in bipolar disorder type 1, and with increased CSF KYNA level and reduced KMO expression', *Mol Psychiatry*, 19: 334-41.

Lee, D. Y., K. S. Lee, H. J. Lee, Y. H. Noh, D. H. Kim, J. Y. Lee, S. H. Cho, O. J. Yoon, W. B. Lee, K. Y. Kim, Y. H. Chung, and S. S. Kim. 2008. 'Kynurenic acid attenuates MPP(+)-induced dopaminergic neuronal cell death via a Bax-mediated mitochondrial pathway', *Eur J Cell Biol*, 87: 389-97.

Lehmann, D. J., H. Refsum, D. R. Warden, C. Medway, G. K. Wilcock, and A. D. Smith. 2011. 'The vitamin D receptor gene is associated with Alzheimer's disease', *Neurosci Lett*, 504: 79-82.

Linderholm, K. R., E. Skogh, S. K. Olsson, M. L. Dahl, M. Holtze, G. Engberg, M. Samuelsson, and S. Erhardt. 2012. 'Increased levels of kynurenine and kynurenic acid in the CSF of patients with schizophrenia', *Schizophr Bull*, 38: 426-32.

Littlejohns, T. J., W. E. Henley, I. A. Lang, C. Annweiler, O. Beauchet, P. H. Chaves, L. Fried, B. R. Kestenbaum, L. H. Kuller, K. M. Langa, O. L. Lopez, K. Kos, M. Soni, and D. J. Llewellyn. 2014. 'Vitamin D and the risk of dementia and Alzheimer disease', *Neurology*, 83: 920-8.

Liu, H. X., X. Han, X. P. Zheng, Y. S. Li, and A. M. Xie. 2013. '[Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with Parkinson disease]', *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 30: 13-6.

Liu, R., W. A. Paxton, S. Choe, D. Ceradini, S. R. Martin, R. Horuk, M. E. MacDonald, H. Stuhlmann, R. A. Koup, and N. R. Landau. 1996. 'Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection', *Cell*, 86: 367-77.

Liu, Y., and B. S. Zhang. 2014. 'Serum 25-hydroxyvitamin D predicts severity in Parkinson's disease patients', *Neurol Sci*, 35: 67-71.

Long, Kv, and L. T. Nguyen. 2013. 'Roles of vitamin D in amyotrophic lateral sclerosis: possible genetic and cellular signaling mechanisms', *Mol Brain*, 6: 16.

Lublin, F. D., and S. C. Reingold. 1996. 'Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis', *Neurology*, 46: 907-11.

Lublin, F. D., S. C. Reingold, J. A. Cohen, G. R. Cutter, P. S. Sorensen, A. J. Thompson, J. S. Wolinsky, L. J. Balcer, B. Banwell, F. Barkhof, B. Bebo, Jr., P. A. Calabresi, M. Clanet, G. Comi, R. J. Fox, M. S. Freedman, A. D. Goodman, M. Inglese, L. Kappos, B. C. Kieseier, J. A. Lincoln, C. Lubetzki, A. E. Miller, X. Montalban, P. W. O'Connor, J. Petkau, C. Pozzilli, R. A. Rudick, M. P. Sormani, O. Stuve, E. Waubant, and C. H. Polman. 2014. 'Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions', *Neurology*, 83: 278-86.

Luchowski, P., E. Luchowska, W. A. Turski, and E. M. Urbanska. 2002. '1-Methyl-4-phenylpyridinium and 3-nitropropionic acid diminish cortical synthesis of kynurenic acid via interference with kynurenine aminotransferases in rats', *Neurosci Lett*, 330: 49-52.

Luomala, M., T. Lehtimaki, H. Huhtala, M. Ukkonen, T. Koivula, M. Hurme, and I. Elovaara. 2003. 'Promoter polymorphism of IL-10 and severity of multiple sclerosis', *Acta Neurol Scand*, 108: 396-400.

Majlath, Z., N. Torok, J. Toldi, and L. Vecsei. 2016. 'Promising therapeutic agents for the treatment of Parkinson's disease', *Expert Opin Biol Ther*, 16: 787-99.

Manouchehrinia, A., C. R. Tench, J. Maxted, R. H. Bibani, J. Britton, and C. S. Constantinescu. 2013. 'Tobacco smoking and disability progression in multiple sclerosis: United Kingdom cohort study', *Brain*, 136: 2298-304.

Marangi, G., and B. J. Traynor. 2015. 'Genetic causes of amyotrophic lateral sclerosis: new genetic analysis methodologies entailing new opportunities and challenges', *Brain Res*, 1607: 75-93.

Matsui, M. 2013. 'Immunology for understanding the pathogenesis of multiple sclerosis', *Rinsho Shinkeigaku*, 53: 898-901.

Matute-Blanch, C., X. Montalban, and M. Comabella. 2017. 'Multiple sclerosis, and other demyelinating and autoimmune inflammatory diseases of the central nervous system', *Handb Clin Neurol*, 146: 67-84.

Molnárné Pásztor Gréta. 2014. 'Modern kori panacea? A D-vitamin új megvilágításban' *Gyógyszerészet*, 58:657-662.

McCauley, J. L., R. L. Zuvich, Y. Bradford, S. J. Kenealy, N. Schnetz-Boutaud, S. G. Gregory, S. L. Hauser, J. R. Oksenberg, D. P. Mortlock, M. A. Pericak-Vance, and J. L. Haines. 2009. 'Follow-up examination of linkage and association to chromosome 1q43 in multiple sclerosis', *Genes Immun*, 10: 624-30.

Miller, S. A., D. D. Dykes, and H. F. Polesky. 1988. 'A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells', *Nucleic Acids Res*, 16: 1215.

Milo, R., and E. Kahana. 2010. 'Multiple sclerosis: geoepidemiology, genetics and the environment', *Autoimmun Rev*, 9: A387-94.

Miranda, A. F., R. J. Boegman, R. J. Beninger, and K. Jhamandas. 1997. 'Protection against quinolinic acid-mediated excitotoxicity in nigrostriatal dopaminergic neurons by endogenous kynurenic acid', *Neuroscience*, 78: 967-75.

Mokry, L. E., S. Ross, N. J. Timpson, S. Sawcer, G. Davey Smith, and J. B. Richards. 2016. 'Obesity and Multiple Sclerosis: A Mendelian Randomization Study', *PLoS Med*, 13: e1002053.

Moroni, F. 1999. 'Tryptophan metabolism and brain function: focus on kynurenine and other indole metabolites', *Eur J Pharmacol*, 375: 87-100.

Motsinger, A. A., D. Brassat, S. J. Caillier, H. A. Erlich, K. Walker, L. L. Steiner, L. F. Barcellos, M. A. Pericak-Vance, S. Schmidt, S. Gregory, S. L. Hauser, J. L. Haines, J. R. Oksenberg, and M. D. Ritchie. 2007. 'Complex gene-gene interactions in multiple sclerosis: a multifactorial approach reveals associations with inflammatory genes', *Neurogenetics*, 8: 11-20.

Mueller, A., and P. G. Strange. 2004. 'The chemokine receptor, CCR5', *Int J Biochem Cell Biol*, 36: 35-8.

Mummidi, S., S. S. Ahuja, B. L. McDaniel, and S. K. Ahuja. 1997. 'The human CC chemokine receptor 5 (CCR5) gene. Multiple transcripts with 5'-end heterogeneity, dual promoter usage, and evidence for polymorphisms within the regulatory regions and noncoding exons', *J Biol Chem*, 272: 30662-71.

Munger, K. L., J. Bentzen, B. Laursen, E. Stenager, N. Koch-Henriksen, T. I. Sorensen, and J. L. Baker. 2013. 'Childhood body mass index and multiple sclerosis risk: a long-term cohort study', *Mult Scler*, 19: 1323-9.

Niino, M., S. Sato, T. Fukazawa, K. Masaki, Y. Miyazaki, D. Matsuse, R. Yamasaki, E. Takahashi, S. Kikuchi, and J. Kira. 2015. 'Decreased serum vitamin D levels in Japanese patients with multiple sclerosis', *J Neuroimmunol*, 279: 40-5.

Novo, A. M., and S. Batista. 2017. 'Multiple Sclerosis: Implications of Obesity in Neuroinflammation', *Adv Neurobiol*, 19: 191-210.

Oczkowska, A., W. Kozubski, and J. Dorszewska. 2014. '[Alpha-synuclein in Parkinson's disease]', *Przegl Lek*, 71: 26-32.

Ogawa, T., W. R. Matson, M. F. Beal, R. H. Myers, E. D. Bird, P. Milbury, and S. Saso. 1992. 'Kynurenine pathway abnormalities in Parkinson's disease', *Neurology*, 42: 1702-6.

Okamoto, H., S. Yamamoto, M. Nozaki, and O. Hayaishi. 1967. 'On the submitochondrial localization of l-kynurenine-3-hydroxylase', *Biochem Biophys Res Commun*, 26: 309-14.

Oksenberg, J. R., and L. F. Barcellos. 2005. 'Multiple sclerosis genetics: leaving no stone unturned', *Genes Immun*, 6: 375-87.

Oppermann, M. 2004. 'Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation', *Cell Signal*, 16: 1201-10.

Otaegui, D., J. Ruiz-Martinez, J. Olaskoaga, J. I. Emparanza, and A. Lopez de Munain. 2007. 'Influence of CCR5-Delta32 genotype in Spanish population with multiple sclerosis', *Neurogenetics*, 8: 201-5.

Paz-Ballesteros, W. C., E. A. Monterrubio-Flores, J. de Jesus Flores-Rivera, T. Corona-Vazquez, and C. Hernandez-Giron. 2017. 'Cigarette Smoking, Alcohol Consumption and Overweight in Multiple Sclerosis: Disability Progression', *Arch Med Res*, 48: 113-20.

Pekmezovic, T., J. Drulovic, M. Milenkovic, M. Jarebinski, N. Stojsavljevic, S. Mesaros, D. Kisic, and J. Kostic. 2006. 'Lifestyle factors and multiple sclerosis: A case-control study in Belgrade', *Neuroepidemiology*, 27: 212-6.

Petersen, M. S., S. Bech, D. H. Christiansen, A. V. Schmedes, and J. Halling. 2014. 'The role of vitamin D levels and vitamin D receptor polymorphism on Parkinson's disease in the Faroe Islands', *Neurosci Lett*, 561: 74-9.

Plitman, E., Y. Iwata, F. Caravaggio, S. Nakajima, J. K. Chung, P. Gerretsen, J. Kim, H. Takeuchi, M. M. Chakravarty, G. Remington, and A. Graff-Guerrero. 2017. 'Kynurenic Acid in Schizophrenia: A Systematic Review and Meta-analysis', *Schizophr Bull*, 43: 764-77.

Polman, C. H., S. C. Reingold, B. Banwell, M. Clanet, J. A. Cohen, M. Filippi, K. Fujihara, E. Havrdova, M. Hutchinson, L. Kappos, F. D. Lublin, X. Montalban, P. O'Connor, M. Sandberg-Wollheim, A. J. Thompson, E. Waubant, B. Weinshenker, and J. S. Wolinsky. 2011. 'Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria', *Ann Neurol*, 69: 292-302.

Pugliatti, M., S. Sotgiu, and G. Rosati. 2002. 'The worldwide prevalence of multiple sclerosis', *Clin Neurol Neurosurg*, 104: 182-91.

Pulkkinen, K., M. Luomala, H. Kuusisto, T. Lehtimaki, M. Saarela, T. O. Jalonen, and I. Elovaara. 2004. 'Increase in CCR5 Delta32/Delta32 genotype in multiple sclerosis', *Acta Neurol Scand*, 109: 342-7.

Rajan, A. J., V. C. Asensio, I. L. Campbell, and C. F. Brosnan. 2000. 'Experimental autoimmune encephalomyelitis on the SJL mouse: effect of gamma delta T cell depletion on chemokine and chemokine receptor expression in the central nervous system', *J Immunol*, 164: 2120-30.

Reale, M., C. Iarlori, A. Thomas, D. Gambi, B. Perfetti, M. Di Nicola, and M. Onofrj. 2009. 'Peripheral cytokines profile in Parkinson's disease', *Brain Behav Immun*, 23: 55-63.

Renton, A. E., A. Chio, and B. J. Traynor. 2014. 'State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics', *Nat Neurosci*, 17: 17-23.

Ristic, S., L. Lovrecic, N. Starcevic-Cizmarevic, B. Brajenovic-Milic, S. S. Jazbec, V. Barac-Latas, D. Vejnovic, J. Sepcic, M. Kapovic, and B. Peterlin. 2006. 'No association of CCR5delta32 gene mutation with multiple sclerosis in Croatian and Slovenian patients', *Mult Scler*, 12: 360-2.

Sakurai, T., N. Ogama, and K. Toba. 2014. 'Lower vitamin D is associated with white matter hyperintensity in elderly women with Alzheimer's disease and amnestic mild cognitive impairment', *J Am Geriatr Soc*, 62: 1993-4.

Samadi, P., L. Gregoire, A. Rassoulpour, P. Guidetti, E. Izzo, R. Schwarcz, and P. J. Bedard. 2005. 'Effect of kynurenine 3-hydroxylase inhibition on the dyskinetic and antiparkinsonian responses to levodopa in Parkinsonian monkeys', *Mov Disord*, 20: 792-802.

Samson, M., F. Libert, B. J. Doranz, J. Rucker, C. Liesnard, C. M. Farber, S. Saragosti, C. Lapoumeroulie, J. Cognaux, C. Forceille, G. Muyldermans, C. Verhofstede, G.

Burtonboy, M. Georges, T. Imai, S. Rana, Y. Yi, R. J. Smyth, R. G. Collman, R. W. Doms, G. Vassart, and M. Parmentier. 1996. 'Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene', *Nature*, 382: 722-5.

Sandi, D., V. Zsiros, J. Fuvesi, Z. T. Kincses, Z. Fricska-Nagy, G. Lencses, L. Vecsei, and K. Bencsik. 2016. 'Mortality in Hungarian patients with multiple sclerosis between 1993 and 2013', *J Neurol Sci*, 367: 329-32.

Sato, Y., Y. Honda, T. Asoh, M. Kikuyama, and K. Oizumi. 1997. 'Hypovitaminosis D and decreased bone mineral density in amyotrophic lateral sclerosis', *Eur Neurol*, 37: 225-9.

Sawcer, S., H. B. Jones, R. Feakes, J. Gray, N. Smaldon, J. Chataway, N. Robertson, D. Clayton, P. N. Goodfellow, and A. Compston. 1996. 'A genome screen in multiple sclerosis reveals susceptibility loci on chromosome 6p21 and 17q22', *Nat Genet*, 13: 464-8.

Schreiber, K., A. B. Otura, L. P. Ryder, H. O. Madsen, O. S. Jorgensen, A. Svejgaard, and P. S. Sorensen. 2002. 'Disease severity in Danish multiple sclerosis patients evaluated by MRI and three genetic markers (HLA-DRB1*1501, CCR5 deletion mutation, apolipoprotein E)', *Mult Scler*, 8: 295-8.

Schwarcz, R. 1993. 'Metabolism and function of brain kynurenines', *Biochem Soc Trans*, 21: 77-82.

Schwarcz, R., J. P. Bruno, P. J. Muchowski, and H. Q. Wu. 2012. 'Kynurenines in the mammalian brain: when physiology meets pathology', *Nat Rev Neurosci*, 13: 465-77.

Sellebjerg, F., T. B. Kristiansen, P. Wittenhagen, P. Garred, J. Eugen-Olsen, J. L. Frederiksen, and T. L. Sorensen. 2007. 'Chemokine receptor CCR5 in interferon-treated multiple sclerosis', *Acta Neurol Scand*, 115: 413-8.

Sellebjerg, F., H. O. Madsen, C. V. Jensen, J. Jensen, and P. Garred. 2000. 'CCR5 delta32, matrix metalloproteinase-9 and disease activity in multiple sclerosis', *J Neuroimmunol*, 102: 98-106.

Shahbazi, M., H. Ebadi, D. Fathi, D. Roshandel, M. Mahamadhoseeni, A. Rashidbaghan, N. Mahammadi, M. R. Mahammadi, and M. Zamani. 2009. 'CCR5-delta 32 allele is associated with the risk of developing multiple sclerosis in the Iranian population', *Cell Mol Neurobiol*, 29: 1205-9.

Silversides, J. A., S. V. Heggarty, G. V. McDonnell, S. A. Hawkins, and C. A. Graham. 2004. 'Influence of CCR5 delta32 polymorphism on multiple sclerosis susceptibility and disease course', *Mult Scler*, 10: 149-52.

Simpson, J., P. Rezaie, J. Newcombe, M. L. Cuzner, D. Male, and M. N. Woodroofe. 2000. 'Expression of the beta-chemokine receptors CCR2, CCR3 and CCR5 in multiple sclerosis central nervous system tissue', *J Neuroimmunol*, 108: 192-200.

Solomon, J. A., A. Gianforcaro, and M. J. Hamadeh. 2011. 'Vitamin D3 deficiency differentially affects functional and disease outcomes in the G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis', *PLoS One*, 6: e29354.

Song, G. G., and Y. H. Lee. 2013. 'A Meta-analysis of the relation between chemokine receptor 5 delta32 polymorphism and multiple sclerosis susceptibility', *Immunol Invest*, Epub ahead of print 2013/12/04.

———. 2014. 'A Meta-analysis of the relation between chemokine receptor 5 delta32 polymorphism and multiple sclerosis susceptibility', *Immunol Invest*, 43: 299-311.

Sorce, S., R. Myburgh, and K. H. Krause. 2011. 'The chemokine receptor CCR5 in the central nervous system', *Prog Neurobiol*, 93: 297-311.

Spatola, M., and C. Wider. 2014. 'Genetics of Parkinson's disease: the yield', *Parkinsonism Relat Disord*, 20 Suppl 1: S35-8.

Stayte, S., and B. Vissel. 2014. 'Advances in non-dopaminergic treatments for Parkinson's disease', *Front Neurosci*, 8: 113.

Stone, T. W. 2000. 'Development and therapeutic potential of kynurenic acid and kynurenine derivatives for neuroprotection', *Trends Pharmacol Sci*, 21: 149-54.

Taniura, H., M. Ito, N. Sanada, N. Kuramoto, Y. Ohno, N. Nakamichi, and Y. Yoneda. 2006. 'Chronic vitamin D3 treatment protects against neurotoxicity by glutamate in association with upregulation of vitamin D receptor mRNA expression in cultured rat cortical neurons', *J Neurosci Res*, 83: 1179-89.

Tizaoui, K., W. Kaabachi, A. Hamzaoui, and K. Hamzaoui. 2015. 'Association between vitamin D receptor polymorphisms and multiple sclerosis: systematic review and meta-analysis of case-control studies', *Cell Mol Immunol*, 12: 243-52.

Tohgi, H., T. Abe, S. Takahashi, J. Takahashi, and H. Hamato. 1993. 'Concentrations of serotonin and its related substances in the cerebrospinal fluid of parkinsonian patients and their relations to the severity of symptoms', *Neurosci Lett*, 150: 71-4.

Torok, N., Z. Majlath, F. Fulop, J. Toldi, and L. Vecsei. 2016. 'Brain Aging and Disorders of the Central Nervous System: Kynurenines and Drug Metabolism', *Curr Drug Metab*, 17: 412-29.

Torok, N., R. Torok, P. Klivenyi, J. Engelhardt, and L. Vecsei. 2016. 'Investigation of vitamin D receptor polymorphisms in amyotrophic lateral sclerosis', *Acta Neurol Scand*, 133: 302-8.

Torok, R., N. Torok, L. Szalardy, I. Plangar, Z. Szolnoki, F. Somogyvari, L. Vecsei, and P. Klivenyi. 2013. 'Association of vitamin D receptor gene polymorphisms and Parkinson's disease in Hungarians', *Neurosci Lett*, 551: 70-4.

van Veen, T., J. Nielsen, J. Berkhof, F. Barkhof, W. Kamphorst, L. Bo, R. Ravid, C. L. Verweij, I. Huitinga, C. H. Polman, and B. M. Uitdehaag. 2007. 'CCL5 and CCR5 genotypes modify clinical, radiological and pathological features of multiple sclerosis', *J Neuroimmunol*, 190: 157-64.

Vecsei, L., L. Szalardy, F. Fulop, and J. Toldi. 2013. 'Kynurenines in the CNS: recent advances and new questions', *Nat Rev Drug Discov*, 12: 64-82.

Wang, J. Y., J. N. Wu, T. L. Cherng, B. J. Hoffer, H. H. Chen, C. V. Borlongan, and Y. Wang. 2001. 'Vitamin D(3) attenuates 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in rats', *Brain Res*, 904: 67-75.

Wang, X., N. Shen, Y. Lu, and K. Tan. 2019. 'Vitamin D receptor polymorphisms and the susceptibility of Parkinson's disease', *Neurosci Lett*, 699: 206-11.

Willer, C. J., D. A. Dyment, N. J. Risch, A. D. Sadovnick, G. C. Ebers, and Group Canadian Collaborative Study. 2003. 'Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 12877-82.

Wonodi, I., R. P. McMahon, N. Krishna, B. D. Mitchell, J. Liu, M. Glassman, L. E. Hong, and J. M. Gold. 2014. 'Influence of kynurenine 3-monooxygenase (KMO) gene polymorphism on cognitive function in schizophrenia', *Schizophr Res*, 160: 80-7.

Wonodi, I., O. C. Stine, K. V. Sathyasaikumar, R. C. Roberts, B. D. Mitchell, L. E. Hong, Y. Kajii, G. K. Thaker, and R. Schwarcz. 2011. 'Downregulated kynurenine 3-monooxygenase gene expression and enzyme activity in schizophrenia and genetic association with schizophrenia endophenotypes', *Arch Gen Psychiatry*, 68: 665-74.

Zadori, D., P. Klivenyi, J. Toldi, F. Fulop, and L. Vecsei. 2012. 'Kynurenines in Parkinson's disease: therapeutic perspectives', *J Neural Transm (Vienna)*, 119: 275-83.

Zang, Y. C., A. K. Samanta, J. B. Halder, J. Hong, M. V. Tejada-Simon, V. M. Rivera, and J. Z. Zhang. 2000. 'Aberrant T cell migration toward RANTES and MIP-1 alpha in patients with multiple sclerosis. Overexpression of chemokine receptor CCR5', *Brain*, 123 (Pt 9): 1874-82.

Zwilling, D., S. Y. Huang, K. V. Sathyasaikumar, F. M. Notarangelo, P. Guidetti, H. Q. Wu, J. Lee, J. Truong, Y. Andrews-Zwilling, E. W. Hsieh, J. Y. Louie, T. Wu, K. Scearce-Levie, C. Patrick, A. Adame, F. Giorgini, S. Moussaoui, G. Laue, A. Rassoulpour, G. Flik, Y. Huang, J. M. Muchowski, E. Masliah, R. Schwarcz, and P. J. Muchowski. 2011. 'Kynurenine 3-monooxygenase inhibition in blood ameliorates neurodegeneration', *Cell*, 145: 863-74.

Zsiros, V., Z. Fricska-Nagy, J. Fuvesi, Z. T. Kincses, E. Langane, E. Paulik, L. Vecsei, and K. Bencsik. 2014. 'Prevalence of multiple sclerosis in Csongrad County, Hungary', *Acta Neurol Scand*, 130: 277-82.

8. Összefoglaló

Eltérő életkori sajátságokat mutató neurológiai kórképek genetikai vizsgálata

Jelen tézis tárgya három neurológiai kórkép genetikai vizsgálata. A munka tárgyát a PD, a SM és az ALS betegségekben végzett kísérleti eredményeink adják.

A munkafolyamat első lépéseként csoportunk egy biobankot alakított ki a szegedi Neurológiai Klinikán annak, minden tárgyi és engedélyi feltételét biztosítva, hogy ez által megkezdhesse a vérminták gyűjtését és tárolását.

Az idős populációt érintő krónikus, progresszív PD vizsgálatába ily módon 105 beteg és 131 kontroll személy került bevonásra. A kutatás célja a kórkép és a kinurenin rendszer kapcsolatának vizsgálata volt. A substantia nigra pars compacta területén megfigyelhető dopaminerg sejtelhalással és a Lewy testek jelenlétével jellemzett kórkép több szakirodalmi adat szerint is összefüggésbe hozható a megváltozott működést mutató kinurenin rendszerrel.

Maga a kinurenin rendszer egy olyan enzimatikus útvonal, mely az emberi agyban lévő triptofán döntő többségének a lebontásáért felel, miközben végtermékként nikotinamid-adenin-dinukleotid és nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát keletkezik. Az általunk vizsgált KMO gén az 1q42 kromoszóma régióra lokalizálódik és az útvonal egyik neurotoxikus termékének szintéziséért felel. Az enzim farmakológiai inhibíciója indukálja a neuroprotektív kinurénsav szintézisét. A KMO gén polimorfizmusai pedig befolyással lehetnek a metabolizmus neuroprotektív vagy neurotoxikus irányba való eltolódására.

Vizsgálatunkba a KMO gén négy SNP polimorfizmusát vontunk be, az rs2050518-at, az rs6661244-et, az rs2275163-at és az rs1053230-at. Célkitűzésünk az volt a vizsgálatok során, hogy kellően nagy beteg és hozzá nemben-korban illesztett kontroll mintaszámon végezzük el azokat. Ugyancsak fontosnak tartottuk, hogy ráirányítsuk a figyelmet a korábban eddig genetikai szemlélettel nem vizsgált kapcsolatra a Parkinson-kór és a kinurenin útvonal között. Továbbá szerettük volna tanulmányozni a vizsgált SNP allélok hatását a betegségkezdetre.

A DNS kinyerését a fehérvérsejtekből a Miller–féle izolálással, míg a genotipizálást Taqman próbás polimeráz láncreakciós módszerrel végeztük el. Az adatok értékeléséhez Khi-négyzet tesztet, és t-próbát alkalmaztunk az SPSS szoftverben. Az így megfigyelt genotípus-frekvenciák összhangban voltak a Hardy-Weinberg egyensúllyal a PD és a kontroll csoportban.

Eredményeink alapján az általunk vizsgált négy KMO polimorfizmus közül egyik sem hozható összefüggésbe a PD-ral, illetve nem befolyásolták a betegség kialakulásának kezdetét sem. Így a genetikai kapcsolat a PD és a kinurenin rendszer között még továbbra sem igazolt.

A vizsgált SNP-k nagy valószínűséggel nincsenek hatással a KMO gén funkciójára, nem részei a regulátor fehérjék kötőhelyeinek, melyek relevánsak a PD tekintetében.

A jövőben további polimorfizmus vizsgálatokat tervezünk a kinurenin rendszer többi enzimének bevonásával. Ez a tanulmány volt az első, mely a kinurenin útvonal biokémiai változásai mögött álló genetikai hátteret vizsgálta. Reményeink szerint munkánk ráirányítja a figyelmet erre a korábban nem tanulmányozott területre, ugyanis az enzimatikus útvonal zavara összefüggésbe hozható nemcsak a PD-ral, hanem számos neurológiai kórképpel is pl. az Alzheimer-kórral és a depresszióval. Ezért az enzimatikus útvonal befolyásolásának lehetősége terápiás jelentőséggel bírhat ezen neurológiai betegségek kapcsán.

Az ALS egy olyan végzetes neurológiai kórkép, mely az akaratlagosan mozgatható izmokat beidegző agyi és gerincvelői mozgató idegsejtek pusztulásával jár. Korábbi vizsgálatok ezen neuronok sebezhetőségének egyik feltételezett okaként a kálcium kötő fehérjéik alacsony szintjét mutatták ki. A kálcium kötő fehérjék szintjét pedig meg lehet emelni D-vitamin pótlással. A D-vitamin aktív formája az 1α-25-(OH)2D, ami a nukleáris receptorához (VDR) kötődik és így modulálja a transzkripcióját az általa befolyásolt géneknek, és fejti ki hatását az ásványi anyag homeosztázisra. Fontos kiemelni továbbá, hogy a D-vitamin regulálja a szérum kálcium szintjét, mely kihathat különböző immunfunkciókra. A D-vitamin csökkentheti a gyulladásos folyamatokat, ami jelentős szerepet játszik a neurodegenerációban. Azonban ezek mellett D-vitamin felelős, többek között a neutrópikus faktorok és az indukálható nitrogén-oxid szintáz bioszintéziséért, valamint emeli a glutation szintet. Ezek mindegyike pedig szerepet játszik az ALS és más neurológiai betegségek pathomechanizmusaiban. Egy tíz évvel ezelőtti tanulmány felvetette, hogy a 25-hidroxi D-vitamin szintje alacsonyabb a betegek estében. Egy pár éves tanulmányban pedig a D-vitamin pótlása, mely a normál tartomány alsó határát érte el, képes volt kismértékű lassulást eredményezni a betegség progressziójában az ALSFRS-R score-alapján egy 9 hónapos vizsgálati periódusban. Nemrégiben számoltak be arról is, hogy a krónikus D-vitamin kezelés fokozza a VDR gén mRNS szintjét patkány agykérgi idegsejtekben glutamát által okozott neurotoxicitáskor. Csoportunk ezért célul tűzte ki, hogy a VDR gén polimorfizmusait tanulmányozza ALS-ben.

Az általunk vizsgált VDR gén a 12q13.11 kromoszóma régióra lokalizálódik és a D3 vitamin nukleáris hormon receptorát kódolja. A VDR gén és egyes neurológiai kórképek kapcsolatáról már olvashattunk a szakirodalomban, azonban az ALS-al összefüggésben kevés adatot publikáltak.

Vizsgálatunkba 75 sporadikus ALS beteg és 97 egészséges kontroll személy vérmintáját sikerült összegyűjteni. A vizsgált SNP-k a következők voltak: az rs1544410 (BsmI), az rs7975232 (ApaI), az rs731236 (TaqI) és az rs2228570 (FokI). Fontos szempont volt a vizsgálat kapcsán, hogy azt kellően nagy beteg és hozzá nemben-korban illesztett kontroll mintaszámon végezzük el. Mivel korábbi adatok nem álltak rendelkezésre a VDR gén polimorfizmusainak és a betegségnek az esetleges kapcsolatáról, így munkánkkal új bizonyítékokat nyújthatunk a D-vitamin szerepére ALS kapcsán. A kutatás további céljai között volt, hogy tanulmányozzuk az allélok esetleges befolyásoló hatását a betegségkezdet tekintetében is.

A mintagyűjtést követően hozzáláttunk a genomi DNS izolálásához Miller–féle kisózási módszert alkalmazva. Az allélok elkülönítésére restrikciós fragment hossz polimorfizmus technikát alkalmaztunk. A vizsgálni kívánt négy polimorfizmus közül három intron variáns egy pedig misszensz mutáció volt. A statisztikai vizsgálat során Khi-négyzet tesztet és t-próbát alkalmaztuk. A gén és a betegség kockázata közötti kapcsolat vizsgálatára az esélyhányados és a 95% -os konfidencia intervallum került kiszámításra. A kapott genotípus-frekvenciák a kontroll és a beteg csoportban összhangban voltak a Hardy-Weinberg egyensúllyal.

Tanulmányunk során szignifikáns eltérést találtunk a genotípus megoszlásban a beteg és a kontroll csoport között az ApaI SNP esetében. Mely azt jelentette, hogy az A allélt tartalmazó genotípusok frekvenciája (AA+AC) vs CC szignfikánsan magasabb volt az ALS betegek között, mint a kontroll csoportban. Továbbá az A allél szignifikáns mértékben összefüggésbe hozható volt az ALS beteg csoporttal. A vizsgált két allél azonban nem volt hatással a betegségkezdetre vagy a nemi megoszlásra az ALS csoportban.

Ez a munka az első genetikai bizonyíték, mely felveti, hogy a VDR gén szerepet játszhat a kórképben. Kamel és munkatársai korábban vizsgálták a VDR gén BsmI SNP-jét, de ez nem volt összefüggésben a kórképpel vagy a kórokozó ólomszinttel (19). Tanulmányunkban igazoltuk ezt a megfigyelést, mert nem találtunk szignifikáns kapcsolatot a BsmI SNP-vel. Nem találtunk továbbá szignifikáns különbséget a FokI vagy a TaqI SNP estében az ALS-kontroll csoport vizsgálatakor. Kapott eredményeinket független beteg és kontroll csoport mintán szeretnénk megismételni.

A PD-ral szemben az SM a fiatal, felnőtt populációt érintő autoimmun, központi idegrendszert támadó neurológiai kórkép. A betegség a fiatal felnőttek leggyakoribb idegrendszeri megbetegedése és az esetek felében a visszafordíthatatlan szövetkárosodás miatt rokkantsághoz vezet. A betegség kiváltója a központi idegrendszer fehérállományának

gyulladása, melynek következtében károsodnak az idegsejtek és az őket körülvevő mielin. A SM kórlefolyása változó, ezért ezerarcú kórnak is hívják és 5 kórformáját különítik el. A betegség etiológiája csak részben ismeretes, a genetika háttér bizonyított szerepe ellenére, azonban sokáig csak a fő hisztokompatibilitás komplexet (MHC) sikerült azonosítani, mint hajlamosító lókuszt. Azonban az MHC lókusz szerepe, nem csak kizárólag erre a kórképre jellemző, hanem az összes autoimmun betegségre. Ezért olyan hajlamosító és protektív lókuszok az azonosítása, melyek specifikusak a SM-re a kutatások középpontjába kerültek.

A kemokinek (kemoatraktáns citokinek) és a kemokin receptorok kulcsszerepet játszanak a gyulladásos folyamatokban, mivel irányítják az immunsejtek vándorlását, így többek között a T-sejtek vér-agy gáton történő átjutását is, ami feltételezhetően az első lépés a kórkép kialakulása felé. Vizsgálati adatok bizonyítják, hogy a CCR5 kemokin receptor upreguláldott a gyulladást mutató agyi régiókban, melyek humán betegektől származtak, illetve ugyan ezt tapasztalták a betegség állatmodelljében, a kísérletes autoimmun enkefalomielitiszben is.

A 3p21.31 kromoszóma régióban található CCR5 gén leginkább tanulmányozott mutációja egy Δ32 bp deléció, melynek vizsgálata ellentmondó eredményeket mutat SM kapcsán. Néhány vizsgálat szerint ugyanis az allél egy kockázati faktor, míg más vizsgálatok protektív szerepét igazolták, sőt akadtak olyan eredmények is melyek szerint se kockázati se protektív szereppel nem rendelkezik. Az ellentmondó eredmények egy része a nem kellően magas mintaszámmal magyarázható, ezért csoportunk egyik legfontosabb célja volt a vizsgálat során, hogy kellően nagy beteg és hozzá nemben-korban illesztett kontroll mintaszámot vonjunk be elemzésünkbe. További célunk volt, hogy olyan populáción végezzük el a vizsgálatokat, melyet korábban még nem vontak be ilyen jellegű tanulmányba és a betegséggel való összefüggés mellett elemezzük az allél esetleges befolyásoló hatását a betegségkezdet, és a Expended Disability Status Scale (EDSS) vonatkozásában is. Fontosnak tartottuk, hogy az életmód, a környezeti faktorok hatását is teszteljük az allélok hordozásával párhuzamosan, így az alkoholfogyasztás a dohányzás és a BMI adatokat figyelembe véve is végezzünk vizsgálatokat. A tervezett magas mintaszám miatt pedig fontos szempont lett, hogy gyorsabb és környezetkímélőbb módszert dolgozzunk ki a korábbi restrikciós fragment hossz technika helyett.

Végezetül a 428 relapszáló-remittáló vagy secunder progresszív kórformát mutató beteg mellett 831 kontrollt vontunk be a felmérésbe. A korábbi vizsgálatokban alkalmazott technika helyett pedig a DNS izolálás után (Miller-féle kisózás) Taqman próbás allél elkülönítéssel terveztük meg a vizsgálatot. A statisztikai elemzésnél Khi-négyzet tesztet alkalmaztunk a

genotípusok és az allélok eloszlásának összehasonlítására, a t-próbát pedig két csoport átlagainak összevetésére. A varianciaanalízist akkor alkalmaztuk, ha több mint két csoport átlagát kellett figyelembe venni, míg a kétirányú varianciaanalízist, ha több mint két csoportosítási kritérium volt. A megfigyelt genotípus-frekvenciák összhangban voltak a Hardy-Weinberg egyensúllyal mind az SM, mind a kontroll csoportban.

Nem találtunk szignifikáns eltérést az SM beteg és a kontroll csoport között sem a genotípus megoszlásban sem az allél frekvenciákban. Nem befolyásolta az rs333 (CCR5 Δ32) polimorfizmus az EDSS pontszámot, vagy a betegségkezdetet. A vad és a deléciós allél együttes vizsgálata a dohányzással, alkoholfogyasztással és a testtömeg-index-szel (BMI) kombinálva egyik kombinációban sem bizonyult szignifikánsnak a beteg csoportban az EDSS-re és a betegségkezdetre vonatkozóan. Eredményeink azt mutatják, hogy nincs összefüggés a CCR5 Δ32 allél és az SM hajlam között a csongrád megyei és az észak-bácskai populációban. Ez a tanulmány nem azonosított a CCR5 gén Δ32-delációja és az SM között összefüggést. A deléció nem jelent nagyobb kockázatot a betegség kialakulására, nem nevezhető biomarkernek, hiszen nem fordult elő nagyobb számban a beteg csoportban. Nincs protektív szerepe, hiszen nem jelent meg nagyobb számban a kontroll csoportban. Továbbá nincs prognosztikai faktor szerepe, hiszen nem befolyásolta sem az EDSS értéket sem a betegségkezdetet. Eredményeink nagyszámú beteg és a második legnagyobb kontroll mintaszámmal végzett vizsgálat adatai. A kapott eredményeinket megerősíti egy nemrégiben megjelent metaanalízis is, mely más vizsgálatok adatait összegezte és új statisztikai vizsgálattal a legtöbb beteg és kontroll minta adatait elemezte újra.

Az alkoholfogyasztási és dohányzási szokások valamint a testtömeg-index vizsgálata az SM esetében két esetben eredményezett szignifikáns eredményt. Az alkoholfogyasztás szignifikáns mértékben korábbi betegségkezdettel volt összefüggésbe hozható, míg a magas testtömeg-index protektív hatást mutatott a betegségkezdet tekintetében.

9. Summary

Genetic analysis of neurological disorders with different age characteristics

The present thesis summarizes the genetic analysis of selected single nucleotide polymorphisms (SNPs) in case of three neurological disorders: Parkinson's disease (PD), multiple sclerosis (MS) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS).

The first major step of the project was to create a biobank at the Department of Neurology in Szeged (Faculty of Medicine, University of Szeged). We had to ensure that all the materials are purchased and all the official licenses are provided which was necessary for collecting and storing human blood samples.

On of our goals was to investigate the chronic, progressive PD which affects mostly the elderly population. In our first study we enrolled 105 PD patients and 131 control subjects. Our aim was to carry out the tests on a large age-matched control and patient group. We also considered it to be important to draw attention to the relationship between PD and the kynurenine pathway which had not previously been genetically studied. The research outline was to investigate the relationship between the disease and the kynurenine system. PD is characterized by dopaminergic cell death in the area of the substantia nigra pars compacta and the presence of Lewy bodies. The kynurenine system itself is an enzymatic pathway which is responsible for the breakdown of the vast majority of tryptophan in the human brain while producing two end-products: nicotinamide adenine dinucleotide and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. The examined KMO gene is located at the 1q42 chromosome region and it is responsible for the synthesis of a neurotoxic product of the pathway. The pharmacological inhibition of this enzyme induces the synthesis of neuroprotective kynurenic acid. The polymorphisms of the KMO gene may also influence a metabolic shift to either neuroprotective or neurotoxic pathways. In our study, four KMO gene SNPs were investigated: rs2050518, rs6661244, rs2275163 and rs1053230. DNA extraction from white blood cells was performed using the Miller isolation, while genotyping was done by Taqman probe based polymerase chain reactions. To evaluate the data, a Chi-square test and a t-test were applied in the SPSS software. The observed genotype frequencies were consistent with the Hardy-Weinberg equilibrium in the PD and the control group.

Based on our results, none of the four analyzed KMO polymorphisms were related to the PD and neither did they influence the age of onset. Thus, the genetic relationship between the PD and the kynurenine system is still not supported. The studied SNPs are unlikely to have an effect on the function of the KMO gene, nor are they part of the regulatory protein

binding sites that are relevant to PD. In the future further polymorphism studies are planned with the involvement of other enzymes of the kynurenine system. This study was the first to investigate the genetic background behind the biochemical changes of the kynurenine pathway in PD. Our work aims to draw attention to this area which has not been studied in depth, although its relevance is unquestionable. A disturbance in the kynurenine enzymatic pathway could be related not only to PD but to numerous neurological pathologies like Alzheimer's disease or depression, therefore biological or pharmacological modifications of this enzyme pathway might be of therapeutic significance.

Amytrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a fatal, progressive, neurodegenerative disorder that affects nerve cells in the brain and spinal cord. Previous studies have shown that affected neurons show low expression of calcium binding proteins. The level of these can be raised with vitamin D supplementation. The active form of vitamin D is 1α-25-(OH)2D, which binds to its nuclear receptor (VDR) in the cell and is able to modulate the transcription of VDR target genes and it can influence mineral homeostasis. It is also important to note that vitamin D regulates serum calcium levels, which contribute to different immune functions. Vitamin D can reduce inflammatory processes, which play a major role in neurodegeneration. It is responsible for the biosynthesis of neurotrophic factors, influences the expression of the inducible nitrogen oxide synthase and increases the level of glutathione. Each of these factors play a role in the pathomechanism of ALS and other neurological diseases. A study ten years ago found that the level of 25-hydroxy vitamin D is lower in ALS patients. Recently another study investigated the effects of vitamin D supplementation of ALS patients. They described that already a minimal vitamin D supplementation was able to slightly slow down the disease progression on the ALSFRS-R score during the 9-month study period. It has recently been reported that chronic vitamin D treatment increases the mRNA level of VDR gene in rat brain neurons after glutamate-induced neurotoxicity. Therefore, our group aimed to study the polymorphisms of the VDR gene in ALS. The VDR gene is localized to the 12q13.11 chromosome region and encodes the nuclear hormone receptor of vitamin D3. The relationship between the VDR gene and some neurological disorders has been described in the literature, but only few articles have been published in the context of ALS. In our study we collected blood samples of 75 sporadic ALS patients (approximately 20% of the Hungarian ALS population) and 97 of age-sex matched healthy controls. The examined SNPs were as follows: rs1544410 (BsmI), rs7975232 (ApaI), rs731236 (TaqI), and rs2228570 (FokI). Since no previous data were available on the possible connection between the polymorphisms of the VDR gene and the disease, our goal was to provide new insight into the

role of vitamin D in ALS. The aim of our research was to study the potential effects of the alleles on the disease age of onset. After the collection of the blood samples we isolated genomic DNA using the Miller's salting method. For the identification of alleles, the restriction fragment length polymorphism (RFLP) technique was used. From the four investigated polymorphisms, three were intron variants and one was missense mutation. In the statistical part of the study, Chi-square test and t-test were used. For examining the relationship between the risk of the gene and the disease, the odds ratio and the 95% confidence interval were calculated. The obtained genotype frequencies were consistent in the control and patient group with the Hardy-Weinberg equilibrium.

A significant difference was found in the genotype distribution between the patient and the control group in case of ApaI SNP, meaning that the frequency (AA+AC) vs. CC of the genotypes containing A alleles was significantly higher in ALS patients than in the control group. Furthermore, the A allele was significantly associated with the ALS patient group. However, the two studied alleles did not affect the disease age of onset or the gender distribution in the ALS group.

This work is the first genetic evidence that the VDR gene can play a role in ALS. Kamel et al.-previously investigated the BsmI SNP of the VDR gene, but this was not related to the pathology or the pathogenic lead level. In our study we support this observation since we did not find any significant relationship between the BsmI SNP and the disease either. No significant difference was found in the case of the FokI or TaqI SNP in the ALS control group. We would like to repeat our investigations on an independent patient and control group sample in the future.

In contrast to PD, multiple sclerosis (MS) is an autoimmune neurological disorder of the central nervous system affecting mainly the young population. This disease is the most common neurological disorder of young adults and in half of the cases it causes disability due to irreversible tissue damage. The trigger of the disease is the inflammation of the white matter in the central nervous system, which results in damage to the neurons and the myelin surrounding them. The course of MS is variable, it has 5 forms and the etiology of the disease is only partially known. However the role of the genetic background is proven, for a long time only the main histocompatibility complex (MHC) was identified as a predisposing-locus. But the role of the MHC locus is not unique to this disorder, but also to all autoimmune diseases. Therefore, the identification of predisposing and protective loci that are specific to MS was in the focus of our research. Chemokines (chemoattractant cytokines) and chemokine receptors play a key role in inflammatory processes as they direct migration of immune cells, including

T-cells through the blood-brain barrier, which is presumably the first step to the development of the disease. Previously published data suggest an upregulation in the CCR5 chemokine receptor expression in inflammatory brain regions derived from human samples and there are similar results in the animal model of the disease, in experimental autoimmune encephalomyelitis. The most studied mutation of the CCR5 gene is in the 3p21.31 chromosomal region, it causes a Δ32 bp deletion, which shows contradictory results in the connection with MS. According to some studies, the allele is a risk factor, there are other studies which show its protective role, but other results claim that this allele does not have any effect in relation to MS. Some of the contradictory results can be explained by the insufficient–sample number, therefore one of the most important goal of our study was to reach large patient and control sample number. Our further aim was to carry out this investigation on a population that has not been included in a similar study before in connection to the disease. We planned to study the potential effect of the allele on the Expensive Disability Status Scale (EDSS) and on the age of onset. We considered it important to test the effect of lifestyle and environmental factors in parallel with carrying the allele, so alcohol consumption, smoking and BMI data were also registered. Finally, 428 patients with relapsing-remitting or secunder progressive disease and 831 healthy controls were included in the survey. Due to the high sample size, it was important to develop a fast and more environmental friendly method than the previous RFLP technique. Instead of the RFLP technique, after the DNA isolation (Miller's salting method) a Taqman probe allele discrimination method was utilized. In the statistical analysis, Chi-squared test was used to compare genotype and allele distribution, and t-test was used to compare the averages of two groups. The variance analysis was used when the average of more than two groups had to be taken into account, while the bidirectional variance analysis was utilized when more than two categorization criteria were analysed. The observed genotype frequencies were consistent with the Hardy-Weinberg equilibrium in both the MS and control groups.

There was no significant difference between the MS patient and the control group either in genotype distribution or in allele frequencies. The rs333 polymorphism did not affect the EDSS score or the age of onset of the disease. In the combined study none of the wild or the deletion allele in combination with smoking, alcohol consumption, and body mass index (BMI) proved to be significant in the patient group for the EDSS or the disease initiation. Our results show that there is no correlation between the CCR5 Δ32 allele and MS susceptibility in the Csongrád County and North Bácska populations. This study did not identify any relationship between the Δ32 deletion of the CCR5 gene and the MS. According to our results

deletion does not mean a greater risk of developing the disease, it cannot be called a biomarker, since it does not occur in a larger number in the patient group. It has no protective role, because it does not appear in a larger number in the control group. Furthermore, it is not a prognostic factor, as it does not affect either the EDSS value or the age of onset. We obtained our results on a large number of patient and the second largest number of control group. Our results were confirmed by a recent meta-analysis study which study re-summarized and re-analyzed data. In that study summarized data were collected and analyzed again from other studies to involve larger sample number.

The studies of the alcohol consumption, smoking habits and body mass index in case of MS have shown two significant results. The alcohol consumption has been shown to be a risk factor for earlier MS onset, while the high body mass index had a protective effect on the age at onset of the disease.

Publikációs lista

MTMT azonosító: 10028826

Kumulatív hatástényező (IF): 34,203

Összes hivatkozások száma: 67

Hirsch index: 5

Tézis tárgyához kapcsolódó publikációk:

I. **Török N**, Török R, Klivényi P, Engelhardt J, Vécsei L.
Investigation of vitamin D receptor polymorphisms in amyotrophic lateral sclerosis.
Acta Neurol Scand. 133(4):302-8 (2016)
IF: 3,087

II. **Török N**, Török R, Szolnoki Z, Somogyvári F, Klivényi P, Vécsei L.
The Genetic Link between Parkinson's Disease and the Kynurenine Pathway Is Still Missing.
Parkinsons Dis. 2015:474135 (2015)
IF: 1,722

III. **Török N**, Molnár K, Füvesi J, Karácsony M, Zsiros V, Fejes-Szabó A, Fiatal S, Ádány R, Somogyvári F, Stojiljković O, Vécsei L, Bencsik K.
Chemokine receptor V Δ32 deletion in multiple sclerosis patients in Csongrád County in Hungary and the North-Bácska region in Serbia.
Hum Immunol. 76(1):59-64 (2015)
IF: 2,127

A tézis tárgyához közvetlenül nem kapcsolódó publikációk:

I. Török R, Zádori D, **Török N**, Csility É, Vécsei L, Klivényi P.
An assessment of the frequency of mutations in the GBA and VPS35 genes in Hungarian patients with sporadic Parkinson's disease.
Neurosci Lett. 610:135-8 (2016)
IF: 2,18

II. Török R, **Török N**, Szalardy L, Plangar I, Szolnoki Z, Somogyvari F, Vecsei L, Klivenyi P.
Association of vitamin D receptor gene polymorphisms and Parkinson's disease in Hungarians.
Neurosci Lett. 551:70-4 (2013)
IF: 2,055

III. Horváth A, Sántha P, Horváth V, **Török N**, Nagy I, Jancsó G, Vágvölgyi C, Somogyvári F.
Rapid genotyping of genetically modified laboratory animals from whole blood samples without DNA preparation.
Acta Biol Hung. 64(2):262-5 (2013)
IF: 0,504

IV. Tripolszki K, Csányi B, Nagy D, Ratti A, Tiloca C, Silani V, Kereszty É, **Török N**, Vécsei L, Engelhardt JI, Klivényi P, Nagy N, Széll M.
Genetic analysis of the SOD1 and C9ORF72 genes in Hungarian patients with amyotrophic lateral sclerosis.
Neurobiol Aging. 53:195.e1-195.e5 (2017)
IF:4,454

V. Tripolszki K, Török D, Goudenège D, Farkas K, Sulák A, **Török N**, Engelhardt JI, Klivényi P, Procaccio V, Nagy N, Széll M
High-throughput sequencing revealed a novel SETX mutation in a Hungarian patient with amyotrophic lateral sclerosis.
Brain Behav. 15;7(4):e00669 (2017)
IF:2,219

VI. Márki S, Göblös A, Szlávicz E, **Török N**, Balicza P, Bereznai B, Takáts A, Engelhardt J, Klivényi P, Vécsei L, Molnár MJ, Nagy N, Széll M.
The rs13388259 Intergenic Polymorphism in the Genomic Context of the BCYRN1 Gene Is Associated with Parkinson's Disease in the Hungarian Population
Parkinsons Dis. 9351598 (2018)
IF:2,117

Review publikációk:

I. **Török N**, Majláth Z, Fülöp F, Toldi J, Vécsei L.
Brain Aging and Disorders of the Central Nervous System: Kynurenines and Drug Metabolism.
Curr Drug Metab. 17(5):412-29 (2016)
IF: 2,659

II. **Török N,** Majláth Z, Szalárdy L, Vécsei L.
Investigational α-synuclein aggregation inhibitors: hope for Parkinson's disease.
Expert Opin Investig Drugs. (11):1281-1294 (2016)
IF: 4.03

III. Majláth Z, **Török N**, Toldi J, Vécsei L.
Promising therapeutic agents for the treatment of Parkinson's disease.
Expert Opin Biol Ther. 16(6):787-99 (2016)
IF: 3,684

IV. Majláth Z, **Török N**, Toldi J, Vécsei L.
Memantine and Kynurenic Acid: Current Neuropharmacological Aspects.
Curr Neuropharmacol. 14(2):200-9 (2016)
IF: 3,365

10. Függelék

EDSS skála (Expanded Disability Status Scale) ismertetése:

Az EDSS-skála egy olyan teszt, amelyet a sclerosis multiplex miatt kialakult rokkantság mértékének a számszerűsítésére dolgoztak ki. A skálát 1983-ban hozta létre az amerikai neurológus, John Francis Kurtzke, ezért gyakran említik Kurtzke-féle skálaként is. A kutatás területén gyakran alkalmazzák a tesztet, hiszen a segítségével könnyen csoportosíthatók a különböző stádiumban lévő betegeket, illetve monitorozhatóvá válik az eltérő kezelések hatása. A skála elsődlegesen a járóképesség megítélésére hivatott. A teszt ezen kívül még nyolc különböző funkcionális rendszer állapotát vizsgálja (piramisrendszer; kisagy; agytörzs; szenzoros területek; bél és a húgyhólyag ill. szexuális funkciók; látórendszer; nagyagy; egyéb), amelyek SM-ben a leggyakrabban érintettek, azonban ezek vizsgálatára léteznek pontosabb tesztek is.

EDSS skála pontozása	
0	semmilyen neurológiai eltérés nem mutatható ki
1.0	funkciózavar nincs, de 1 funkcionális rendszer minimálisan érintett (pl. enyhe látási zavar, nyelési nehézség)
1.5	funkciózavar nincs, de 1-nél több funkcionális rendszer minimálisan érintett
2.0	minimális fogyatékosság 1 funkcionális rendszerben (pl. mérsékelt bénulás, koordinációs zavar)
2.5	1 enyhe vagy 2 minimális funkciózavar
3.0	közepes fogyatékosság 1 (pl. bénulás, koordinációs zavar, kifejezett látási probléma) vagy enyhe fogyatékosság 3-4 funkcionális rendszerben teljes járóképesség mellett
3.5	teljes járóképesség közepes fogyatékossággal 1 és enyhe fogyatékossággal 1-2 funkcionális rendszerben; vagy közepes fogyatékosság 2 funkcionális rendszerben; vagy enyhe fogyatékosság 5 funkcionális rendszerben
4.0	segédeszköz nélküli teljes járóképesség, hétköznapi aktivitás napi 12 órában a relatíve komoly fogyatékosság mellett, 500 méter megtétele segédeszköz nélkül
4.5	segédeszköz nélküli teljes járóképesség, aktivitás a nap nagy részében, komoly korlátok vagy minimális segítség szükségessége bizonyos tevékenységek végzésében, 300 méter megtétele segédeszköz nélkül
5.0	200 méter megtétele segédeszköz nélkül, hétköznapi tevékenységben már akadályozó mértékű fogyatékosság

5.5	100 méter megtétele segédeszköz nélkül, a fogyatékosság a hétköznapi tevékenységek önálló végzését megakadályozza
6.0	időszakosan vagy egyoldalúan folyamatos segédeszköz (pl. mankó) szükséges 100 méter megtételéhez pihenéssel vagy anélkül
6.5	folyamatos kétoldalú segédeszköz (pl. dupla mankó) szükséges 20 méter megtételéhez pihenés nélküli
7.0	5 méternél nagyobb távolság megtételére még segédeszközzel is képtelen, kerekesszékhez kötött, önálló kerekesszék-hajtás és utazás, aktív tevékenység kerekesszékben napi 12 órán át
7.5	néhány lépésnél több megtételére képtelen, kerekesszékhez kötött, a székbe üléshez esetleg segítségre van szüksége, önálló kerekesszék-hajtás, de a teljes napi tevékenység során motoros székre lehet szükség
8.0	ágyhoz, székhez vagy kerekesszékhez kötött, de a nap részében ágyon kívül van, öngondoskodásra képes, a kéz hatékony használata
8.5	a nap nagy részében ágyhoz kötött, a kéz némileg hatékony használata, részleges öngondoskodási képesség
9.0	magatehetetlen ágyhoz kötöttség a kommunikációs és étkezési képesség megtartása mellett
9.5	magatehetetlenség, hatékony kommunikációra vagy evésre/nyelésre való képtelenség
10	SM miatt fellépő halál

El Escorial kritériumok:

A World Federation of Neurology El Escorial-ban elfogadott diagnosztikus kritériumai szerint az ALS igazolására jelen kell lennie az alábbiaknak: centrális motoneuron-szindróma; perifériás motoneuron-szindróma és progresszió. Az ALS klinikai diagnózisa igazolt, ha centrális és perifériás motoneuron-szindróma legkevesebb három testtájon (testtájak: fej, nyak és felső végtag, törzs, ágyék és alsó végtagok) észlelhető. Amennyiben háromnál kevesebb testtáj érintett, valószínű (két testtáj) vagy lehetséges (egy testtáj) ALS állapítható meg, amit a laboratóriumi leletek is támogathatnak, illetve a tünetek egyik esetben sem magyarázhatók más okokkal.

I. Publikáció

II. Publikáció

III. Publikáció